

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/04/2021.

BRUNA FONSECA MAZZEU

Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade

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

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan
Coorientadora: Profa. Dra. Lidiane Gaspareto Felipe

**Araraquara
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Mazzeu, Bruna Fonseca
M477a Avanços no processo de purificação da friedelina sintase
e estudos de sua atividade e especificidade / Bruna Fonseca
Mazzeu. – Araraquara : [s.n.], 2019
107 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan
Coorientador: Lidiane Gaspareto Felipe

1. Espinheira Santa. 2. Mutagenese. 3. Saccharomyces
cerevisiae. 4. Terpenos. 5. Reconhecimento molecular.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade"

AUTORA: BRUNA FONSECA MAZZEU

ORIENTADORA: MAYSA FURLAN

COORDINADORA: LIDIANE GASPARETO FELIPPE

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

Lidiane Gaspareto Felipe
Prof.^a. Dr.^a. LIDIANE GASPARETO FELIPPE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Cintia Duarte de Freitas Milagre
Prof.^a. Dr.^a. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Isabele R. Nascimento
Prof.^a. Dr.^a. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Taícia Pacheco Fill
Prof.^a. Dr.^a. TAÍCIA PACHÊCO FILL
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Andre Luiz Meleiro Porto
Prof. Dr. ANDRE LUIZ MELEIRO PORTO
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 18 de outubro de 2019

INFORMAÇÕES CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Nome: Bruna Fonseca Mazzeu
Filiação: Benedito Antonio Mazzeu e Roseli Aparecida Fonseca Mazzeu
Nascimento: 08/08/1987 - Araraquara/SP - Brasil
Estado Civil: Solteira
Endereço residencial: Avenida Laudomiro Scotton, 52
Jardim Califórnia – Araraquara, 14801-024, SP - Brasil
Telefone: (16) 3332-1883
Endereço profissional Instituto de Química de Araraquara – UNESP
Departamento de Química Orgânica
Rua Prof. Francisco Degni, 55
Quitandinha – Araraquara, 14800-970, SP - Brasil
Telefone: (16) 3301-9510
e-mail: bruna.mazzeu@gmail.com

2. Formação Profissional

2.1. Graduação

Curso: Licenciatura em Química
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Período: março de 2007 a dezembro de 2011.

2.2. Iniciação Científica

Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Modalidade: Produtos Naturais
Projeto: “Estudo químico e biológico de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”
Orientadora: Maysa Furlan
Período: janeiro de 2010 a dezembro de 2011

2.3. Pós-Graduação

2.3.1. Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Modalidade: Produtos Naturais
Projeto: “Estudo de aspectos estruturais e biossintéticos em *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)”
Orientadora: Maysa Furlan
Período: março de 2012 a maio de 2014

2.3.2. Doutorado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP
Modalidade: Produtos Naturais
Projeto: “Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade”
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maysa Furlan
Co orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lidianne Gaspareto Felipe
Período: março de 2015 a outubro de 2019

3. Trabalhos publicados.

MAZZEU, B. F.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; OLIVEIRA, A. A.; REMLINGER, M.; FELIPPE, L. G.; VALENTINI, S. R.; GUIDO, R. V. C. ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. The methionine 549 and leucine 552 residues of friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia* are important for the substrate binding specificity, **Scientific Reports**. (SUBMETIDO)

MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; COTINGUIBA, F.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Kavalactones and benzoic acid derivatives from leaves of *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1286-1290, 2018.

FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F.; PRATI, A. U. C.; SOUZA JÚNIOR, A. A.; MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; PINTO, R. A.; GOLIM, M. A.; ARRUDA, M. S. P.; FURLAN, M.; VENTURINI, J. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PLoS One**, v. 13, n. 6, 2018.

JARDIM, A.; SANTOS, V. A.; FELIPPE, L. G.; MAZZEU, B. F.; IGLOI, Z; AMAKO, Y; FURLAN, M.; HARRIS, M.; RAHAL, P. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Journal: Antiviral Research**, v. 115, p. 39-47, 2014.

Dedicatória

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me deu forças para vencer todas as dificuldades. À minha família por estar presente neste momento tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por estar sempre me guiando.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Maysa Furlan, pelo seu incansável e permanente encorajamento, pela disponibilidade dispensada em todas as situações, por todo o incentivo e principalmente a confiança depositada em mim; os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo.

A minha coorientadora, grande amiga e incentivadora Lidiane Gaspareto Felipe, pela dedicação, disponibilidade, pela ajuda sempre tão importante e principalmente pela amizade.

A meu pai, Mazzeu, meu irmão Murilo e a meu namorado Ederson, a toda minha família e amigos pelo apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Química, por todas as conquistas e realizações, desde a graduação.

Ao professor Cleslei Zanelli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Unesp) por disponibilizar o laboratório de biologia molecular e possibilitar a realização deste trabalho.

À Dra Tatiana Maria de Souza Moreira, por todo ensinamento prático de biologia molecular.

A todo pessoal do laboratório de biologia molecular: Angélica, Suélen, Fernanda, Ana, Marco, Bianca, Maria Olivia, Anderson.

Aos amigos do grupo de Biossíntese de Produtos Naturais: Aline, João Bronzel, João Paulo, Karina, Keylla, Naira, Vania, Wellington e Weslei pelas discussões, conversas, risadas e acima de tudo, pela amizade.

Ao professor Dr Richard Garratt e à Dra Tatiana Watanabe, do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física da USP de São Carlos, pela oportunidade e aprendizado.

Ao professor Dr Rafael Guido e ao Dr Andrew Oliveira do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos, Instituto de Física de São Carlos, USP de São Carlos, pelas análises de modelagem molecular.

Aos amigos e professores do Departamento de Química Orgânica e do NuBBE, pela amizade, pelo convívio e pela ajuda.

À Juliana e João pela obtenção dos cromatogramas e por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários e funcionárias do Departamento de Química Orgânica, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários e funcionárias da Seção de Pós-Graduação e da biblioteca pela atenção e dedicação

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A engenharia metabólica tem ajudado a melhorar ou redirecionar as vias metabólicas, fazendo modificações genéticas, como, a deleção ou superexpressão de genes e desta forma alterando a atividade de reações enzimáticas específicas. Friedelina é um triterpeno pentacíclico encontrado nas folhas das espécies de Celastraceae, que demonstrou inúmeras atividades biológicas e é precursor dos triterpenos quinonemetideos, promissor antitumoral. É biossintetizada a partir da ciclização do 2,3-oxidosqualeno e envolve o número máximo de rearranjos para a formação de uma cetona por desprotonação do intermediário hidroxilado sem o auxílio de uma enzima oxidoredutase. O estudo das enzimas responsáveis pela produção de metabólitos secundários é importante na busca de novas alternativas sustentáveis para a produção dos mesmos. Nessas condições, friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* foi clonada e expressa em *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, levando a sua obtenção em um sistema heterólogo. A obtenção da fração enriquecida com friedelina sintase, foi realizada em duas etapas cromatográficas: cromatografia por afinidade, utilizando uma coluna com resina Ni-NTA (ácido nitrilotriacético) e cromatografia de troca iônica com resina de troca aniônica. A presença e pureza de *MiFRS* foi avaliada por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelado com Coomassie e comparado com o perfil em *Western Blot*. As etapas de purificação removeram uma grande parte das proteínas contaminantes. Os estudos de mutação sitio dirigida *in vivo* foram realizados com quatro mutações: a troca de um resíduo de cisteína, na posição 369 por um resíduo de prolina (C369P), a troca de uma fenilalanina, na posição 473 por um triptofano (F473W), a troca de um resíduo de metionina, na posição 549 por um resíduo de serina (M549S) e a troca de uma leucina por uma fenilalanina, na posição 552 (L552F). As mutações C369P e F473W levaram a perda de função, além de não produzir qualquer outro triterpeno. Os mutantes M549S e L552F conservaram a atividade da enzima, produzindo friedelina e foram capazes de produzir α -amirina e β -amirina.

Palavras-chave: Friedelina sintase, sistema heterólogo, modelagem molecular, mutação sitio dirigida.

ABSTRACT

Metabolic engineering has helped to improve or redirect metabolic pathways, making genetic modifications such as deletion or overexpression of genes and thus altering the activity of specific enzyme reactions. Friedelin is a pentacyclic triterpene found in the leaves of Celastraceae species, which has demonstrated numerous biological activities and is a precursor of quinonemethide, promising antitumoral. It is biosynthesized from 2,3-oxidosqualene cyclization and involves the maximum number of rearrangements for ketone formation by deprotonation of the hydroxylated intermediate without the aid of an oxidoreductase enzyme. The study of the enzymes responsible for the production of secondary metabolites is important in the search for new sustainable alternatives for their production. Under these conditions, friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia* was cloned and expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, leading to its obtention in a heterologous system. Enriched fraction with friedelin synthase was obtained in two chromatographic steps: affinity chromatography using a column with Ni–NTA resin (nitrilotriacetic acid) and ion exchange chromatography with anion exchange resin. The presence and purity of *MiFRS* was evaluated by polyacrylamide denaturing gel electrophoresis (SDS-PAGE) developed with Coomassie and compared to the Western Blot profile. The purification steps removed a large portion of the contaminating proteins. Site-directed mutation studies were performed with four mutations: exchanging a cysteine residue at position 369 for a proline residue (C369P), exchanging a phenylalanine residue at position 473 for a tryptophan residue (F473W), exchanging a methionine residue at position 549 for a serine residue (M549S) and exchanging a leucine residue for a phenylalanine residue at position 552 (L552F). Mutations C369P and F473W led to loss of function and produced no other triterpene. Mutants M549S and L552F retained enzyme activity, producing friedelin and were capable of producing α -amyrin and β -amyrin.

Keywords: Friedelin synthase, heterologous system, molecular modeling, site directed mutation.

Lista de figuras

Figura 1: Estruturas químicas de algumas substâncias produzidas por engenharia metabólica.	23
Figura 2: Vias biossintéticas que levam a produção dos esqueletos terpênicos.	25
Figura 3: Cátions intermediários e produtos da ciclização de 2,3-oxidosqualeno por oxidosqualeno ciclases.	29
Figura 4: Vias biossintéticas dos diferentes esqueletos triterpênicos (HAN, et al., 2019).	30
Figura 5: Via biossintética que leva a produção dos triterpenos quinonametídeos pela oxidação da friedelina.	33
Figura 6: Mapa do plasmídeo pET28a(+)-6xHis-MiFRS.	38
Figura 7: Interação entre a cauda de histidina da enzima e o Ni^{2+} da resina Ni-NTA.	41
Figura 8: Esquema da purificação de MiFRS por cromatografia de afinidade.	42
Figura 9: Modelo <i>in silico</i> da enzima friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i> (MiFRS). A representação da estrutura secundária mostra os domínios α/α conhecidos como proteína $\beta\gamma$. A hélice α_9 se aproxima da bicamada lipídica que origina o substrato. Por outro lado, o domínio γ processa e libera o produto friedelina. Horizontalmente ao N-terminal está organizado o sítio ativo, criado na interface entre os domínios γ e β . Especificamente, alças flexíveis e três pinos β dão movimento e polaridade para a produção do substrato.	54
Figura 10: Alinhamento entre as sequências primárias das oxidosqualeno ciclases. Em destaque o motivo conservado DCTAE.	55
Figura 11: Curva analítica da substância padrão, friedelina, obtida com as seguintes concentrações: 5,0; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g/mL}$	56
Figura 12: SDS-PAGE (10% poliacrilamida). Ensaios de expressão a 37° C para o vetor pET28a(+)-6xHis-MiFRS, variando o tempo de indução: 1; 3; 6 e 24 h; e a concentração de IPTG: 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mM. Os retângulos destacam as bandas de expressão.	58
Figura 13: SDS-PAGE (10% poliacrilamida). Ensaios de expressão a 37° C e 18 °C para o vetor pET28a(+)-6xHis-MiFRS, com 6 h de indução e a 0,25 mM de IPTG. Os retângulos destacam as bandas de expressão.	59
Figura 14: SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação por cromatografia de afinidade. Lav ₁₋₂ são as lavagens feitas com 50 mM de imidazol e E ₁₋₄ são as eluições feitas com 500 mM de imidazol. Os retângulos destacam as bandas referentes a MiFRS.	60
Figura 15: Comparação entre eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>Western blotting</i> . (a) SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação de MiFRS (F _{MiFRS}) por cromatografia de afinidade. (b) Perfil em <i>Western blotting</i> da purificação de MiFRS por cromatografia de afinidade.	61
Figura 16: (a) SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da purificação por cromatografia de troca iônica. L ₁₋₂ são as lavagens feitas com 50 mM de KCl, E ₁ a eluição feita com KCl 1 M e E ₁ conc é a eluição após ser concentrada. As bandas referentes a MiFRS estão destacadas com flechas. (b) Perfil em <i>Western blotting</i> da purificação de MiFRS por cromatografia por troca iônica.	63
Figura 17: Cascata de reações envolvida na produção de friedelina e outros triterpenos (HAN, et al., 2019).	64

Figura 18 - Alinhamento global múltiplo entre a sequência selvagem de <i>MiFRS</i> e as sequências mutadas obtidas.	65
Figura 19 - Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Comparação entre os resíduos na posição 369. A identificação e número de acesso estão apresentados na Tabela 1 do Anexo I.	67
Figura 20 : Estruturas químicas dos aminoácidos cisteína e prolina.	67
Figura 21 : Interação entre os resíduos F473 e W612.	68
Figura 22 : Estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina e triptofano.	69
Figura 23 : Alinhamento secundário da proteína nativa (<i>MiFRS</i>) (carbonos em cinza) com o mutante F473W (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Interação favorável entre o resíduo F473 da enzima nativa e substrato. (b) Impedimento estérico do resíduo W473 no sítio ativo de <i>MiFRS</i> mutante. (c) Interação entre os resíduos W417 e W473, favorecendo o impedimento estérico. (d) Interação entre os resíduos W417 e F473.	71
Figura 24 : Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Comparação entre os resíduos na posição M549S.	72
Figura 25 : Estruturas químicas dos aminoácidos metionina e serina.	72
Figura 26 : Alinhamento secundário (ou representação lado a lado) da proteína nativa (<i>MiFRS</i>) (carbonos em cinza) com o mutante M549S (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Interação dos resíduos Y259 e L482. (b) estabilização dos resíduos aromáticos Y264 e W219; interação ânion- π entre a hidroxila do resíduo S549 e o resíduo F551. (c) A estrutura nativa mostra um ângulo desfavorável de 98 ° a partir da interação do M549 com o F551. (d) Sanduíche entre os resíduos Y264 e W219 e o ânion no resíduo mutado S549 próximo ao anel C. Estabilização do complexo S549/F551/W219/Y264.	73
Figura 27 : Alinhamento entre oxidoesqualeno ciclases e friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Comparação entre os resíduos na posição L552F.	74
Figura 28 : Estruturas químicas dos aminoácidos leucina e fenilalanina.	75
Figura 29 : Alinhamento secundário da proteína nativa (<i>MiFRS</i>) (carbonos em cinza) com o mutante L552F (carbonos em verde). A superfície destaca o volume adotado pela molécula de friedelina na cavidade catalítica. A seta vermelha indica o resíduo mutado. (a) Sanduíche entre os resíduos de fenilalanina nas posições 551/552/728 (b) A mutação aproximou o resíduo F728 do sítio catalítico, com uma interação do tipo elétron π que estabiliza o anel C, diminuindo a especificidade da enzima. (c) A estrutura nativa mostra a interação dos resíduos L552 e F728. (d) Outra possibilidade de rotâmero é prejudicada devido ao colapso de outros resíduos da cadeia principal ou lateral.	76
Figura 30 : Cromatograma das substâncias usadas como padrão: (a) friedelina, (b) β -amirina e α - amirina. Cromatograma das frações hexânicas de <i>MiFRS</i> (c), C369P (d), F473W (e), L552F (f) e M549S (g).	76
Figura 31 : Cromatograma da friedelina purificada por CC (t_r =21,100 minutos).	80
Figura 32 : Curva analítica da substância padrão, friedelina, obtida com as seguintes concentrações: 15,62; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0, 500,0 e 1000,0 $\mu\text{g/mL}$	81

Figura 33: Teores de friedelina, β -amirina e α - amirina produzidas nos mutantes de MiFRS.....83

Figura 34: Concentração de friedelina em frações extraídas de *Saccharomyces cerevisiae*, expressando mutantes *MiFRS*. A concentração de friedelina é expressa em mg/L de meio de cultura.84

Lista de tabelas

Tabela 1: Estruturas químicas e atividades biológicas de alguns terpenos.	26
Tabela 2: Massa seca das células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressando friedelina sintase selvagem (pYES-MiFRS) e expressando com uma sequência de seis histidinas, na região N-terminal (pYES-6xHis-MiFRS) e C-terminal (pYES-MiFRS-6xHis).....	36
Tabela 3 - Lista com os <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> para cada reação de mutação sítio-dirigida.	45
Tabela 4 - Lista com os <i>primers forward</i> usados no sequenciamento para cada reação de mutação sítio-dirigida.....	47
Tabela 5: Massa seca das células e extratos da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressando friedelina sintase selvagem (<i>MiFRS</i>) e expressando as sequências dos mutantes. Análise feita em triplicata.	51
Tabela 6: Concentração de friedelina presente nos extratos brutos da levedura <i>S. cerevisiae</i>	57
Tabela 7 - Resíduos de aminoácidos do sítio ativo da friedelina sintase selecionados para mutagenese sítio dirigida.....	65
Tabela 8: Concentração de friedelina presente nas frações extraídas dos mutantes da levedura <i>S. cerevisiae</i>	78
Tabela 9: Dados referentes às concentrações da substância padrão friedelina e do padrão interno colesterol usados na construção da curva analítica.	81
Tabela 10: Concentração de friedelina presente nas frações extraídas da levedura <i>S. cerevisiae</i> , expressando os mutantes de <i>MiFRS</i>	82

Lista de fluxogramas

Fluxograma 1: Procedimento geral de extração da friedelina do sistema heterólogo (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	36
Fluxograma 2: Procedimento geral para extração dos triterpenos produzidos heterologamente nas linhagens modificadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
Fluxograma 3: Procedimento experimental para purificação de friedelina.	52

Lista de cromatogramas

Cromatograma 1: Cromatograma da fração hexânica do vetor vazio expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	93
Cromatograma 2: Cromatograma da fração clorofórmica do vetor vazio expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	93
Cromatograma 3: Cromatograma da fração hexânica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	93
Cromatograma 4: Comparação entre os cromatograma da fração hexânica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa).	93
Cromatograma 5: Cromatograma da fração clorofórmica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	94
Cromatograma 6: Comparação entre os cromatograma da fração clorofórmica do gene selvagem expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa).	95
Cromatograma 7: Cromatograma da fração hexânica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	95
Cromatograma 8: Comparação entre os cromatograma da fração hexânica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) e os padrões friedelina e colesterol (rosa) (Ampliação).	96
Cromatograma 9: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	96
Cromatograma 10: Comparação entre os cromatograma da fração clorofórmica do mutante C369P expresso em <i>S. cerevisiae</i> (rosa) e os padrões friedelina e colesterol (preto).	97
Cromatograma 11: Cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	97
Cromatograma 12: Cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> (Ampliação).	98
Cromatograma 13: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> (rosa) com o padrão friedelina (preto) (Ampliação).	98
Cromatograma 14: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	99
Cromatograma 15: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante F473W expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com os padrões friedelina e colesterol (rosa).	99
Cromatograma 16: Cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	100
Cromatograma 17: Cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> (Ampliação).	100
Cromatograma 18: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).	101
Cromatograma 19: Cromatograma da fração clorofórmica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> .	101

Cromatograma 20: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante M549S expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão friedelina (rosa) (Ampliação).	102
Cromatograma 21: Cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i>	102
Cromatograma 22: Cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (Ampliação).	103
Cromatograma 23: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).	103
Cromatograma 24: Comparação entre o cromatograma da fração hexânica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão friedelina (rosa) (Ampliação).	104
Cromatograma 25: Comparação entre o cromatograma da fração clorofórmica do mutante L552F expresso em <i>S. cerevisiae</i> (preto) com o padrão α -amirina e β -amirina (rosa) (Ampliação).	104

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

2YT	-	meio de cultura a base de triptona, extrato de levedura e NaCl
6xHis	-	sequência de 6 histidinas
CC	-	cromatografia em coluna
CG-EM	-	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DMAPP	-	difosfato de dimetilalila
D.O.	-	densidade optica
DTT	-	1,4-ditiotreitol
EDTA	-	ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
Hex	-	hexano
His-tag	-	cauda de histidina
IPP	-	difosfato de isopentenila
IPTG	-	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo
LB	-	meio de cultura Luria-Bertani
MiFRS	-	friedelina sintase de <i>Maytenus ilicifolia</i>
m/z	-	relação massa-carga
Ni-NTA	-	matriz de íons níquel ligados a agarose
OSCs	-	oxidoesqualeno ciclases
p.	-	página
PBS	-	tampão fosfato salino
PBS-T	-	tampão fosfato salino com Tween [®] 20 0,5%
PCR	-	reação em cadeia da polimerase
PEG	-	polietilenoglicol
PLAC	-	inibidor de protease
rpm	-	rotações por minuto
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	-	eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
SC-URA	-	meio de cultura a base de extrato de levedura, vitaminas e bases nitrogenadas exceto uracila
TE	-	tampão tris/HCl com EDTA
UV	-	ultravioleta

- VC - volumes de coluna
- YNB - base nitrogenada de levedura sem adição de aminoácidos

SUMÁRIO

1.1. Engenharia metabólica aplicada a produtos naturais	21
1.2. Terpenóides	25
1.3. Biossíntese da friedelina	27
1.4. Mutações em enzimas oxidoesqualeno ciclasas	31
2. OBJETIVOS	33
3. PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1. Análise quantitativa da friedelina em levedura	34
3.1.1. Extração de friedelina biossintetizada no sistema heterólogo (<i>S. cerevisiae</i>)	35
3.1.2. Curva analítica	37
3.1.3. Análise dos produtos gerados	37
3.2. Produção de friedelina sintase	38
3.2.1. Teste de indução	38
3.2.2. Crescimento das células	39
3.2.3. Lise das células	40
3.3. Purificação da proteína	40
3.3.1. Cromatografia por afinidade	40
3.3.2. Diálise	42
3.3.3. Cromatografia por troca iônica	42
3.3.4. Determinação de pureza e confirmação da obtenção de <i>MiFRS</i>	43
3.4. Estudo mutagênico de <i>MiFRS</i>	44
3.4.1. Reações de mutagênese sítio-dirigida	44
3.4.2. Transformação dos mutantes em levedura	47
3.4.3. Expressão heteróloga dos mutantes de <i>MiFRS</i> em <i>S. cerevisiae</i>	48
3.4.4. Extração das substâncias biossintetizadas no sistema heterólogo (<i>S. cerevisiae</i>)	49
3.4.5. Curva analítica	51
3.4.5.1. Purificação da friedelina	52
3.4.6. Análise dos produtos gerados	52
3.4.7. Estudos de modelagem molecular	53

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. Friedelina sintase.....	54
4.2. Análise quantitativa da friedelina em levedura	55
4.3. Produção de friedelina sintase	57
4.3.1. Teste de indução.	57
4.4. Purificação parcial da friedelina sintase	59
4.4.1. Cromatografia por afinidade.....	59
4.4.2. Determinação da pureza e confirmação da obtenção de <i>MiFRS</i>	60
4.4.3. Cromatografia por troca iônica.....	62
4.5. Estudo mutagênico de <i>MiFRS</i>	63
4.5.1. Obtenção dos mutantes do sítio ativo de <i>MiFRS</i>	65
4.5.1.1. Confirmação das mutações realizadas	65
4.5.2. Análise dos produtos triterpênicos produzidos pelos mutantes de <i>MiFRS</i>	66
4.5.2.1. Mutante C369P	66
4.5.2.2. Mutante F473W	68
4.5.2.3. Mutante M549S.....	71
4.5.2.4. Mutante L552F.....	74
4.5.3. Quantificação da friedelina nos mutantes	80
5. CONCLUSÃO	84
6. Referências	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Engenharia metabólica aplicada a produtos naturais

A engenharia metabólica surgiu no final da década de 1980, quando cientistas introduziram o gene da diidroquercetina 4-redutase do milho em petúnia (*Petunia hybrida*). Essa nova alternativa de manipulação genética levou a uma mudança na coloração das flores devido ao aumento da produção da antocianina pelargonidina (Figura 1, p. 23) nas plantas transgênicas (MEYER, et al., 1987). A partir de então, uma grande variedade de petúnia com diferentes cores, padrões e formas foram produzidas, por expressão ou silenciamento de genes críticos que levavam à produção das plantas modificadas (NAKATSUKA, et al., 2007; SHIMADA, et al., 2001; TSUDA, et al., 2004).

Em suas primeiras aparições, a engenharia metabólica era vista apenas como uma maneira de melhorar as propriedades das células por modificações genéticas no seu metabolismo. No entanto, isso exigia uma compreensão do funcionamento metabólico. Desta forma, as análises metabólicas e fisiológicas da célula desempenharam um importante papel no início dos estudos de engenharia metabólica. Com o passar dos anos, a engenharia metabólica evoluiu e passou a abranger muito mais do que esses conceitos tradicionais (NIELSEN e LEE, 2018). Atualmente a engenharia metabólica permite melhorar ou redirecionar as vias metabólicas, por modificações genéticas, incluindo, a deleção ou superexpressão de genes o que altera a atividade de reações enzimáticas específicas (SOUZA-MOREIRA et al., 2016; IKRAM E SIMONSEN, 2017; IBDAH, et al., 2018; KAYANI, et al., 2018, ABDALLAH, et al., 2019, ZHANG, et al., 2019).

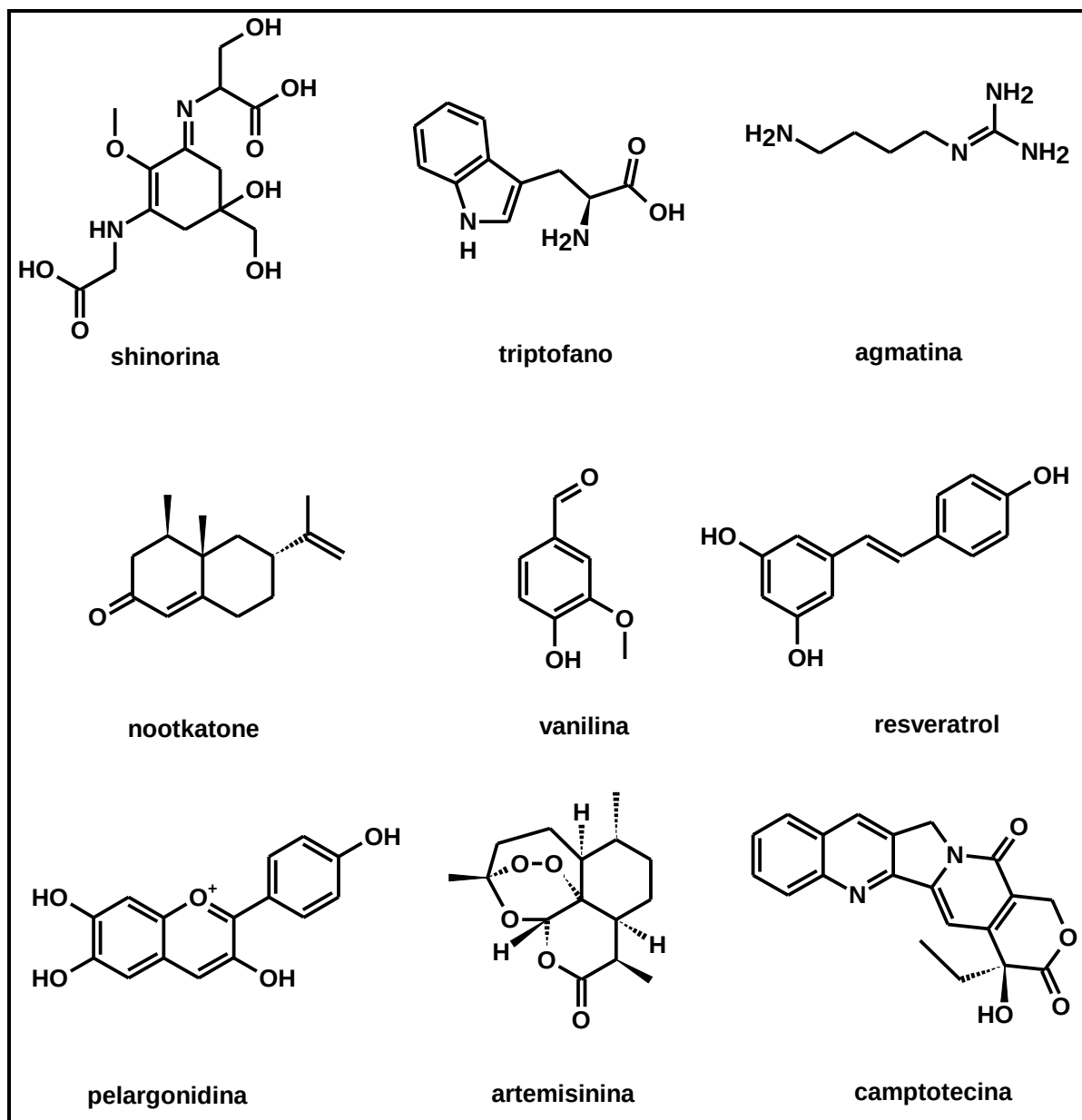
Plantas, fungos e microorganismos possuem uma maquinaria biossintética capaz de produzir uma variedade de metabólitos secundários, cuja função na natureza é atuar na defesa contra predadores ou competidores, além de outros significados ecológicos. Por isso, essas substâncias apresentam baixo acúmulo nas espécies e sua produção em larga escala é limitada. Desta forma, a prática do extrativismo vegetal torna-se desvantajosa devido à necessidade de grande quantidade da planta para obtenção razoável do produto. Nessas condições, estudos das vias metabólicas e das enzimas responsáveis pela produção de metabólitos secundários em uma fonte natural são de extrema importância na busca de novas alternativas sustentáveis para a produção dos mesmos. Uma vez que conhecida a via metabólica e as enzimas envolvidas na produção de substâncias de interesse é

possível propor modificações genéticas, com o intuito de aumentar o rendimento de importantes metabólitos (NABAVI, et al., 2018). Para isso, é necessário expressar os genes que codificam enzimas da via biossintética da planta ou fungo que produz a substância de interesse, em hospedeiros microbianos, chamados de sistema heterólogo. A produção desses metabólitos utilizando hospedeiros microbianos é ecologicamente amigável e pode produzir produtos com alto grau de pureza quando comparados aos obtidos a partir de plantas, permitindo assim, quando necessário, a utilização de estratégias de purificação mais simples e mais afeitas a processos “verdes” (IBDAH, et al., 2018).

Os sistemas heterólogos podem ser plantas (DESAI, et al., 2010), células de mamíferos (REED e NOPO-OLAZABAL, 2005), de eucarióticos e procarióticos, como por exemplo *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*. A produção microbiana oferece vantagem em comparação com outros sistemas heterólogos, devido ao seu rápido crescimento, a conveniência da manipulação genética e também as ferramentas de engenharia metabólica estar bem estabelecidas e desenvolvidas para serem usadas em microrganismos (IBDAH, et al., 2018). *S. cerevisiae* e *E. coli*, são amplamente utilizados como fábricas celulares para sintetizar substâncias desejadas pela utilização de uma abordagem biossintética dirigida por precursores (KENNEDY, 2008).

O aumento de doenças como Alzheimer, obesidade, câncer e diabetes nas últimas décadas, acompanhada da grande demanda pública por medicamentos fitoterápicos levou ao interesse crescente pela engenharia metabólica como uma abordagem para produzir tais produtos naturais em escala industrial, que tem o potencial de reduzir os custos de produção (IBDAH, et al., 2018). Dessa forma, estão sendo produzidas em microrganismos algumas substâncias de interesse para as indústrias, como os fármacos artemisinina (ABDIN, et al., 2015) e camptotecina (LISCOMBE e O'CONNOR, 2011), fragrâncias como o nootkatone, produtos químicos alimentares, como a vanilina e o resveratrol (Figura 1, p. 23), e até mesmo, biocombustíveis como o etanol e isobutanol (JULLESSON, et al., 2018).

Figura 1: Estruturas químicas de algumas substâncias produzidas por engenharia metabólica.



Um exemplo dessa abordagem biotecnológica para o acesso a substâncias bioativas de interesse é a produção da agmatina (Figura 1, p. 23) em *Escherichia coli*. A agmatina é uma substância natural produzida pela descarboxilação enzimática do aminoácido arginina. Tem sido usada como suplemento alimentar e apresenta grande potencial para aplicações no tratamento de muitas doenças complexas, incluindo distúrbios do sistema nervoso central, doenças cardiovasculares e cânceres (KEYNAN, et al., 2010; PILETZ, et al., 2013). Atualmente, a síntese química da agmatina depende de um processo que envolve várias etapas (YE, et al., 2010). Além disso, as condições de reação são severas e envolvem altas questões de segurança

de produção, além de gerar resíduos que poluem o ambiente. Estudos apontaram que *Escherichia coli* modificada geneticamente foi capaz de excretar agmatina para o meio de cultura, demonstrando seu potencial para produzi-la em larga escala (XU e ZHANG, 2019). Outro aditivo alimentar que foi produzido em *E. coli* é o aminoácido *L*-triptofano, que é largamente utilizado na indústria alimentar, farmacêutica e química. A produção heteróloga do *L*-triptofano foi mais eficiente, quando comparada com os métodos tradicionais de síntese, além de ser ambientalmente melhor e ter baixos custos de produção (HAO, et al., 2019).

Recentemente, Seong-Hee e colaboradores (2019) relataram a produção heteróloga de shinorina em *Saccharomyces cerevisiae*. A shinorina pode ser usada como protetor solar, uma vez que, seus comprimentos de onda de absorbância máxima (310–365 nm) cobrem UV-A, que é mais abundante na luz do sol e mais penetrante do que UV-B (CARRETO, et al., 2011; GAO e GARCIA-PICHEL, 2011; SINGH, et al., 2008). A shinorina é isolada da alga vermelha *Porphyra umbilicalis* e produzida em algumas cianobactérias como *Nostoc punctiform* e *Anabaena variabilis*, entretanto tem um rendimento muito baixo na sua produção. Nesse trabalho, os genes da shinorina da cianobactéria *N. punctiform* foram introduzidos em *Saccharomyces cerevisiae* resultando em uma elevada produção de shinorina, fazendo com que sua produção heteróloga seja uma alternativa promissora (SEONG-HEE, et al., 2019).

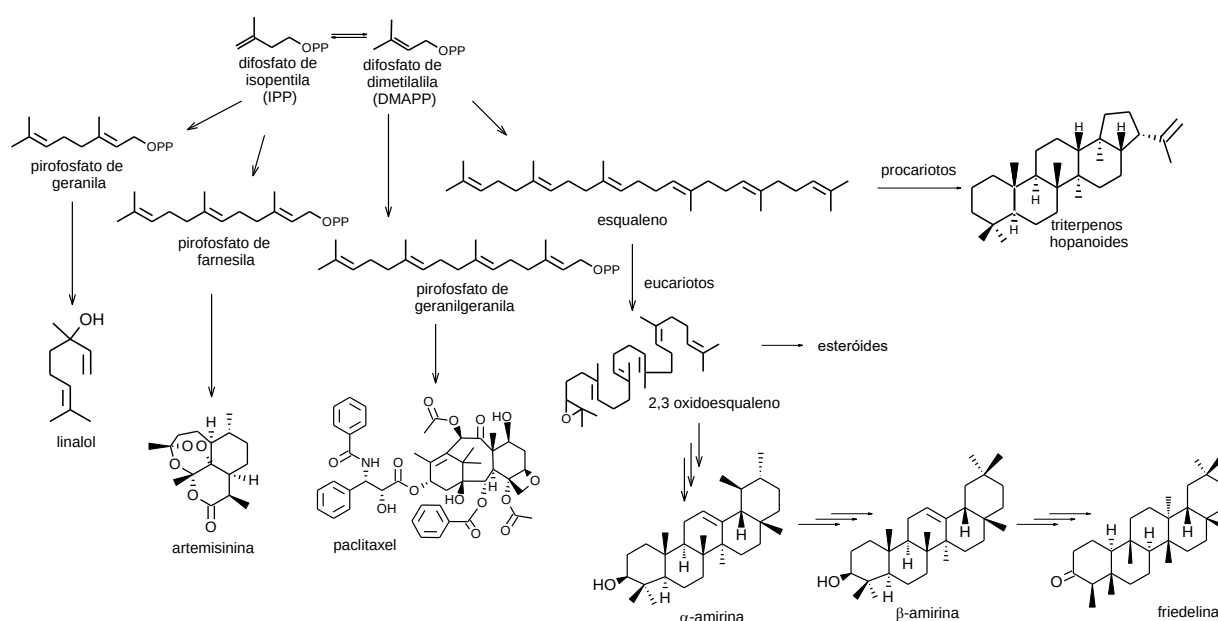
A artemisinina, é um fármaco antimalárico que fornece o tratamento contra as formas parasitárias resistentes a cloroquina e outras formas parasitárias multirresistentes do *Plasmodium sp.* O baixo teor de artemisinina em *Artemisia annua* torna o fármaco, relativamente caro para as pessoas de baixa renda. Além disso, sua complexidade estrutural faz com que sua síntese química seja cara e inviável (ABDIN e ALAM, 2015). Desta forma, foram feitos vários estudos para produzir artemisinina utilizando sistemas heterólogos, como leveduras (PADDON, et al., 2013), bactérias (ANTHONY, et al., 2009) e outras plantas, como por exemplo *Cichorium intybus L.* (chicória) (KRAKER, et al., 2003).

Diante do exposto, fica claro que a engenharia metabólica vem se tornando uma importante ferramenta para a produção de uma gama de substâncias de interesse comercial e biológico, especialmente por apresentar uma alternativa a uma produção sustentável de substâncias úteis a sociedade.

1.2. Terpenóides

Terpenos são substâncias que fazem parte de uma diversificada classe de metabolitos secundários derivados dos isoprenóides (C_5H_8). Podem ser classificados em diferentes grupos, de acordo com o número de unidades de isopreno, incluindo os monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos) e os triterpenos (30 carbonos) (PAPADA et al., 2017). Representam um grupo diversificado de metabólitos secundários presentes em plantas, organismos marinhos, microrganismos etc. São utilizados como aditivos alimentares, fragrâncias, aromas e são considerados promissores agentes farmacológicos, o que têm atraído à atenção da indústria farmacêutica (PAPADA et al., 2017) (Figura 2, p.25).

Figura 2: Vias biossintéticas que levam a produção dos esqueletos terpênicos.

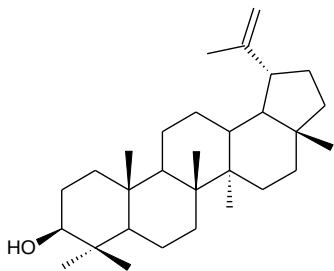
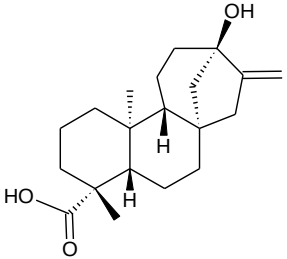
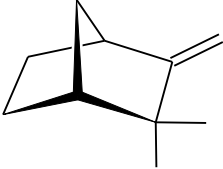
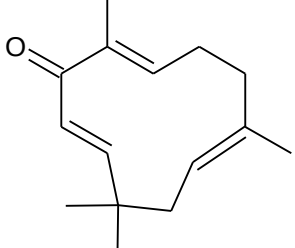


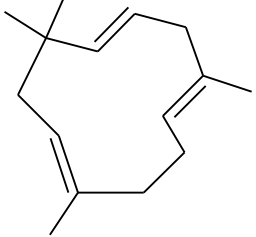
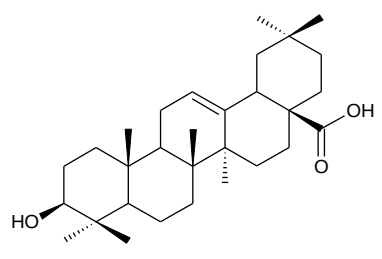
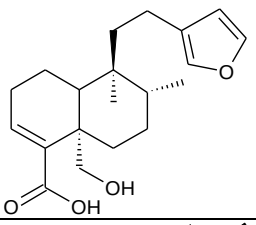
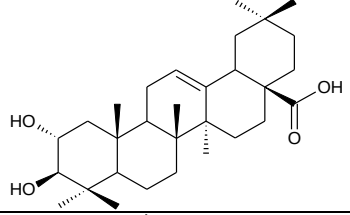
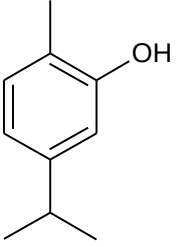
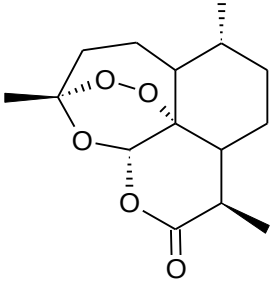
Recentemente, foi mostrado que o esteviol presente nas folhas de *Stevia rebaudiana*, e usado como adoçante natural, mostrou potente inibição de células cancerígenas gastrointestinais (CHEN et al., 2018). O óleo essencial de *Cheilocostus speciosus* com destaque para o canfeno, zerumbona e α -humuleno têm um potencial promissor como inseticidas com toxicidade reduzida em vertebrados não alvos. (BENELLI et al., 2018). Há também relatos dos monoterpenos carvacrol, timol, mentol, geraniol, e triterpenos ácido maslínico, ácido ursólico e ácido oleanólico que em ação conjunta a antibióticos potencializam seus efeitos (ZACCHINO et al., 2017), além de se mostrarem eficientes contra os sintomas de artrite (CARVALHO et al., 2019) (Tabela 1, p. 26). Além disso, estudos mostraram que o triterpeno lupeol

apresentou ação contra artrite, anti-inflamatória, antimutagênica e antimalárica *in vitro* e *in vivo*, além de efeito quimiopreventivo e quimioterápico contra uma variedade de cânceres como o melanoma, próstata e colorretal (TARAPORE et al., 2013).

Diante dos dados apresentados, fica claro que os estudos dos terpenóides têm contribuído enormemente para o desenvolvimento de diversos fármacos com importantes aplicações terapêuticas, entretanto é interessante desenvolver novas estratégias que permitam a produção destes metabolitos em quantidades apreciáveis, de uma forma mais eficiente e limpa. O desenvolvimento da engenharia genética favorece essas estratégias.

Tabela 1: Estruturas químicas e atividades biológicas de alguns terpenos.

Substância	Estrutura química	Atividade biológica	Referência
lupeol (<i>Aloe vera</i>)		anti-inflamatória, anti-artrítica, atividade antimutagênica e antimalárica e antitumoral	TARAPORE, et al., 2013
esteviol (<i>Stevia rebaudiana</i>)		antitumoral	CHEN, et al., 2018
canfeno (<i>Cheilocostus speciosus</i>)		inseticida	BENELLI, et al., 2018
zerumbona (<i>Cheilocostus speciosus</i>)		inseticida	BENELLI, et al., 2018

α -humuleno (<i>Cheilocostus speciosus</i>)		inseticida	BENELLI, et al., 2018
ácido oleanólico (<i>Eugenia caryophyllata</i>)		antibacteriana, em sinergismo com gentamicina e kanamicina	SHIN E PARK, 2015
ácido hautriwaic (<i>Dodonaea viscosa</i>)		sintomas de artrite	SALINAS- SÁNCHEZ et al., 2015
ácido maslínico (<i>Olea europaea</i> L.)		sintomas de artrite	FUKUMITSU et al., 2016
carvacrol (<i>Origanum vulgare</i>)		doenças cardiovasculares	SILVA et al., 2019
artemisinina (<i>artemisia annua</i>)		malária	KNAEPPER, et al., 2012

1.3. Biossíntese da friedelina

Friedelina é um triterpeno pentacíclico encontrado nas folhas de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), conhecida como “Espinheira Santa”, tradicionalmente usada em distúrbios estomacais (TABACH et al., 2017). Apresenta um grande potencial

medicinal e atua também como antiinflamatório, analgésico, antipirético, gastroprotetor e antibiótico, contra as bactérias não patogênicas *Mycobacterium madagascariense* e *Mycobacterium indicus pranii*, e contra a bactéria responsável pela tuberculose em bovinos, *Mycobacterium bovis* e em humanos, *Mycobacterium tuberculosis* (ABDULLAHI, et al., 2011; ANTONISAMY, et al., 2016; ANTONISAMY, et al., 2015; CHRISTOPHER, et al., 2014). Também se mostrou eficiente na redução dos níveis lipídicos em ratos hiperlipidêmicos (DURAIPANDIYAN et al., 2016). Além disso, em espécies de Celastraceae, friedelina é considerada o precursor dos triterpenos quinonametídeos, substâncias consideradas promissoras antitumorais (CORSINO et al., 2000; SUNG et al., 2010; YELANI et al., 2010; BUFFA-FILHO, et al., 2014; LIU, et al., 2015; SHARMA, et al., 2017; BARKER, et al., 2018; CEVATEMRE, et al., 2018; TANG, et al., 2018; YOUSEF, et al., 2018; YANG, et al., 2018; BICALHO et al., 2019).

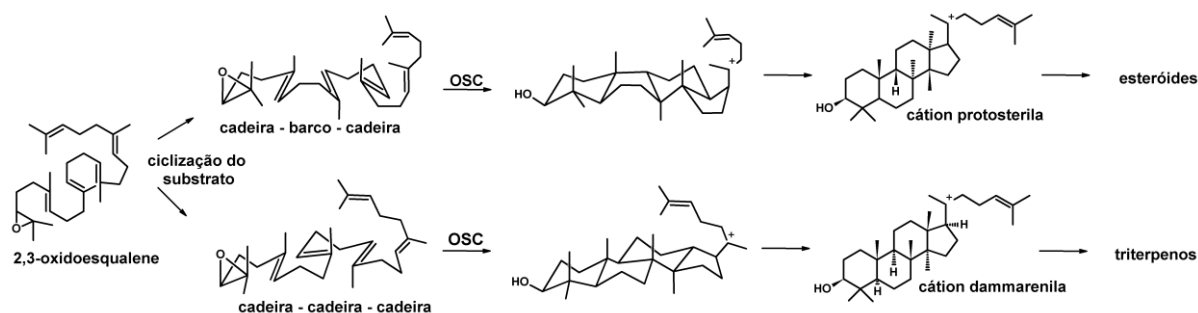
Como já descrito, a friedelina é biossintetizada a partir de blocos construtores com cinco átomos de carbono, os isoprenóides. Esses blocos, pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), são combinados para formar isoprenóides de cadeia mais longas: pirofosfato de geranila (GPP), pirofosfato de farnesila (FPP), pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) e esqualeno, precursores dos mono-, sesqui-, di-, tri-terpenos e esteroides, respectivamente (THIMMAPPA, et al., 2014) (Figura 2, p.25).

Em procariotos, o esqualeno é diretamente ciclizado a triterpenos hopanóides, enquanto que em eucariotos, é primeiramente convertido a 2,3-oxidoesqualeno e, em seguida, ciclizado produzindo cicloartenol (precursor de fitoesteróis) (WANG et al., 2010) ou triterpenos pentacíclicos em plantas, lanosterol em fungos e mamíferos, resultando em ergosterol e colesterol, respectivamente (OHYAMA et al., 2009; WANG, et al., 2010).

A ciclização do precursor 2,3-oxidoesqualeno é catalisada por enzimas denominadas oxidoesqualeno ciclasas (OSCs), as quais são geralmente produto-específicas, mas competem pelo mesmo substrato para formar esteróides e triterpenos pentacíclicos, o que as torna um importante ponto de separação entre o metabolismo primário e secundário (LODEIRO et al., 2007). A conformação do substrato é uma etapa chave para a formação dos diferentes produtos. A reação de ciclização das OSCs se inicia com a protonação do substrato 2,3-oxidoesqualeno. Em seguida, ocorre seu dobramento podendo assumir a conformação cadeira-barco-

cadeira que leva a formação do cátion protosterila, o qual dá origem a esteróides (GASPASCUAL et al., 2014) ou a conformação cadeira-cadeira-cadeira levando a formação do cátion damarenila, dando origem aos diferentes esqueletos triterpênicos (XUE et al., 2012) (Figura 3, p. 29).

Figura 3: Cátions intermediários e produtos da ciclização de 2,3-oxidosqualeno por oxidoesqualeno ciclases.

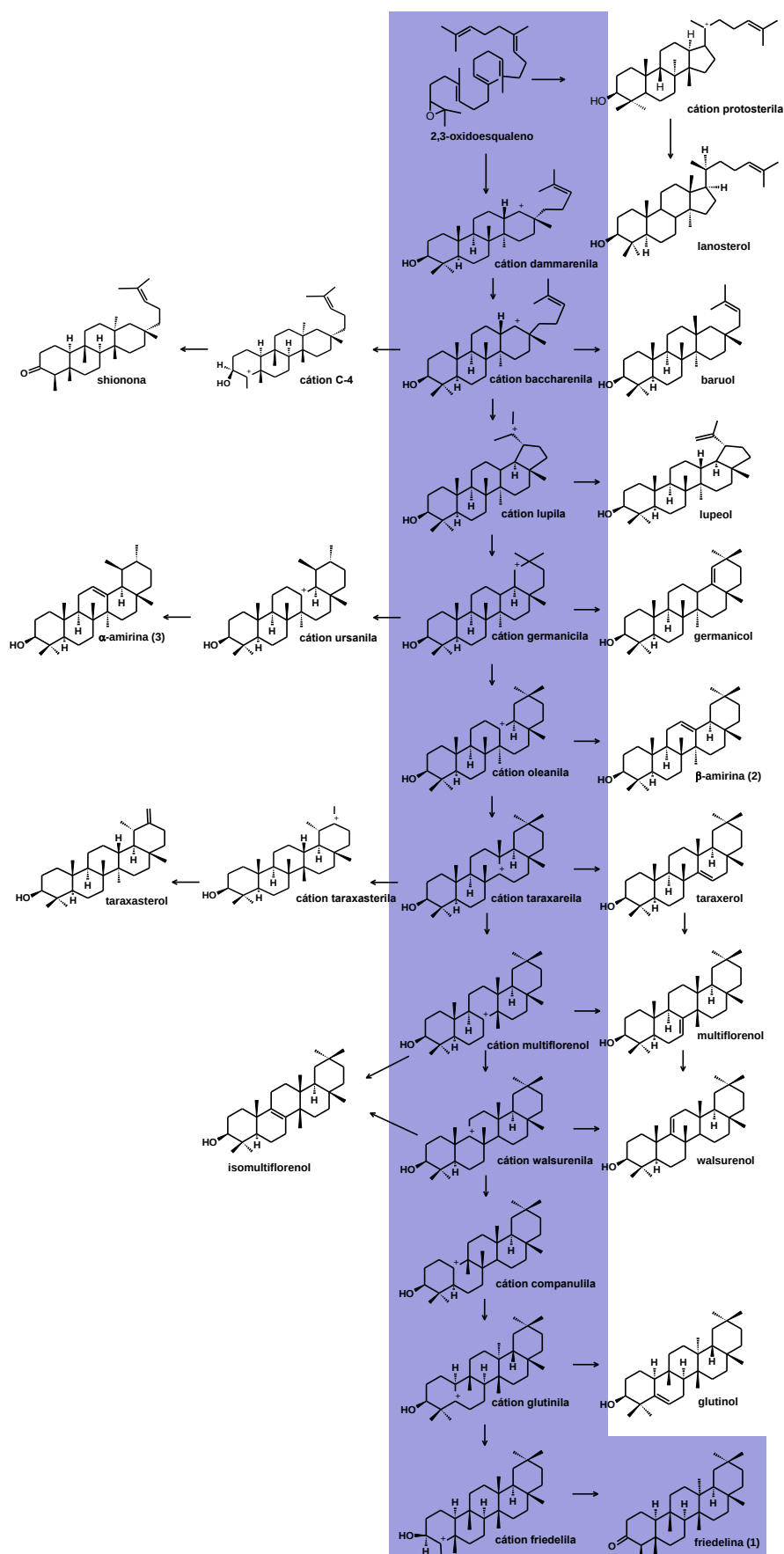


Após a formação dos cátions, ocorrem as ciclizações específicas, resultando numa cascata de reações para a formação dos esqueletos triterpênicos e esteróidicos (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016) (Figura 4, p. 30).

As enzimas oxidoesqualeno ciclases que atuam na ciclização do cátion damarenila produzem os diferentes triterpenos pentacíclicos. Importante notar que nesta via ocorre também a produção da shionona, único triterpeno tetracíclico com uma carbonila no anel A, produzido pela shionona sintase (Figura 4, p. 30).

A friedelina sintase tem capacidade de produzir a friedelina e envolve o número máximo de rearranjos na cascata de reações, com formação de uma carbonila em C-3 pela desprotonação do intermediário hidroxilado, utilizando o resíduo de aspartato que iniciou o ciclização, sem auxílio de uma enzima oxidorredutase (ABE e PRESTWICH, 1995; WANG et al., 2010) (Figura 4, p. 30).

Figura 4: Vias biossintéticas dos diferentes esqueletos triterpênicos (HAN, et al., 2019).



Com o intuito de estudar as vias metabólicas de derivados terpênicos, assim como controlar a sua produção, diversas espécies vegetais tiveram suas triterpeno sintases clonadas e expressas em *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, levando à obtenção desses produtos em sistemas heterólogos (WANG, et al., 2010; ITO, et al., 2013a; KÜRTEN, et al., 2015, SOUZA-MOREIRA, et al., 2016). Como já mencionado, a utilização desses microrganismos como sistemas heterólogos evita o extrativismo predatório, emprega menos solventes e se aproxima de práticas relacionadas a “química verde”. Portanto, a engenharia metabólica é uma ferramenta de manipulação genética que utiliza produtos renováveis e fontes de carbono baratas, permitindo assim o aumento do rendimento e produção de substâncias de interesse comercial e biológico em larga escala.

1.4. Mutações em enzimas oxidoesqualeno ciclases

Vários estudos mutagênicos foram realizados entre diferentes OSCs para avaliar a importância dos resíduos de aminoácidos envolvidos em suas atividades e especificidades catalíticas. Pequenas alterações na estrutura do sítio ativo podem alterar o rendimento do produto dessas enzimas. Dentre os exemplos, pode-se incluir os mutantes F728H da β -amirina sintase de *Euphorbia tirucalli* (EtAS), que passou a produzir germanicol como principal produto (ITO, et al., 2013b) e I481V da cicloartenol sintase, que perde sua especificidade, e passou a produzir uma mistura de cicloartenol, lanosterol e parkeol (LODEIRO et al., 2005).

Os estudos das mutações sítio dirigidas também podem melhorar a compreensão sobre resíduos de aminoácidos que são essenciais para a atividade catalítica da enzima. Como mostrado em um estudo sobre mutantes de β -amirina sintase e lupeol sintase. A mutação W259L da β -amirina sintase de *Panax ginseng*, levou à produção de lupeol e β -amirina, tendo o lupeol como principal produto (TETSUO e KAZUO, 2000). Quando a mutação foi feita na lupeol sintase (L256W) produziu predominantemente β -amirina, mostrando que o resíduo de triptofano é crucial para a produção de β -amirina, enquanto o resíduo de leucina pode desempenhar um papel importante na biossíntese do lupeol (TETSUO e KAZUO, 2000). Isso também foi mostrado no mutante S728F da β -amirina sintase de *Avena strigosa* (SAD1). A alteração da serina pela fenilalanina levou à estabilização do cátion dammarenila (Figura 3, p.29), gerando o triterpeno tetracíclico dammarano, ao

invés dos triterpenos pentacíclicos, indicando a importância do resíduo de aminoácido serina para a atividade catalítica da β -amirina sintase de *Avena strigosa* (SALMON, et al., 2016).

Em relação a todas as friedelina sintases conhecidas, foi observado um único resíduo de leucina a duas posições do sítio ativo. Estudos de mutagênese com friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (MiFRS) e *Tripterygium wilfordii* (TwOSC1) comprovaram a influência da leucina na especificidade da atividade das enzimas que produzem friedelina e β -amirina ou apenas β -amirina, dependendo do resíduo trocado (SOUZA-MOREIRA et al., 2016; ZHOU, et al., 2019). Entretanto, outro mutante da friedelina sintase (TwOSC1), que alterou treonina 502 para ácido glutâmico, foi capaz de aumentar a produção heteróloga de friedelina e não alterar sua especificidade, mostrando o potencial desses estudos para melhorar a produção de frielina (ZHOU, et al., 2019).

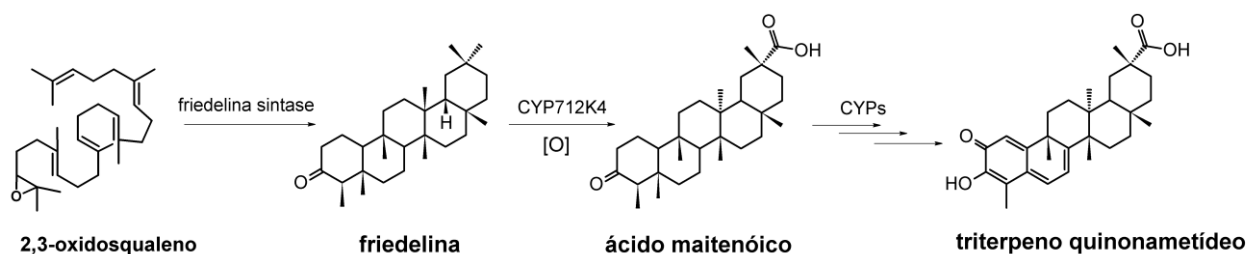
Como mencionado, a friedelina é um triterpeno pentacíclico que possui uma variedade de atividade biológica, além de ser precursora dos triterpenos quinonametideos, importantes substâncias anticancerígenas produzidas em pequena quantidade nas cascas das raízes de *M. ilicifolia* (CORSINO et al., 2000). Estudos apontam que a friedelina é biossintetizada nas folhas, translocada para as raízes e posteriormente transformada nos triterpenos quinonametideos por enzimas oxidoredutases do tipo citocromo P450 (CYPs) (CORSINO et al., 2000; BICALHO, et al., 2019).

Nosso grupo vem utilizando ferramentas de engenharia metabólica, a fim de produzir uma enzima que apresente melhores rendimentos de friedelina em *Saccharomyces cerevisiae* (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016, ALVES, et al., 2018) para que se possa dar continuidade e estudar as P450 responsáveis pelas etapas de oxidação até a produção dos triterpenos quinonametideos (BICALHO, et al., 2019).

Em trabalho anterior a sequência de MiFRS foi clonada em um plasmídeo de expressão de levedura e transformada em *S. cerevisiae* com expressão reduzida de ERG7 (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016). A lanosterol sintase compete com friedelina sintase pelo mesmo substrato, o 2,3-oxidosqualeno. Dessa forma, para melhorar a produção de friedelina, foi necessário diminuir a expressão de ERG7, o qual produz lanosterol. Isso ocorre, pois lanosterol é essencial para o metabolismo da levedura e o gene que codifica a lanosterol sintase não pode ser excluído (ALVES, et al., 2018).

A reconstituição de uma via metabólica visando à produção heteróloga de uma substância de interesse depende da identificação das enzimas responsáveis pela produção desses metabolitos. Nesse sentido, a produção de friedelina em sistema heterólogo tem sido otimizada e ferramentas de engenharia metabólica estão sendo usadas para a obtenção dos triterpenos quinonametideos em sistema heterólogo (SOUZA-MOREIRA, et al., 2016; BICALHO, et al., 2019). A oxidação da friedelina a ácido maitenólico pelo CYP712K4 pode ser considerada como o segundo passo dessa via. Recentemente, Bicalho et al., (2019) caracterizou a CYP712K4, uma enzima do tipo citocromo P450 de *Maytenus ilicifolia* que catalisa a oxidação da friedelina na posição C-29, levando ao ácido maitenólico (Figura 5, p.33). Entretanto, ainda é necessária a identificação de outros genes que possam permitir a reconstituição gradual da via biossintética dos triterpenos quinonametideos e finalmente, fornecer uma fonte heteróloga de produção desses metabolitos e promover seu uso terapêutico futuro.

Figura 5: Via biossintética que leva a produção dos triterpenos quinonametideos pela oxidação da friedelina.



5. CONCLUSÃO

A friedelina é uma substância medicinalmente importante devido à diversidade de atividades biológicas atribuídas a ela, além de ser o principal precursor dos promissores antitumorais, triterpenos quinonametídeos. Com isso, a transferência do gene da friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* para um sistema heterólogo (*Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*) permitiu avançar nos estudos sobre sua produção em *E. coli*, e obter uma fração concentrada da enzima estudada. Além disso, foi possível avaliar a sua capacidade biossintética por estudos de mutação sítio dirigida, expressas em levedura *Saccharomyces cerevisiae* e, assim, avançar no entendimento da sua atividade e especificidade na produção de metabólitos secundários de interesse, de forma sustentável e mais eficiente, como uma pequena fábrica biológica.

6. Referências

- ABE, I.; PRESTWICH, G. Identification of the active site of vertebrate oxidosqualene cyclase. **Lipids**, v. 30, n. 3, p. 231-234, 1995.
- ABDALLAH, I. I; PRAMASTYA, H.; VAN, M. R.; QUAX, W. J; PRAMASTYA, H. Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* Toward Taxadiene Biosynthesis as the First Committed Step for Taxol Production. **Frontiers in microbiology**, n. 10, v. 218, 2019.
- ABDIN, M. Z., ALAM, P. Genetic engineering of artemisinin biosynthesis: prospects to improve its production. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 33, 2015.
- ABDULLAHI, M. KOLO, I. ADEBAYO, O. OYEWALE, J. O. AMUPITAN, M. O. FATOPE, J. I. OKOGUN. Antimycobacterial Friedelane-terpenoid from the Root Bark of *Terminalia Avicennioides*. **American Journal of Chemistry**, n. 2, p. 52-55, 2011.
- ALVES T.B., SOUZA-MOREIRA T.M., VALENTINI S.R., ZANELLI C.F., FURLAN M. (2018) Friedelin in *Maytenus ilicifolia* is produced by friedelin synthase isoforms. **Molecules**, n. 3,v. 23, 2018.
- ANJANA, R. VAISHNAVI, M. K. SHERLIN, D. KUMAR, S. P. NAVEEN, K. KANTH, P. S. SEKAR, K. Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: a study based on orientation and distance. **Bioinformation**, n. 8, p. 1220-1224, 2012.
- ANTHONY, J.; ANTHONY, L. C.; NOWROOZI, F.; KWON, G.; NEWMAN, J. D.; KEASLING, J. D. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. **Metabolic Engineering**, v. 11, n. 1, p. 13-19, 2009.
- ANTONISAMY, P. DURAIPANDIYAN, V. IGNACIMUTHU, S. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 63, p. 1070-1077, 2016.
- ANTONISAMY, P. DURAIPANDIYAN, V. ARAVINTHAN, A. AL-DHABI, N. A. IGNACIMUTHU, S; CHOI, K. C. KIM, J. H. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, n. 750, p. 167-175, 2015.
- BARKER, E. C.; KIM, B.; YOON, J. H.; TOCHTROP, G. P.; LETTERIO, J. J.; CHOI, S. H. Potent suppression of both spontaneous and carcinogen-induced colitis-associated colorectal cancer in mice by dietary celastrol supplementation. **Carcinogenesis**, v. 39, n.1, p. 36-46, 2018.
- BENELLI, G.; GOVINDARAJAN, F.; RAJESWARY, M.; VASEEHARAN, B.; ALYAHYA, S. A.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; MAGGI, F. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.148, p. 781-786, 2018.

BICALHO, K. U. SANTONI, M. M. ARENDT, P., ZANELLI, C. F., FURLAN, M., GOOSSENS, A., POLLIER, J. CYP712K4 Catalyzes the C-29 Oxidation of Friedelin in the Maytenus ilicifolia Quinone Methide Triterpenoid Biosynthesis Pathway. **Plant and Cell Physiology**, 2019. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz144>.

BUFFA-FILHO, W., BOLZANI, V. S., FURLAN, M., PEREIRA, S. I. V., PEREIRA, A. M. S., FRANÇA, S. C. In vitro propagation of Maytenus ilicifolia (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinonemethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, v. 6, p. 137–146, 2014.

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects, v. 9, p. 387-446, 2011.

CARVALHO, A. M. S.; HEIMFARTH, L.; SANTOS, K. A.; GUIMARAES, A. G.; PICOT, L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Terpenes as possible drugs for the mitigation of arthritic symptoms - A systematic review. **Phytomedicine**, n. 57, p. 137-147, 2019.

FUJII, Y., KANEKO, M. K.; YUKINARI, K. MAP Tag: A Novel Tagging System for Protein Purification and Detection. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 35, n. 6, p. 293-299, 2016

FUKUMITSU, S.; VILLAREAL, M.O.; FUJITSUKA, T.; AIDA, K.; ISODA, H. Anti-inflammatory and anti-arthritis effects of pentacyclic triterpenoids maslinic acid through NF- κ B inactivation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, pp. 399-409, 2016.

GAO, Q.; GARCIA-PICHEL, F. Microbial ultraviolet sunscreens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 791-802, 2011.

GASPASCUAL, E.; BERNA, A.; BACH, T. J.; SCHALLER, H. Plant oxidosqualene metabolism: cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. **PLoS One**, v. 10, 2014.

GROOTA, N. S.; VENTURA, S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. **FEBS Letters**, v. 580, n. 27, p. 6471-6476, 2006.

HAN, J. Y. AHN, C. ADHIKARI, P. B. KONDETI, S. CHOI, Y. E. Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (*PdFRS*) encoding a monofunctional friedelin synthase in *Populus davidiana*. **Planta**, n. 249, v. 1, p. 95-111, 2019.

HAO, N.; RUIRUI, L.; QIANG, L.; PENGFEI, G.; QUANFENG, L.; QINGSHENG, Q. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 46, p. 1, p. 55-65, 2019.

HUNKE, S.; BETTON, J. M. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, n. 5, v. 50, p. 1579-1589, 2003.

IBDAH, M.; MARTENS, S.; GANG, D. R. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of plant dihydrochalcones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 10, p. 2273-2280, 2018.

IKRAM, N. K. B. K; SIMONSEN, H. T. A Review of Biotechnological Artemisinin Production in Plants, **Frontiers in plant science**, n. 8, p. 1966, 2017.

ITO, R; MASUKAWA, Y; HOSHINO, T. Purification, kinetics, inhibitors and CD for recombinant β -amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli* L and functional analysis of the DCTA motif, which is highly conserved among oxidosqualene cyclases. **FEBS Journal**, v. 280, n. 5, p. 1267-80, 2013a.

ITO, R. MASUKAWA, Y. NAKADA, C. AMARI, K. NAKANO, C. HOSHINO, T. β -Amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli*. Steric bulk, not the π -electrons of Phe, at position 474 has a key role in affording the correct folding of the substrate to complete the normal polycyclization cascade. **Organic & Biomolecular Chemistry**, n. 12, p. 3836-3846, 2014.

ITO, R. HASHIMOTO, I. MASUKAWA, Y. HOSHINO, T. Effect of Cation- π Interactions and Steric Bulk on the Catalytic Action of Oxidosqualene Cyclase: A Case Study of Phe728 of β -Amyrin Synthase from *Euphorbia tirucalli* L. **Chemistry a European Journal**, n. 50, p. 17150-17158, 2013b.

JIN, S; KENNEDY, R. T. New developments in Western blot technology. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 4, p. 416-418, 2015.

JOHNSON, M. S., SRINIVASAN, N. SOWDHAMINI, R. BLUNDELL, T. L. Knowledge-based protein modeling. **Crit. Biochemistry & Molecular Biology Journal**, n. 29, p. 1-68, 1994.

JULLESSON, D.; DAVID, F.; PFLEGER, B.; NIELSEN, J. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1395-1402, 2015.

KAYANI, W. K.; KIANI, B. H.; DILSHAD, E.; MIRZA, B. Biotechnological approaches for artemisinin production in *Artemisia*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 4, p.54, 2018.

KNAEPPER, S.; PENA, Y.; SULLEIRO, E.; FERNANDEZ-POLO, A.; ESPIAU, M.; MARTIN-NALDA A. Use of intravenous artemisinin derivatives in severe malária. **Anales de pediatria**, v. 77, n. 1, p. 67-68, 2012.

KRAKER, J.; SCHURINK, M.; FRANSSEN, M. C. R.; KONIG, W. A.; DE GROOT, A.; BOUWMEESTER, H. J. Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. **Tetrahedron**, v. 59, n. 3, p. 409-418, 2003.

KENNEDY, J. Mutasythesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: Combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 25– 34, 2008.

KEYNAN, O.; MIROVSKY, Y.; DEKEL, S.; GILAD, V. H.; GILAD, G. M. Safety and efficacy of dietary agmatine sulfate in lumbar disc-associated radiculopathy. An open-label, dose-escalating study followed by a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Pain Medicine**, v. 11, p. 356-368, 2010.

KÜRTEN, C.; UHLÉN, M.; SYRÉN, P. O. Overexpression of functional human oxidosqualene cyclase in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 115, p. 46–53, 2015.

LISCOMBE, D. K., O'CONNOR, S. E. A virus-induced gene silencing approach to understanding alkaloid metabolism in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 72, p.1969-1977, 2011.

LIU, Y. B.; GAO, X.; DEEB, D.; PINDOLIA, K.; GAUTAM, S. C. Role of telomerase in anticancer activity of pristimerin in prostate cancer cells. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, n. 1, v. 11, p. 41-44, 2015.

LODEIRO, S.; GASCHSEIICHI, T.; MATSUDA, S. P. T. Enzyme Redesign: Two Mutations Cooperate to Convert Cycloartenol Synthase into an Accurate Lanosterol Synthase. **American Chemical Society**, v.127, n.41, p.14132-14133, 2005.

LODEIRO, S.; XIONG, Q.; WILSON, W.K.; KOLESNIKOVA, M.D.; ONAK, C.S.; MATSUDA, S.P.T. An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse mechanisms: A challenge to prevailing concepts of triterpene biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v.129, n.36, p.11213-11222, 2007.

MATSUDA, S. P. T., DARR, L. B., HART, E. A., HERRERA, J. B. R., MCCANN, K. E., MEYER, M. M., PANG, J., SCHEPMANN, H. G. AND WILSON, W. K. STERIC Bulk at Cycloartenol Synthase Position 481 Influences Cyclization and Deprotonation. **Organic Letters**, n. 2, p. 2261-2263, 2000.

MEYER, P. I. HEIDMANN, G. FORKMANN, H. SAEDLER. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 677, 1987.

NABAVI, S. MOHAMMAD; SAMEC, D.; TOMCZYK, M.; MILELLA, L.; RUSSO, D.; HABTEMARIAM, S.; SUNTAR, I.; RASTRELLI, L.; DAGLIA, M.; XIAO, J.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; YOUSEFI, B.; JEANDET, P.; XU, S.; SHIROOIE, S. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, 2018.

NAKATSUKA, T.; ABE, Y.; KAKIZAKI, Y.; YAMAMURA, S.; NISHIHARA, M. Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 11, p. 1951-1959, 2007.

NIELSEN, J.; YUPLEE, S. Evolution of the Metabolic Engineering Community. **Metabolic Engineering**, v. 48, p. A1-A2, 2018.

OHYAMA, K.; SUZUKI, M.; KIKUCHI, J.; SAITO, K.; MURANAKA, T. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. **PNAS**, v.106, n.3, p.725-730, 2009.

PADDON, C. J.; WESTFALL, P. J.; PITERA, D. J.; BENJAMIN, K.; FISHER, K.; MCPHEE, D.; LEAVELL, M. D.; TAI, A.; MAIN, A.; ENG, D.; POLICHUK, D. R.; TEOH, K. H.; REED, D. W.; TREYNOR, T.; LENIHAN, J.; JIANG, H.; FLECK, M.; BAJAD, S.; DANG, G.; DENGROVE, D.; DIOLA, D.; DORIN, G.; ELLENS, K. W.; FICKES, S.; GALAZZO, J.; GAUCHER, S. P.; GEISTLINGER, T.; HENRY, R.; HEPP, M.; HORNING, T.; IQBAL, T.; KIZER, L.; LIEU, B.; MELIS, D.; MOSS, N.; REGENTIN, R.; SECREST, S.; TSURUTA, H.; VAZQUEZ, R.; WESTBLADE, L. F.; XU, L.; YU, M.; ZHANG, Y.; ZHAO, L.; LIEVENSE J.; COVELLO, P. S.; KEASLING, J. D.; REILING, K. K.; RENNINGER, N. S.; NEWMAN, J. D. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 528-532, 2013.

PAPADA, E., GIOXARI, A., BRIEUDES, V., AMERIKANOU, C., HALABALAKI, M., SKALTSOUNIS, A. L., SMYRNIODIS, I., KALIORA, A. C. Bioavailability of terpenes and postprandial effect on human antioxidant potential. **An Open-Label Study in Healthy Subjects Molecular Nutrition Food Research**, 1700751, 2017.

PILETZ, J. E.; ARICIOGLU, F.; CHENG, J. T.; FAIRBANKS, C. A.; GILAD, V. H.; HAENISCH, B.; HALARIS, A.; HONG, S.; LEE, J. E.; LI, J.; LIU, P.; MOLDERINGS, G. J.; RODRIGUES, A. L.; SATRIANO, J.; SEONG, G. J.; WILCOX, G.; WU, N.; GILAD, G. M. Agmatine: Clinical applications after 100 years in translation. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 18, p. 880-893, 2013.

REED, D. G.; NOPO-OLAZABAL, L. H.; FUNK, V.; WOFFENDEN, B. J.; REIDY, M. J.; DOLAN, M. C.; CRAMER, C. L.; MEDINA-BOLIVAR, F. Expression of functional hexahistidine-tagged ricin B in tobacco. **Plant Cell Reports**, v. 24, n.1, p. 15-24, 2005.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, n. 234, p. 779–815, 1993.

SALINAS-SÁNCHEZ, D.O.; ZAMILPA, A.; PÉREZ, S.; HERRERA-RUIZ, M.; TORTORIELLO, J.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; JIMÉNEZ-FERRER, E. Effect of hautriwaic acid isolated from *dodonaea viscosa* in a model of kaolin/carrageenan-induced monoarthritis. **Planta Medicinal**, v. 81, p. 1240-1247, 2015.

SALMON, M. THIMMAPPA, R. B. MINTO, R. E. MELTON, R. E. HUGHES, R. K. O'MAILLE, P. E. HEMMINGS, A. M. OSBOURN, A. A conserved amino acid residue for product and substrate specificity in plant triterpene synthases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 113, p. 4407-4414, 2016.

SEONG-HEE, P.; KYUSUNG, L.; JAE, W. J.; JI-SOOK, H. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of shinorine, a sunscreen material, from xylose. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 2, p. 346-357, 2019.

SHARMA, S. H., THULASINGAM, S., NAGARAJAN, S. Terpenoids as anti-colon cancer agents – A comprehensive review on its mechanistic perspectives, **European Journal of Pharmacology**, v. 795, p. 169–178, 2017.

SHEN, M. Y. SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, n. 15, p. 2507-2524, 2006.

SHIMADA, Y.; OHBAYASHI, M.; NAKANO-SHIMADA, M.; OKINAKA, Y.; KIYOKAWA, Y.; KIKUCHI, Y. Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3', 5'-hydroxylase: specific switching of the pathway in petunia. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 5, p. 456-462, 2001.

SHIN, B e PARK, W. Synergistic effect of oleanolic acid on aminoglycoside antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **PLOS One**, v. 10, 2015.

SILVA, E. A. P.; CARVALHO, J. S.; GUIMARAES, A. G.; BARRETO, R. S. S.; SANTOS, M. R. V.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. The use of terpenes and derivatives as a new perspective for cardiovascular disease treatment: a patent review (2008-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 1, p. 43-53, 2019.

SINGH, S. P.; KUMARI, S.; RASTOGI, R. P.; SINGH, K. L.; SINHA, R. P. Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 7-17, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; ALVES, T. B.; PINHEIRO, K. A.; FELIPPE, L. G.; LIMA, G. M. A. de; WATANABE, T. F.; BARBOSA, C. C.; SANTOS, V. A. F. F. M.; LOPES, N. P.; VALENTINI, S. R.; GUIDO, R. V. C.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. Friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia*: leucine 482 plays an essential role in the production of the most rearranged pentacyclic triterpene. **Scientific Reports**, n. 6, p. 36858, 2016.

SUNG, B.; PARK, B.; YADAV, V. R.; AGGARWAL, B. B. Celastrol, a Triterpene, Enhances TRAIL-induced Apoptosis through the Down-regulation of Cell Survival Proteins and Up-regulation of Death Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, n. 5, v. 285, p. 11498-11507, 2010.

TABACH, R. DUARTE-ALMEIDA, J. M. CARLINI, E. A. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract. Part I - Preclinical Studies. **Phytotherapy Research**, n. 31, p. 915-920, 2017.

TANG, B.; XU, D.; ZHAO, Y.; LIANG, G.; CHEN, X.; WANG, L. Celastrol inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration through suppression of MMP3 and MMP7 by the PI3K/AKT signaling pathway. **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 6, p. 530-538, 2018.

TARAPORE, R. S.; SIDDIQUI, I. A.; ADHAMI, V. M.; SPIEGELMAN, V. S.; MUKHTAR, H. The dietary terpene lupeol targets colorectal cancer cells with constitutively active Wnt/ β -catenin signaling. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 11, p. 1950-1958, 2013.

TETSUO, K. M. S. KAZUO, M. Y. E. Mutational Studies on Triterpene Synthases: Engineering Lupeol Synthase into β -Amyrin Synthase. **Journal of the American Chemical Society**, n. 122, p. 6816-6824, 2000.

THIMMAPPA R. GEISLER K. LOUVEAU T. O'MAILLE P. OSBOURN A. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, n. 65, p. 225-257, 2014.

TSUDA, S.; FUKUI, Y.; NAKAMURA, N.; KATSUMOTO, Y.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; FUKUCHI-MIZUTANI, M.; OHIRA, K.; UEYAMA, Y.; OHKAWA, H.; HOLTON, T. A. Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. **Plant Biotechnol**, v. 21, n. 5, p. 377-386, 2004.

WANG, Z.; YEATS, T.; HAN, H.; JETTER, R. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29703-29712, 2010.

XU, D., ZHANG, L. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for agmatine production, Engineering in Life. **Sciences**, v. 19, p. 13–20, 2019.

XUE, Z.; DUAN, L.; LIU, D.; GUO, J.; GE, S.; ÓMÁILLE, P.; DICKS, J.; OSBOURN, A.; QI, X. Divergent evolution of oxidosqualene cyclases in plants. **New Phytologist**, v. 193, p. 1022-1038, 2012.

YANG, Y.; CHENG, S.; LIANG, G.; HONGGANG, L.; WU, H. Celastrol inhibits cancer metastasis by suppressing M2-like polarization of macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 2, n. 503, p. 414-419, 2018.

YE, S.; WANG, J.; SHAN, W.; YE, L.; ZOU, J. Green process for the preparation of agmatine sulfate. **Zhejiang Chemystri**, v. 41, p. 5-7, 2010.

YELANI, T., HUSSEIN, A. A., MEYER, J. J. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*, **Natural Product Research**, n 15, v. 24, p. 1418-1425, 2010.

YOUSEF, B. A.; HASSAN, H. M; ZHANG, L.; JIANG, Z. Pristimerin exhibits in vitro and in vivo anticancer activities through inhibition of nuclear factor-kB signaling pathway in colorectal cancer cells. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 40, p. 140-147, 2018.

WU, T.; GRIFFIN, J. H. Conversion of a Plant Oxidosqualene-Cycloartenol Synthase to an Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase by Random Mutagenesis. **Biochemistry**, n. 26, p. 8238-8244, 2002.

ZACCHINO, S. A., BUTASSI, E., DILIBERTO, M., RAIMONDI, M., POSTIGO, A., SORTINO, M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 37, n. 15, p. 27-48, 2017.

ZHANG, Q. Z.; WU, N.; JIAN, D.; JIANG, R.I; YANG, C.; LAN, X. Z.; CHEN, M.; ZHANG, F. Y.; LIAO, Z. Overexpression of AaPIF3 promotes artemisinin production in *Artemisia annua*. **Industrial Crops and Products**, n. 138, p. 111476, 2019.

ZHOU, J. HU, T. GAO, L. SU, P. ZHANG, Y. ZHAO, Y. CHEN, S. TU, L. SONG, Y. WANG, X. HUANG, L. GAO, W. Friedelane-type triterpene cyclase in celastrol biosynthesis from *Tripterygium wilfordii* and its application for triterpenes biosynthesis in yeast. **New Phytologist**, n. 2, p. 722-73, 2019.