RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 31/03/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

Engenharia metabólica aplicada à elucidação de etapas adicionais da via biossintética de triterpenos quinonametídeos de *Monteverdia ilicifolia* por expressão heteróloga de enzimas da família citocromo P450 nos sistemas *Nicotiana benthamiana* e *Saccharomyces cerevisiae*

Araraquara
2026

OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

Engenharia metabólica aplicada à elucidação de etapas adicionais da via biossintética de triterpenos quinonametídeos de *Monteverdia ilicifolia* por expressão heteróloga de enzimas da família citocromo P450 nos sistemas *Nicotiana benthamiana* e *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Coorientadora: Profa. Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira

Araraquara

2026

S729e

Souza, Otávio Aguiar de

Engenharia metabólica aplicada à elucidação de etapas adicionais da via biossintética de triterpenos quinonametídeos de Monteverdia ilicifolia por expressão heteróloga de enzimas da família citocromo P450 nos sistemas Nicotiana benthamiana e Saccharomyces cerevisiae / Otávio Aguiar de Souza. -- Araraquara, 2026

295 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Maysa Furlan

Coorientadora: Tatiana Maria de Souza Moreira

1. Biossíntese. 2. Terpenos. 3. Biologia Sintética. 4. Biocatálise. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta tese contribui para a elucidação de etapas adicionais da via de biossíntese de triterpenos quinonametídeos de *Monteverdia ilicifolia*, fornecendo base para a futura produção em larga escala desses compostos de interesse farmacológico por meio de sistemas heterólogos como estratégia sustentável e inovadora, em alinhamento aos ODS 3, 9, 12 e 15.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This thesis contributes to elucidating additional steps in the biosynthetic pathway of quinone methide triterpenes from *Monteverdia ilicifolia*, supporting the future large-scale production of these pharmacologically relevant compounds through heterologous systems as a sustainable and innovative strategy, aligned with SDGs 3, 9, 12 and 15.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Engenharia metabólica aplicada à elucidação de etapas adicionais da via biossintética de triterpenos quinonametídeos de Monteverdia ilicifolia por expressão heteróloga de enzimas da família citocromo P450 nos sistemas *Nicotiana benthamiana* e *Saccharomyces cerevisiae*

AUTOR: OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA
ORIENTADORA: MAYSA FURLAN
COORIENTADORA: TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA

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

Prof.ª Dr.ª MAYSA FURLAN (Participaçao Virtual)
Gabinete do Reitor e do Vice-reitor / Reitoria - RUNESP - UNESP

MAYSA FURLAN:06003111801
Assinado de forma digital por MAYSA FURLAN:06003111801
Dados: 2026.04.06 09:20:37 -03'00'

Prof. Dr. FERNANDO COTINGUIBA DA SILVA (Participaçao Virtual)
Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors / Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro

Prof.ª Dr.ª CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA (Participaçao Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Maranhão - UFMA - São Luís

Prof.ª Dr.ª HOSANA MARIA DEBONSI (Participaçao Virtual)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. MARCELO JOSÉ PENA FERREIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - USP - São Paulo

Araraquara, 30 de março de 2026.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
Nome **Data de nascimento**	OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA 15/07/1996
Nacionalidade	brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	SOUZA, O. A.;SOUZA, OTÁVIO AGUIAR;DE SOUZA, OTÁVIO A.;SOUZA, OTÁVIO A.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Bioquímica e Química Orgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (16) 996345705
Currículo Lattes	https://lattes.cnpq.br/5832359209230852
ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6841-390X
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
09/2020 - 03/2026	Doutorado em Química Instituição: UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, UNESP Araraquara. Agência financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil (Processos FAPESP 21/05646-2 e BEPE/FAPESP 23/04093-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil (Processo CAPES 88887.612514/2021-00). Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan
07/2018 - 10/2020	Mestrado em Química Instituição: UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, UNESP Araraquara.

	Agência financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil (Processo CNPq 134790/2018-9). Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo
02/2014-07/2018	Licenciatura em Química UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências – UNESP Bauru. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil (Processo FAPESP 15/20639-1). Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

SOUZA, OTÁVIO AGUIAR; RAMALHÃO, VITÓRIA GIOVANNA DA SILVA ; TRENTIN, LUCAS DE MELO ; FUNARI, CRISTIANO SOLEO ; CARNEIRO, RENATO LAJARIM ; BOLZANI, VANDERLAN DA SILVA ; RINALDO, DANIEL . Combining natural deep eutectic solvent and microwave irradiation towards the eco-friendly and optimized extraction of bioactive phenolics from Eugenia uniflora L..**Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 26, p. 100618, 2022.

SOUZA, OTÁVIO AGUIAR; FURLANI, RAFAEL PELEGRINO ; RAMALHÃO, VITÓRIA GIOVANNA DA SILVA ; BORGES, MAIARA STEFANINI ; FUNARI, CRISTIANO SOLEO ; BOLZANI, VANDERLAN DA SILVA ; RINALDO, DANIEL . Eco-friendly and inexpensive food grade bioethanol for Eugenia uniflora L. chromatographic fingerprinting: A trade-off between separation and sustainability. **Phytochemistry Letters**, v. 43, p. 200-207, 2021.

BORGES, MAIARA S.; ZANATTA, ANA C.; SOUZA, OTÁVIO A. ; PELISSARI, JOÃO H. ; CAMARGO, JÚLIO G.S. ; CARNEIRO, RENATO L. ; FUNARI, CRISTIANO S. ; BOLZANI, VANDERLAN S. ; RINALDO, DANIEL . A green and sustainable method for monitoring the chemical composition of soybean: an alternative for quality control. **Phytochemical Analysis**, p. 1-13, 2020.

ALARCON, RAFAEL T.; GAGLIERI, CAROLINE; DE SOUZA, OTÁVIO A.; RINALDO, DANIEL; BANNACH, GILBERT. Microwave-Assisted Syntheses of Vegetable Oil-Based Monomer: A Cleaner, Faster, and More Energy Efficient Route. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, p. 1265-1278, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s10924-020-01680-4

SOUZA, O. A.; CARNEIRO, R.L.; VIEIRA, T.H.M.; FUNARI, C.S.; RINALDO, D. Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by Means of a Green Statistically Developed HPLC-PAD Method. **Food Analytical Methods**, v. 11, p 1977–1985, 2018.

Capítulo de livro publicado

SOUZA, OTÁVIO AGUIAR; RINALDO, D. ; PORTO, C. M. ; SAMBRANO, J. R. ; MORGON, N. H. ; SOUZA, A. R. . Computer simulation applied to structural analysis

and experimental applications of natural deep eutectic solvents. In: Liliana L. Mammino. (Org.). **Green Chemistry and Computational Chemistry: Shared Lessons in Sustainability**. 1ed. Amsterdã: Elsevier, 2022, v. , p. 281-297.

Resumos de congressos publicados em anais de eventos durante o doutorado

SOUZA, O. A.; FURLAN, M.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; COURDAVAULT, V. . CYP716C52 of Monteverdia ilicifolia catalyzes the C2 oxidation of populnonic acid in the quinonemethide triterpenoids biosynthetic pathway. 2024.In: 48th FEBS Congress, Milão, Itália, LBR0309.

CASTRO, M. R. ; FURLAN, M. ; SOUZA, O. A. ; SOUZA-MOREIRA, T. M. ; VALENTINI, S. R. . modificações genéticas de levedura visando expressão de enzimas do tipo P450 e elucidação de etapas adicionais da via biossintética da pristimerina. 2024. In: XXXVI CIC - Congresso de Iniciação Científica Unesp, 2024, Araraquara. Anais do XXXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. São Paulo: UNESP, 2024.

SOUZA, O. A. ; SOUZA-MOREIRA, T. M. ; BOTERO, W. B. ; BICALHO, K. U. ; SANTONI, M. M. ; VALENTINI, S. R. ; FURLAN, M. . CYP716C58 and its role in celastrol biosynthetic pathway of Maytenus ilicifolia. 2023. In: Anais da 46ª RASBQ, Águas de Lindoia-SP, Brasil.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2024: 48th FEBS Congress, Milão, Itália (Pôster)

2023: 46ª Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindoia-SP (Pôster e apresentação oral)

2022: Reunião geral do CEPID-CIBFar, São Pedro-SP, Brasil (Apresentação Oral)

2020: 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ, Brasil (Pôster)

2019: II Workshop INCTBioNat, São Pedro-SP, Brasil (Pôster)

2018: XIII Workshop de Plantas Medicinais: em busca de produtos naturais, Botucatu-SP, Brasil. (Pôster premiado).

2017: 1ª fase do XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP- Faculdade de Ciências da UNESP, Bauru-SP, Brasil (Pôster)

2017: 6th Brazilian Conference on Natural Products/ XXXII RESEM, Vitória-ES, Brasil (Pôster e apresentação oral)

2017: III Escola de Inverno em Quimiometria – Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP, Brasil (Pôster)

2017: IUPAC 2017 - 46th World Chemistry Congress/ IUPAC 49th General Assembly/ 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo-SP, Brasil (Pôster)

2017: XI Semana da Química (Unesp Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual. - Faculdade de Ciências da UNESP, Bauru-SP, Brasil (Pôster premiado)

2017: XXI Disciplina Intersemestral do G6: Quimiometria – Instituto de Química da UNICAMP, Campinas-SP, Brasil

2016: 1ª fase do XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - Faculdade de Ciências da UNESP, Bauru-SP, Brasil (Pôster)

2016: 2ª fase do XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - Faculdade de Ciências da UNESP, Bauru-SP, Brasil (Pôster)

2016: 56° Congresso Brasileiro de Química Belém-PA, Brasil (Pôster e apresentação oral)

2016: X Semana da Química - UNESP Bauru - Faculdade de Ciências da UNESP Bauru-SP, Brasil.

2015: IX Semana da Química – UNESP, Bauru-SP, Brasil.

Dedico este trabalho à minha mãe, Iraci, e à minha avó, Senhorinha (*in memoriam*). Mesmo se eu perder todas as batalhas da vida, eu fui amado de verdade por vocês e eu não consigo imaginar uma vitória maior que essa.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão eterna à minha mãe, Iraci, que sempre me apoiou, mesmo sem me entender completamente. Sou muito grato por herdar sua coragem, ousadia, insistência e — mesmo que você não admita — teimosia para lutar pelo que acredito. Minha gratidão também à minha avó Senhorinha (*in memoriam*), talvez minha maior incentivadora em vida, que, mesmo nunca tendo pisado em um espaço de aprendizado "formal" e tendo sido analfabeta por boa parte de sua vida, sabia muito bem o valor da educação.

Meus sinceros agradecimentos à Professora Maysa Furlan, que conheci durante uma palestra na abertura do Congresso de Iniciação Científica da UNESP, muito antes de imaginar que eu faria pós-graduação, que seria orientado pela senhora, a qual se tornaria, futuramente, a primeira reitora da UNESP. Obrigado por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por me introduzir a uma ciência totalmente interdisciplinar e de fronteira, envolvendo a Química de Produtos Naturais, e por sempre ser firme, mas, ao mesmo tempo, muito educada, sensível e humana no trato com os alunos, entre os quais honrosamente me incluo. Obrigado pelos esforços para tornar a UNESP um espaço menos inóspito para pessoas como eu. A senhora é um orgulho para o nosso país.

Meus agradecimentos à Professora Doutora Tatiana Maria de Souza Moreira por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência, pelo treinamento e pelo apoio nos momentos difíceis, principalmente durante o estágio no exterior. Obrigado por tudo.

Meus agradecimentos ao Dr. Weslei Botero por todo conhecimento compartilhado, apoio com os experimentos e ajuda nos momentos difíceis. Você é um excelente pesquisador.

Quentin, merci pour tout l'amour, le chemin parcouru et le soutien au cours des deux dernières années. Merci pour tes paroles encourageantes, pour les moments très spéciaux avec ta famille, pour les dîners, pour les vins et pour le soutien inconditionnel que tu as manifesté envers ma réussite académique et mes recherches. Je ne sais pas ce que l'avenir nous réserve, mais je veux que tu sois toujours dans ma vie, peu importe comment. Je t'aime.

Ana Letícia, que linda surpresa foi ter te conhecido. Fiquei muito positivamente impressionado com os seus esforços para me ajudar nos momentos de (muito) desespero. Inteligentíssima, extremamente organizada, muito humana, com consciência racial e política, e muito divertida. Obrigado por me inspirar a dar o meu melhor como cientista e por me ajudar a lembrar por que estou fazendo um doutorado. Obrigado pela ajuda no laboratório, pelas caminhadas, pelas risadas, pelas fofocas e pelas suas tentativas de me acalmar no momento que considero o mais denso e desafiador da minha vida. Torço muito para que você seja absorvida pela academia. Você é exatamente o tipo de pessoa de que a academia precisa para se tornar mais humanizada e conectada à realidade brasileira. Você também tem todo o meu carinho e admiração, e acredito que, do ponto de vista social, conhecer você, o Weslei e o

Quentin foi o ponto alto do meu doutorado. Impossível não se encantar por vocês três. Muito obrigado por tudo!

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Leonardo di Filippo e ao Dr. Jonatas Lobato por todas as dicas acadêmicas e por praticamente me assessorarem no meu relacionamento com a Fapesp (seja em prestações de contas, dicas de prorrogação, BEPE, entre outros). Vocês são brilhantes, pessoas muito bacanas e a amizade de vocês (que começou por acaso, aliás) significou muito para mim durante esses anos em Araraquara. Obrigado pelas fofocas, pelas festas, pelas risadas, pelas viagens, pelos convites pra jantar e beber vinho quando eu saía cansado do laboratório, e por terem o perfil de cientista que eu espero ter um dia.

Toda a minha gratidão aos técnicos Juliana Rodrigues e João Bronzel. Vocês exercem o trabalho de vocês com excelência e maestria. São profissionais impecáveis, pessoas muito boas, e merecem toda a visibilidade e reconhecimento. Foi uma honra conhecê-los e conversar durante os almoços na Vandinha com a Ana Letícia. Na minha visão, vocês dois são os pilares do NuBBE. Parabéns pelo excelente trabalho!

Minha gratidão aos amigos do IQ, Marcelino, Éder, Natasha e Ariele. Obrigado pela ajuda e pelas muitas risadas, que nos faziam esquecer dos momentos de tensão. Foi realmente muito divertido e terapêutico. Toda a minha torcida para vocês também.

Minha gratidão aos colegas da FCFar Enzo, Ieda e Ana Júlia pelas dicas, fofocas e risadas enquanto executávamos os experimentos de biologia molecular. E Enzo, muito obrigado por me conectar com os membros do seu novo laboratório e assim possibilitar que eu usasse o biorreator.

Minha gratidão à Profa. Dra. Marcela Forgerini por todas as sugestões e conselhos, que foram vitais para que eu conseguisse um supervisor de estágio no exterior e colocasse a parte experimental do meu doutorado “nos trilhos”. Você é um doce. Adoro a forma delicada como você trata as pessoas.

Thank you, Professor Vincent Courdavault, for kindly hosting me in your laboratory and allowing me to deepen my knowledge of synthetic biology and metabolic engineering.

Thank you Professor Alain Goossens for the plasmids.

Thank you Professor Sotirios Kampranis and Yong Zhao for the authentic standards of wilforic acid C and salaspermic acid. They were really helpful during my PhD.

Thank you, Jonathan, Malorie, and Eva, for being among the sweetest people I have ever met in my life. Thank you for your friendship while I was in France, for all the advice, and for the fruitful discussions about being a minority in academia. And Jonathan, it is a pleasure to gossip with you every single day. Two years of friendship and counting!

Thank you, Renaud, for all the support while I was in France and for being an excellent example of what a scientist should be.

Thanks to the technicians Elfie, Issl, Florent, Céline e Marianne for all the help and technical support with UPLC analyses.

Obrigado à aluna de iniciação científica Mariana Castro por ter me enviado os plasmídeos durante o estágio-sanduíche e pelos esforços em me ajudar nas transformações em levedura. Adoro sua organização. Você tem um futuro brilhante pela frente. Seu empenho não será esquecido.

Obrigado à Dra. Mariana Marchi Santoni Biasoli por toda a ajuda na refiltragem dos candidatos para compreender como foi feita a seleção para clonagem.

Obrigado ao técnico Eduardo Rossini por todas as dicas no uso de MRM.

Obrigado à Professora Doutora Jéssica Amaral da UFScar por todas as dicas envolvendo o estabelecimento da metodologia de análise dos triterpenos.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Processos nº 88887.612514/2021-00 e 88887.549319/2020-00.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processos nº 2021/05646-2 e nº 2023/04093-5.

“Escrevo a miséria e a vida infausta dos favelados. Eu era revoltada, não acreditava em ninguém. Odiava os políticos e os patrões, porque o meu sonho era escrever e o pobre não pode ter ideal nobre.Eu sabia que ia angariar inimigos, porque ninguém está habituado a esse tipo de literatura. Seja o que Deus quiser. Eu escrevi a realidade”.

Carolina Maria de Jesus

“Qualquer um pode cozinhar”

Chef Auguste Gusteau, personagem fictício do filme *Ratatouille*

RESUMO

Triterpenos quinonametídeos (TQMs) constituem uma classe de compostos de especial interesse devido à sua potente atividade antitumoral. Esses metabólitos são marcadores químicos de plantas da família Celastraceae, da qual faz parte a espécie *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral, pertencente à biodiversidade brasileira. O acúmulo muito reduzido de TQMs nas raízes dessa espécie aliado à sua complexidade química (que dificulta o desenvolvimento de rotas de síntese eficientes) e o conhecimento ainda parcial das etapas da sua via biossintética em *M. ilicifolia* motivou a integração de ferramentas da engenharia metabólica e da biologia sintética para a reconstituição de etapas da sua biossíntese nos sistemas heterólogos *Nicotiana benthamiana* e *Saccharomyces cerevisiae*. A análise transcriptômica, associada ao nível de expressão de genes nas raízes, orientou previamente a clonagem das sequências codificadoras de nove enzimas da família citocromo P450 em vetores de expressão em *S. cerevisiae*, sistema no qual elas foram caracterizadas funcionalmente. Paralelamente, as sequências de sete dessas nove enzimas foram clonadas e caracterizadas em *N. benthamiana*. Em ambos os sistemas heterólogos, quatro enzimas apresentaram atividade catalítica e produziram intermediários biossintéticos dos TQMs, identificados como ácido wilfórico C, ácido salaspérmico e ácido 24-carboxi-polpunônico. O ácido wilfórico C foi produzido em larga escala tanto em *S. cerevisiae* quanto em *N. benthamiana*, enquanto o ácido salaspérmico e o ácido 24-carboxi-polpunônico foram produzidos em larga escala apenas em *N. benthamiana*. A análise cromatográfica das raízes permitiu, pela primeira vez, a anotação desses mesmos compostos na planta nativa produtora. Esse resultado sugere que esses compostos não sejam apenas artefatos produzidos nos sistemas heterólogos, mas possam estar efetivamente envolvidos na via biossintética dos TQMs. Assim, os resultados obtidos fornecem uma base para a futura identificação de etapas oxidativas subsequentes envolvidas nessa biossíntese, contribuindo para viabilizar a futura produção biotecnológica em larga escala dos TQMs para sua aplicação farmacológica.

Palavras-chave: Biossíntese; Terpenos; Biologia Sintética; Biocatálise.

ABSTRACT

Quinonemethide triterpenes (QMTs) constitute a class of compounds of particular interest because of their potent antitumor activity. These metabolites are chemical markers of plants belonging to the Celastraceae family, which includes *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral, a species from Brazilian biodiversity. The very low accumulation of QMTs in the roots of this species, together with their chemical complexity (which hinders the development of efficient synthetic routes) and the still partial knowledge of the steps involved in their biosynthetic pathway in *M. ilicifolia*, motivated the integration of metabolic engineering and synthetic biology tools to reconstitute stages of their biosynthesis in the heterologous systems *Nicotiana benthamiana* and *Saccharomyces cerevisiae*. Transcriptomic analysis, combined with gene expression levels in roots, previously guided the cloning of the coding sequences of nine enzymes from the cytochrome P450 family into expression vectors for *S. cerevisiae*, a system in which they were functionally characterized. In parallel, the sequences of seven of these nine enzymes were cloned and characterized in *N. benthamiana*. In both heterologous systems, four enzymes showed catalytic activity and produced biosynthetic intermediates of QMTs, identified as wilforic acid C, salaspermic acid, and 24-carboxy-polpunonic acid. Wilforic acid C was produced on a large scale in both *S. cerevisiae* and *N. benthamiana*, whereas salaspermic acid and 24-carboxy-polpunonic acid were produced on a large scale only in *N. benthamiana*. Chromatographic analysis of the roots enabled, for the first time, the annotation of these same compounds in the native producing plant. This result suggests that these compounds are not merely artifacts produced in the heterologous systems, but may be effectively involved in the QMT biosynthetic pathway. Thus, the results obtained provide a foundation for the future identification of subsequent oxidative steps involved in this biosynthesis, contributing to enabling the future large-scale biotechnological production of QMTs for pharmacological application.

Keywords: Biosynthesis; Terpenes; Synthetic Biology; Biocatalysis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA.....21
1.1 Biologia sintética e seu papel na revitalização da Química de Produtos Naturais na era pós-genômica.....21
1.2 Uso de sistemas heterólogos em biologia sintética para reconstituir a biossíntese de compostos naturais 23
1.3 Potencial da Biologia Sintética para se explorar o potencial de triterpenos bioativos – Contribuições do Brasil 27
1.4 Uma proposta de biogênese de triterpenos quinonametídeos em *M. ilicifolia*.....38
1. 5. Elucidação da via biossintética do celastrol em *Tripterygium wilfordii*.....43
1.5 Questões remanescentes a respeito da atividade catalítica de enzimas homólogas e da biossíntese de TQMs - justificativa da tese.....49
1.6 Objetivos 51
1.6.1 Objetivos gerais.....51
1.6.2 Objetivos específicos.....51
CAPÍTULO 2 – Clonagem e caracterização de enzimas de *M. ilicifolia* via expressão heteróloga em *N. benthamiana* 52
2.1 Materiais e reagentes.....52
2.1.1 Preparação de amostras e suporte laboratorial.....52
2.1.2 Materiais para Biologia Molecular e Microbiologia 52
2.1.3 Incubação e Esterilização.....53
2.1.4 Solventes.....53
2.1.5 Meios de cultura, suplementação e material pra incubação.....53
2.1.6 Antibióticos.....53
2.1.7 Enzimas, tampões e kits de clonagem e purificação.....53
2.1.8 Outros reagentes para experimentos de biologia molecular 54
2.1.9 Linhagens celulares 54
2.1.10 Padrões analíticos.....54
2.2 Metodologia.....56
2.2.1 Seleção de candidatos de enzimas P450 para clonagem em vetores de expressão de S. cerevisiae a partir do montagem de novo do transcriptoma de M. ilicifolia.....56
2.2.2 Experimentos de clonagem, transformação de células de A. tumefaciens e caracterização funcional de enzimas P450 de M. ilicifolia via expressão transiente em N. benthamiana.....59

2.2.2.1 Purificação de plasmídeos contendo a sequência codificadora de enzimas potencialmente atuantes na biossíntese de QMTs.....59

2.2.2.2 Clonagem Golden Gate: Estratégia para desenho de primers e domesticação de cds para correta amplificação de sequências de enzimas OSC e P450 61

2.2.2.3 Amplificação das sequências codificadoras de enzimas OSC e P450.....68

2.2.2.4 Purificação dos fragmentos amplificados 68

2.2.2.5 Clonagem via tecnologia *Golden Gate* – Reações para montagem de vetores pHREAC contendo enzimas OSC ou P450 de *M. ilicifolia* como inserto.....69

2.2.2.6 Transformação de células de *E. coli* competentes (TOP10) 71

2.2.2.7 PCR de colônia 71

2.2.2.8 Diagnósticos de restrição 72

2.2.2.9 Sequenciamento Automatizado de Sanger 73

2.2.2.10 Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* competentes por eletroporação 74

2.2.2.11 Agroinfiltração das folhas de *N. benthamiana* 75

2.2.2.12 Infiltração em larga escala das folhas de N*. benthamiana* visando produção heteróloga de ácido wilfórico C em escala de miligramas.....77

2.2.2.13 Infiltração em larga escala das folhas de *N. benthamiana* visando produção heteróloga de ácido 24-hidroxipolpunônico e ácido 24-carboxipolpunônico em escala de miligramas.....77

2.2.2.14 Preparo de amostra – Detecção de friedelina por cromatografia gasosa....78

2.2.2.16 Preparo de amostra – Detecção de derivados oxidados de friedelina por cromatografia líquida (injeção no sistema UHPLC-ESI-qTOF-MS) 78

2.3 Resultados e discussão.....80

2.3.1 PCR de colônia e diagnósticos de restrição para confirmação inicial de clonagens no vetor pHREAC – enzimas MiFRS4, MiCYP716C52 e enzimas de subfamília CYP716E 80

2.3.2 Sequenciamento Automatizado de Sanger para confirmação definitiva de clonagens no vetor pHREAC – enzimas MiFRS4, MiCYP716C52 e enzimas de subfamília CYP716E 89

2.3.4 Sequenciamento automatizado de Sanger para confirmação definitiva de clonagens no vetor pHREAC e mutação pontual – enzimas CYP712K4 e MiCYP716A280 domesticadas.....97

2.3.5 Clonagens no vetor de expressão pHREACΔBsaI::BsmBI – enzimas MiCYP716C58 e MiCYP81AM4 101

2.3.6 Sequenciamento automatizado de Sanger para confirmação definitiva de clonagens no vetor pHREAC modificado – enzimas MiCYP716C58 e MiCYP81AM4 104

2.3.7 Clonagem no vetor de expressão pHREACΔBsaI::BsmBI – enzima MiCYP716C57.....105

2.3.8 Transformações de A. tumefaciens com plasmídeos recombinantes contendo sequências de enzimas de M. ilicifolia 107
2.3.5 Expressão transiente da enzima oxidosqualenociclase MiFRS4 de M. ilicifolia em N. benthamiana 113
.....114
2.3.6 Caracterização funcional de enzimas P450 de M. ilicifolia em N. benthamiana 115
2.3.6 Expressão transiente em larga escala de enzimas P450 nas folhas de N. benthamiana.....125
2.3.7 Considerações preliminares acerca da biossíntese de TQMs em M. ilicifolia129
.....130
CAPÍTULO 3 – Caracterização de enzimas de *M. ilicifolia* via expressão heteróloga em *S. cerevisiae* e comparação dos metabólitos produzidos com os originalmente acumulados na planta nativa.....134
3.1 Materiais e reagentes.....134
3.1.1 Preparação de amostras e suporte laboratorial.....134
3.1.2 Materiais para Biologia Molecular e Microbiologia 135
3.1.3 Incubação e Esterilização.....135
3.1.4 Reagentes e Insumos Cromatográficos 135
3.1.5 Solventes.....135
3.1.6 Meios de cultura, suplementação e material pra incubação.....136
3.1.7 Antibióticos.....136
3.1.8 Enzimas, tampões e kits de clonagem e purificação.....136
3.1.9 Outros reagentes para experimentos de biologia molecular 136
3.1.10 Linhagens celulares 139
3.1.11 Padrões analíticos.....139
3.1.12 Material vegetal 139
3.2 Metodologia.....140
3.2.1 Purificação de DNA plasmidial 140
3.2.2 Transformação de levedura de alta eficiência (TRAFO).....141
3.2.3 PCR de colônia para levedura.....144
3.2.4. Cultivo das leveduras transformadas e indução de expressão 147
3.2.5 Extração dos triterpenos produzidos – friedelina e derivados oxidados.....147
3.2.6 Cultivo em larga escala da levedura OA04 em biorreator 148
3.2.7 Extração de metabólitos produzidos em biorreator 149
3.2.8 Análises por CG-MS – verificação da produção de friedelina 149
3.2.9 Curva de calibração para quantificação de friedelina.....150

3.2.10 Análises por HPLC-ESI-IT-MS 150
3.2.11 Análises por UPLC-ESI-QqQ-MS/MS.....151
3.2.12 Análises no sistema UHPLC-ESI-qTOF-MS.....152
3.2.13 Fracionamento dos extratos de N. benthamiana e isolamento dos compostos produzidos.....152
3.2.14 Extração dos metabólitos das raízes e folhas de M. ilicifolia - comparação entre os metabólitos produzidos via expressão heteróloga em levedura e tabaco e os produzidos pela espécie nativa 156
3.3. Resultados e Discussão.....158
3.3.1 Seleção da linhagem de S. cerevisiae a ser utilizada como sistema heterólogo 158
3.3.2. Seleção de vetores recombinantes para produção heteróloga do intermediário friedelina.....159
3.3.3 Transformação de linhagem KB13: Seleção de vetores recombinantes para produção heteróloga do intermediário ácido maitenoico e resultados de PCR de colônia.....162
3.3.4 Transformações da levedura OA03 - obtenção de sistemas heterólogos para caracterização funcional de enzimas P450 de M. ilicifolia não publicadas via biossíntese combinatória.....167
3.3.5 Caracterização funcional das enzima friedelina sintase de M. ilicifolia em S. cerevisiae – avaliação inicial da expressão enzimática e da capacidade de captura dos triterpenos produzidos pela adição de metil-β-ciclodextrina 174
2.3.6 Caracterização funcional das enzimas da família citocromo P450 de M. ilicifolia em S. cerevisiae via sistema HPLC-ESI-IT-MS.....179
2.3.7 Fermentação da levedura OA04 em biorreator 187
.....192
3.3.8 Análises por UPLC-ESI-qTOF-MS 194
.....198
3.3.9 Análises por UPLC-QqQ-MS/MS (Multiple Reaction Monitoring) 200
3.3.10 Fracionamento dos extratos NB_C52 e NB_AM4 e tentativa de isolamento dos compostos produzidos em N. benthamiana.....210
.....213
.....224
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS 225
REFERÊNCIAS.....227
APÊNDICE.....240
ANEXO A- ESPECTROS DE MASSA.....240
.....240

ANEXO B - Primers 260

ANEXO C - Protocolos 261

C-1- Drop-out usado para preparo de meio sintético completo sem uracila (SC-URA) 261

C-2- Drop-out usado para preparo de meio sintético completo sem uracila e histidina (SC-URA-HIS) 262

C-3- Drop-out usado para preparo de meio sintético completo sem uracila, histidina e leucina (SC-URA-HIS-LEU) 263

C-4- Drop-out usado para preparo de meio sintético completo sem uracila, histidina, leucina e triptofano (SC-URA-HIS-LEU-TRP) 264

C-5- Clonagem Gateway 265

C-6- Preparação de bactéria termocompetente (Escherichia coli) TOP 10 266

C-7- Preparação de Agrobacterium tumefaciens eletrocompetente GV3101 267

C-8 - Clonagem das sequências codificadoras das enzimas CYP712K4, MiCYP716C52 e MiCYP81AM4 em vetores de integração por CRISPR/Cas9 268

C-9- Procedimento para integração das enzimas CYP712K4, MiCYP716C52 e MiCYP81AM4 no genoma da linhagem CEN.PK113 7D utilizando CRISPR/Cas9 . 269

ANEXO D – Resultados de Sequenciamento Automatizado de Sanger 271

ANEXO E – Sequências primárias das enzimas P450 de *M. ilicifolia* 290

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA

1.1 Biologia sintética e seu papel na revitalização da Química de Produtos Naturais na era pós-genômica

A natureza é a maior origem da diversidade estrutural de substâncias bioativas e uma quantidade significativa de substâncias com propriedades terapêuticas para humanos são produtos naturais e derivados ou substâncias sintetizadas tendo produtos naturais como modelo (ATANASOV *et al*., 2021; MISHRA;TIWARI, 2011; KINGHORN *et al.,* 2011; NEWMAN; CRAGG, 2020; HARVEY*,* EDRADA-EBEL, QUINN, 2015).

Entre 1981 e 2019 por exemplo, substâncias relacionadas a produtos naturais (PN), sejam elas obtidas diretamente da natureza, modificadas a partir das mesmas ou desenvolvidas baseadas em suas estruturas químicas, corresponderam a aproximadamente 65% dos novos medicamentos aprovados (NEWMAN; CRAGG, 2020). Entretanto, apesar dos numerosos casos bem-sucedidos observados no período áureo da descoberta de fármacos baseada em produtos naturais, dificuldades importantes passaram a surgir no início da década de 1990, contribuindo para a diminuição do interesse da indústria farmacêutica nos mesmos (ATANASOV *et al*., 2021). Entre esses entraves, destacava-se a recorrente identificação de substâncias já previamente conhecidas. Adicionalmente, o acúmulo muito reduzido que compostos bioativos podem apresentar em fontes naturais, aliados a barreiras técnicas como dificuldades de isolamento, limitações de oferta e complexidade química que dificulta o estabelecimento de rotas de síntese eficazes para os mesmos também tem sido obstáculos históricos para o interesse industrial pela pesquisa em PN (SHEN, 2015; ATANASOV *et al*., 2021; SESHADRI *et al*., 2025).

Sob uma perspectiva histórica, a identificação, isolamento e a elucidação estrutural de produtos naturais foram conduzidos principalmente por químicos da área, os quais, após analisarem extratos de plantas e microrganismos na busca por atividades biológicas inéditas e notarem efeitos promissores, enriqueciam frações ativas e procediam com a identificação de compostos responsáveis por tais efeitos. Nesse contexto, embora conhecimentos de botânica, bacteriologia e micologia fossem relevantes, um domínio detalhado de bioquímica ou biologia molecular não era esperado ou essencial para a condução racional dessas investigações (SESHADRI *et al*., 2025). Somado a isso, antes do advento da genômica, a escassez de dados por

muito tempo inviabilizou a investigação eficaz de rotas metabólicas e dos genes ou enzimas associados à biossíntese de produtos naturais, impedindo sua produção em larga escala. A caracterização dessas rotas, baseada em estratégias como marcação isotópica, por exemplo, era demorada e trabalhosa, e o progresso na elucidação das vias se mostrava limitado e lento (HERBERT, 2003; CHENG *et al*., 2025).

Em contraste, a partir da década de 1990, com a consolidação de abordagens orientadas por genes para o estudo da biossíntese de produtos naturais, os determinantes genéticos associados à produção desses metabólitos passaram a receber relevância (SESHADRI *et al*., 2025). Avanços na biologia molecular levaram a área a priorizar estratégias de clonagem baseada em homologia e a busca por mutantes que modificavam perfis metabólicos, visando isolar enzimas biossintéticas específicas (CHENG *et al*., 2025). Isso permitiu por exemplo que Unterlinner, Lenz e Rainer (1999) identificassem genes importantes envolvidos na biossíntese da morfina. Em anos mais recentes, ocorreu uma reconfiguração ainda maior na pesquisa nesse âmbito e por consequência em química de produtos naturais de modo geral, a qual, integrada a outras áreas do saber, foi revitalizada majoritariamente devido à incorporação de estratégias de descoberta de produtos naturais com o uso de tecnologias *in silico* ou experimentais orientadas por genômica e transcriptômica, aliadas ao emprego de ferramentas avançadas da biologia sintética, a qual pode ser definida como a área do conhecimento que realiza o *design* racional, construção e reprogramação de sistemas biológicos visando a obtenção de comportamentos biológicos definidos que podem ser úteis para os mais variados interesses (SESHADRI *et al*., 2025; CHALLIS, 2008; BACHMANN, VAN LANEN, BALTZ, 2014; ENDY, 2005, ATANASOV *et al*., 2021).

Assim, na era pós-genômica, avanços em bioinformática possibilitaram, a partir de genomas, a identificação de agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs), um grupo de genes reunidos que codificam enzimas para a biossíntese de um produto natural. Esses mesmos avanços propiciaram a predição de estruturas e funções de proteínas, a desreplicação estrutural computacional, além da disponibilidade de bancos de dados públicos possibilitar que a pesquisa em PN também se tornasse um campo rico em informação e, em grande medida, independente do organismo produtor de compostos naturais, desde que haja informação genômica disponível a respeito dele. Esses avanços, aliados aos rápidos progressos em sequenciamento genômico,

na edição gênica, na síntese e montagem de genes, e na engenharia de proteínas possibilitaram pesquisas multidisciplinares visando explorar de modo pleno e otimizado o potencial do repertório químico da natureza para a descoberta de fármacos, a biomanufatura e a síntese sustentável (SESHADRI *et al*., 2025; MEDEMA; FISCHBACH, 2015, KIM *et al*., 2023).

Com uso coletivo de genômica comparativa e funcional, transcriptômica e metabolômica, o número de genes potencialmente ativos em um via metabólica puderam finalmente ser reduzidos, e após essa filtragem, a comparação de amostras com diferentes níveis de metabólitos possibilitou a identificação desses genes candidatos, os quais poderiam ser validados por superexpressão ou tecnologias como CRISPR, e ter suas funções finalmente confirmadas por análises metabolômicas. Essa abordagem se tornou ainda mais capaz de elucidar vias biossintéticas complexas quanto integradas ao emprego de sistemas de expressão heterólogos que possibilitassem caracterização funcional desses genes candidatos (SUN *et al*., 2022; DIXON; DICKSON, 2024; CHENG *et al*., 2025), os quais podem ser manipulados via engenharia metabólica, isto é, a alteração direcionada das redes metabólicas, regulatórias e de sinalização em sistemas celulares a nível genético e molecular, visando propiciar e otimizar a biossíntese de moléculas de interesse. Assim, nos últimos 30 anos, avanços expressivos na produção heteróloga de compostos de interesse foram obtidos pela convergência entre engenharia metabólica, biologia sintética, biologia de sistemas e métodos de ciência de dados (KIM *et al*., 2023).

1.2 Uso de sistemas heterólogos em biologia sintética para reconstituir a biossíntese de compostos naturais

Dentre os vários sistemas heterólogos utilizado em estudos biossintéticos, o organismo *Saccharomyces cerevisiae* se notabiliza como o principal eucarioto em aplicações da biologia sintética, em partes por ter sido o primeiro organismo eucariótico a ter o seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU *et al*., 1996). Sua compartimentalização celular semelhante a de eucariotos mais complexos favorece a expressão e caracterização funcional de enzimas vegetais, sendo considerado o padrão “ouro” como sistema heterólogo para biossíntese e produção biotecnológica de compostos de plantas. Também, seus sistemas de endomembranas também contribuem para a produção eficaz de proteínas vegetais de maior complexidade estrutural, como as enzimas oxidoredutases do tipo citocromo P450

(CYPs). Essas enzimas pertencem a uma das maiores superfamílias enzimáticas de plantas; em algumas espécies, cerca de 1% de todos os genes codificam CYPs. Elas se destacam pela elevada capacidade de catalisar reações altamente régio- e estereosseletivas em substratos complexos (MALHOTRA; FRANKE, 2022; NELSON; WERCK-REICHHART, 2011). Enzimas P450 de plantas, em seus organismos de origem, estão associadas ao retículo endoplasmático. Dessa forma, em procariotos, a expressão de tais enzimas costuma apresentar pouca confiabilidade e limitações, o que torna *S. cerevisiae* um sistema heterólogo atrativo para sua caracterização. Além disso, atributos como rápido crescimento, ferramentas genéticas amplamente consolidadas e o status de GRAS (*Generally Recognized as Safe;* ZHAO *et al.*, 2024b) são motivos adicionais que despertam o interesse no seu uso para produção biotecnológica de fitocompostos (WONG *et al*., 2022; WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000; SESHADRI *et al*., 2025). A possibilidade do organismo *S. cerevisiae* superexpressar enzimas de interesse através de estratégias relacionadas à engenharia metabólica como otimização de códons, aumento do número de cópias de genes, por exemplo, aliados à seleção de vetores de expressão apropriados e regulação transcricional também o tornam atrativo do ponto de vista biotecnológico e biossintético (ZHAO *et al*., 2024b).

Um exemplo mais antigo porém proeminente de produção bem sucedida de fitocompostos em levedura é o ácido artemisínico (Fig. 1, à esquerda, RO *et al*., 2006). Sua produção heteróloga em *S. cerevisiae* viabilizou sua produção em quantidades apreciáveis e com significativa redução de custos em comparação à extração convencional desse composto da planta *Artemisia annua* (HOFF *et al*., 2021; DURAIRAJ, HUR;YUN, 2016; PADDON *et al*., 2013). O ácido artemisínico é um terpeno precursor da artemisinina, importante droga antimalárica (TU, 2011; SHEN, 2015), cuja descoberta laureou a cientista Tu Youyou em conjunto com os cientistas William C. Campbell e Satoshi Ōmura com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina do ano de 2015. A extração ineficiente e o consequente custo elevado da artemisinina a princípio limitavam seu suprimento para regiões mais pobres assoladas por endemias de malária. Essas adversidades foram superadas por esforços do grupo do renomado cientista Jay Keasling, que em conjunto com a Universidade Berkeley (EUA) e a empresa biotecnológica Amyris, aplicou de maneira bem sucedida o uso tecnologias fermentativas para produzir o precursor ácido artemisínico na

concentração de 25g/L, possibilitando a posterior semissíntese eficiente da artemisinina (PADDON *et al*., 2013). Esta tecnologia tem sido aplicada pela empresa Sanofi desde 2013 e é um marco na produção biotecnológica de drogas terapêuticas (HOFF *et al*., 2021).

No entanto, apesar de alguns exemplos bem-sucedidos de produção heteróloga de compostos de interesse em leveduras, geralmente essa produção ocorre apenas em níveis traço, e a otimização do processo em termos de escalabilidade não é trivial, a depender do caso. Por exemplo, estima-se que o desenvolvimento da plataforma de levedura bem-sucedida para a produção de ácido artemisínico tenha exigido mais de 150 pessoa-anos de esforços (REED *et al*., 2017; KWOK, 2010). Outro exemplo mais recente é um trabalho publicado na *Nature* (LIU *et al*., 2024) e coordenado por Keasling que elucidou em *S. cerevisiae* a via de biossíntese do composto QS21 (cujo isômero majoritário é apresentado na Fig. 1, à direita). Trata-se de um potente adjuvante de vacina, clinicamente aprovado para uso em humanos e que se encontra em baixíssimas concentrações em sua fonte natural, a espécie vegetal *Quillaja saponaria*, nativa do Chile. 38 enzimas foram introduzidas em *S. cerevisiae* para reconstituir a biossíntese desse composto, mas obteve-se o rendimento de apenas 0,0012% (m/m) de QS-21 por massa de células secas de levedura.

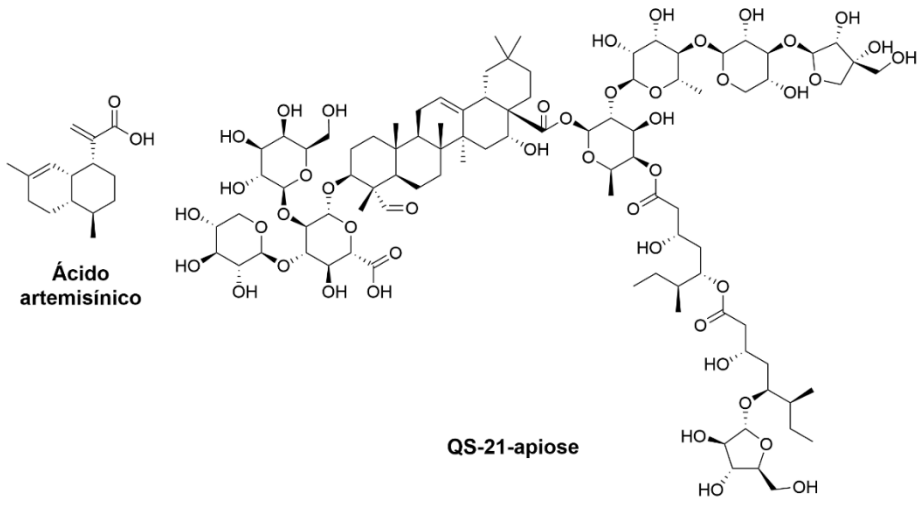


Figura 1: Estrutura do ácido artemisínico (à esquerda) e o isômero que apresenta a forma majoritária da saponina QS-21 (QS-21-apiose, com a presença de β-D-apiofuranose; à direita), exemplos notáveis de metabólitos de planta com biossíntese reconstituída em *S. cerevisiae*. **Fonte**: RO *et al*., 2006; LIU *et al*., 2024.

Evidentemente as linhagens de levedura podem ser submetidas a otimizações futuras com vistas a aumentar essa produção, mas isso é um indicativo de que, apesar

da vasta experiência de diversos grupos de pesquisa bem estabelecidos em engenharia metabólica/bioquímica e biologia sintética, transformar leveduras em biofábricas eficientes para a produção, em escala preparativa, de metabólitos heterólogos ainda constitui um grande gargalo, sendo dificultado pelo conhecimento crescente, porém ainda limitado, sobre processos celulares e/ou de engenharia específicos e complexos, indispensáveis para escalar esse tipo de produção (SESHADRI *et al*., 2025; NIELSEN;KEASLING, 2016).

Uma alternativa mais simples para se realizar a produção de compostos-alvo rapidamente e com a possibilidade de se atingir a escala de gramas é utilizar plantas como hospedeiros heterólogos. Além de necessitarem apenas de nutrientes inorgânicos simples, dióxido de carbono, água e luz solar para um crescimento eficiente, algumas espécies vegetais podem compartilhar compartimentalização, cofatores e coenzimas comuns com outras. É o caso de *Nicotiana benthamiana* (Figura 2), um parente silvestre do tabaco, cujas vantagens tornaram essa espécie inclusive uma plataforma de fabricação atualmente empregada para vacinas recombinantes, por exemplo, contra influenza e COVID-19 (MOLINA-HIDALGO *et al*., 2021).



Figura 2: Individuos de *Nicotiana benthamiana*. **Fonte:** Arquivo pessoal

Em particular, essa espécie é adequada para expressão transiente mediada por *Agrobacterium*, processo no qual suas folhas são infiltradas com uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* contendo vetores modificados com genes de interesse clonados (por exemplo, enzimas P450 de interesse), permitindo a transferência facilitada desses genes para a planta. Essa abordagem é rápida, pois possibilita a expressão gênica e a detecção da proteína-alvo ou do produto desejado em poucos

dias. QS-21 é um exemplo de metabólito que, além de *S. cerevisiae*, também teve sua biossíntese reconstituída em *N. benthamiana* (MARTIN *et al*., 2024). Além da possibilidade de compartimentalização de vias tanto no nível celular quanto no nível de tecido, uma vantagem notável é a possibilidade de realizar co-infiltrações simultâneas de diferentes linhagens de *Agrobacterium* contendo distintos construtos de expressão, o que viabiliza a expressão de vias multietapas e, consequentemente, a realização de biossíntese combinatória. O processo pode ser facilmente escalonado para aumentar a produção dos compostos desejados com o uso de dezenas ou centenas de plantas, aumentando as possibilidades de seu posterior isolamento e a elucidação estrutural confiável (CARQUEIJEIRO *et al*., 2020; REED *et al*., 2017; REED E OSBOURN, 2018; STEPHENSON *et al*., 2018; MOLINA-HIDALGO *et al*., 2021; COURDAVAULT *et al*., 2021).

Em particular, o uso de ferramentas biotecnológicas que permitem converter uma cultura não alimentar, como *N. benthamiana*, em uma biofábrica para a produção em larga escala de terpenos de valor agregado oferece perspectivas positivas e soluções aplicáveis no mundo real para contornar as limitações da extração a partir de fontes naturais ou da síntese total de produtos naturais estruturalmente complexos, em termos de rendimento, viabilidade e sustentabilidade. Essa estratégia possibilita a transição para uma economia circular ao aumentar a produtividade e, simultaneamente, ajudar a reduzir (ou mesmo evitar completamente) o uso de insumos petroquímicos perigosos, não renováveis e/ou de origem sintética, substituindo-os por alternativas de base biológica. Ela representa uma contribuição sólida para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 das Nações Unidas e, portanto, espera-se que seja uma solução eficaz e um ativo robusto em direção a uma bioeconomia moderna e sustentável (FRENCH, 2019; MOLINA-HIDALGO *et al*., 2021).

1.3 Potencial da Biologia Sintética para se explorar o potencial de triterpenos bioativos – Contribuições do Brasil

As tecnologias e abordagens supracitadas podem ser empregadas para se explorar de modo mais racional e dinâmico o potencial farmacológico dos cerca de 500.000-600.000 produtos naturais, de potencial muitas vezes desconhecido, que têm sido isolados até os dias atuais (SESHADRI *et al*., 2025), além dos possíveis 5 milhões

que ainda não foram descobertos mas que são estimados segundo predições de agrupamentos de genes biossintéticos, ou BGCs (WALSH;TANG, 2022).

Dentre toda essa multiplicidade de compostos, os terpenos constituem a maior classe de produtos naturais, com mais de 75.000 representantes já descritos. É um consenso na literatura que a biossíntese dos compostos dessa classe ocorre a partir da polimerização de unidades de cinco carbonos derivadas do pirofosfato de isopentenila, especificamente o Δ^2-isoprenil pirofosfato (também denominado pirofosfato demetilalila, ou DMAPP, em verde, Figura 3) e o Δ^3-isoprenil pirofosfato (ou pirofosfato de isopentenila, IPP, em rosa, Figura 3). Etapas de alongamento de sua cadeia carbônica e subsequente ciclização são conduzidas pela geração e neutralização de carbocátions (GERSHENZON E DUDAREVA, 2007; SESHADRI *et al*., 2025).

Terpenos com 10,15, 20 e 25 átomos de carbono são denominados respectivamente monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos. Além disso, a dimerização do pirofosfato de farnesila (FPP, C-15) origina o esqualeno (C-30). Curiosamente, derivados do esqualeno (C-30, em laranja, Fig. 3) ou de outros precursores C-30 relacionados ao esqualeno e que apresentam como blocos construtores as unidades isoprênicas supracitadas IPP e DMAPP (Fig. 3) constituem o grupo dos triterpenos, o maior grupo de produtos naturais derivados especificamente de plantas reunindo mais de 20.000 substâncias conhecidas e apresentando elevada diversidade estrutural (~200 esqueletos triterpênicos) (XU, FAZIO, MATSUDA, 2004; PETRONELLI, PANNITTERI, TESTA, 2009; SESHADRI *et al*., 2025; HILL, CONNOLLY, 2020; REN, KINGHORN, 2019; GHOSH *et al.*, 2021).

Do ponto de vista enzimático e, consequentemente, biossintético, a literatura afirma que triterpenos são produzidos pela via do mevalonato (Fig. 3, em preto, LU *et al*., 2021), na qual o esqualeno (no caso de bactérias) e o 2,3-epoxidoesqualeno (no caso de animais, fungos e plantas; em azul, Fig. 3) são produzidos antes de sofrer uma série de ciclizações enzimáticas complexas (THIMMAPPA *et al.*, 2014). As enzimas que catalisam a biossíntese dos triterpenos dividem-se em dois grandes grupos: (1) as esqualeno-hopeno ciclases (SHC), responsáveis por converter o esqualeno em hopeno e (2) oxidoesqualeno ciclases (OSC), conversoras do 2,3-epoxidoesqualeno (ou 2,3-oxidosqualeno; RACOLTA *et al.,* 2012). No caso de plantas, por exemplo, o intermediário 2,3-oxidoesqualeno é ciclizado em conformação

cadeira-cadeira-cadeira (C-C-C) para síntese dos triterpenos (THIMMAPPA *et al*., 2014). Como primeira etapa biossintética dos triterpenos especializados em plantas, o intermediário 2,3-epoxidoesqualeno é protonado no grupamento epóxido para posterior ciclização e rearranjos de carbocátion, de modo que triterpenos pentacíclicos, sejam formados por meio de oxidosqualenociclases (LU *et al.,* 2021; WANG *et al*., 2010; SOUZA-MOREIRA *et al*., 2016; ALVES *et al*., 2018; HAN *et al*., 2019). Especificamente, as enzimas OSCs estabelecem a fronteira entre o metabolismo primário e secundário das plantas considerando seu caráter produto-específico e por sua competição pelo substrato 2,3-epoxidoesqualeno para a biossíntese de fitosteróis e triterpenos pentacíclicos (LU *et al*., 2021). Para fins de clareza, a Fig. 3 inicialmente apresenta apenas as vias do metil-eritrolfosfato (MEV, em cinza), que ocorre nos cloroplastos, em fronteira com a via do mevalonato (MVA, em preto), que ocorre no citoplasma e é responsável pela biossíntese do 2,3-epoxidosqualeno (ou 2,3-oxidosqualeno), o qual posteriormente será o substrato de outros triterpenos que serão apresentados durante o texto.

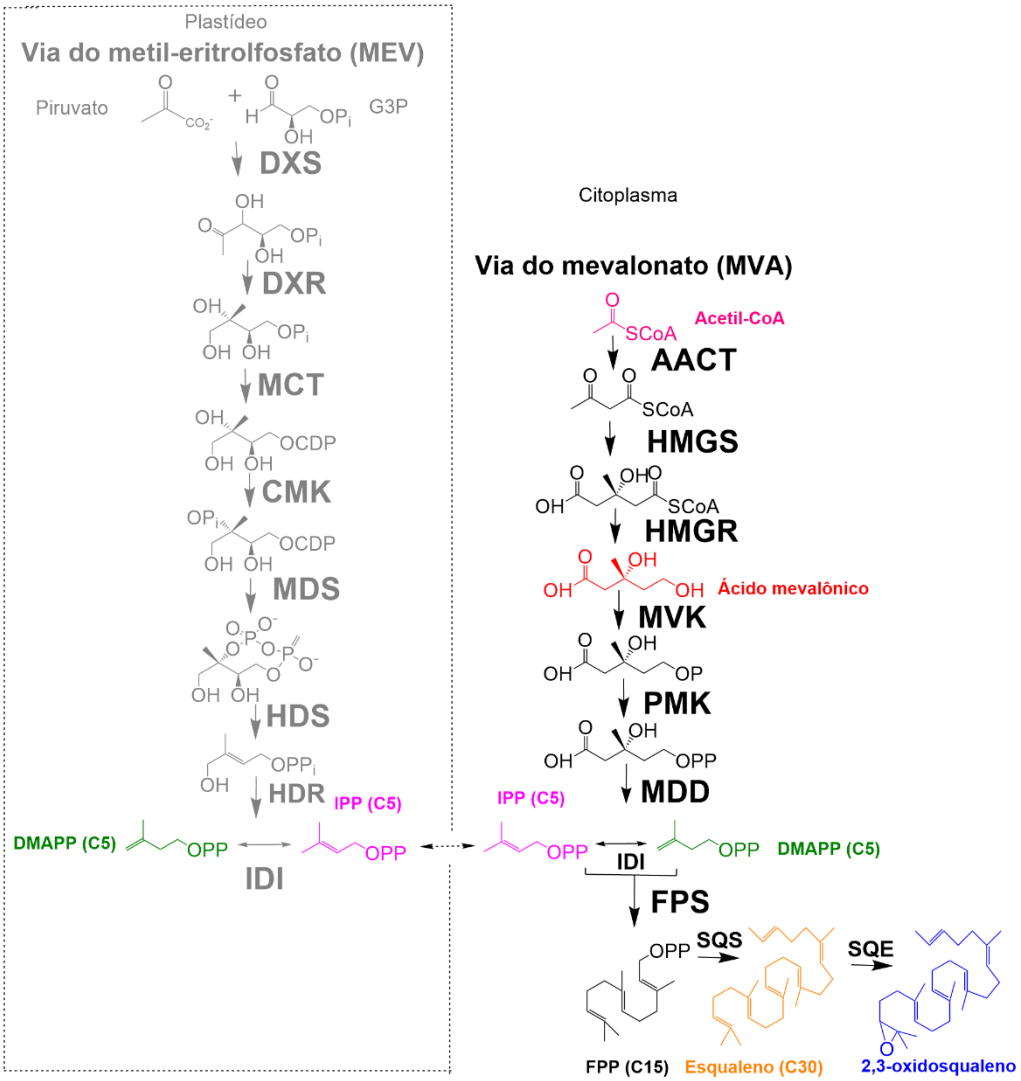


Figura 3: A via do metil-eritrolfosfato (MEP), nos cloropastos (em fronteira), está destacada em **cinza**, a via geral do mevalonato que produz, dentre outros compostos, o ácido mevalônico (em **vermelho**), IPP (em **rosa**), DMAPP (em **verde**), esqualeno (em **laranja**) e 2,3-oxidosqualeno **(em azul)**, no citoplasma, está destacada em **preto.** Enzimas da via MEP (**em cinza**) – DXS: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase; DXS: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase sintase; MCT: 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato citidililtransferase; CMK: 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritrol cinase; MDS: 2-C-metil-D-eritrol-2,4-ciclodifosfato sintase; HDS: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintase; HDR: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase; IDI: isopentenil difosfato isomerase. Enzimas da via MVA **(em preto)** – AACT: acetil-COA (coenzima A) C-acetiltransferase; HMGS: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintase; HMGR: HMG-CoA sintase dependente de NADPH; MVK: ácido mevalônico cinase; PMK: fosfomevalonato cinase; MDD: mevalonato-5-difosfato descarboxilase; FPS: farnesil pirofosfato sintase; SQS: esqualeno sintase; SQE. Esqualeno epoxidase. **Fonte:** Adaptado de LU *et al*., 2021.

Dentre os triterpenos com potencial farmacológico, merecem atenção especial os triterpenos quinonametídeos (TQMs) substâncias de estrutura pentacíclica que apresentam como esqueleto básico o núcleo 24-nor-D:A-friedo-oleanano (Figura 4),

com um sistema conjugado que envolve os anéis A e B da estrutura (ALVARENGA; FERRO, 2006). .

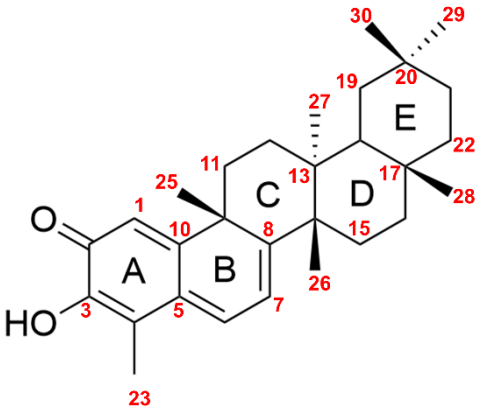


Figura 4: Esqueleto 24-nor-D:A-friedo-oleanano, típico de triterpenos quinonametídeos. **Fonte:** Adaptado de Gunatilaka, 1996; Santos, Furlan, Amorim, 2016; Fontanin, 2023

Os TQMs são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae, a qual abrange plantas lianas, arbustivas e arbóreas encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (SIMMONS, 2004; ALVARENGA;FERRO, 2006) e reúne aproximadamente 55 gêneros e 855 espécies, às quais estão majoritariamente inclusas nos gêneros *Maytenus* e *Euonymus*, cada um com cerca de 200 espécies (SCHWEINGRUBER, BÖRNER, SCHULZE, 2011).

Dentre as várias espécies vegetais pertencentes a família, têm se como uma das representantes no Brasil a planta *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek (popularmente conhecida como espinheira-santa e reclassificada para *Monteverdia ilicifolia;* Fig. 5). Usada na medicina popular para o tratamento de úlceras gástricas, essa espécie apresenta uma variedade de compostos bioativos em sua constituição - incluindo os TQMs – que justificam sua presença na Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (ReniSUS), em virtude do seu potencial para desenvolvimento de fitoterápicos acessíveis à população brasileira (BIRAL *et al*., 2017; PÉRICO *et al*., 2018; NIERO, FALONI DE ANDRADE, CECHINEL FILHO, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2025).



Figura 5: Indivíduo adulto de *Monteverdia ilicifolia* Mart. Ex Reissek. **Fonte:** Arquivo pessoal

Especificamente no caso dos TQMs de *M. ilicifolia*, historicamente, o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maysa Furlan no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese de Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) têm se dedicado a, dentre outros objetivos, realizar estudos fitoquímicos, proteômicos, metabolômicos e biossintéticos de plantas como *M. ilicifolia* visando a exploração racional e terapêutica dos TQMs.

Por exemplo, um estudo piloto identificou que os TQMs majoritários produzidos por essa planta são maitenina e pristimerina (BUFFA FILHO *et al*., 2002), provavelmente biosintetizados a partir do celastrol, um composto promissor para o tratamento da obesidade (LIU *et al*., 2015). Estudos do grupo da Profa. Furlan indicaram que esses compostos, acumulados nas raízes da planta, apresentam, dentre outras atividades terapêuticas, potente atividade antitumoral (CORSINO *et al*.,

1998; DA COSTA *et al*., 2008; BUFFA-FILHO *et al*., 2002; 2004; SANTOS *et al*., 2010; estruturas disponíveis na Fig. 6). No entanto, embora as potencialidades anticâncer dessas substâncias (e potencialmente de seus análogos ou derivados) as tornem muito relevantes do ponto de vista medicinal (SALVADOR *et al*., 2017), sua concentração muito reduzida no sistema radicular de *M. ilicifolia* (na faixa de 0,015-0,0008%; BUFFA-FILHO *et al*., 2002) estabelece um obstáculo à sua aplicação terapêutica, em virtude da elevada quantidade de matéria-prima vegetal que seria mandatória para a obtenção de quantidades adequadas de TQMs que atendessem a demandas industriais.

Esse conhecimento, alinhado a um estudo antigo do grupo realizado por Corsino *et al.* (2000), estabeleceram o interesse na via biossíntética desses compostos visando sua futura exploração terapêutica. Com base no conhecimento da co-ocorrência de triterpenos friedelânicos e quinonametídeos, respectivamente, nas folhas e nas raízes de plantas das famílias Hippocrateaceae (à qual pertence a espécie *Salacia campestris*) e Celastraceae (à qual pertence à espécie *Maytenus aquifolium*) e na hipótese de que, embora fossem de diferentes classes, esses triterpenos tivessem uma biogênese comum (KUTNEY *et al*., 1981), Corsino *et al.* (2000) prepararam extratos enzimáticos de *S. campestris* e *M. aquifolium* que foram capazes de converter o substrato 2,3-oxidosqualeno em 3β-friedelanol e friedelina. A mevalonolactona é um intermediário biossintético de triterpenos (uma forma cíclica do ácido mevalônico, em equilíbrio com sua forma aberta na via MVA, destacada em vermelho na Fig. 3). Com base nisso, ensaios de marcação isotópica utilizando (±)5-^{3}H mevalonolactona em *Maytenus aquifolium* produziram friedelina radiomarcada nas folhas, ramos e caules e produziram TQMs radiomarcados nas raízes da espécie. Isso indicou essencialmente que o triterpeno pentacíclico friedelina (Fig. 6, em verde) é translocado das folhas para as raízes, onde é posteriormente convertida a triterpenos quinonametídeos (Fig. 6, em laranja). Isso confirmou o postulado de biogênese comum entre triterpenos friedelânicos e quinonametídeos, possibilitando estudos posteriores. Essa translocação está esquematizada na Fig. 6.

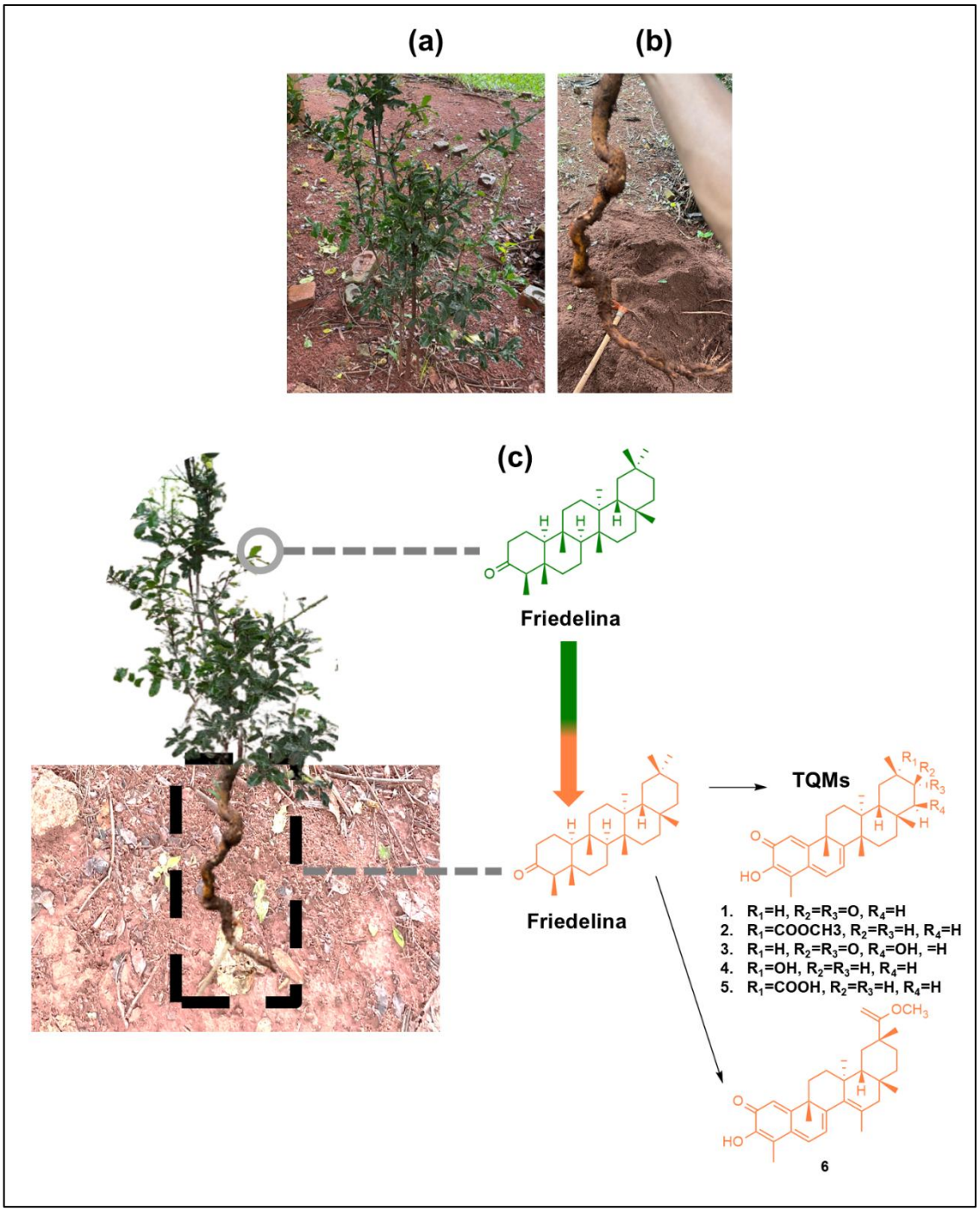


Fig. 6: Partes aéreas **(a)** e raízes **(b)** de indivíduo jovem de *M. aquifolium*, coletado no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Unesp de Araraquara (arquivo pessoal), e **(c)** Representação esquemática (com fotografia da espécie alterada digitalmente) do transporte da friedelina das folhas de *M. aquifolium* (estrutura em verde) para as raízes (estrutura em laranja, à esquerda), onde postula-se que seja posteriormente convertida para os triterpenos quinonametídeos (1) maitenina, (2) pristimerina, (3) 22β-hidroximaitenina, (4) 20α-hidroximaitenina, (5) celastrol (estruturas em laranja, à direita, canto superior) e (6) netzahualcoyona (em laranja, à direita, canto inferior). **Fonte:** Adaptado de Corsino *et al*. (2000).

Com base nessas informações e motivados pelas vantagens que as abordagens contemporâneas que integram biologia sintética e engenharia metabólica apresentam em estudos biossintéticos, prosseguiu-se com os estudos biossintéticos dos triterpenos quinonametídeos em *M. ilicifolia* mas via expressão heteróloga em *S. cerevisiae* e, quando possível e viável, *N. benthamiana*, visto que, além das vantagens supracitadas do ponto de vista de produção biotecnológica de (fito)compostos, *S. cerevisiae* possui uma via do mevalonato (MVA) endógena (MOSER; PICHLER, 2019; BYUN *et al*., 2025) e as folhas de *N. benthamiana* possuem o intermediário 2,3-oxidosqualeno (CZECHOWSKI *et al*., 2025), de modo que ambos os sistemas, de modo independente ou integrado, possibilitariam reconstituir a biossíntese de TQMs de alto valor agregado. De modo paralelo, estudos realizados ao longo de anos pelo grupo com cultura de células vegetais e estímulo exógeno, por exemplo, (PAZ *et al*., 2013; PAZ *et al*., 2017) apresentaram resultados interessantes mas uma rota de produção ainda incipiente de triterpenos quinonametídeos, fornecendo uma razão adicional para a necessidade de aplicar um modelo alternativo mais eficiente para compreender e otimizar a produção dessas substâncias.

Os estudos se seguiram com um enfoque de descobrir qual era a enzima capaz de ciclizar 2,3-oxidosqualeno a friedelina. Nesse contexto, em um dos trabalhos subsequentes do grupo em parceria com o grupo do Dr. Jens Nielsen (Departamento de Biologia e Engenharia Biológica da *Chalmers University of Technology*, Gotemburgo, Suécia), Souza-Moreira *et al.* (2016) identificaram uma oxidosqualenociclase (OSC) de *M. ilicifolia* capaz de realizar essa conversão, identificada como *Mi*FRS (Código de Acesso GenBank: KX147270). Essa conversão foi considerada a primeira etapa da via biossintética dos TQMs na espécie. Utilizou-se como sistema heterólogo a linhagem de *S. cerevisiae* geneticamente modificada VZL 1303 com níveis reduzidos de mRNA do gene *ERG7***,** reduzindo a competição da OSC codificada por esse gene (*a* lanosterol sintase) pelo mesmo substrato 2,3-oxidoesqualeno, viabilizando a conversão do mesmo em friedelina*.* O avanço científico também foi significativo do ponto de vista da enzimologia. O estudo, ao integrar análises filogenéticas, estudos estruturais *in silico,* alinhamento múltiplo da sequência primária de enzimas, estudos de clonagem e também, caracterização funcional de enzimas oxidosqualenociclases (com otimização dos códons para expressão) usando sistema heterólogo, possibilitou aos autores concluir que há um

resíduo de leucina na posição 482 da sequência primária da *Mi*FRS duas posições acima do *motif* catalítico DCTAE, enquanto a maioria das OSCs já caracterizadas apresentam um resíduo de valina ou isoleucina na mesma posição. A substituição de um resíduo de leucina por isoleucina, treonina ou valina na sequência de *Mi*FRS interferiu no reconhecimento do substrato e levou à produção heteróloga de outros triterpenos ao invés da friedelina. Assim, além de identificar qual enzima cicliza o 2,3-oxidosqualeno, foi possível compreender melhor como esse processo ocorre a nível molecular (SOUZA-MOREIRA *et al*., 2016).

Até 2018, apenas o gene de *M. ilicifolia* identificado por Souza-Moreira *et al.* (2016) que codifica a enzima OSC *Mi*FRS e um gene da espécie vegetal *Kalanchoe daigremontiana*, identificado por Wang *et al.* (2010) haviam sido caracterizados funcionalmente como friedelina sintases. Esse cenário se modificou quando um trabalho do grupo, desenvolvido por Alves *et al.* (2018), observou diferentes polimorfismos no gene que codifica *Mi*FRS. Realizou-se um alinhamento múltiplo global com as sequências que codificam as isoformas encontradas (identificadas como *Mi*FRS2, *Mi*FRS3 e *Mi*FRS4 e com Código de Acesso GenBank: MG677552, MG677553 e MG677554, respectivamente) e notou-se que elas apresentam identidade entre 99,63 e 99,80% em relação à sequência de *Mi*FRS e mesmo comprimento de quadro de leitura aberto (*open reading frame*, ou ORF, de 2316 pb). Todas codificam 771 aminoácidos e possuem ponto isoelétrico e peso molecular previstos muito similares. Elas também foram caracterizadas funcionalmente utilizando como sistema heterólogo a linhagem modificada de *S. cerevisiae* VZL 1303, e notou-se que a isoforma *Mi*FRS4 foi capaz de produzir uma maior quantidade de friedelina. Um ano depois, estudos de um grupo coreano (HAN *et al*., 2019) e de um chinês (ZHOU *et al*., 2019) caracterizaram friedelina sintases nas plantas *Populus davidiana* e *Tripterygium wilfordii*, respectivamente.

A isoforma *Mi*FRS4 de M. ilicifolia contribuiu para a elucidação de uma etapa adicional da via biossintética dos TQMs. Em 2019, em colaboração com o grupo do Dr. Alain Goossens, do Centro para Sistemas Biológicos de Plantas do VIB-Ghent, *Vlaams Instituut voor Biotechnologie* (VIB), em Ghent, Bélgica, o grupo de pesquisa publicou um artigo (Bicalho *et al*., 2019) no qual descreveu a segunda etapa da via biossintética dos triterpenos quinonametídeos. Essa etapa envolve a formação de um derivado carboxilado da friedelina (denominado ácido maitenoico) bem como a

identificação da enzima P450 responsável por catalisar essa reação. Esse estudo foi motivado, dentre outras razões por (1) especulações antigas da literatura que apontavam uma possível relação biogenética de ácido maitenoico com o triterpeno quinonametídeo maitenina em virtude da co-ocorrência de ambos em *Pleuckia Polpunea* (DELLEMONACHE *et al*., 1972), e (2) pelo fato de que oxidações no esqueleto triterpênico são frequentemente mediadas por enzimas P450 (MIETTINEN *et al*., 2018; THIMMAPPA et al., 2014; MOSES *et al*., 2013; SEKI, TAMURA E MURANAKA, 2015). Esse estudo, integrando análise transcriptômica da raíz e expressão heteróloga, identificou que a enzima P450 de *M. ilicifolia* CYP712K4 (Código de Acesso GenBank: MG677554) catalisa a oxidação (em três etapas) da friedelina (em C-29) a ácido maitenoico (também conhecido como polpunônico ou maitenônico). Adicionalmente, além de fornecer a base para a descoberta futura das etapas subsequentes da via biossintética dos TQMs e as enzimas P450 potencialmente envolvidas, o trabalho propiciou uma rota sustentável e rápida para produção heteróloga de quantidades apreciáveis de friedelina usando uma linhagem modificada de *S. cerevisiae* através do controle de fatores como meio de cultura, superexpressão de genes codificadores de enzimas formadoras dos precursores da via, regulação da expressão do gene codificador da OSC de levedura lanosterol sintase e supressão de *PAH1* (BICALHO *et al*., 2019).

Nesse trabalho em específico, *Nicotiana benthamiana* também foi utilizada como sistema heterólogo: coexpressando a enzima CYP712K4 com a enzima OSC *Mi*FRS4 [identificada previamente por Alves et al. (2018) como a isoforma de *Mi*FRS que mais produz friedelina] e a versão truncada de *tHMGR1* de *Medicago truncatula* capaz de aumentar os precursores da via (POLLIER *et al*., 2013; REED;OSBOURN, 2018), foi possível realizar nas folhas de *N. benthamiana* a biossíntese combinatória em larga escala do ácido maitenoico. Isso viabilizou seu posterior isolamento e elucidação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) mono e bidimensional. Alguns anos após a publicação desse trabalho, estudos posteriores independentes de grupos na Dinamarca e na China identificaram que as enzimas *Tw*CYP712K1, *Tw*CYP712K2 e *Tw*CYP712K3 possuem atividade catalítica idêntica em C-29 da friedelina na espécie *Tripterygium wilfordii* (ZHOU *et al*., 2021; HANSEN *et al*., 2020), e o mesmo ocorre com a enzima *Th*CYP712K1 em *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch (XIAO-CHAO *et al*., 2022), ambas da família Celastraceae,

assim como *M. ilicifolia*. A primeira e segunda etapas da via dos TQMs elucidadas em *M. ilicifolia* estão apresentadas na Figura 7.

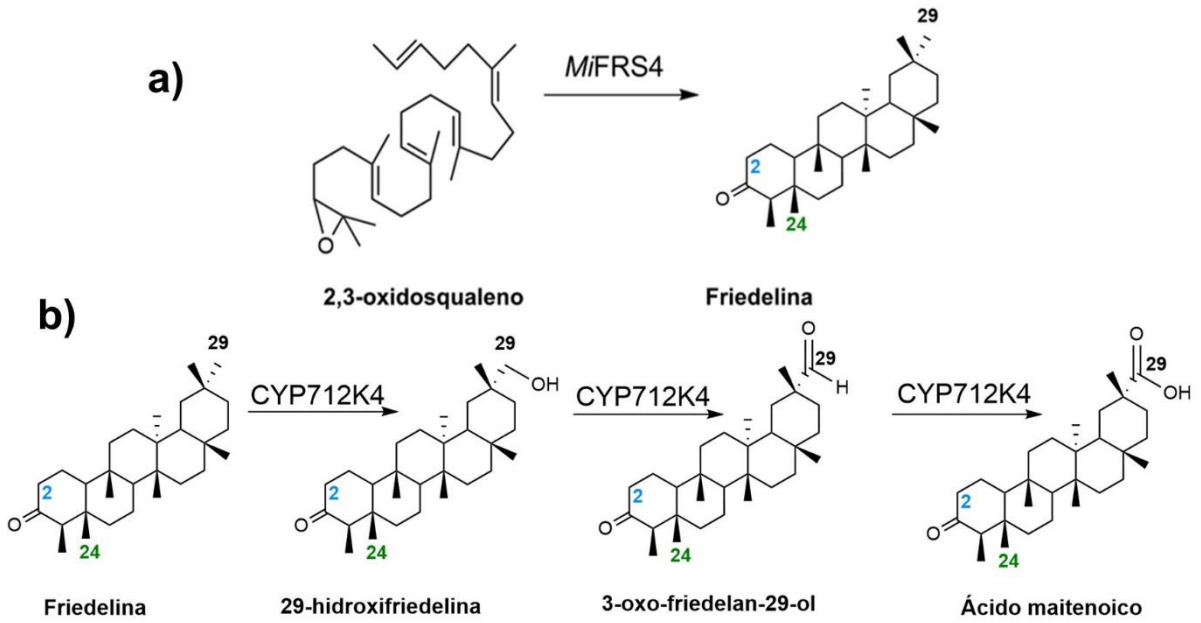


Figura 7: Primeira (a) e segunda (b) etapas da via biossintética dos TQMs, elucidadas por Souza-Moreira *et al*.(2016) e Bicalho *et al*.(2019). A posição C-3 da friedelina, onde há uma carbonila, e a posição C-29, oxidada por CYP712K4, estão destacadas, assim como a posição C-24. **Fonte:** Adaptado de Souza-Moreira *et al.* (2016) e Bicalho *et al.* (2019).

1.4 Uma proposta de biogênese de triterpenos quinonametídeos em *M. ilicifolia*

Uma contribuição adicional do trabalho de Bicalho *et al*. (2019) foi a proposição de uma proposta biogenética plausível para a biossíntese de TQMs em *M. ilicifolia*, alicerçada em propostas de biogênese de décadas anteriores [como, por exemplo, a de Kutney *et al.* (1981) e Gunatilaka (1996)] ou em trabalhos fitoquímicos que descreviam compostos estruturalmente semelhantes aos TQMs e que poderiam ter uma biogênese comum. Embora ela tenha permanecido apenas especulativa durante anos, durante um certo tempo foi a mais completa da literatura e bem citada por trabalhos contemporâneos à sua publicação (LU *et al*., 2021). Essa via de biogênese, assim como as etapas da via biossintética dos TQMs elucidadas pelo grupo e o conhecimento estabelecido acerca da via do mevalonato são resumidos na Figura 8. Compostos relevantes para a discussão da proposta de biogênese estão destacadas com números em vermelho.

Essa proposta de biogênese havia especulado que um dos possíveis intermediários biossintéticos dos TQMs após a biossíntese do ácido maitenoico seria a cangoronina (com estrutura destacada com o número **3**, em vermelho na Fig. 8),

uma substância que, assim como a maitenina e pristimerina, já foi previamente isolada das raízes de *M. ilicifolia* por Itokawa *et al.* (1991), e que provavelmente seria um produto de oxidação do ácido maitenoico em C-2 e C-24. Isso é possível visto que, por exemplo, Miettinen *et al.* (2017) identificaram que na espécie *Centella asiatica* a enzima P450 CYP716C11 catalisa a oxidação do triterpeno pentacíclico ácido oleanólico em C-2α, formando ácido maslínico. Uma enzima possivelmente catalisaria a oxidação do ácido maitenoico em C-2 e apresentaria em tese como produtos os compostos ácido wilfórico C e ácido 3-hidroxi-2-oxo-D:A-friedelan-3-en-29-oico (Fig. 8, destacados com o número **1** e **2**, em vermelho), os quais se acumulam em *Tripterygium wilfordii*, uma espécie vegetal que, assim como *M. ilicifolia*, é da família Celastraceae e, consequentemente, também produzem triterpenos quinonametídeos (LI *et al*., 1997; MOROTA *et al*., 1995). O metabólito ácido 3-hidroxi-2-oxo-D:A-friedelan-3-en-29-oico (**2**) poderia ser posteriormente convertido à cangoronina (**3**; BICALHO *et al*., 2019).

Por outro lado, a oxidação do ácido maitenoico em C-24 poderia resultar em um composto com uma hidroxila ligada a esse carbono (Fig. 8, composto **4**), que por sua vez poderia sofrer interconversão ao ácido salaspérmico (**5**) a partir de adição nucleofílica intramolecular envolvendo a hidroxila de C-24 e a carbonila de C-3. A ocorrência dessa reação é plausível considerando a possibilidade de relação biogenética do ácido maitenoico com o ácido salaspérmico (**5**), visto que este, de modo paralelo ao ácido 3-hidroxi-2-oxo-D:A-friedelan-3-en-29-oico (**2**), por exemplo, também foi isolado de uma planta da família Celastraceae que também acumula maitenina e pristimerina (no caso, a espécie *Salacia macrosperma;* VISWANATHAN,1979). Adicionalmente, o isolamento prévio dos triterpenos ácido wilfórico E (Fig. 8, composto **7**) de *T. wilfordii* (DUAN *et al*., 2000) e do ácido ortosfênico (**6**) de *Orthospenia mexicana* Standley (GONZÁLEZ *et al*., 1983) respectivamente, indicam que provavelmente o ácido salaspérmico (**5**) pode ser o substrato de uma enzima P450 que catalisa a oxidação de C-2 em duas etapas. No caso específico do ácido wilfórico E (**7**), sua conversão a cangoronina (**3**) exigiria a abertura do anel hemicetal intramolecular presente em sua estrutura estável, o que é energeticamente disfavorável e portanto improvável. Assim, coletivamente falando, esses fatores apontam que o ácido maitenoico poderia servir como substrato e alvo da ação catalítica competitiva de duas enzimas P450: enquanto a oxidação em C-24

formaria um hemicetal estável com conversão improvável a cangoronina (**3**) e a triterpenos derivados, se a oxidação ocorresse a princípio em C-2, o produto ácido 3-hidroxi-2-oxo-D:A-friedelan-3-en-29-oico (**2**), por apresentar uma hidroxila em C-3, inviabilizaria a ocorrência de uma adição nucleofílica intramolecular e possibilitaria uma nova oxidação em C-24, o que provavelmente resultaria na cangoronina (**3**, BICALHO *et al*., 2019).

Comparando-se as estruturas da cangoronina (**3**) e do celastrol (Fig. 8), a remoção do grupo aldeído em C-5β da cangoronina (**3**) seria necessária para se biossintetizar esse triterpeno quinonametídeo. Uma vez que a cangoronina (**3**) e o ácido salaspérmico (**5**) apresentem uma carbonila e uma hidroxila em C-5β, respectivamente, Bicalho *et al.* (2019) especularam a possibilidade de eliminação de grupo metila no C-5β do esqueleto friedelânico. Essa hipótese foi sustentada pelo fato de que essa eliminação já foi reportada na literatura. Por exemplo, enzimas P450 da família CYP51 estão envolvidas na biossíntese de esteróis, possibilitando a desmetilação de produtos formados pela ciclização do 2,3-oxidoesqualeno, como o lanosterol e o cicloartenol, por meio de três etapas oxidativas sucessivas. Nas duas primeiras etapas, o grupo metil na posição 14α é progressivamente oxidado, passando por um intermediário alcoólico até ser convertido em um aldeído. Na etapa final, esse grupo aldeído é eliminado na forma de ácido fórmico, enquanto, de maneira concomitante, ocorre a introdução de uma ligação dupla na estrutura principal do esterol (LEPESHEVA; WATERMAN, 2007).

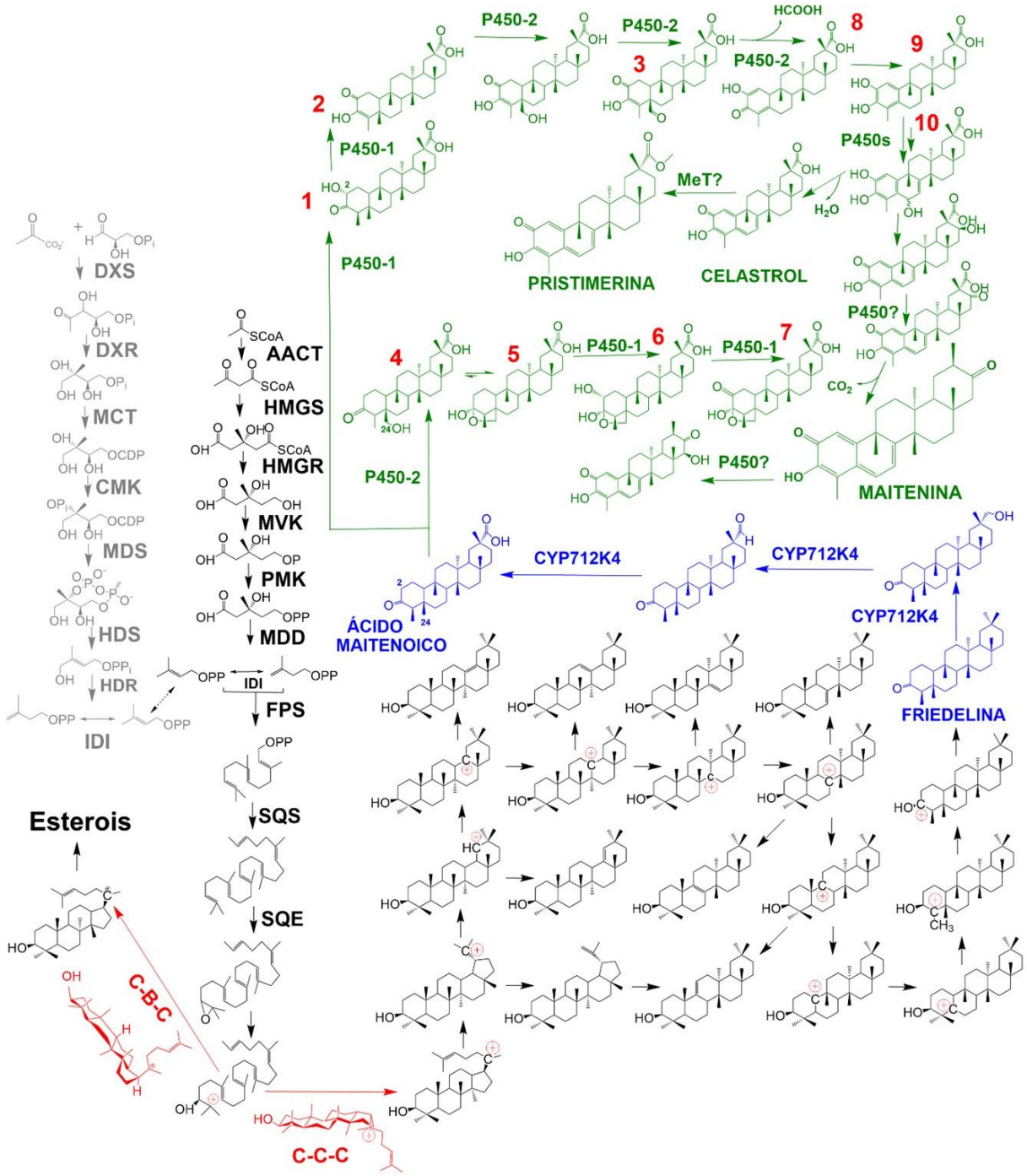


Figura 8: Via biossintética geral do ácido maitenoico e proposta de biogênese dos triterpenos quinonametídeos. As enzimas da via do metil-eritrolfosfato (MEP) em **cinza**, a via geral do mevalonato, em **preto**, são explicadas na legenda da Fig. 3. A oxidação da friedelina ao ácido maitenoico está destacada em **azul**. A proposta biogenética publicada pelo mesmo trabalho para construção do esqueleto quinonametídeo (bem como as possíveis reações e enzimas do tipo P450 participantes na formação do celastrol, pristimerina e maitenina), publicada pelo nosso grupo está destacada em **verde.** A ciclização do esqueleto pentacíclico pode ocorrer na conformação cadeira-cadeira-cadeira (C-C-C) ou cadeira-barco-cadeira (ambos destacados em **vermelho**). A ciclização do 2,3-epoxidoesqualeno envolvendo o rearranjo complexo de carbocátions (com cargas positivas destacadas em **vermelho**) e levando à friedelina é catalisado por oxidoesqualenociclases (OSCs). P4501,2 e P450s: Potenciais enzimas P450 envolvidas na biogênese dos TQMs (destacadas em **verde**). MeT: possível metiltransferase (destacada em **verde**). **Fonte:** Adaptado de Corsino *et al*., 2000; Gunatilaka, 1996, Bicalho *et al*., 2019 e Lu *et al*., 2021.

Apesar da plausibilidade de um mecanismo semelhante na via biossintética de TQMs, outros processos possíveis de desmetilação também devem ser considerados, e alguns mecanismos distntos já foram descritos na literatura. LV *et al.* (2017) reportam por exemplo que na biossíntese do triterpeno ácido helvólico, a desmetilação em C-4β ocorre por meio da atuação consecutiva de uma enzima P450 e de uma desidrogenase/redutase de cadeia curta com ampla especificidade de substrato. Em contraste, na formação de esteróis, sabe-se que a remoção do grupo metil em C-4α resulta da ação sequencial das enzimas C-4 esterol metiloxidase, esterol C4-descarboxilase e 3-ceto redutase (NES, 2011). Em ambos os mecanismos, a etapa de descarboxilação depende da presença de uma carbonila no carbono C-3 da molécula. Há uma carbonila exatamente nessa posição no ácido maitenoico, mas não na cangoronina, o que tornaria a presença dos mecanismos citados improváveis na via biossintética em questão (BICALHO *et al*., 2019).

Adicionalmente, especulava-se que, caso tais mecanismos fossem responsáveis pela remoção do grupo metil no esqueleto friedelânico, não se esperaria a formação de uma nova ligação dupla durante o processo. Outro aspecto importante é que esses mecanismos implicariam a oxidação subsequente do grupo aldeído presente na posição C-24 até a formação de um ácido carboxílico, e até o momento de publicação dessa via de biogênese em questão, compostos friedelânicos contendo uma carboxila em C-24 não haviam sido descritos na literatura. Assim, a participação de um sistema multienzimático semelhante aos descritos anteriormente parecia menos provável para essa etapa da via metabólica. Dessa forma, foi proposta uma alternativa em que a remoção do grupo metil em C-5β ocorreria por meio de um processo de três oxidações sucessivas catalisadas por uma única enzima P450 que resultaria nos compostos **8**, **9** e **10** (Fig. 8), sequencial e respectivamente. Após essa etapa de desmetilação, o esqueleto resultante do tipo 24-norfriedelano (Fig. 8, composto **10**) ainda necessitaria sofrer modificações adicionais para originar o celastrol. Mais especificamente, a formação dessa molécula exigiria a introdução de duas ligações duplas adicionais no esqueleto triterpênico (BICALHO *et al*., 2019).

A ocorrência natural de diversos derivados fenólicos de 24-norfriedelano contendo grupos hidroxila ou carbonila nas posições C-6 e/ou C-7 (SHAN *et al*., 2013) sugeria que essas insaturações poderiam surgir a partir de reações sequenciais de oxidação seguidas de desidratação nessas posições. Esse conjunto de

transformações estruturais em tese poderiam conduzir, portanto, à formação do celastrol. Em *M. ilicifolia*, o celastrol poderia ainda sofrer transformações adicionais catalisadas por enzimas especializadas considerando a presença dos TQMs maitenina e pristimerina na sua raíz. Uma dessas etapas envolve a metilação do grupo ácido carboxílico localizado na posição C-29, uma reação que poderia catalisada por uma metiltransferase e que resultaria na formação de pristimerina. Paralelamente, uma reação de oxidação na posição C-21 (possivelmente mediada por outra enzima P450) poderia resultar em desmetilação oxidativa do esqueleto friedelânico, culminando na formação de maitenina (BICALHO *et al*., 2019).

1. 5. Elucidação da via biossintética do celastrol em *Tripterygium wilfordii*

Recentemente, avanços significativos na compreensão de como plantas da família Celastraceae podem biossintetizar triterpenos quinonametídeos foram apresentados no trabalho de Zhao *et al*. (2023). Publicado no periódico *Nature Chemistry*, o estudo foi coordenado pelo Professor Sotirios Kampranis, pesquisador da Universidade de Copenhagen (Dinamarca) e referência mundial no uso de biologia sintética para produção heteróloga de terpenos. Combinando bioquímica de plantas, engenharia metabólica e semi(bio)ssíntese, os autores foram capazes de elucidar a via de biossíntese do celastrol na espécie vegetal *T. wilfordii* utilizando expressão heteróloga de enzimas P450 em *N. benthamiana* e *S. cerevisiae,* seguido da posterior conversão química de intermediários biossintéticos instáveis no produto-alvo em bancada e em levedura geneticamente modificada (Figura 9). Compostos que aparecem na via elucidada experimentalmente e que foram previstos na proposta de biogênese (Fig. 8) foram destacados na Fig. 9 com o mesmo número correspondente, em vermelho. Compostos instáveis estão com colchetes.

Inicialmente, de modo análogo ao trabalho de Bicalho *et al* (2019), com base no fato que o celastrol se acumula – e em quantidade muito reduzida - nas raízes de *T. wilfordii* (assim como ocorre em *M. ilicifolia*; CORSINO *et al*., 2000) e portanto esperando-se que os transcritos que correspondessem a enzimas ativas na via metabólica do celastrol fossem detectados nesse tecido, Zhao *et al*. (2023) realizaram inicialmente análise da expressão diferencial de genes P450 entre as raízes e folhas de *T. wilfordii.* A partir de análise transcriptômica foram selecionados 21 candidatos das raízes para estudo. Através de caracterização funcional em levedura e tabaco, os autores notaram que a enzima *Tw*CYP716C52 foi capaz de catalisar a hidroxilação do

ácido polpunônico (maitenoico) em C-2, formando o ácido wilfórico C (composto **1**, Figuras 8 e 9). Mais recentemente, de modo independente do estudo de Zhao e outros, Lu *et al.*(2024) deram evidências adicionais do envolvimento dessa enzima nessa etapa específica da via biossintética por um estudo que integrou, além de caracterização funcional desse gene em levedura, indução de suspensões celulares de *T. wilfordii* com metil jasmonato (um fitohormônio capaz de regular o metabolismo secundário em plantas superiores; LIU *et al*., 2016) e experimento de interferência por RNA (RNAi). O nível do transcrito correspondente a esse gene aumentou em relação às suspensões não tratadas com esse indutor, e paralelamente o seu silenciamento levou à uma redução considerável dos níveis de transcritos para *Tw*CYP716C52, a qual foi acompanhada de diminuição do acúmulo de celastrol nas suspensões celulares. Esses resultados, de modo integrado, reforçam a hipótese da participação de *Tw*CYP716C52 na via biossintética do celastrol (LU *et al*., 2024; ZHAO, MIETTINEN, KAMPRANIS, 2024a, NIELSEN, 2023).

Em seguida, Zhao *et al.*(2023) identificaram, também através de caracterização funcional em levedura e tabaco, que a enzima *Tw*CYP81AM1 converte o grupo metílico do ácido polpunônico (maitenoico) a um grupo carboxílico, e com base nos compostos detectados é possível que essa conversão ocorra em três etapas. Embora ainda não se saiba em qual ordem ou sequência ocorra as oxidações dos carbonos do substrato (C-2 ou C-24), considerando que *Tw*CYP716C52 e *Tw*CYP81AM1 são igualmente capazes de oxidar o ácido polpunônico, é razoável presumir que ambas ocorram por meio de uma rota ramificada ou em rede, ou seja, o substrato sofra a ação competitiva e/ou simultânea de duas enzimas P450, o que converge perfeitamente com o especulado pela via de biogênese proposta por Bicalho *et al.* (2019). Subsequentemente, identificou-se que que dois genes parólogos de *Tw*CYP716C52 (*Tw*CYP716C57 e *Tw*CYP716C52v2) e um gene parólogo de *Tw*CYP81AM1 (*Tw*CYP81AM2) apresentam a mesma atividade catalítica, mas uma vez que, comparativamente falando, eles foram expressos em quantidades muito menores nas raízes, os autores postulam que *Tw*CYP716C52 e *Tw*CYP81AM1 sejam as enzimas predominantes envolvidas na via biossintética (ZHAO, MIETTINEN, KAMPRANIS, 2024a). Etapas de biossíntese em que essas enzimas estão envolvidas na via do celastrol em *T. wilfordii* estão destacadas na Figura 9.

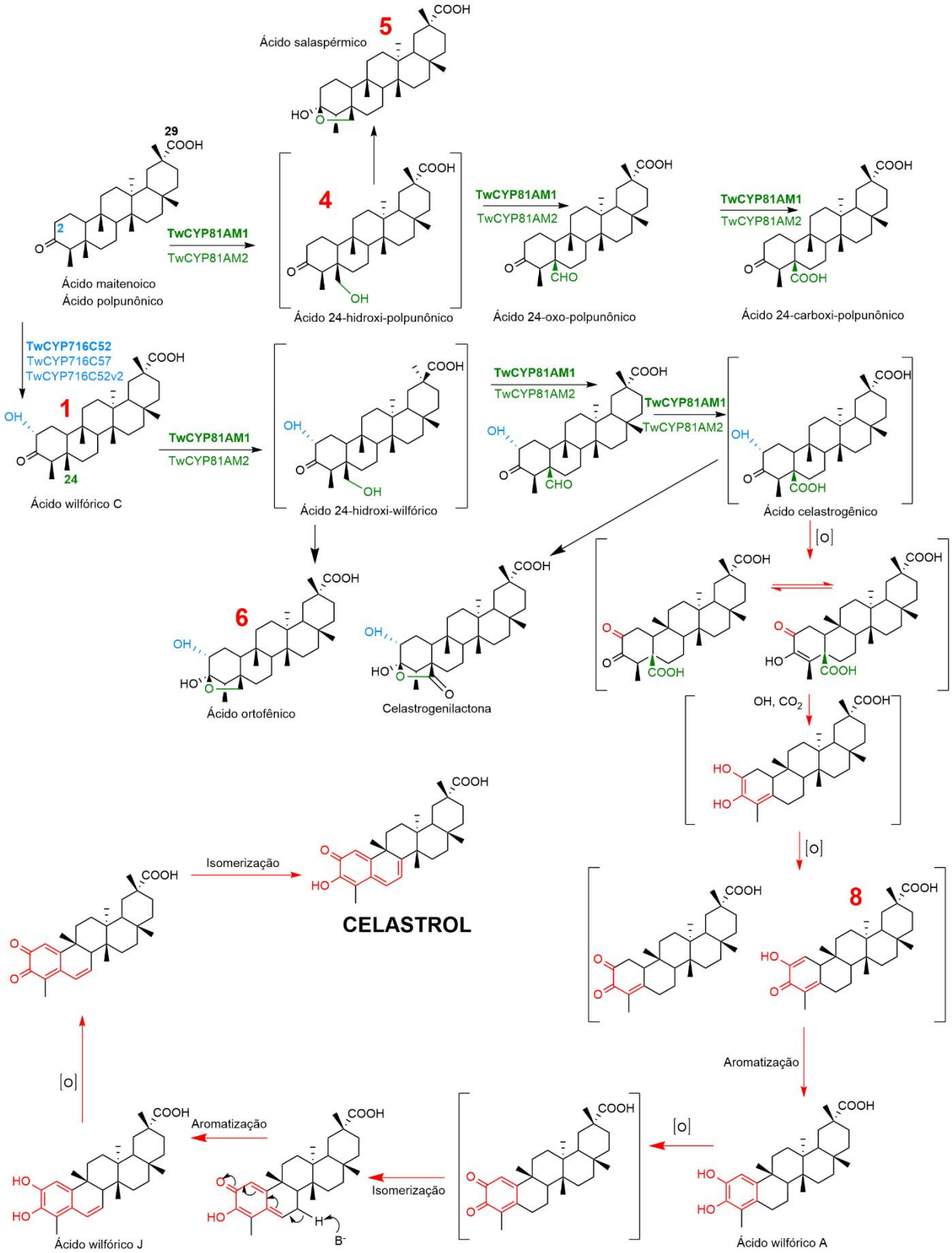


Figura 9: Via biossintética do celastrol em *T. wilfordii*. Enzimas majoritariamente envolvidas estão em negrito. Conversões não-enzimáticas estão em vermelho. **Fonte:** Adaptado de Zhou *et al.* (2023).

Modificações químicas catalisadas pelas enzimas de subfamília TwCYP716C e TwCYP81AM estão destacadas em azul e verde, respectivamente. Considerando

que a caracterização funcional de ambas as enzimas resultou em derivados glicosilados dos compostos produzidos, visto que *N. benthamiana* apresenta várias glicosiltransferases (NIELSEN, 2023; JANSING *et al*., 2019), seguiu-se o estudo biossintético apenas em levedura. Em *S. cerevisiae*, a coexpressão de *Tw*CYP716C52 e *Tw*CYP81AM1 produziu um composto que apresentou modificações oxidativas em C-2 e C-24 e foi nomeado pelos autores como ácido celastrogênico. Eles notaram que o ácido celastrogênico é instável em pH baixo, sofrendo interconversão para uma estrutura lactônica formada entre esses dois carbonos. Devido ao tautomerismo ceto-enólico no anel A da molécula, essa lactona, denominada de celastrogenilactona, foi detectada em mistura com ácido celastrogênico no ambiente ácido típico de meio de cultivo para leveduras (ZHAO *et al*., 2023).

As etapas experimentalmente elucidadas da via biossintética do celastrol em *T. wilfordii* apresentam relativa concordância com o previsto pela via de biogênese de Bicalho *et al.* (2019). 6 compostos aparecem simultaneamente na proposta de biogênese e na via elucidada experimentalmente (compostos **1**,**4**,**5**,**6**,**8** e **9,** Figuras 8 e 9). É evidente que pode-se notar certas diferenças, sobretudo em relação à presença de compostos como ácido salaspérmico (**5**) e ácido ortosfênico (**6**). Embora eles tenham sido indicados como prováveis intermediários biossintéticos na via de biogênese, a via biossintética experimental indicou que na verdade eles podem se tratar de isômeros (favorecidos pelo equilíbrio) ou até mesmo artefatos (se relacionados ao pH do meio de cultivo por exemplo) obtidos durante a tentativa de isolamento do compostos produzidos pela ação catalítica das enzimas; no caso, ácido 24-hidroxipolpunônico e ácido 24-hidroxi-wilfórico C (ZHAO *et al*., 2023). Cabe salientar que a produção do ácido 24-hidroxipolpunônico e sua conversão a ácido salaspérmico (**5**) foram previstos pela via de biogênese, mas ela apontou o composto **5** como um intermediário biossintético ao invés do ácido-24-carboxi-polpunônico, intermediário da via putativamente detectado experimentalmente na segunda etapa de oxidação catalisado por *Tw*CYP81AM1. No entanto, com exceção dessas diferenças e/ou outras como a discrepâncias na etapa em que compostos idênticos aparecem na via biogenética e na via atestada experimentalmente, a via de biogênese previu de modo minimamente coerente algumas etapas de oxidação após a formação do ácido maitenoico na via dos TQMs.

Porém, há uma discrepância notável e fundamental entre a proposta de Bicalho *et al.* (2019) e a via elucidada após a produção do ácido celastrogênico em *T. wilfordii*, a qual enfatiza a necessidade de abordagens interdisciplinares em estudos biossintéticos e consagra o trabalho de Zhao *et al.* (2023) como um dos marcos da biologia sintética moderna (NIELSEN, 2023): A via de biogênese especula que a biossíntese do celastrol seja totalmente mediada por enzimas P450. E de fato, até a biossíntese do intermediário ácido celastrogênico, a via do celastrol, do ponto de vista experimental, prossegue segundo um esquema clássico de biossíntese de triterpenos, iniciando-se com a formação de um esqueleto que será posteriormente modificado por enzimas, incluindo as do tipo P450 (THIMMAPPA *et al*., 2014; BERGMAN *et al*., 2024). Porém, os autores não encontraram nenhuma enzima P450 que utilizava o ácido celastrogênico como substrato, o que motivou investigações adicionais. Como previamente comentado e apresentado na Fig. 9, o ácido celastrogênico, comparado a outros triterpenos (como sapogeninas, por exemplo; ZHAO, MIETTINEN, KAMPRANIS, 2024a) é instável e está sujeito à interconversão em virtude da presença de um grupo cetol no anel A. Assim, esse composto pode sofrer auto-oxidação. Essa constatação guiou Zhao *et al.* (2023) a descobrir uma cascata de reações envolvendo sete etapas de auto-oxidação que converteram o ácido celastrogênico a celastrol sem a necessidade de enzimas. As modificações químicas ocasionadas por essa cascata estão destacadas na Figura 9 em vermelho.

É possível dividir esse processo em dois módulos: O módulo 1 envolve a descarboxilação não-enzimática do ácido celastrogênico em C-24, reação que conduz à formação do intermediário ácido wilfórico A, composto previamente identificado nas raízes de *T. wilfordii* (LI *et al.,*1997). Propõe-se que essa etapa tenha início com eventos de oxidação e isomerização no carbono C-2, os quais originam uma porção instável de ácido β,γ-insaturado envolvendo os carbonos C-3, C-4 e C-24, desencadeando assim a reação de descarboxilação. O intermediário gerado passa então por etapas adicionais de oxidação e tautomerização, resultando finalmente na formação do sistema aromático característico do ácido wilfórico A. Por sua vez, no módulo 2, a biossíntese do celastrol é concluída por meio de uma cascata tandem de oxidações do tipo catecol. Inicialmente, o ácido wilfórico A é oxidado para formar uma orto-benzoquinona, que posteriormente sofre tautomerização formando um sistema *p*-quinonametídeo. Essa conversão promove a ampliação do sistema de duplas ligações

até o anel B do esqueleto triterpênico. Em seguida, a estrutura intermediária do tipo ciclohexadienona obtida sofre isomerização, originando o composto nomeado como ácido wilfórico J, um triterpeno que ainda não havia sido descrito na literatura e foi detectado pelos autores nas raízes de *T. wilfordii* pela primeira vez**.** Processos semelhantes de oxidação e isomerização ocorrem novamente a partir desse intermediário, culminando na formação da estrutura final do celastrol. Esses resultados experimentais envolvendo uma cascata de oxidações, integrados à constatação de que intermediários presentes nessas reações (como os ácidos wilfóricos A e J) sejam detectáveis em quantidade adequada na raíz de *T. wilfordii,* apontam que a conversão do ácido celastrogênico a celastrol seja um processo que ocorra lentamente na planta, sem a mediação de enzimas P450 (ZHAO *et al*., 2023; ZHAO, MIETTINEN, KAMPRANIS, 2024a).

Por fim, essencialmente, além de elucidar a biossíntese do celastrol em bancada via conversão química de um intermediário instável, os autores foram capazes de realizar a produção biotecnológica desse triterpeno quinonametídeo em levedura geneticamente modificada. Por meio de CRISPR/Cas9, os autores integraram ao genoma da levedura múltiplas cópias de genes previamente associados à biossíntese do celastrol, além de uma redutase do tipo P450 de *T. wilfordii* (*Tw*CPR1) e uma versão truncada do gene *tHMG2*. Esta última é análoga a uma enzima que aumenta a produção de precursores na via do MVA (Figura 6). Essas modificações foram realizadas em uma linhagem de levedura previamente desenvolvida e otimizada para a produção de terpenos, em um estudo anterior que identificou a enzima *Tw*CYP712K1 como responsável pela conversão de friedelina em ácido polpunônico (HANSEN *et al*., 2020). Em seguida, esse levedura modificada foi cultivado em meio tamponado e não ácido para evitar a formação de subprodutos, considerando a instabilidade do ácido celastrogênico em pH baixo. Dessa forma, foi possível produzir o ácido celastrogênico, que sofreu auto-oxidação a celastrol em levedura. Visto que esse processo de auto-oxidação em levedura durou 4 semanas, obteve-se uma otimização do mesmo (em termos de tempo, viabilidade e rendimento) realizando-se alternativamente um processo semi(bio)sintético no qual (1) produziu-se ácido celastrogênico em levedura através da tecnologia fermentativa supracitada, (2) isolou-se esse intermediário do meio de cultivo e (3) realizou-se em bancada a conversão química do ácido celastrogênico a celastrol de maneira análoga a já

descrita, mas aquecendo-se esse intermediário a 60ºC e em metanol, que resultou na conversão de 21,4% do ácido celastrogênico a celastrol (ZHAO *et al*., 2023; ZHAO, MIETTINEN, KAMPRANIS, 2024a).

Embora apresente potencial em termos de escalabilidade, a produção do celastrol ainda não atingiu a escala de mg/L, o que é um obstáculo à sua aplicação terapêutica visto que sua semi(bio)síntese ainda não atende às demandas industriais e portanto ainda não é comercialmente viável. No entanto, esse trabalho pioneiro estabelece a fundação para que, num futuro próximo, estratégias baseadas em engenharia metabólica otimizem a produção desse triterpeno de alto valor agregado, bem como de compostos com estrutura análoga (ZHAO *et al*., 2023).

1.5 Questões remanescentes a respeito da atividade catalítica de enzimas homólogas e da biossíntese de TQMs - justificativa da tese

Do ponto de vista biossintético, ainda há questões a serem respondidas. Por mais inovador que tenham sido as conclusões obtidas no trabalho de Zhao *et al.* (2023), os próprios autores admitem que não se pode descartar completamente a possibilidade de outras enzimas de *T. wilfordii* ainda não identificadas catalisarem e/ou acelerarem a conversão de ácido celastrogênico a celastrol. Essa possibilidade é plausível, inclusive com as enzimas que já foram identificadas e caracterizadas na via. A literatura aponta por exemplo que enzimas P450 atuantes em compostos de caráter muito apolar (a exemplo de triterpenos) tem a tendência de metabolizar uma maior amplitude de substratos, possivelmente porque seus sítios ativos e canais de acesso são essencialmente revestidos por resíduos hidrofóbicos e, portanto, são menos seletivos, pelo menos no que se refere a compostos hidrofóbicos (HANSEN *et al*., 2021). É o caso por exemplo da enzima *Tw*CYP81AM1, identificada por Zhao e colaboradores como ativa na via do celastrol. Dois anos antes de Zhao *et al.* (2023) publicarem seu trabalho, um grupo de pesquisa chinês identificou que a mesma enzima *Tw*CYP81AM1 catalisa a hidroxilação do ácido dehidrodiabético em C-15 (WANG *et al*., 2021). Assim, por mais que essas enzimas sejam caracterizadas na via, tais proteínas (assim como enzimas homólogas) podem atuar em outras etapas da via e carecem de mais estudos.

Além disso, embora CYPs da mesma subfamília apresentem mais de 55% de identidade de aminoácidos e a literatura afirme que enzimas de 60-70% de identidade de aminoácidos podem apresentar a mesma atividade bioquímica (MALHOTRA;

FRANKE, 2022) há vários casos descritos na em que enzimas P450 homólogas, pertencentes à mesma subfamília, exibem padrões oxidativos divergentes sobre o mesmo substrato. Por exemplo, Scheler *et al.* (2016) mostraram que a CYP76AH1 de *Salvia miltiorrhiza* atua como ferruginol sintase, ao passo que CYP76AH4, CYP76AH22, CYP76AH23 e CYP76AH24, de *Rosmarinus officinalis* e *Salvia fruticosa*, também catalisam uma oxidação adicional e formam 11-hidroxiferruginol. Embora essas enzimas apresentem alta similaridade de sequência (cerca de 80% de identidade em média), elas diferem pela presença dessa etapa oxidativa extra. De modo análogo, outros trabalhos constataram que enzimas da subfamília CYP76AK em plantas do gênero *Salvia* divergem quanto ao grau de oxidação em C-20: enquanto Hu *et al.* (2023) demonstrou que a enzima CYP76AK1 de *S. miltiorrhiza* catalsa apenas a hidroxilação de 11-hidroxiferruginol, outras referências indicaram que a enzima CYP76AK6 de *S. fruticosa* e *S. pomifera*, bem como CYP76AK7 e CYP76AK8 de *S. rosmarinus*, catalisam oxidações sucessivas em C-20 até a formação de ácido carnósico (SCHELER *et al.,* 2016; IGNEA *et al.,* 2016; LI *et al.,* 2022).

Esse indicativo que enzimas homólogas da mesma espécie ou de outras nem sempre apresentam a mesma atividade é uma motivação adicional para se estudar enzimas homólogas às previamente caracterizadas na via do celastrol. Embora, conforme já mencionado, algumas enzimas da subfamília CYP712K de *T. wilfordii* e M. *ilicifolia* hidroxilem o mesmo carbono da friedelina, existe a possibilidade de que outras enzimas homólogas apresentem uma atividade catalítica distinta.

Por fim, ainda não se elucidou a biossíntese de triterpenos quinonametídeos provavelmente derivados do celastrol, como maitenina e pristimerina, detectados em *M. ilicifolia*. Dessa forma, de modo coletivo, esses fatores motivam investigações adicionais. Essa tese visa responder algumas dessas questões e lançar luz sobre a biossíntese dos TQMs em *M. ilicifolia* usabdo abordagens atuais da engenharia metabólica e biologia sintética.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivos gerais

Como parte da rede INCT-Bionat (Processo FAPESP #14/50926-0 e CNPq #465637/2014-0) e vinculado ao CEPID-CIBFar (Processo FAPESP #13/07600-3), o presente trabalho visa elucidar etapas adicionais da via biossintética de triterpenos quinonametídeos (TQMs) na espécie vegetal *M. ilicifolia*, viabilizando sua futura produção em larga escala e consequente aplicação terapêutica em virtude de suas propriedades antitumorais.

1.6.2 Objetivos específicos

- Clonar e caracterizar funcionalmente enzimas de *M. ilicifolia* potencialmente envolvidas na biossíntese dos TQMs e induzir a sua expressão em *N. benthamiana*;
- Caracterizar as mesmas enzimas em *S. cerevisiae* visando validar a caracterização funcional *in planta;*
- Verificar a escalabilidade da produção biotecnológica de intermediários biossintéticos;
- Verificar se os compostos produzidos via expressão heteróloga de enzimas de *M. ilicifolia* estão originalmente presentes na espécie vegetal nativa;
- Propor uma via biogênese para os TQMs de *M. ilicifolia*.

REFERÊNCIAS

ADDGENE. Golden Gate Assembly Upgrades: More Fragments, Faster Assembly, and Higher Fidelity. [S. l.], 11 out. 2018. Disponível em: https://blog.addgene.org/golden-gate-assembly-upgrade-more-fragments-faster-assembly-and-higher-fidelity. Acesso em: 18 mar. 2026.

ALBERTI, S.; GITLER, A. D.; LINDQUIST, S. A suite of Gateway® cloning vectors for high-throughput genetic analysis in Saccharomyces cerevisiae. **Yeast**, v. 24, n. 10, p. 913-919, 2007.

ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from Celastraceae. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 33, p. 239-307, 2006.

ALVES, T. B. et al. Friedelin in Maytenus ilicifolia is produced by friedelin synthase isoforms. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 700, 2018.

ANHESINE, N. B. **Oxidoredutase de Maytenus: seu papel na biossíntese dos derivados friedelânicos.** 2022. 104p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, 2022.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 200-216, 2021.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**, Vol. 2, pp. 10.2 A. 1–10.2 A. 27. 2004.

BACHMANN, B. O.; VAN LANEN, S. G.; BALTZ, R.H. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making?. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 175-184, 2014.

BAILEY, S. F.; MORALES, L. A. A.; KASSEN, R. Effects of synonymous mutations beyond codon bias: the evidence for adaptive synonymous substitutions from microbial evolution experiments. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, n. 9, p. evab141, 2021.

BERGMAN, M.E. et al. Plant terpenoid biosynthetic network and its multiple layers of regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 95, p. 101287, 2024.

BERTHOLD, F. et al. Inside or outside? A new collection of Gateway vectors allowing plant protein subcellular localization or over-expression. **Plasmid**, v. 105, p. 102436, 2019.

BESSEAU, S. et al. Evolution of CYP71D drives the diversification of monoterpene indole alkaloid biosynthesis in Gentianales. **Plant Communications**, v. 6, n. 8, 2025.

BICALHO, K. U. et al. CYP712K4 catalyzes the C-29 oxidation of friedelin in the Maytenus ilicifolia quinone methide triterpenoid biosynthesis pathway. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 11, p. 2510-2522, 2019.

BIRAL, L. et al. Systematics of new world Maytenus (Celastraceae) and a new delimitation of the genus. **Systematic Botany**, v. 42, n. 4, p. 680-693, 2017.

BIRD, J.E.; MARLES-WRIGHT, J.; GIACHINO, A. A user's guide to Golden Gate cloning methods and standards. **ACS Synthetic Biology**, v. 11, n. 11, p. 3551-3563, 2022.

BOEKE, J. D. et al. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1987. p. 164-175.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOTERO, W.B. **Avaliação da especificidade e da capacidade produtiva da enzima friedelina sintase a partir de estudos de mutação sítio-dirigida**. 2023. 108f.Tese (Doutorado em Química) — Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2023.

BOUCHOUX, G. Gas-phase basicities of polyfunctional molecules. Part 1: Theory and methods. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 6, p. 775-835, 2007.

BRAUS, G. H. et al. The role of the TRP1 gene in yeast tryptophan biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7868-7875, 1988.

BRÜCKNER, K.; TISSIER, A. High-level diterpene production by transient expression in Nicotiana benthamiana. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 46, 2013.

BUFFA FILHO, W. et al. In vitro propagation of Maytenus ilicifolia (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, part. 6, p. 137-146, 2004.

BUFFA FILHO, W. et al. Quantitative determination of cytotoxicFriedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of Maytenus ilicifolia (celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 13, n. 2, p. 75-78, 2002.

BYUN, J.-Y. et al. Rap1 overexpression boosts triterpenoid saponin production in yeast by enhancing precursor supply and heterologous gene expression. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 47, 2025.

CARNEIRO, S.B. et al. Cyclodextrin–drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 642, 2019.

CARQUEIJEIRO, I. et al. Beyond the semi-synthetic artemisinin: metabolic engineering of plant-derived anti-cancer drugs. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 65, p. 17-24, 2020.

CHALLIS, G. L. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1555-1569, 2008.

CHAMBERS, M.C. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918-920, 2012.

CHAPPLE, C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. **Annual Review of Plant Biology**, v. 49, n. 1, p. 311-343, 1998.

CHEN, G. et al. Biosynthetic pathway of prescription cucurbitacin IIa and high-level production of key triterpenoid intermediates in engineered yeast and tobacco. **Plant Communications**, v. 5, n. 6, 2024.

CHENG, L.-T. et al. A long road ahead to reliable and complete medicinal plant genomes. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 2150, 2025.

CHRISTIANSON, T. W. et al. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, n. 1, p. 119-122, 1992.

CHUANG, L.; FRANKE, J. Rapid combinatorial coexpression of biosynthetic genes by transient expression in the plant host Nicotiana benthamiana. In: **Engineering Natural Product Biosynthesis: Methods and Protocols.** New York, NY: Springer US, 2022. p. 395-420.

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.

CORSINO, J. et al. Quantitative determination of maitenin and 22β-hydroxymaitenin in callus of Maytenus aquifolium (celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 9, n. 5, p. 245-247, 1998.

COURDAVAULT, V. et al. Metabolic engineering for plant natural products biosynthesis: new procedures, concrete achievements and remaining limits. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 12, p. 2145-2153, 2021.

CRUZ, P.L. et al. Identification of a second 16-hydroxytabersonine-O-methyltransferase suggests an evolutionary relationship between alkaloid and flavonoid metabolisms in Catharanthus roseus. **Protoplasma**, v. 260, n. 2, p. 607-624, 2023.

CZECHOWSKI, T. et al. Evolution of linear triterpenoid biosynthesis within the Euphorbia genus. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 5602, 2025.

DA 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.

DELLEMONACHE, F. et al. Polpunonic acid, a new triterpenic acid with friedelane carbon skeleton. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 102, n. 8, p. 636-646, 1972.

DEN DUNNEN, J. T. et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. **Human Mutation**, v. 37, n. 6, p. 564-569, 2016.

DIXON, R. A.; DICKINSON, A. J. A century of studying plant secondary metabolism—From “what?” to “where, how, and why?”. **Plant Physiology**, v. 195, n. 1, p. 48-66, 2024.

DONG, L. et al. Monoterpene biosynthesis potential of plant subcellular compartments. **New Phytologist,** v. 209, n. 2, p. 679-690, 2016.

DU, P. et al. Genome-wide identification and characterization of the HMGR gene family in taraxacum kok-saghyz provide insights into its regulation in response to ethylene and Methyl Jsamonate treatments. **Plants**, v. 13, n. 18, p. 2646, 2024.

DUAN, H.et al. Triterpenoids from Tripterygium wilfordii. **Phytochemistry**, v. 53, n. 7, p. 805-810, 2000.

DURAIRAJ, P.; HUR, J.-S.; YUN, H. Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 125, 2016.

ENDY, D. Foundations for engineering biology. **Nature**, v. 438, n. 7067, p. 449-453, 2005.

ENGLER, C.; KANDZIA, R.; MARILLONNET, S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. **PloS One**, v. 3, n. 11, p. e3647, 2008.

FALEV, D.I. et al. Rapid simultaneous determination of pentacyclic triterpenoids by mixed-mode liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1609, p. 460458, 2020.

FIALLOS-JURADO, J. et al. Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in Chenopodium quinoa leaves. **Plant Science**, v. 250, p. 188-197, 2016.

FONTANIN, K. A. P. **Maytenus ilicifolia e Xanthomonas albilineans: uma interação desvendada pela interdisciplinaridade entre a química e a genética**. 2023. 90f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2023.

FRENCH, K. E. Harnessing synthetic biology for sustainable development. **Nature Sustainability**, v. 2, n. 4, p. 250-252, 2019.

FUKUDA, N. Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1513, 2023.

GAVIRA, C. et al. Challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by Saccharomyces cerevisiae. **Metabolic Engineering**, v. 18, p. 25-35, 2013.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007.

GHOSH, S. et al. Triterpenoids: Structural diversity, biosynthetic pathway, and bioactivity. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, 2021. v.67, p. 411-461.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2002. p. 87-96.

GNÜGGE, R.; RUDOLF, F. Saccharomyces cerevisiae Shuttle vectors. **Yeast**, v. 34, n. 5, p. 205-221, 2017.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

GONZÁLEZ, Antonio et al. Crystal structure of orthosphenic acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 3759-3761, 1983.

GÖRGENS, J. F. et al. Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by S. cerevisiae in defined medium. **Yeast**, v. 21, n. 14, p. 1205-1217, 2004.

GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.

GRÜTZNER, R.; MARILLONNET, S. Generation of MoClo standard parts using Golden Gate cloning. In: **DNA Cloning and Assembly: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 107-123.

GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001.

GUNATILAKA, A.A Leslie. Triterpenoid quinonemethides and related compounds (Celastroloids). **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the chemistry of organic natural products**, p. 1-123, 1996.

HAN, J. Y. et al. Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (PdFRS) encoding a monofunctional friedelin synthase in Populus davidiana. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 95-111, 2019.

HANSEN, C. C. et al. Plant cytochrome P450 plasticity and evolution. **Molecular Plant**, v. 14, n. 8, p. 1244-1265, 2021.

HANSEN, N. L. et al. Integrating pathway elucidation with yeast engineering to produce polpunonic acid the precursor of the anti-obesity agent celastrol. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 15, 2020.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.A; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HAWKES, T. R. et al. Purification and characterization of the imidazoleglycerol-phosphate dehydratase of Saccharomyces cerevisiae from recombinant Escherichia coli. **Biochemical Journal**, v. 306, n. 2, p. 385-397, 1995.

HERBERT, R.B. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 5, p. 494-508, 2003.

HERMAN, P.K. Stationary phase in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 602-607, 2002.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 7, p. 962-998, 2020.

HOFF, B. et al. Unlocking nature's biosynthetic power—metabolic engineering for the fermentative production of chemicals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 5, p. 2258-2278, 2021.

HU, J. et al. Functional divergence of CYP76AKs shapes the chemodiversity of abietane-type diterpenoids in genus Salvia. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 4696, 2023.

HWANG, H.-H.; YU, M.; LAI, E.-M. Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. **The Arabidopsis Book**, v. 15, p. e0186, 2017.

IGNEA, C. et al. Carnosic acid biosynthesis elucidated by a synthetic biology platform. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 13, p. 3681-3686, 2016.

ISTIANDARI, P. et al. Comparative analysis of NADPH-cytochrome P450 reductases from legumes for heterologous production of triterpenoids in transgenic Saccharomyces cerevisiae. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 762546, 2021.

INVITROGEN. Gateway Technology with Clonase II. **User Guide**, p. 74, 2012.

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

JANSING, J. et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in Nicotiana benthamiana for the production of recombinant proteins lacking β-1, 2-xylose and core α-1, 3-fucose. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 2, p. 350-361, 2019.

JESSOP-FABRE, M.M. et al. EasyClone-MarkerFree: A vector toolkit for marker-less integration of genes into Saccharomyces cerevisiae via CRISPR-Cas9. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 8, p. 1110-1117, 2016.

JOHNSTON, E.J. et al. Cyclodextrins sequester glycosylated triterpenoid saponins from engineered yeast. **Bioresource Technology Reports**, v. 29, p. 102058, 2025.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002.

KAUFMANN, A.; WALKER, S. Accuracy of relative isotopic abundance and mass measurements in a single-stage orbitrap mass spectrometer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 9, p. 1081-1090, 2012.

KHAKIMOV, B. et al. Identification and genome organization of saponin pathway genes from a wild crucifer, and their use for transient production of saponins in Nicotiana benthamiana. **The Plant Journal**, v. 84, n. 3, p. 478-490, 2015.

KIM, G. B. et al. Metabolic engineering for sustainability and health. **Trends in Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 425-451, 2023.

KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1539-1555, 2011.

KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 335-355, 2009.

KIYOKAWA, K. et al. Construction of disarmed Ti plasmids transferable between Escherichia coli and Agrobacterium species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1845-1851, 2009.

KNOLHOFF, A. M.; CALLAHAN, J. H.; CROLEY, T. R. Mass accuracy and isotopic abundance measurements for HR-MS instrumentation: capabilities for non-targeted analyses. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 1285-1294, 2014.

KOHLHAW, G. B. et al. Transposed LEU2 gene of Saccharomyces cerevisiae is regulated normally. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 2, p. 852-855, 1980.

KUTNEY, J. P. et al. Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of Maytenus buchananii. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 653-657, 1981.

KWOK, R. Five hard truths for synthetic biology. **Nature**, v. 463, p. 288-290, 2010.

LAN, X.; XIAO, H. Cyclodextrins facilitate the efficient secretion of an anti-tumor triterpenoid ganoderic acid HLDOA by Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 2, p. 142-148, 2020.

LEE, A.-R. et al. Increased sesqui-and triterpene production by co-expression of HMG-CoA reductase and biotin carboxyl carrier protein in tobacco (Nicotiana benthamiana). **Metabolic Engineering**, v. 52, p. 20-28, 2019.

LEE, L.-Y.; GELVIN, S. B. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 325-332, 2008.

LEPESHEVA, G.I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14α-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 467-477, 2007.

LERA-RAMÍREZ, M. et al. Revised fission yeast gene and allele nomenclature guidelines for machine readability. **Genetics**, v. 225, n. 3, p. iyad143, 2023.

LEZIN, E. et al. Genome-based discovery of pachysiphine synthases in Tabernaemontana elegans. **The Plant Journal**, v. 120, n. 5, p. 1880-1900, 2024.

LI, K. et al. Terpenoids from Tripterygium wilfordii. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 791-796, 1997.

LI, C.-Y. et al. The sage genome provides insight into the evolutionary dynamics of diterpene biosynthesis gene cluster in plants. **Cell Reports**, v. 40, n. 7, 2022.

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

LIU, Q. et al. Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and Nicotiana benthamiana. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23255, 2011.

LIU, Y.-J. et al. The MVA pathway genes expressions and accumulation of celastrol in Tripterygium wilfordii suspension cells in response to methyl jasmonate treatment. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 18, n. 7, p. 619-628, 2016.

LIU, Y. et al. Complete biosynthesis of QS-21 in engineered yeast. **Nature**, v. 629, n. 8013, p. 937-944, 2024.

LOOS, M. et al. Accelerated isotope fine structure calculation using pruned transition trees. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 11, p. 5738-5744, 2015.

LU, Y. et al. Biosynthesis, total synthesis, structural modifications, bioactivity, and mechanism of action of the quinone-methide triterpenoid celastrol. **Medicinal Research Reviews**, v. 41, n. 2, p. 1022-1060, 2021.

LU, Y. et al. Characterization of the cytochrome P450 CYP716C52 in celastrol biosynthesis and its applications in engineered Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Natural Products**, v. 87, n. 2, p. 176-185, 2024.

LV, J.-M. et al. Biosynthesis of helvolic acid and identification of an unusual C-4-demethylation process distinct from sterol biosynthesis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1644, 2017.

MADDEN, T. The BLAST sequence analysis tool. The NCBI Handbook. **National Center for Biotechnology Information (US)**, 2013.

MALHOTRA, K.; FRANKE, J. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated tailoring of triterpenoids and steroids in plants. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 1289-1310, 2022.

MARILLONNET, S.; GRÜTZNER, R. Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 130, n. 1, p. e115, 2020.

MARTIN, L. BB et al. Complete biosynthesis of the potent vaccine adjuvant QS-21. **Nature Chemical Biology,** v. 20, n. 4, p. 493-502, 2024.

MAZZEU, B. F. **Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade**. 2019. 107 f. Tese (Doutorado em Química) — Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2019.

MEDEMA, M.H.; FISCHBACH, M. A. Computational approaches to natural product discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 9, p. 639-648, 2015.

MÉTEIGNIER, L.-V. et al. Harnessing the spatial and transcriptional regulation of monoterpenoid indole alkaloid metabolism in Alstonia scholaris leads to the identification of broad geissoschizine cyclase activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 219, p. 109363, 2025.

MIETTINEN, K. et al. The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14153, 2017.

MIETTINEN, K. et al. The TriForC database: a comprehensive up-to-date resource of plant triterpene biosynthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D586-D594, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (ReniSUS)**. Disponível em: < https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/plantas-medicinais-e-fitoterapicos/ppnpmf/arquivos/2014/renisus.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2026.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MITCHELL, A.J.; WENG, J.-K. Unleashing the synthetic power of plant oxygenases: from mechanism to application. **Plant Physiology**, v. 179, n. 3, p. 813-829, 2019.

MIZUTANI, M.; OHTA, D. Diversification of P450 genes during land plant evolution. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 291-315, 2010.

MOLINA-HIDALGO, F. J. et al. Engineering metabolism in Nicotiana species: a promising future. **Trends in Biotechnology**, v. 39, n. 9, p. 901-913, 2021.

MOROTA, T. et al. Triterpenes from Tripterigium wilfordii. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1153-1157, 1995.

MOSER, S.; PICHLER, H. Identifying and engineering the ideal microbial terpenoid production host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 14, p. 5501-5516, 2019.

MOSES, T. et al. Bioengineering of plant (tri) terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro. **New Phytologist**, v. 200, n. 1, p. 27-43, 2013.

MOSES, T. et al. Combinatorial biosynthesis of sapogenins and saponins in Saccharomyces cerevisiae using a C-16α hydroxylase from Bupleurum falcatum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1634-1639, 2014.

MÜLLEDER, M. et al. Saccharomyces cerevisiae single-copy plasmids for auxotrophy compensation, multiple marker selection, and for designing metabolically cooperating communities. **F1000Research**, v. 5, p. 2351, 2016.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 1, p. 141-154, 2018.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. In: **Cytochrome P450 protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 1-10.

NELSON, D.R. The cytochrome p450 homepage. **Human Genomics**, v. 4, n. 1, p. 59, 2009.

NELSON, D.; WERCK-REICHHART, D. A P450-centric view of plant evolution. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 194-211, 2011.

NES, W. D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6423-6451, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIELSEN, J. Engineering yeast to produce plant-derived anti-obesity agent. **Nature Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1204-1205, 2023.

NIELSEN, J.; KEASLING, J. D. Engineering cellular metabolism. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1185-1197, 2016.

NIERO, R.; FALONI DE ANDRADE, S.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the Maytenus genus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1851-1871, 2011.

OELSCHLAEGER, P. Molecular mechanisms and the significance of synonymous mutations. **Biomolecules**, v. 14, n. 1, p. 132, 2024.

OPALEK, M.; WLOCH-SALAMON, D.; SMUG, B.J. Assessing methods for estimating microbial lag phase duration: a comparative analysis using Saccharomyces cerevisiae empirical and simulated data. **FEMS Yeast Research**, v. 25, p. foaf033, 2025.

ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 2, p. 932-948, 2010.

PADDON, C. J. et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 528-532, 2013.

PAVIA, D.L. et al. **Introdução à espectroscopia**: Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

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 (PCTOC)**, v. 130, n. 2, p. 405-416, 2017.

PAZ, T. A. et al. Production of the quinone-methide triterpene maytenin by in vitro adventitious roots of Peritassa campestris (Cambess.) AC Sm.(Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 485837, 2013.

PERALTA, C.O.; LATINI, A.O.; MENDONÇA, F.M. Prospecção científica e tecnológica de espinheira santa Maytenus Ilicifolia e Maytenus Aquifolium. **Cadernos de Prospecção**, v. 15, n. 3, p. 929-943, 2022.

PÉRICO L.L. et al. (2018) Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek. In: **Medicinal and Aromatic Plants of South America: Brazil.** Edited by Albuquerque U.P., Patil U., Máthé Á. pp. 323–335. Springer, Dordrecht.

PETRONELLI, A.; PANNITTERI, G.; TESTA, U.. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anti-cancer drugs**, v. 20, n. 10, p. 880-892, 2009.

PEYRET, H.; BROWN, J.K.M.; LOMONOSSOFF, G.P. Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5′ and 3′ untranslated regions. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 108, 2019.

PEYRET, H.; LOMONOSSOFF, G. P. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 83, n. 1, p. 51-58, 2013.

POLAKOWSKI, T.; STAHL, U.; LANG, C. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 66-71, 1998.

POLLIER, J. et al. The protein quality control system manages plant defence compound synthesis. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 148-152, 2013.

PRINS, R.C.; BILLERBECK, S. A buffered media system for yeast batch culture growth. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 127, 2021.

PRONK, J.T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095-2100, 2002.

RACOLTA, S. et al. The triterpene cyclase protein family: a systematic analysis. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 80, n. 8, p. 2009-2019, 2012.

REED, J. et al. A translational synthetic biology platform for rapid access to gram-scale quantities of novel drug-like molecules. **Metabolic Engineering**, v. 42, p. 185-193, 2017.

REED, J.; OSBOURN, A. Engineering terpenoid production through transient expression in Nicotiana benthamiana. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 10, p. 1431-1441, 2018.

REN, Y.; KINGHORN, A. D. Natural product triterpenoids and their semi-synthetic derivatives with potential anticancer activity. **Planta Medica**, v. 85, n. 11/12, p. 802-814, 2019.

RHOURRI-FRIH, B. et al. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC–MS. A comparative study between APCI and APPI. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 1, p. 71-80, 2009.

RO, D-K. et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 940-943, 2006.

ROSANO, G.L.; CECCARELLI, E.A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

ROSE, M.; BOTSTEIN, D. Structure and function of the yeast URA3 gene differentially regulated expression of hybrid β-galactosidase from overlapping coding sequences in yeast. **Journal of Molecular Biology**, v. 170, n. 4, p. 883-904, 1983.

SAÏDA, F. Overview on the expression of toxic gene products in Escherichia coli. **Current Protocols in Protein Science**, v. 50, n. 1, p. 5.19. 1-5.19. 13, 2007.

SAINSBURY, F.; THUENEMANN, E. C.; LOMONOSSOFF, G. P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, n. 7, p. 682-693, 2009.

SALVADOR, J.A.R. et al. Oleanane-, ursane-, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: Recent advances in cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 95-130, 2017.

SALZBERG, S.L. Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 92, 2019.

SÁNCHEZ, A. K. V. **Design and implementation of molecular circuits for mitigating genetic diseases**. 2022. 173p. Tese de Doutorado. Technische Universität Hamburg.

SÁNCHEZ-ÁVILA, N. et al. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 40-48, 2009.

SANTONI, M. M. et al. Comparative transcriptome profiling of Maytenus ilicifolia root and leaf. In: **Brazilian Symposium on Bioinformatics**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 3-14.

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

SANTOS, L. C. DOS; FURLAN, M.; AMORIM, M. R. **Produtos naturais bioativos**. São Paulo: Editora Cultura Acadêmica, 2016.

SCHELER, U. et al. Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12942, 2016.

SCHWEINGRUBER, F. H.; BÖRNER, A.; SCHULZE, E.-D. **Atlas of Stem Anatomy in Herbs, Shrubs and Trees: Volume 1.** Springer Science & Business Media, 2011.

SEKI, H.; TAMURA, K.; MURANAKA, T. P450s and UGTs: key players in the structural diversity of triterpenoid saponins. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 8, p. 1463-1471, 2015.

SESHADRI, K. et al. Synthetic biology in natural product biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 125, n. 7, p. 3814-3931, 2025.

SHAN, W.-G. et al. Natural friedelanes. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1392-1434, 2013.

SHEN, B. A new golden age of natural products drug discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.

SIKORSKI, R. S.; HIETER, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae. **Genetics**, v. 122, n. 1, p. 19-27, 1989.

SIMMONS, M. P. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlim: Springer, 2004. 6: 29-64.

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, n. 1, p. 36858, 2016.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Screening of 2A peptides for polycistronic gene expression in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 5, p. foy036, 2018.

STEPHENSON, M. J. et al. Transient expression in Nicotiana benthamiana leaves for triterpene production at a preparative scale. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 138, p. 58169, 2018.

STERMER, B.A.; BIANCHINI, G.M.; KORTH, K.L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 7, p. 1133-1140, 1994.

STRUHL, K.; DAVIS, R. W. Production of a functional eukaryotic enzyme in Escherichia coli: cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole-glycerolphosphate dehydratase (his3). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5255-5259, 1977.

SUN, W. et al. Herbgenomics: decipher molecular genetics of medicinal plants. **The Innovation**, v. 3, n. 6, 2022.

SUN, W. et al. Novel trends for producing plant triterpenoids in yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 618-632, 2019.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D609-D617, 2025.

THIMMAPPA, R. et al. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 225-257, 2014.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1217-1220, 2011.

UDDIN, J. et al. Structure–fragmentation study of pentacyclic triterpenoids using electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (ESI-QTOFMS/MS). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 36, n. 4, p. e9243, 2022.

UGOLINI, S.; TOSATO, V.; BRUSCHI, C. V. Selective fitness of four episomal shuttle-vectors carrying HIS3, LEU2, TRP1, and URA3 selectable markers in Saccharomyces cerevisiae. **Plasmid**, v. 47, n. 2, p. 94-107, 2002.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W71-W74, 2007.

UNTERLINNER, B.; LENZ, R.; KUTCHAN, T. M. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy Papaver somniferum. **The Plant Journal**, v. 18, n. 5, p. 465-475, 1999.

VAN ENGELEN, F.A. et al. pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. **Transgenic Research**, v. 4, n. 4, p. 288-290, 1995.

VISWANATHAN, N. I. Salaspermic acid, a new triterpene acid from Salacia macrosperma Wight. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 349-352, 1979.

VORONOV, I.S. et al. Determination of pentacyclic triterpenoids in plant biomass by porous graphitic carbon liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3945, 2023.

WALSH, C. T.; TANG, Y. **Natural product biosynthesis: chemical logic and enzymatic machinery**. Royal Society of Chemistry, 2022.

WANG, B. et al. Transient production of artemisinin in Nicotiana benthamiana is boosted by a specific lipid transfer protein from A. annua. **Metabolic Engineering**, v. 38, p. 159-169, 2016.

WANG, J. et al. A cytochrome P450 CYP81AM1 from Tripterygium wilfordii catalyses the C-15 hydroxylation of dehydroabietic acid. **Planta**, v. 254, n. 5, p. 95, 2021.

WANG, S. et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes from Glycine max regulate plant growth and isoprenoid biosynthesis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 3902, 2023.

WANG, Z. et al. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from Kalanchoe daigremontiana: enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other triterpenoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29703-29712, 2010.

WEBER, E. et al. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. **PloS One**, v. 6, n. 2, p. e16765, 2011.

WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Cytochromes P450: a success story. **Genome Biology**, v. 1, n. 6, p. reviews3003. 1, 2000.

WONG, G. et al. Reconstituting the complete biosynthesis of D-lysergic acid in yeast. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 712, 2022.

WU, Z.-J. et al. Evaluation of relative isotopic abundance measurements in a quadrupole time-of-flight mass spectrometer for elemental composition determination of natural products in traditional Chinese medicine. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 19, n. 2, p. 91-102, 2013.

XIAO-CHAO, C. H. E. N. et al. Identification of a cytochrome P450 from Tripterygium hypoglaucum (Levl.) Hutch that catalyzes polpunonic acid formation in celastrol biosynthesis. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 20, n. 9, p. 691-700, 2022.

XU, B. et al. Identification and characterization of L-lysine decarboxylase from Huperzia serrata and its role in the metabolic pathway of lycopodium alkaloid. **Phytochemistry**, v. 136, p. 23-30, 2017.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 261-291, 2004.

YAN, C. et al. Auxotrophs compromise cell growth and fatty acid production in Saccharomyces cerevisiae. **Biotechnology Journal**, v. 18, n. 4, p. 2200510, 2023.

ZERBE, P. et al. Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems. **Plant Physiology**, v. 162, n. 2, p. 1073-1091, 2013.

ZHANG, J.; QIAN, W. Functional synonymous mutations and their evolutionary consequences. **Nature Reviews Genetics**, v. 26, n. 11, p. 789-804, 2025.

ZHAO, M. et al. Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by Saccharomyces cerevisiae. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 32, 2024b.

ZHAO, Y. et al. Biosynthesis and biotechnological production of the anti-obesity agent celastrol. **Nature Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1236-1246, 2023.

ZHAO, Y.; MIETTINEN, K.; KAMPRANIS, S. C. Celastrol: A century-long journey from the isolation to the biotechnological production and the development of an antiobesity drug. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 81, p. 102615, 2024a.

ZHAO, Y. et al. Structure-Agnostic Bioactivity-Driven Combinatorial Biosynthesis Reveals New Antidiabetic and Anticancer Triterpenoids. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 64, n. 4, p. e202416218, 2025.

ZHOU, J. et al. Cytochrome P450 catalyses the 29-carboxyl group formation of celastrol. **Phytochemistry**, v. 190, p. 112868, 2021.

ZHOU, Jiawei et al. Friedelane-type triterpene cyclase in celastrol biosynthesis from Tripterygium wilfordii and its application for triterpenes biosynthesis in yeast. **New Phytologist**, v. 223, n. 2, p. 722-735, 2019.

ZHU, Y. et al. High-yield production of protopanaxadiol from sugarcane molasses by metabolically engineered Saccharomyces cerevisiae. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 230, 2022.