

KARINA ALVES PINHEIRO

**Estudo da formação da friedelina a partir de
mutações no gene da friedelina sintase**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção de título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Co-orientadora: Dra. Lidiane Gaspareto Felipe

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

P654e	Pinheiro, Karina Alves Estudo da formação da friedelina a partir de mutações no gene da friedelina sintase / Karina Alves Pinheiro. – Araraquara : [s.n], 2015 67 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Maysa Furlan Coorientador: Lidiane Gaspareto Felipe 1. Espinheira santa. 2. Mutagenese. 3. Clonagem. 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. 5. Espectrometria de massa. I. Título
-------	---

KARINA ALVES PINHEIRO

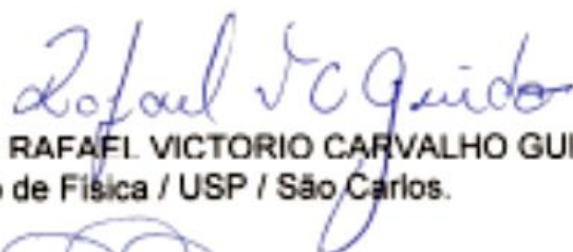
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 27 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. MAYSA FURLAN (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Prof. Dr. RAFAEL VICTORIO CARVALHO GUIDO
Instituto de Física / USP / São Carlos.



Drª. ADRIANA APARECIDA LOPES
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNAERP / Ribeirão Preto.

INFORMAÇÕES CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Karina Alves Pinheiro

Filiação: João Alves Pinheiro Neto e Rute Ferraz da Silva Alves Pinheiro

Nascimento: 25/02/1987 - São Paulo/SP - Brasil

Estado Civil: Solteira

Endereço residencial: Rua Marino Félix, 294

Casa Verde - São Paulo

02515-030, SP - Brasil

Telefone: (11) 3951-0100

E-mail: karinaalves.87@gmail.com

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Departamento de Química Orgânica

Rua Prof. Francisco Degni, S/N

Quitandinha - Araraquara

14800-970, SP - Brasil

Telefone: (16) 3301-6600 – ramal 6788

FORMAÇÃO PROFISSIONAL

Graduação

Curso: Bacharelado com atribuições tecnológicas e Licenciatura em Química

Instituição: Escola de Engenharia, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil.

Período: agosto de 2008 a julho de 2012.

Pós-Graduação

Curso: Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica - Química dos Produtos Naturais.

Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Projeto: “Estudo da formação da friedelina a partir de mutações no gene da friedelina sintase”.

Orientadora: Maysa Furlan

Período: agosto de 2012 a julho de 2015

Iniciação Científica

Área de Concentração: Química Analítica - Análise por ativação com nêutrons/Análise de Traços e Química Ambiental.

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – Universidade de São Paulo – USP.

Projeto: “Estudo sobre a determinação de elementos de terras raras em amostras de plantas acumuladoras de poluentes atmosféricos”.

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

Orientadora: Mitiko Saiki

Período: setembro de 2009 a fevereiro de 2011

Área de Concentração: Química dos Produtos Naturais – Química computacional.

Instituição: Instituto de Química – Universidade de São Paulo – USP.

Projeto: “Estudo da atividade biológica de lactonas sesquiterpênicas usando descritores moleculares”.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

Orientador: Vicente de Paulo Emerenciano

Período: março de 2011 a julho de 2012

Estágios

Estágio de Licenciatura em Química

Instituição: Colégio Centenário

Período: Fevereiro de 2011 a Junho de 2011

Estágio de Licenciatura em Química

Instituição: Escola Estadual Professor Benedito Tolosa

Período: Fevereiro de 2009 a Novembro de 2010

Monitoria de Química Analítica Qualitativa I

Instituição: Universidade Presbiteriana Mackenzie

Período: Fevereiro de 2010 a Junho de 2010

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais

FELIPPE, L.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; PINHEIRO, K. A.; SANTOS, V. A. F. F. M.; VALENTINI, S.R.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Metabolic profile of genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* to produce friedelin. In: 11th ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE METABOLOMICS SOCIETY, 2015, San Francisco Bay Area, California – USA. Apresentação de pôster.

PINHEIRO, K. A.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; VALENTINI, S.R.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Mutational studies on friedelin and friedelanol formation. In: 4th BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS (BCNP) AND THE XXX ANNUAL MEETING ON MICROMOLECULAR EVOLUTION,

SYSTEMATICS AND ECOLOGY (RESEM), 2013, Natal - RN. Apresentação de pôster.

PINHEIRO, K. A.; FERREIRA, M. J. P.; SCHIMDT, T. J.; EMERENCIANO, V. P. Relação quantitativa entre estrutura química – atividade citotóxica de lactonas sesquiterpênicas sobre células H.Ep.-2 (Carcinoma de laringe). In: 35ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2012, Águas de Lindóia - SP. Apresentação de pôster.

PINHEIRO, K. A.; SAIKI, M. Estudo sobre a interferência da fissão de urânio na determinação de terras raras pelo método de ativação com nêutrons. In: XVI SEMINÁRIO ANUAL - PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - CNPQ - PIBIC/VII SEMINÁRIO ANUAL - PROGRAMA DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA CNEN - PROBIC, 2010. São Paulo - SP. Apresentação oral e pôster.

Trabalhos submetidos à publicação

SANTOS, V. A. F. F. M.; FELIPPE, L. G.; PINHEIRO, K. A.; MOREIRA, T. M. S.; FURLAN, M. *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) e os produtos naturais que a santificam. In: SANTOS, L. C. dos; FURLAN, M, (Org.). **Produtos naturais bioativos**. São Paulo: Ed. Unesp, 2015. E-book. Submetido

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me dar coragem, inspiração e força para concluí-lo.

As meus pais João e Rute, que sempre acreditaram em mim, incentivando-me de todas as maneiras possíveis a conquistar todos os meus sonhos.

As meus irmãos Karoline e Pedro Luis que sempre trouxeram grandes experiências de vida a mim, incluindo o amor e a amizade.

Ao meu amado Raffael pelo amor, carinho, constante apoio e pelas alegrias e tristezas compartilhadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sabedoria que me foi dada ao longo da vida, por ter direcionado o meu caminho e pela força para conseguir trilhá-lo. Sem Ele não teria chegado até aqui.

À minha orientadora Maysa Furlan pela confiança depositada em mim na realização desse projeto inovador, pelos ensinamentos fornecidos, por todo apoio e incentivo a prosseguir nessa carreira brilhante.

À minha co-orientadora Lidiane Gaspareto Fellipe por todos os conhecimentos transmitidos com tanta dedicação e pelo apoio prestado durante o trabalho.

Aos meus pais, João e Rute, que sempre acreditaram no meu futuro durante a trajetória oferecendo-me muito amor, carinho e incentivo. Em todos os momentos me mostraram que é possível realizar qualquer um dos meus sonhos e objetivos através de muito trabalho e esforço. Nas minhas impossibilidades se responsabilizaram em me fazer enxergar que sempre posso contar com vocês fazendo-me sentir tão segura. Gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu pai que dedicou tanto da sua vida em me fazer feliz. Sei que de alguma maneira, Deus te fará saber de mais esse sonho conquistado, no qual, nunca mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Karoline e Pedro Luis, pelo amor e amizade e à minha querida sobrinha Bianca por fazer os meus dias mais alegres.

Ao meu amado Raffael, pessoa com quem amo partilhar a vida e que me ensinou a amar independente de qualquer situação. Obrigada por apoiar meus sonhos e ajudar a realizá-los com amor, carinho, amizade, fundamental para o nosso relacionamento, e por sua capacidade de me trazer paz em meio à correria. Ao seu lado me sinto mais viva de verdade.

A toda minha família, meu apoio.

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista que promoveu a realização desse trabalho.

Aos amigos e docentes do Departamento de Química Orgânica pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade. Sempre me lembrarei de todos com grande carinho.

À Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira pela fundamental colaboração nas principais etapas desse projeto.

Aos doutores Christiann Davis Tosta e Alexander Alves da Silva por todos os ensinamentos e ajuda na utilização da cromatografia gasosa.

Ao Dr. Nivaldo Boralle e à Dra. Lucinéia Vizzotto, pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear, pelos ensinamentos, discussões e amizade.

Aos técnicos dos laboratórios do NuBBE, João Bronzel e Juliana Rodrigues, por todo apoio na realização desse trabalho.

Aos professores Cleslei F. Zanelli e Sandro R. Valentini do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara e ao professor Norberto Pepporine Lopes da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto pela colaboração em etapas tão importantes desse projeto.

Aos professores doutores Juliana Silva da Luz, Adriano Mondini e Patrícia Mastroianni da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara por todo ensinamento fornecido.

Às amigas queridas Bruna, Viviane, Vania e Rute que compartilharam comigo as alegrias, tristezas e dificuldades. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Lembrarei de todas com muito carinho.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa de Biossíntese de Produtos Naturais: Andrea, Amauri, Amanda, Renan, Daniel e Tiago, pelas discussões, confiança e, acima de tudo, pelos laços de amizade.

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

Aos funcionários e funcionárias da Seção de Pós-Graduação pela atenção, ajuda e dedicação aos serviços prestados.

Às funcionárias da biblioteca, pelas ajudas tão importantes.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

*Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio
entendimento.
Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas.
Não sejas sábio a teus próprios olhos; teme ao Senhor e aparta-te do
mal.*

(Provérbios 3:5-7)

RESUMO

A clonagem de oxidoesqualeno ciclase das folhas de *M. ilicifolia* já foi estudada por nosso grupo, bem como os estudos de expressão em *S. cerevisiae* geneticamente modificada para melhor produção da friedelina. Para o desenvolvimento do trabalho, optou-se por realizar a expressão do gene de friedelina sintase de *Kalanchoe daigremontiana* obtido comercialmente, cuja sequência foi otimizada de acordo com o *codon usage* de *S. cerevisiae*. A partir das mutações sítio-dirigidas, duas mutações no gene sintético foram confirmadas. A primeira mutação do resíduo de leucina para valina na posição 483 do gene sintético levou à produção da friedelina e dos triterpenos β -amirina e taraxerol enquanto a segunda mutação do resíduo de leucina para treonina na mesma posição deste gene produziu unicamente a β -amirina. Após a padronização e análises das mutações no gene sintético, as mesmas mutações foram realizadas no gene da friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia*. A mutação por valina levou à produção de β -amirina e friedelina e, igualmente ao gene sintético, a mutação por treonina levou à formação apenas da β -amirina. De acordo com a mutação gerada, os compostos produzidos pela levedura foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas e observou-se que algumas mutações levavam a uma alteração da especificidade do produto formado pela enzima. Esses estudos sugerem que a relação da estrutura proteica-função da enzima produtora da friedelina possa estar associada ao ajuste da cavidade ativa da enzima e, quando um resíduo de aminoácido do sítio ativo é substituído por resíduos menores, a ampliação da cavidade proporciona a estabilização prévia do carbocátion em um triterpeno com menor número de rearranjos, como a β -amirina. Desta forma, estes dados contribuem com o entendimento da especificidade desta enzima, são os primeiros a retratar a importância de um aminoácido do sítio ativo na produção específica do triterpeno pentacíclico com maior número de rearranjos e é a base de futuros estudos de engenhieramento da enzima para aumento da sua produtividade.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, clonagem, cromatografia gasosa, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The cloning of oxidosqualene cyclase from *Maytenus ilicifolia* leaves and expression in *Saccharomyces cerevisiae* has been studied by our group to generate friedelin. The main objective of this project was to carry out the expression of friedelin synthase gene using commercially *Kalanchoe daigremontiana*, whose sequence has been optimized according to the codon usage of *S. cerevisiae*. In such studies, two mutations in the synthetic gene were confirmed. The first mutation of valine for leucine residue at position 483 synthetic gene led to the production of friedelin, β -amyrin and tararexol, while the second mutation of leucine to threonine residue, at the same position, produced exclusively β -amyrin. The same mutations were performed using the gene of friedelin synthase of *Maytenus ilicifolia*. The compound identities were confirmed by gas chromatography and mass spectrometry. The results suggested that the ratio of protein production-enzyme function, involved in the production of friedelin, may be associated with the active cavity of the enzyme setting, when an amino acid residue of the active site is replaced for smaller, expanding the cavity to provide the prior stabilization of the carbocation in the biosynthetic pathway of triterpenes to produce β -amyrin. Thus, these data contribute to understand the specificity of such enzyme. Furthermore, this study was the first one to show the importance of each amino acid in the active site of the enzyme to produce a pentacyclic triterpene with the highest number of rearrangements and was the basis for future studies of enzyme engineering to increase productivity of such compounds.

Keywords: *Maytenus ilicifolia*, cloning, gas chromatography, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conversão do 2,3-epoxiesqualeno à friedelina e posteriores etapas de oxidação para dar origem ao triterpeno quinonametídeo, exemplificado pelo celastrol.	23
Figura 2: Sequência de rearranjos e os respectivos triterpenos formados pela ciclização do 2,3-epoxiesqualeno.	25
Figura 3: Via do mevalonato com formação do ergosterol e friedelina em <i>S. cerevisiae</i>	26
Figura 4: Alinhamento múltiplo entre as friedelinas sintases KdFRS e MiFRS e outras triterpeno sintases.	38
Figura 5: Clonagem da ORF do gene sintético em pYES2 e confirmação.	39
Figura 6: Eletroferograma gerado pelo sequenciamento genético do mutante L483V do gene sintético.	41
Figura 7: Eletroferograma gerado pelo sequenciamento genético do mutante L483T do gene sintético.	42
Figura 8: Eletroferograma gerado pelo sequenciamento genético do mutante L482V do gene de friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i>	43
Figura 9: Eletroferograma gerado pelo sequenciamento genético do mutante L482T do gene de friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i>	44
Figura 10: Mutações sítio-dirigidas L483V e L483T no gene sintético de friedelina sintase.	45
Figura 11: Mutações sítio-dirigidas L482V e L482T no gene de friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i>	45
Figura 12: Estrutura química de 1	48
Figura 13: Cromatogramas de íons totais (TIC) e os espectros de massas das substâncias que apresentam [M] ⁺ com <i>m/z</i> 426 da linhagem controle e da amostra de extração da levedura com o vetor contendo o gene de friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i>	49
Figura 14: Esquema de fragmentação da friedelina.	50
Figura 15: Cromatogramas de íons totais (TIC) e os espectros de massas das substâncias que apresentam [M] ⁺ com <i>m/z</i> 426 da linhagem controle e da amostra de extração da levedura com o vetor contendo o gene de friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i>	52

Figura 16: Mutação do resíduo de leucina para valina na posição 483 do gene sintético e 482 do gene da <i>M. ilicifolia</i>	53
Figura 17: Cromatograma (TIC) e espectros de massas obtidos após a mutação na posição 483 do resíduo de leucina para valina no gene sintético de <i>K. daigremontiana</i>	54
Figura 18: Cromatograma (TIC) e espectros de massas obtidos após a mutação na posição 482 do resíduo de leucina para valina no gene de friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i>	55
Figura 19: Mutação do resíduo de leucina para treonina na posição 483 do gene sintético e 482 do gene da <i>M. ilicifolia</i>	56
Figura 20: Cromatograma (TIC) e espectro de massas (EI) da β -amirina (t_R = 30,4 min) obtido após a mutação na posição 483 do resíduo de leucina para treonina no gene sintético de <i>K. daigremontiana</i>	56
Figura 21: Cromatograma (TIC) e espectro de massas da β -amirina (t_R =31,1 min) obtido após a mutação na posição 482 do resíduo de leucina para treonina no gene de friedelina sintase de <i>M. ilicifolia</i>	57
Figura 22: Cromatograma (TIC) obtido após a limpeza da amostra do mutante L483V (mutação na posição 483 do resíduo de leucina para valina).....	59
Figura 23: Espectros de massas das substâncias presentes na amostra após a limpeza....	60
Figura 24: Teores das substâncias obtidas do gene selvagem e após as mutações no gene sintético.	61
Figura 25: Teores das substâncias obtidas do gene selvagem e após as mutações no gene de <i>M. ilicifolia</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados de acordo com a mutação desejada no gene sintético.	32
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados de acordo com a mutação desejada no gene de <i>M. ilicifolia</i> (MiFRS).	33
Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) de 1	47

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Expansão do espectro de RMN de ^1H de 1 (600 MHz, CDCl_3).....	46
Espectro 2: Espectro de RMN de ^{13}C de 1 (150 MHz, CDCl_3).....	47

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	- acetato de etila
BSA	- <i>bovine serum albumin</i>
°C	- graus <i>Celsius</i>
C	- carbono
CC	- cromatografia em coluna
CCDC	- cromatografia em camada delgada comparativa
CDCl ₃	- clorofórmio deuterado
cDNA	- DNA codificador
CHCl ₃	- clorofórmio
CG	- cromatografia gasosa
CG-EM	- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
δ	- deslocamento químico
d	- duplete
DCM	- diclorometano
dd	- duplo duplete
DMAPP	- pirofosfato de dimetilalila
DNA	- abreviatura do inglês “deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico)
DTT	- 1,4-ditiotreitol
EFS	- extração em fase sólida
EI	- abreviatura do inglês “electron ionization” (impacto eletrônico)
ERG7	- gene codificador da enzima lanosterol sintase
EtOH	- etanol
H	- hidrogênio
HCl	- ácido clorídrico
Hex	- hexano
IPP	- pirofosfato de isopentenila
J	- constante de acoplamento
kb	- quilo pares de base (1000 pb)
KOH	- hidróxido de potássio

LB	- meio de cultura Lúria-Berthani
[M] ⁺	- íon molecular
m	- multiplete
m	- massa
M	- molar
m/v	- relação massa-volume
m/z	- relação massa-carga
µg	- microgramas
mg	- miligramas
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
MgSO ₄	- sulfato de magnésio
min	- minutos
µL	- microlitros
mL	- mililitros
µm	- micrometros
µM	- micromolar
mm	- milímetros
mM	- milimolar
ng	- nanogramas
nm	- nanometros
ORF	- abreviatura do inglês “open reading frame” (janela aberta de leitura)
OSC	- enzima oxidoesqualeno ciclase
p.	- página
pb	- pares de bases
PCR	- abreviatura do inglês “polymerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase)
q.s.p.	- quantidade suficiente para
RMN	- ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	- ressonância magnética nuclear de hidrogênio um
RMN de ¹³ C	- ressonância magnética nuclear de carbono treze
s	- simpleto
SC-ura	- meio sintético com auxotrofia para uracila

T	- tesla
TIC	- cromatogramas de íons totais
t _R	- tempo de retenção

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	22
1.1 - Biossíntese dos triterpenos friedelânicos e quinonametídeos	23
1.2 - Mutações da oxidoesqualeno ciclase em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2 - OBJETIVOS.....	27
2.1 - Objetivo Geral	27
2.2 - Objetivos específicos	27
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 - Obtenção do gene de friedelina sintase	28
3.2 - Clonagem para o vetor de expressão	30
3.3 - Mutações sitio-dirigidas nos genes da friedelina sintase	31
3.4 - Expressão dos genes e produção heteróloga de friedelina	34
3.5 - Material vegetal	36
3.6 - Isolamento do padrão de friedelina	36
3.7 - Análise do padrão de friedelina obtido a partir das folhas de <i>M. ilicifolia</i> e da produção do gene sintético da friedelina	37
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 - Estudo de mutação sítio-dirigidas do gene de friedelina sintase.....	37
4.1.1 - Clonagem para vetor de expressão	38
4.1.2 - Mutações sítio-dirigidas	39
4.2 - Análise do padrão de friedelina (1) obtido a partir das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> por ressonância magnética nuclear.....	46
4.3 - Análise dos produtos obtidos a partir da extração de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	48
4.3.1 - Gene Sintético	48
4.3.2 - Gene da <i>Maytenus ilicifolia</i>	51
4.4 - Análise das amostras das mutações sitio-dirigidas no gene da friedelina sintase por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	53
4.4.1 - Mutação do resíduo de leucina para valina	53
4.4.2 - Mutação do resíduo de leucina para treonina	56
4.5 - Otimização cromatográfica das análises das amostras que produziram friedelina	58
4.6 - Determinação dos teores relativos dos triterpenos identificados	60

5 - CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63

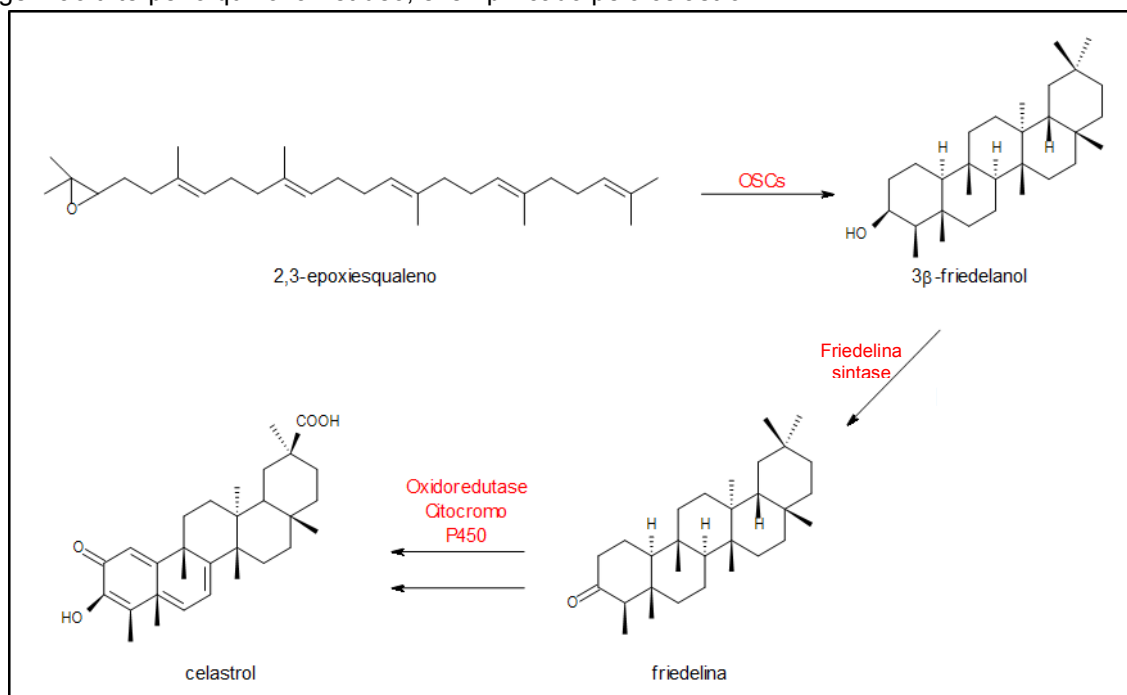
1 - INTRODUÇÃO

A espécie *Maytenus ilicifolia*, nativa do Sul do Brasil (NEGRI et al., 2009), é popularmente conhecida como “espinheira-santa” sendo empregada para aliviar dores de estômago, náuseas, úlceras e gastrites (COSTA et al., 2008 apud CAMPAROTO et al., 2002). Amplamente utilizada no Brasil e em outros países, apresenta potencialidade no tratamento de câncer (VELLOSA et al., 2006).

Os triterpenos quinonametídeos, considerados marcadores químicos dessa espécie, já demonstraram potente atividade antioxidante (SANTOS et al., 2010; VELLOSA et al., 2006; CARVALHO et al., 2005; JELLER et al., 2004; BUFFA FILHO et al., 2004), efeito antiproliferativo em diferentes linhagens de células de câncer humano pela inibição da síntese de DNA (COSTA et al., 2008) e antifúngica (GULLO et al., 2012).

Em 2000, Corsino e colaboradores demonstraram a origem biossintética dos triterpenos quinonametídeos. Estudos de incorporação de precursores específicos da classe de triterpenóides em folhas de *Maytenus ilicifolia*, indicaram que a friedelina é biossintetizada neste órgão, translocada para as raízes e posteriormente biotransformada nos triterpenos quinonametídeos. Foi demonstrado também que a formação da friedelina é catalisada pela enzima oxidoesqualeno ciclase (friedelina sintase) na ciclização do 2,3-epoxiesqualeno (Figura 1, p. 23). Esses estudos foram baseados em incorporação *in vivo* de precursores marcados com isótopos radioativos utilizando as espécies *M. aquifolium* (sinonímia de *M. ilicifolia*) e *Salacia campestris*. Para tanto, foi incorporado ($\pm$)5-³H-mevalonolactona, precursor comum dos terpenóides, nas folhas dos espécimes selecionados.

Figura 1: Conversão do 2,3-epoxiesqualeno à friedelina e posteriores etapas de oxidação para dar origem ao triterpeno quinonametídeo, exemplificado pelo celastrol.



Fonte: Corsino et al., 2000.

A importância biológica desta classe de substâncias, aliada a baixa concentração das mesmas nas cascas das raízes de espécies de Celastraceae, corroborou os estudos biossintéticos desenvolvidos por Corsino e colaboradores (2000). Tais substâncias formam um grupo relativamente pequeno de produtos naturais em espécies de Celastraceae e são alvos de trabalhos com objetivo de aumentar a produção devido ao potencial antitumoral e anti-inflamatório que apresentam.

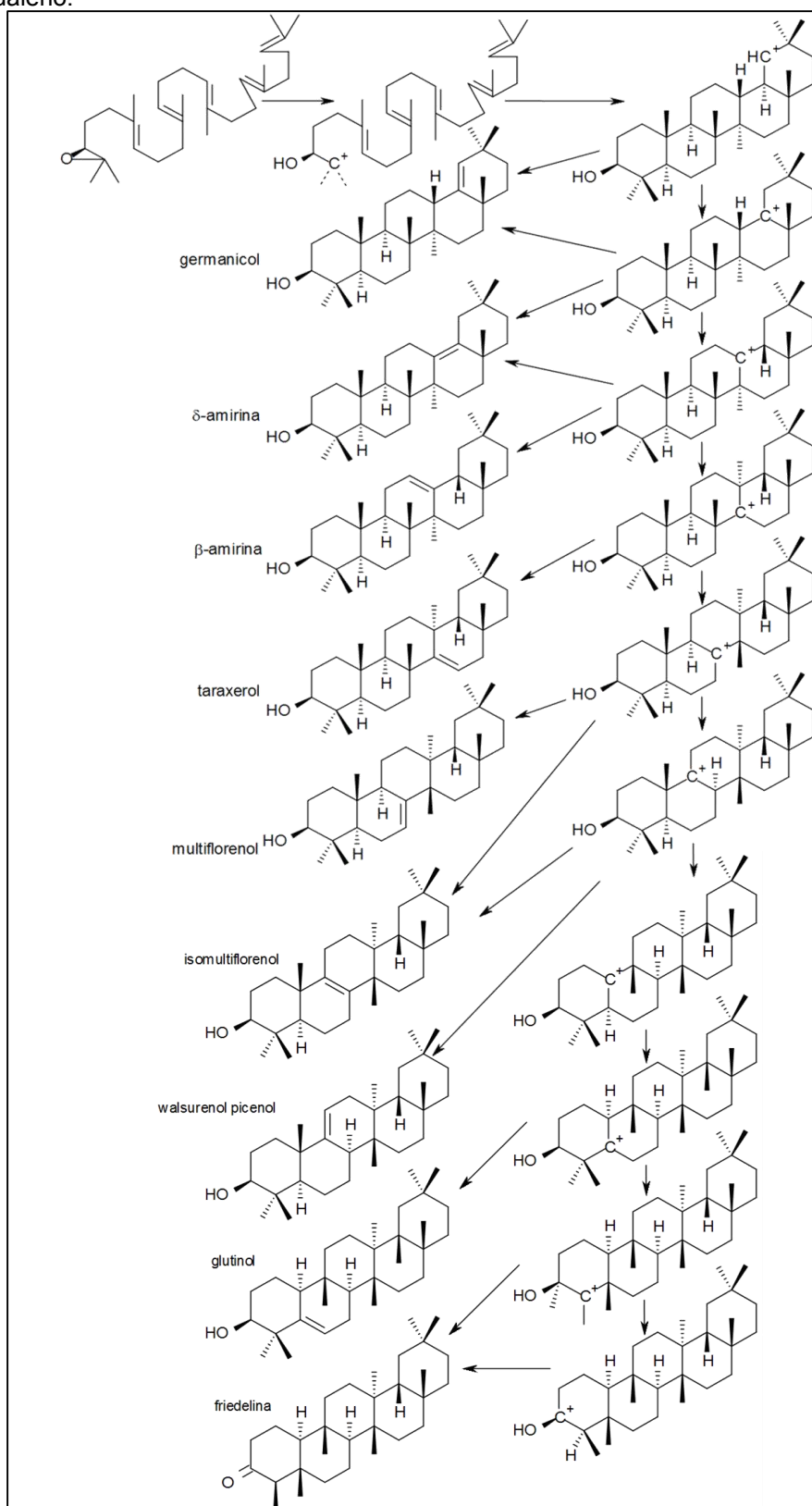
1.1 - Biossíntese dos triterpenos friedelânicos e quinonametídeos

Ao contrário dos metabólitos primários, que se configuram em produtos essenciais biossintetizados pelas plantas para a manutenção, desenvolvimento e adaptação das mesmas (WILLIAMS et al., 1989), os metabólitos secundários são produzidos em baixa concentração e podem representar menos de 2% do peso seco da planta (ROBERTS, 2007). Assim, a prática do extrativismo vegetal torna-se desvantajosa devido à necessidade de grande quantidade da planta para obtenção

razoável do produto, além de empregar maior volume de solventes, tornando-se assim uma prática insustentável e contrária aos preceitos da “química verde”. Nessas condições, estudos da via metabólica em uma fonte natural dos metabólitos secundários e das enzimas responsáveis pela produção dos mesmos são de extrema importância.

Foram descritos na literatura a clonagem e caracterização funcional, por expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, da enzima oxidoesqualeno ciclase (OSC) de *Kalanchoe daigremontiana* responsável pela formação de friedelina (Wang et al., 2010). Esse grupo de ciclases, responsáveis pela ciclização do 2,3-epoxiesqualeno para a formação de cetonas ou álcoois triterpênicos, pode catalisar variados rearranjos levando à formação de triterpenóides com diferentes esqueletos carbônicos (Figura 2, p. 25). Algumas enzimas das OSCs de diversas espécies de plantas foram clonadas e caracterizadas por expressão heteróloga em leveduras, o que abre um caminho para o emprego da biologia sintética no estudo do metabolismo secundário vegetal.

Figura 2: Sequência de rearranjos e os respectivos triterpenos formados pela ciclização do 2,3-epoxiesqualeno.

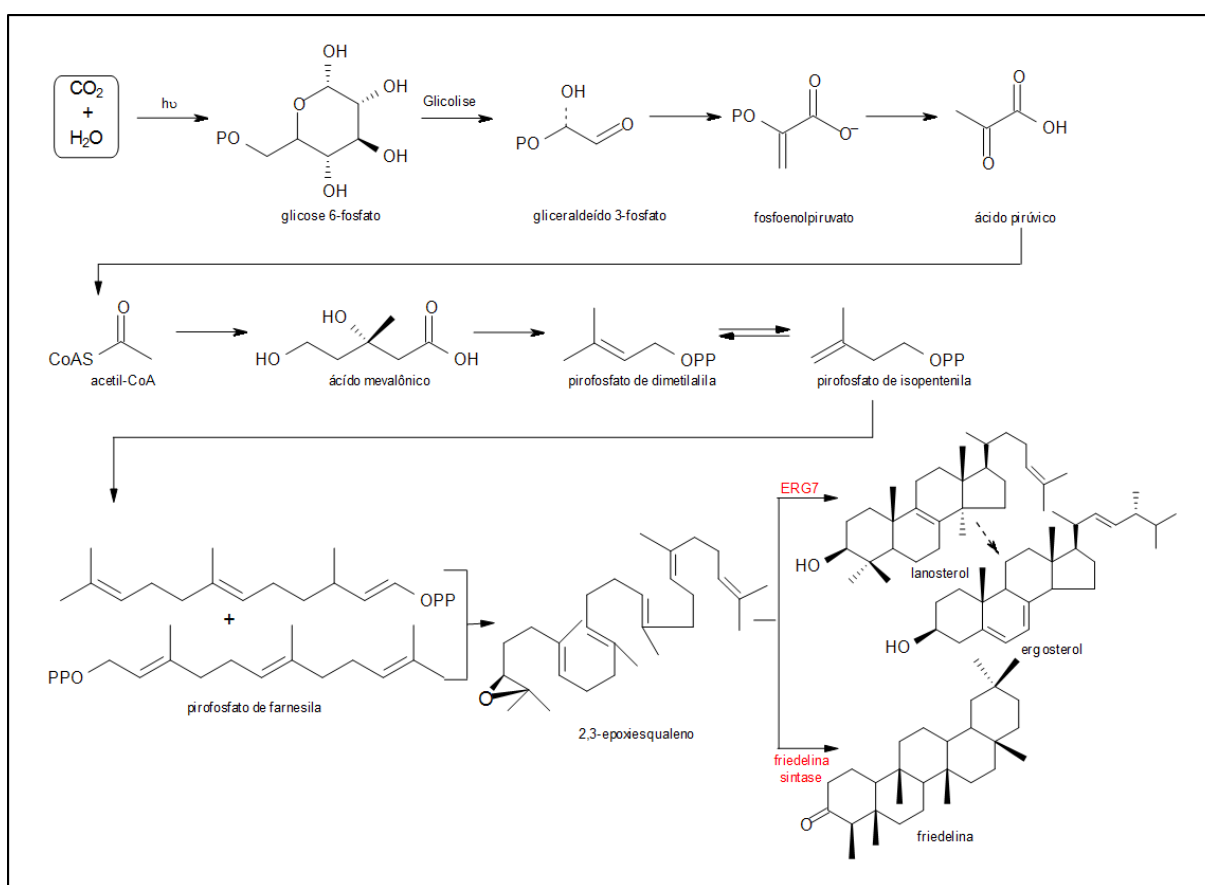


Fonte: WANG et al., 2010.

1.2 - Mutações da oxidoesqualeno ciclase em *Saccharomyces cerevisiae*

Pela clássica via do mevalonato, vários compostos como ubiquinona, dolicol e ergosterol podem ser sintetizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 3, p. 26). A obtenção dos triterpenos pentacíclicos de origem vegetal também segue a mesma via metabólica (ROHMER, 2010), no entanto, devido à especificidade das enzimas OSCs, tem-se uma ampla variedade de esqueletos formados, como já apresentado na Figura 2, p. 24.

Figura 3: Via do mevalonato com formação do ergosterol e friedelina em *S. cerevisiae*.



Legenda: *ERG7* é o gene codificador da enzima lanosterol sintase, uma OSC presente em fungos. Mutações nessa levedura com vista à supressão da expressão de genes codificadores de enzimas que atuam na formação do ergosterol contribuem para uma retroalimentação positiva para a biossíntese dos precursores chave, pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), envolvidos na formação dos triterpenóides (DONALD et al., 1997). Da mesma forma o desvio da via biossintética da produção do lanosterol, estudada por Wang et al. (2010), pode favorecer a formação dos triterpenos pentacíclicos na presença de enzimas triterpeno sintases.

Fonte: Adaptado de Donald et al., 1997.

O estudo do mecanismo de produção de esteróides tetracíclicos e/ou pentacíclicos e triterpenóides a partir do 2,3-epoxiesqualeno foi realizado por Wu e

colaboradores (2011). Os autores avaliaram, por meio de mutações sítio-dirigidas, a importância de diferentes resíduos de aminoácidos na enzima lanosterol sintase de *S. cerevisiae* para a formação de lanosterol. Observaram, por exemplo, que o resíduo de isoleucina na posição 705 (Ile705) afeta a estabilização dos anéis C/D do lanosterol. Outros resíduos da mesma enzima (Tyr99, Trp232, His234, Phe445, Tyr510, Phe699 e Tyr707) também foram identificados como críticos para a catálise enzimática (WU et al., 2004; 2005; 2006a; 2006b; 2006c; 2008a; 2008b; 2008c; 2010; CHANG et al., 2012). Os trabalhos resultaram no isolamento de diversos metabólitos originados de rearranjos e desprotonações. Foi observado também que a substituição de um único aminoácido pode afetar drasticamente o efeito catalítico da enzima OSC a partir do mecanismo de rearranjo/ciclização. Estes resíduos estão todos localizados especificamente na superfície da cavidade do sítio ativo da proteína colaborando com a especificidade do produto obtido pela interação entre os resíduos e os aminoácidos vizinhos.

Tendo por base os estudos realizados por Wu e colaboradores (2011, 2008a, 2008b, 2008c, 2006a, 2006b, 2006c, 2002), esse projeto tem como objetivo avaliar a especificidade de produção de friedelina pela enzima friedelina sintase e pelos mutantes desta levedura com aminoácidos que interagem com o 2,3-epoxiesqualeno, por expressão da sequência codificadora do gene e mutantes em linhagem de *S. cerevisiae*.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo central deste trabalho foi desenvolver estudo do mecanismo de produção da friedelina por meio de mutações sítio-dirigidas do gene da friedelina sintase sintético e de *M. ilicifolia* expresso em *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 - Objetivos específicos

✓ Mutações no gene sintético (*K. daigremontiana*) de expressão da enzima friedelina sintase.

- ✓ Análise da produção de friedelina na levedura contendo o gene sintético e seus mutantes.
- ✓ Mutações no gene de expressão da enzima friedelina sintase clonado de *M. ilicifolia*.
- ✓ Análise da produção de friedelina na levedura contendo o gene de *M. ilicifolia* e seus mutantes.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Obtenção do gene de friedelina sintase

A janela aberta de leitura (open reading frame, ORF) do gene de friedelina sintase de *K. daigremontiana* (KdFRS - Genbank número de acesso HM623870.1) foi obtida da empresa Epoch Life Science (Missouri, Texas, EUA). Sua sequência foi otimizada para expressão em levedura e ela foi adquirida clonada no vetor pBluescript II SK(-) (pBSK), com um tamanho total de 5164 pb, sendo 2316 pb correspondentes à ORF.

A etapa de clonagem da sequência codificadora de friedelina sintase de *M. ilicifolia* (MiFRS) foi realizada pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, no qual a Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira e os professores Dr. Cleslei F. Zanelli e Dr. Sandro R. Valentini também forneceram sua colaboração para a realização das reações de mutação sítio-dirigidas nos dois genes de friedelina sintase deste trabalho.

O plasmídeo pBSK-KdFRS foi transformado em linhagem de *E. coli* DH10B competente, através de choque térmico (AUSUBEL, 2004). Para a transformação, foram adicionados a 100 µL da bactéria competente, 2 µL do plasmídeo pBSK-KdFRS, que foram deixados em repouso no gelo por 30 min e, em seguida, o microtubo foi incubado a 42 °C por 2 min. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB (Lúria-Berthani) com incubação a 37 °C por 1 h. Os microtubos foram centrifugados por 1 min na máxima velocidade. O pellet gerado foi ressuspendido em 100 µL do sobrenadante que foi plaqueado em meio LB contendo ampicilina (100 µg/µL) e as

placas foram incubadas por 12 a 16 horas a 37 °C, para seleção das colônias transformadas.

Posteriormente, as colônias foram inoculadas em meio LB líquido e, após incubação *overnight* a 37 °C, os plasmídeos foram extraídos com auxílio do kit *QIAprep Miniprep* (Qiagen) e então a presença do inserto foi confirmada por digestão com as enzimas *KpnI* e *XhoI* (New England Biolabs), cujos sítios estão localizados na extremidade 5' e 3', respectivamente, da ORF de KdFRS. A reação foi realizada em tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados: 1 µL de BSA (10X; New England Biolabs), 1 µL de tampão 1 (10X: 10 mM bis-tris-propano HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,0; New England Biolabs), 0,5 µL da enzima *KpnI* (10 U/µL) e 0,3 µL da enzima *XhoI* (20 U/µL), DNA plasmidial (~1 µg) e água q.s.p. volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora e meia e o resultado da digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

A sequência do gene sintético foi confirmada por meio de sequenciamento utilizando *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) empregando *primers* M13 *forward* e *reverse* para as extremidades do inserto e *primers* internos específicos para a sequência do gene.

Para as reações de PCR para sequenciamento foram misturados: 1 µL de mix Big Dye, 3,5 µL do tampão de sequenciamento (5X), 1 µL de iniciadores (3,2 µM) M13F ou M13R, 4 µL do DNA plasmidial (100 ng/µL) e água q.s.p. volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram: hot start de 96 °C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 43 °C por 5 s, 60 °C por 4 min e extensão final de 60 °C por 5 min. Em seguida à amplificação, as amostras foram precipitadas com o kit Big Dye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante, mantendo-as na ausência de luminosidade. Para cada amostra a ser sequenciada, foram utilizados 10 µL de solução X-Terminator™, 45 µL de solução SAM e 10 µL da PCR. As amostras foram submetidas à homogeneização em vórtex por 30 min e centrifugadas por 2 min a 200 x g, 4 °C. O sequenciamento automático foi realizado com 20 µL de cada amostra no sequenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Da mesma forma, a construção e confirmação da identidade do gene de friedelina sintase clonado de *M. Ilícifolia* foi realizada pela Mestre Thaís B. Alves, pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos.

3.2 - Clonagem para o vetor de expressão

A ORF do gene sintético de KdFRS e do gene de MiFRS foi então subclonada no vetor de expressão pYES2 (Invitrogen). Para tanto, foi realizada uma amplificação da ORF por PCR para inserção do sítio de restrição de *Bam*HI na extremidade 5' de cada gene, respectivamente: *primer* 5'-CGGGATCCGGTACCATGTGGAAG-3' e 5'-CGCGGATCCGCGATCATGTGGAAGATAAAGATTGC-3' (o sítio de restrição está sublinhado); e do sítio de *Xho*I para KdFRS e *Eco*RI para MiFRS na extremidade 3': *primer* 5'-CCGCTCGAGTTACTTAGAAGG-3' e 5'-GGAATTCCGTGTAAAGTGGACATATCATATGATAGC-3', respectivamente. Para a reação, foram adicionados em um tubo de 200 µL os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão de amplificação (10X); 1,25 µL de solução enhancer (10X); 0,5 µL de MgSO₄ (50 mM); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 0,5 µL de cada primer específico (50 µM); 0,2 µL da enzima Pfx DNA polimerase (2,5 U/µL; Invitrogen), 0,5 µL de cDNA e água q.s.p. volume final de 25 µL. O tubo foi centrifugado brevemente e a amplificação, realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 45 s, 68 °C por 3 min e uma extensão final a 68 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram então purificados com *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante.

Para a digestão dos produtos de PCR e do vetor de expressão pYES2 com as enzimas de restrição, foram adicionados os seguintes reagentes: 2 µL de BSA (10X; New England Biolabs); 2 µL de tampão 3 (10X: 50 mM de acetato de potássio; 20 mM Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7,9; New England Biolabs), 0,6 µL de cada enzima (20 U/µL; New England Biolabs), 2 µL de DNA plasmidial ou 4 µL de produto de PCR, separadamente, e água q.s.p. volume final de 20 µL. As reações foram incubadas a 37 °C por 1 h e o resultado da digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. A banda referente ao vetor pYES2 linearizado (~6 kb) foi recortada e purificada do gel

com auxílio do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. Os insertos digeridos foram purificados novamente com *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen).

As reações de ligação dos insertos e vetor pYES2 digeridos foram realizadas em um microtubo contendo: 2 µL de tampão da ligase (10X, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP, 10 mM de DTT, pH 7,5); 1 µL de T4 DNA ligase (400 U/µL; New England Biolabs); 1 volume do vetor pYES2: 5 volumes de inserto e água q.s.p. volume final de 20 µL de reação. A reação foi então incubada a 16 °C por 20 h e, posteriormente, transformada em linhagem de *E. coli* DH10B competente seguindo o protocolo descrito anteriormente (p. 28).

A eficácia do processo de clonagem foi verificada pela técnica de PCR de colônia com o *primer* universal T7 *forward* e com o *primer reverse* específico do inserto, utilizando a enzima *Taq* DNA Polimerase. O diagnóstico de restrição com plasmídeos extraídos das bactérias transformantes também foi empregado como checagem da eficácia do processo de clonagem, bem como para confirmar a direcionalidade de inserção da ORF no vetor pYES2. Para tanto, foram utilizados 0,5 µL das enzimas de restrição utilizadas. As reações foram incubadas a 37 °C por 30 min. O resultado da PCR e da digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio.

Após confirmação da clonagem, o DNA plasmidial de cada uma das sequências codificadoras, seja de KdFRS ou de MiFRS, foi submetido à reação de mutagênese sítio-dirigida.

3.3 - Mutações sítio-dirigidas nos genes da friedelina sintase

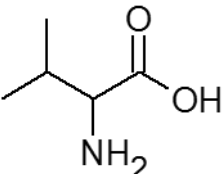
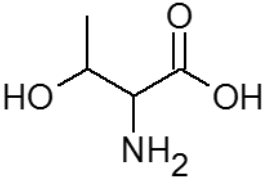
As mutações sítio-dirigidas foram realizadas com oligonucleotídeos iniciadores contendo as alterações de nucleotídeos de acordo com o aminoácido específico a ser mutado tendo sido desenhados segundo recomendações descritas no kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagene).

Para as reações de mutagênese sítio-dirigida o DNA plasmidial formado pelo vetor pYES2 ligado a cada um dos genes de friedelina sintase foi extraído como já

anteriormente descrito (p. 28), utilizando o kit *QIAprep Miniprep* (Qiagen). A qualidade do DNA extraído foi verificada por espectrofotometria (Beckman Coulter, DU 800), observando-se a razão entre os comprimentos de onda 260/280 entre 1,8 a 2,0 e a concentração do material foi ajustada para 45 ng/μL.

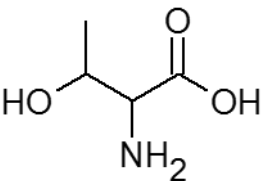
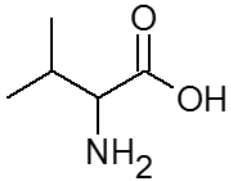
O meio reacional para a mutação foi composto de: 1,0 μL de DNA plasmidial (45 ng/ μL); 5,0 μL de tampão para Phusion High Fidelity (5X; New England Biolabs); 0,25 μL MgCl₂ (25 mM); 0,25 μL dNTPs (10 mM); 0,3 μg/μL de cada *primer* (Tabela 1, p. 32 e Tabela 2, p. 33); 0,3 μL da enzima Phusion High Fidelity DNA Polimerase (2 U/μL); e água q.s.p. volume final de 25 μL. Em paralelo, foi submetida às mesmas condições uma reação sem a enzima, para ser analisada como controle experimental. As condições da PCR foram: 98 °C por 30 s, seguidos de 18 ciclos de 98 °C por 10 s, 45 °C por 30 s e 72 °C por 17 min e um ciclo de polimerização final de 72 °C por 10 min.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados de acordo com a mutação desejada no gene sintético.

Mutação	Par de oligonucleotídeos utilizados	Aminoácido a ser mutado
L483V	Forward: 5'- CAAGATCATGGTTGGCAAG TT AGTGATTGCACAGCAGAG- 3' Reverse: 5'- CTCTGCTGTGCAATCACT AA CTTGCCAACCATGATCTTG- 3'	 valina (V)
L483T	Forward: 5'- CAAGATCATGGTTGGCAA ACT AGTGATTGCACAGCAGAG- 3' Reverse: 5'- CTCTGCTGTGCAATCACT AG TTTGCCAACCATGATCTTG- 3'	 treonina (T)

Legenda: A região em negrito indica as bases do respectivo resíduo de aminoácido a ser mutado.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados de acordo com a mutação desejada no gene de *M. ilicifolia* (MiFRS).

Mutação	Par de oligonucleotídeos utilizados	Aminoácido a ser mutado
L482T	Forward: 5'-GATCATGGATGGCAA ACT TTCTGATTGCACTGC-3' Reverse: 5'-GCAGTGCAATCAGAA AG TTTGCCATCCATGATC-3'	 treonina (T)
L482V	Forward: 5'-GATCATGGATGGCAA G TTTCTGATTGCACTG-3' Reverse: 5'-CAGTGCAATCAGAA AACT TTGCCATCCATGATC-3'	 valina (V)

Legenda: A região em negrito indica as bases do respectivo resíduo de aminoácido a ser mutado.

Ao volume de 12,5 µL da reação de PCR foram adicionados 2,5 µL de tampão 4 (New England Biolabs, pH 7.9), 1,0 µL da enzima *DpnI* (20 U/µL) e água q.s.p. volume final de 25 µL. A digestão foi incubada a 37 °C por 16 h e, ao final deste período, todo o volume foi transformado em *E. coli* competente, como já descrito na p. 28 e plaqueadas em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina.

A partir das colônias transformantes, o DNA plasmidial mutado foi extraído e utilizado em reação de sequenciamento para confirmação da mutação esperada. Uma vez que a presente mutação encontra-se em uma parte central do gene, um *primer* para checagem foi desenhado para KdFRS: *forward*: 5'-GTGCAAGCTTTATTGGC-3'; e outro, para checagem do gene MiFRS: 5'-GGTCAGAGATAACCC-3'. A reação de sequenciamento foi conduzida como previamente descrito, utilizando os *primers* (3,2 µM) aqui referidos, o DNA plasmidial extraído (400 ng) e temperatura de anelamento de 50 °C. O produto de amplificação foi purificado com *Big Dye® XTerminator™ Purification Kit* (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. O sequenciamento automático foi realizado com 20 µL de cada amostra no sequenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) e as sequências obtidas foram alinhadas com a sequência original dos genes, na região correspondente à mutação, utilizando o programa ClustalW.

3.4 - Expressão dos genes e produção heteróloga de friedelina

O DNA plasmidial contendo então a ORF do gene sintético de friedelina sintase de *Kalanchoe daigremontiana* (pYES2-KdFRS) e do gene de friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia* (pYES2-MiFRS) foi inserido por transformação na linhagem de levedura selvagem CEN.PK2 haploide.

Após incubação de colônias da levedura em 5 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%), *overnight* a 30 °C, uma alíquota de 1 mL da cultura foi centrifugada em um microtubo por 5 segundos na velocidade máxima e as células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de acetato de lítio 100 mM e incubadas por 15 min a 30 °C. O tubo foi centrifugado por 5 s na máxima velocidade e o sobrenadante removido por pipetagem. Os seguintes reagentes foram adicionados, em ordem: 240 µL de solução de polietilenoglicol 3350 a 50% (m/v), 36 µL de acetato de lítio (1 M), 50 µL de ss-DNA (*single strand*-DNA, 2 mg/mL), 10 µL de DNA plasmidial e 45 µL de água Milli-Q autoclavada. O tubo foi agitado por 1 min para homogeneização dos componentes e incubado a 42 °C por 20 min. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 s na velocidade máxima e o sobrenadante removido com o pipetador. O precipitado de células foi ressuspensado em 150 µL de água Milli-Q autoclavada, plaqueado em meio sintético completo (AUSUBEL, 2004) sem a adição de uracila (SC-ura) e incubado a 30 °C por 2-3 dias. Colônias isoladas das leveduras transformadas foram repassadas para outra placa SC-ura e incubadas novamente.

Semelhante transformação também foi realizada com a mesma linhagem, mas para controle negativo e, portanto, o vetor utilizado não continha a inserção de nenhuma ORF no cassete de clonagem.

Para indução da expressão dos genes selvagens de friedelina sintase e seus mutantes e produção dos metabólitos, uma colônia foi incubada em SC-ura foram utilizadas no preparo de um pré-inóculo em 5 mL de meio líquido SC-ura, contendo glicose, mantido sob agitação constante, *overnight*, a 30 °C. Posteriormente, uma alíquota foi utilizada para inocular 30 mL do mesmo meio de cultura por mais um período *overnight*, sob agitação constante a 30 °C. Em seguida, a densidade óptica das culturas foi medida a 600 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU 800)

e um volume correspondente à densidade óptica de 0,1 foi lavado 2x com tampão salina-fosfato (PBS, pH 7,0) esterilizado e inoculado em 500 mL de meio SC-ura contendo 2% de rafinose como única fonte de carbono. O crescimento celular, sob agitação a 30 °C, foi acompanhado até a faixa de densidade óptica de 0,4-0,8, momento em que foi adicionada solução de galactose a 2% aos meios de cultura. A partir deste momento, a cultura foi incubada por 10 h, mantendo a agitação e temperatura, para indução da expressão de cada gene ligado ao promotor de *GAL1*. Após este período, as células das culturas foram coletadas por centrifugação e inoculadas em 500 mL de uma solução de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, suplementado com 3% de glicose, por 24 h a 30 °C, sob agitação constante, para otimização da produção dos triterpenos (KUSHIRO et al., 1998).

As células foram novamente coletadas e colocadas em sistema de refluxo na presença de 50 mL de solução etanólica 50% de KOH 20% por 5 min. Depois, foi realizada uma extração por partição líquido-líquido, 3x, com o mesmo volume de hexano. A fase orgânica foi separada e seca para análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (KUSHIRO et al., 1998).

Após indução da expressão dos genes de friedelina sintase na presença de galactose e ausência de glicose, mantendo em paralelo uma cultura de CEN.PK2 contendo apenas o vetor pYES2 sem inserto como controle negativo, as células foram inoculadas em glicose novamente, por 24 h, possibilitando aumento da produção do triterpeno, uma vez que a taxa de produtividade da via de ergosterol é maior em glicose do que em galactose (OTERO et al., 2010). Em seguida, os triterpenos foram extraídos de acordo com o protocolo descrito por Kushiro et al. (1998).

A linhagem selvagem CEN.PK2 foi escolhida para a padronização da expressão das ORFs de oxidoesqualeno ciclases e produção dos triterpenos por ser uma levedura que tem como vantagem ser uma excelente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas, ter um conteúdo de ergosterol e ácidos graxos que é significativamente maior do que em outras linhagens e por não precisar da suplementação de outros compostos no meio de cultura a ser induzido (van DIJKEN et al., 2000; OTERO et al., 2010).

3.5 - Material vegetal

As folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (10 anos) foram coletadas pela Dra. Vânia A. F. F. M. dos Santos em fevereiro de 2013, na Fazenda Experimental da UNAERP (10:00 h, coordenada 21°11'56,6" de longitude, 47°46'42,3" de altitude e de 606 m).

A identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Rita Maria de Carvalho-Okano do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HPM-UNAERP) sob o voucher 00755.

3.6 - Isolamento do padrão de friedelina

Com o intuito de isolar o triterpeno friedelânico, friedelina (Figura 8, p. 44), para posterior identificação dos produtos biossintetizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, buscou-se otimizar o solvente extrator e a separação cromatográfica dos extratos das folhas de *Maytenus ilicifolia*.

Para tanto, foram realizados cinco extratos a partir de 1g de folhas utilizando como solventes extratores (20 mL, 3x) o Hex, Hex:AcOEt (8:2), Hex:AcOEt (2:8), AcOEt e DCM. Os extratos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia de camada delgada (CCDC) com revelação em anisaldeído. Após a identificação, observou-se uma melhor separação das substâncias de interesse, no extrato Hex:AcOEt (8:2). Esta análise foi realizada a fim de minimizar as etapas de isolamento dos padrões (Corsino et al., 2000).

Após a otimização, 190,39 g de folhas de *M. ilicifolia* foram submetidas à trituração com nitrogênio líquido e a extração foi realizada com Hex:AcOEt (8:2), resultando em 2,6384 g do extrato bruto. Durante o tempo de secagem em capela com fluxo de ar contínuo, ocorreu precipitação de sólido branco, posteriormente identificada como uma mistura de friedelina e friedelanol. Esse sólido foi pré-purificado por centrifugação e lavagem em AcOEt e posteriormente purificado por cromatografia em coluna (CC) utilizando Hex e AcOEt em gradiente de polaridade crescente. A

separação por CC deu origem a 29 frações, sendo que a fração **2** (0,247 g) foi identificada como friedelina.

A partir do método de extração estabelecido e dos padrões obtidos deu-se continuidade ao trabalho de identificação dos produtos biossintetizados pela levedura *S. cerevisiae*.

3.7 - Análise do padrão de friedelina obtido a partir das folhas de *M. ilicifolia* e da produção do gene sintético da friedelina

O padrão de friedelina obtido foi identificado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) utilizando o espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 (14,1 T) operando a 600 MHz na frequência do ^1H e 150 MHz na frequência do ^{13}C . A amostra foi analisada em clorofórmio deuterado.

Os extratos obtidos da levedura foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) realizada no cromatógrafo Shimadzu QP-2010 com coluna Agilent Technologies DB-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . As condições de análise são descritas a seguir:

Temperatura inicial da coluna: 200 °C

Temperatura final da coluna: 290 °C

Temperatura do injetor: 250 °C

Rampa de Aquecimento: 200 °C (12 min) e aumento linear de 10 °C/min até 290 °C (30 min).

Modo de injeção: split (1/10)

Modo de ionização: Impacto Eletrônico

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estudo de mutação sítio-dirigidas do gene de friedelina sintase

A molécula de friedelina é o único triterpeno pentacíclico que apresenta uma cetona no C-3 (WANG, 2010). Assim, estudos relativos à ciclização desta molécula

tornam-se importantes tanto para definir a especificidade de produto da ciclase, quanto para confirmar a formação de friedelanol além da friedelina (CORSINO et al., 2000).

Para tanto, a partir do gene sintético de friedelina sintase, adquirido e otimizado para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, foram estabelecidos pontos de mutação sítio-dirigida com base em estudos de ciclização com as enzimas lanosterol sintase (EC 5.4.99.7) de *S. cerevisiae* (ERG7pS288c), β -amirina sintase (EC 5.4.99.39) de *Panax ginseng* (PNY1), *Pisum sativum* (PSY) e *Glycyrrhiza glabra* (GgbAS1) e lupeol sintase (EC 5.4.99.41) de *Olea europaea* (OEW), *Taraxacum officinale* (TRW) e *Arabidopsis thaliana* (LUP1) (WU et al., 2004). A Figura 4, p. 38 apresenta os resíduos da friedelina sintase das diferentes matrizes alinhados juntamente com o ponto de mutação estabelecido para KdFRS e MiFRS.

Figura 4: Alinhamento múltiplo entre as friedelinas sintases KdFRS e MiFRS e outras triterpeno sintases.

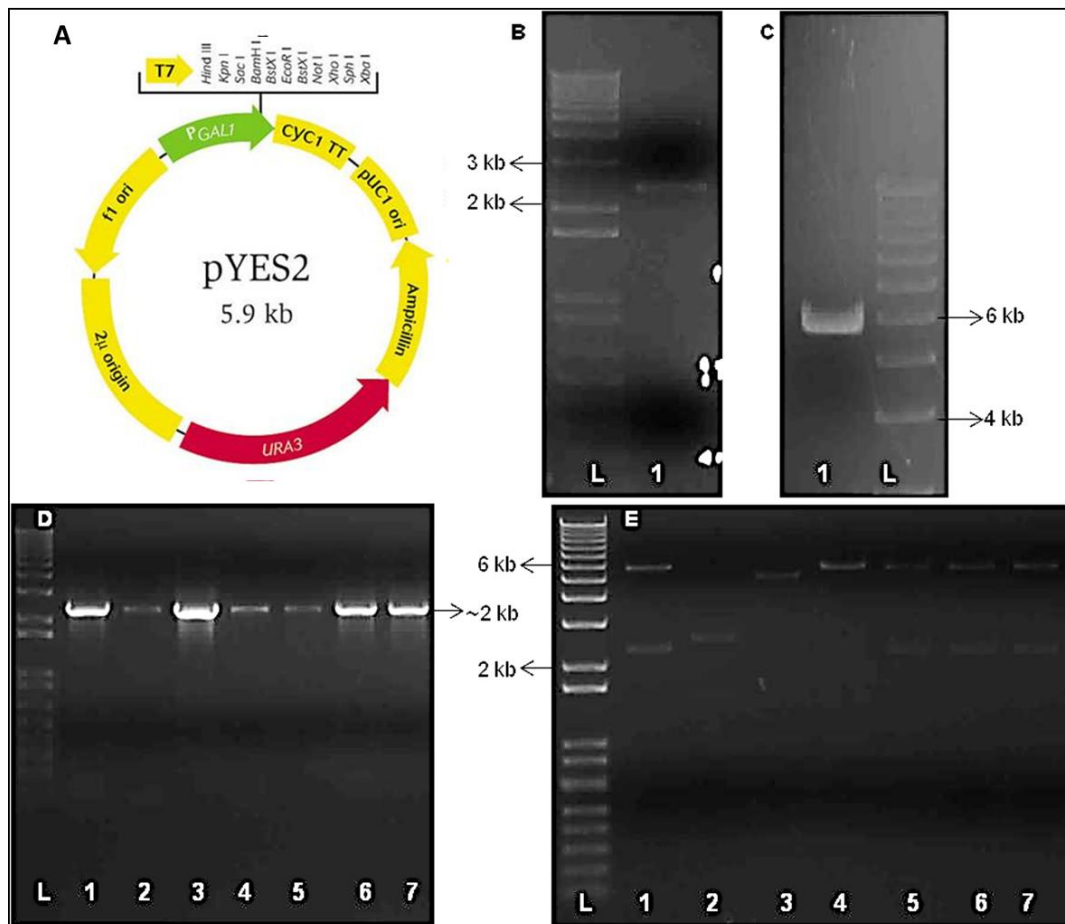
PSY	469	KG	SWTFSDQDHGWQVSDCTA	EGLKCCLLS	LS	LI	PP	ELVGEKMEPERLE	FDSVNI	LLSLQ	--
GgbAS1	469	KG	SWTFSDQDHGWQVSDCTA	EGLKCCLLS	LS	MI	PP	ELVGEKMEPERLY	DSVNVLLSLQ	--	
PNY1	470	KG	SWTFSDQDHGWQVSDCTA	EGLKCCLLS	FS	TM	PE	ELVGGKIKPERLY	DSVNVLLSLQ	--	
KdFRS	469	KG	AWTFSDQDHGWQVSDCTA	EGLKCCLLS	FS	LM	QPE	LVGEAMP	PERLYDSVNVLLSLQ	--	
LUP1	467	KG	AWTFSDRDHGWQVSDCTA	EALKCCLLS	LS	MM	SAD	IVGQKIDDE	QLYDSVNI	LLSLQ	--
MiFRS	468	KG	SWTFSDQDHGWQVSDCTA	EALKCCLLS	AA	TM	PE	ELVGEKLD	PQWIFESVNI	LLSLQE	--
OEW	467	KG	AWTFSDQDHGWQVSDCTA	EGLKAA	LLFS	QM	PI	ELVGAETETG	HYDAVNVLLSLQ	--	
TRW	469	KG	AWTFSDQDHGWQVSDCTA	EGLKVS	LLYS	QM	NPK	LVGEKVE	TEHYDAVNVLLSLQ	--	
Erg7pS288c	440	KG	AWGFS	TKTQGT	TVADCTAEAIKAI	IM	VKN	SPVFSEV	VHHMIS	SERLFEGIDVLLN	LQNI

Legenda: O alinhamento foi gerado com a ferramenta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e o background de acordo com a classe de aminoácidos foi gerado pela ferramenta BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

4.1.1 - Clonagem para vetor de expressão

A fim de elucidar a clonagem das ORFs, a Figura 5 (p. 39) mostra um mapa vetor pYES2 utilizado e os produtos de digestão com duas enzimas de restrição coesivas com diferentes sítios de reconhecimento do cassete de clonagem (Figura 5 A, p. 39), permitindo uma clonagem direcional. A Figura 5 (p. 39) mostra que o inserto (do gene sintético, nesta ilustração) foi gerado por PCR com *primers* (Figura 5 B, p. 39), e, também apresenta a digestão do inserto e do vetor (Figura 5 C, p. 39), confirmando a clonagem por PCR (Figura 5 D, p. 39) e por digestão com as mesmas enzimas de restrição (Figura 5 E, p. 39).

Figura 5: Clonagem da ORF do gene sintético em pYES2 e confirmação.



Legenda: A) Esquema ilustrativo mostrando o cassete de clonagem do vetor pYES2. B) Amplificação do inserto (1) com *primers* contendo o sítio de restrição das enzimas para clonagem. C) Digestão do vetor pYES2 (1; ~5900 pb). D) Confirmação da clonagem por PCR de colônia (numeradas de 1 a 7). E) Diagnóstico de restrição, em que as colônias numeradas de 2 a 4 não apresentaram o inserto, enquanto que as colônias numeradas como 1, 5 a 7, apresentaram o vetor pYES2 linearizado ~5900 pb e o inserto em ~2500 pb. L: marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen).

Fonte: Autora, 2015.

4.1.2 - Mutações sítio-dirigidas

A primeira mutação realizada nos genes de friedelina sintase foi a substituição de um resíduo de leucina por um de valina na posição 483 em KdFRS e 482 em MiFRS, baseada na observação de que mutações sítio-dirigidas realizadas no resíduo de posição correspondente em lanosterol sintase (V454) de *Saccharomyces cerevisiae* onde foi observado que entre as alterações dos resíduos de histidina para glutamina e de isoleucina para valina apenas o segundo mutante permitiu o crescimento independente do ergosterol e em cicloartenol sintase (I481) de

Arabidopsis thaliana onde foi estudado a produção de cicloartenol através da substituição do resíduo de isoleucina por fenilalanina, leucina, alanina e glicina causando pequenas mudanças relacionadas ao tamanho e dos aminoácidos inseridos demonstraram que esses resíduos foram eficazes na determinação do perfil do produto ciclizado e desprotonado (HART et al., 1999; JOUBERT et al., 2000; MATSUDA et al., 2000; HERRERA et al., 2000; MEYER et al., 2002).

Considerando a especificidade da enzima ciclase nos processos de ciclização e rearranjo para a formação dos triterpenos a partir da mutação de isoleucina para treonina na posição 481 de *Arabidopsis thaliana* (WU et al., 2002), executou-se a segunda mutação correspondente ao gene sintético da friedelina sintase com a troca de um resíduo de leucina por um de treonina na posição 483 (L483T). A partir do sequenciamento genético foram gerados os eletroferogramas dos mutantes contendo as sequências de nucleotídeos dos genes de friedelina sintase sintético (Figuras 6, p. 41 e 7, p. 42) e de *Maytenus ilicifolia* (Figuras 8, p. 43 e 9, p. 44) mutados, respectivamente.

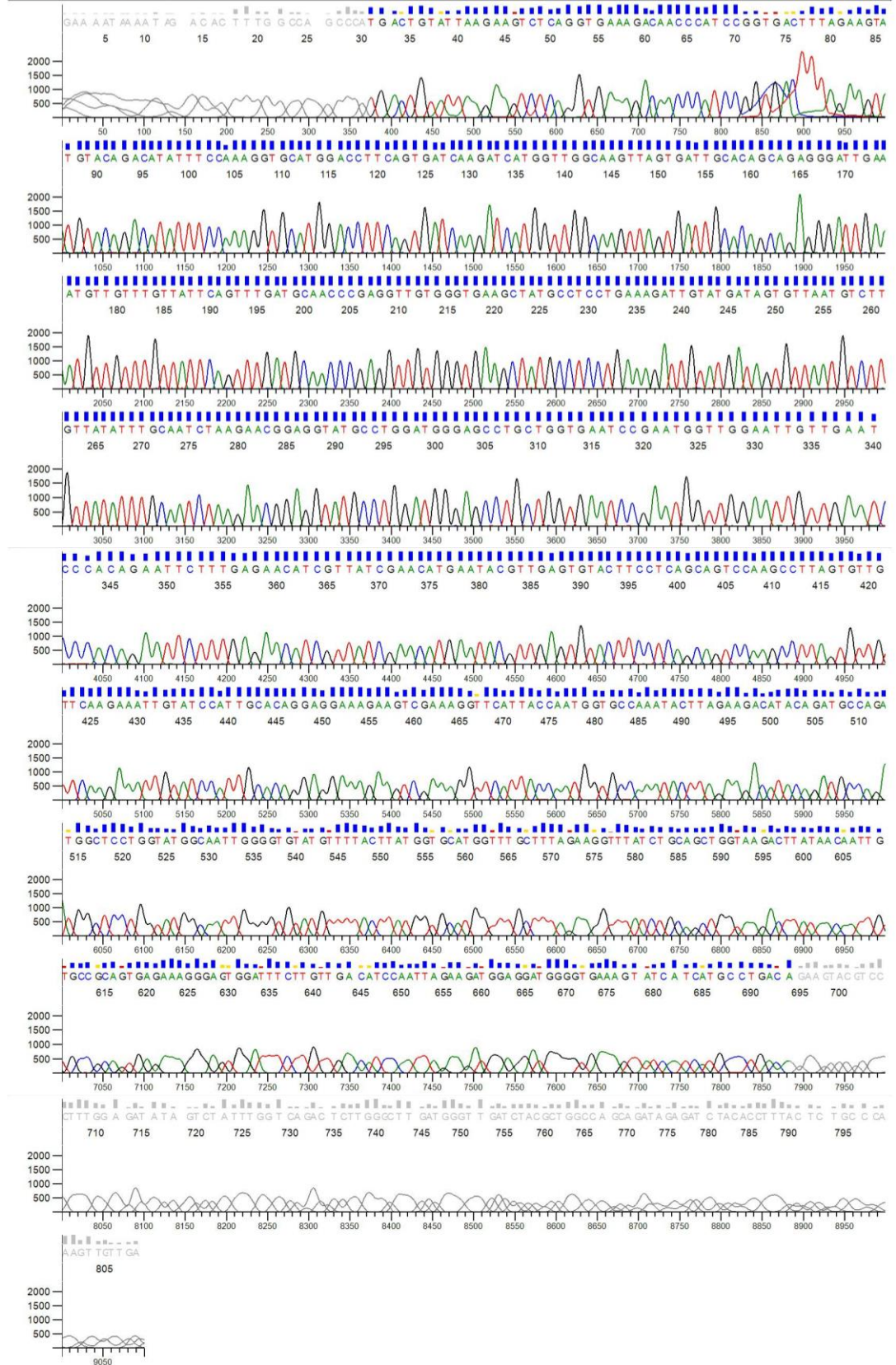


Figura 7: Eletroferograma gerado pelo sequenciamento genético do mutante L483T do gene sintético.

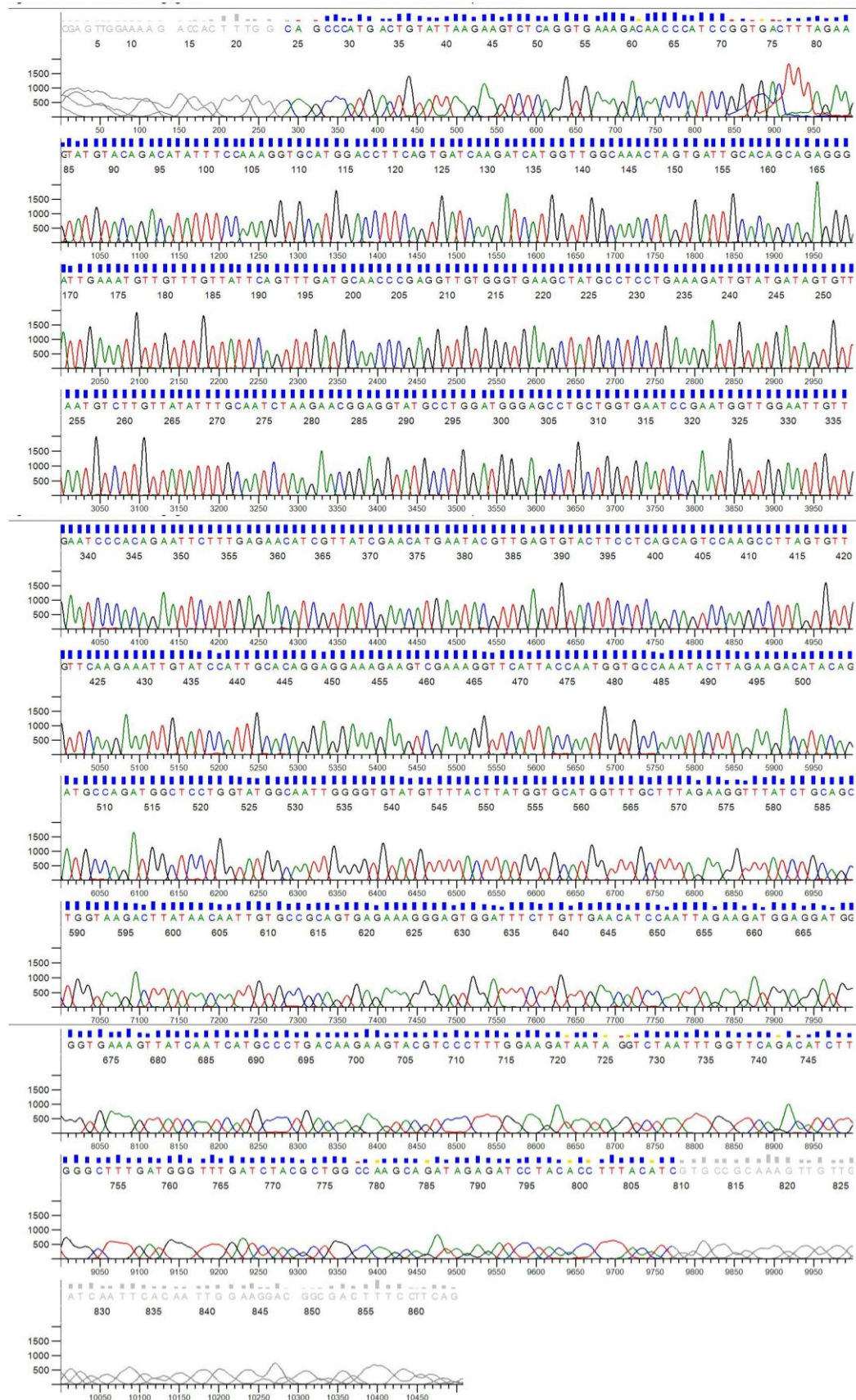


Figura 8: Eletroferograma gerado pelo sequenciamento genético do mutante L482V do gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.

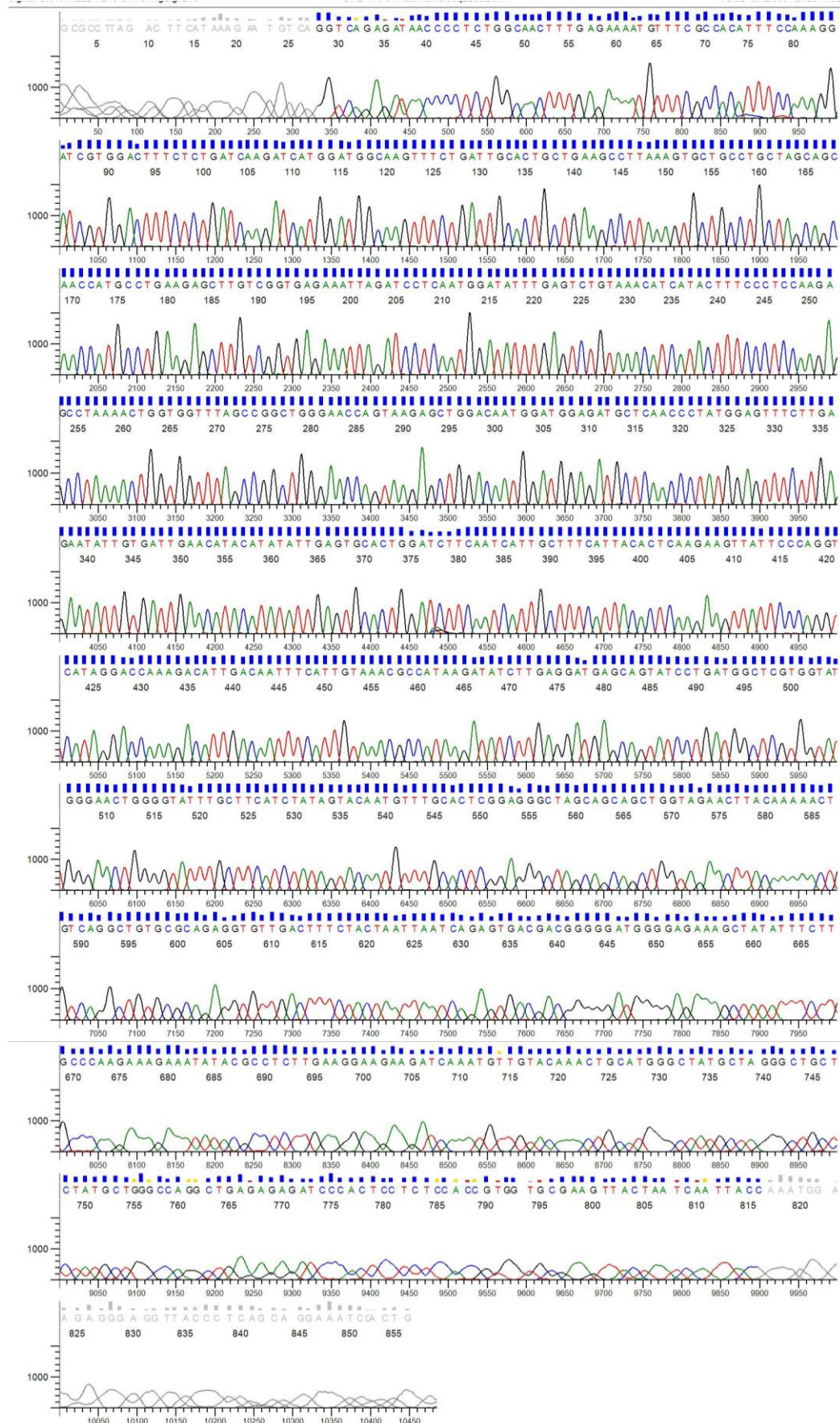
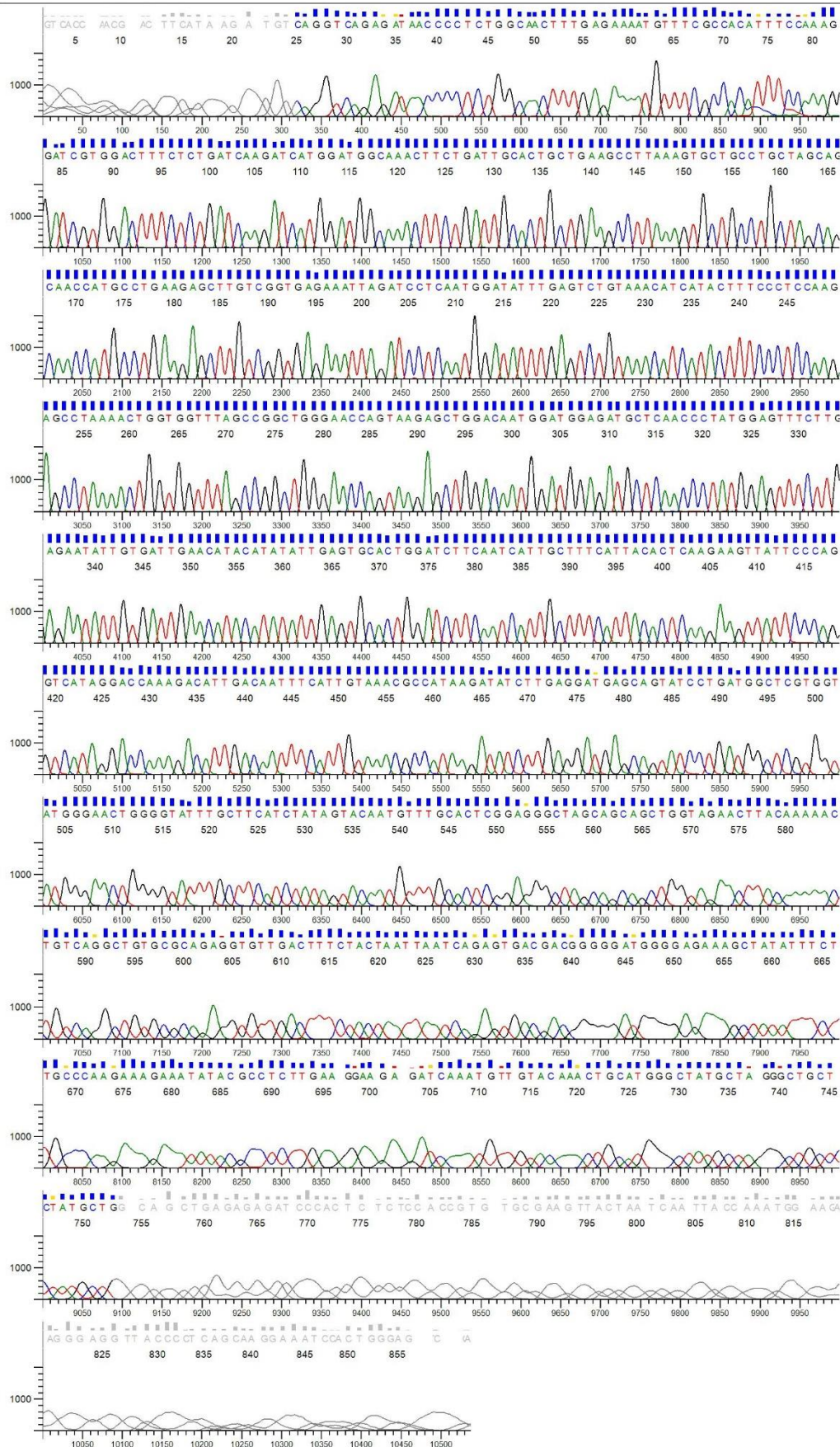


Figura 9: Eletroferograma gerado pelo sequenciamento genético do mutante L482T do gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.



A partir do sequenciamento obtido fez-se o alinhamento com a sequência original dos genes de friedelina sintase sintético (Figuras 10, p. 45) e de *Maytenus ilicifolia* (Figura 11, p. 45).

Figura 10: Mutações sítio-dirigidas L483V e L483T no gene sintético de friedelina sintase.

WT	460	FRSMYRHISKGAWTFSDQDHGWQLSDCTAEGCLKCCLLFSLMQPEVVGEA	508
L483V	460	FRSMYRHISKGAWTFSDQDHGWQVSDCTAEGCLKCCLLFSLMQPEVVGEA	508
L483T	460	FRSMYRHISKGAWTFSDQDHGWQTSCTAEGCLKCCLLFSLMQPEVVGEA	508

Figura 11: Mutações sítio-dirigidas L482V e L482T no gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.

wt	481	QLSDCTAEALKCCLLAATMPEELVGEKLDPQWIFESVNIILSLQEPKTGGLAGWEPVRAG
L482T	481	QTSCTAEALKCCLLAATMPEELVGEKLDPQWIFESVNIILSLQEPKTGGLAGWEPVRAG
L482V	481	QVSDCTAEALKCCLLAATMPEELVGEKLDPQWIFESVNIILSLQEPKTGGLAGWEPVRAG

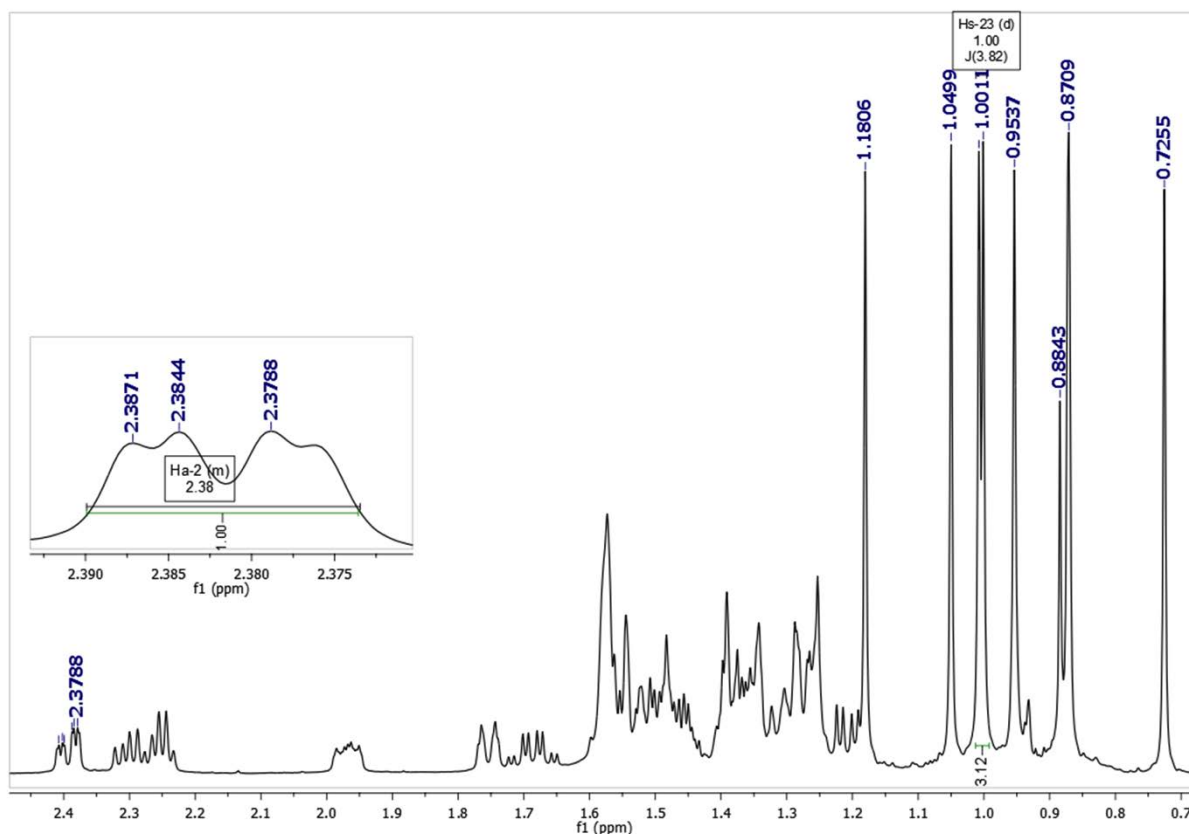
Os produtos formados a partir da extração dos mutantes L483V (m=4,7 mg) e L483T (m=8,1 mg) foram então extraídos de acordo com o protocolo utilizado por Kushiro et al. (1998), como descrito anteriormente (p. 35) e analisados por CG-EM a fim de propor características específicas de ciclização da enzima friedelina sintase e a formação de friedelina e/ou friedelanol.

As mesmas mutações foram realizadas com o gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia* e levaram à formação dos mutantes de L482V e L482T que também foram extraídos e analisados por CG-EM.

4.2 - Análise do padrão de friedelina (**1**) obtido a partir das folhas de *Maytenus ilicifolia* por ressonância magnética nuclear

O espectro de RMN de ^1H da friedelina (**1**) (Espectro 1, p. 46) confirmou a identidade desse triterpeno pentacíclico apresentando sinais referentes a grupos metílicos, metilênicos e metínicos. Foi observado um multipletto em δ 2,38 atribuído ao hidrogênio α carbonílico H-2, seis simpletos em δ 0,88, 0,73, 0,87, 1,05, 1,18, 0,95, atribuídos aos hidrogênios metílicos H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 e H-30, respectivamente, e um duplete em δ 1,00 (3H, $J=3,8$ Hz) atribuído aos hidrogênios H-23, caracterizando o esqueleto friedelânico.

Espectro 1: Expansão do espectro de RMN de ^1H de **1** (600 MHz, CDCl_3).



A análise dos dados de RMN de ^{13}C de **1** mostrou a presença de um carbono carbonílico com sinal em δ 213,3 (Espectro 2, p. 47). O sinal em δ 6,8, atribuído ao C-23, é característico do esqueleto friedelânico e apresenta proteção pelo efeito gama da carbonila em C-2. O espectro apresenta também os sinais referentes aos 28 carbonos restantes, os quais, por comparação com dados da literatura (MAHATO et

al., 1994), Tabela 3, p. 47, corroboram a atribuição da estrutura química da friedelina (**1**) (Figura 12, p. 48).

Espectro 2: Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (150 MHz, CDCl_3).

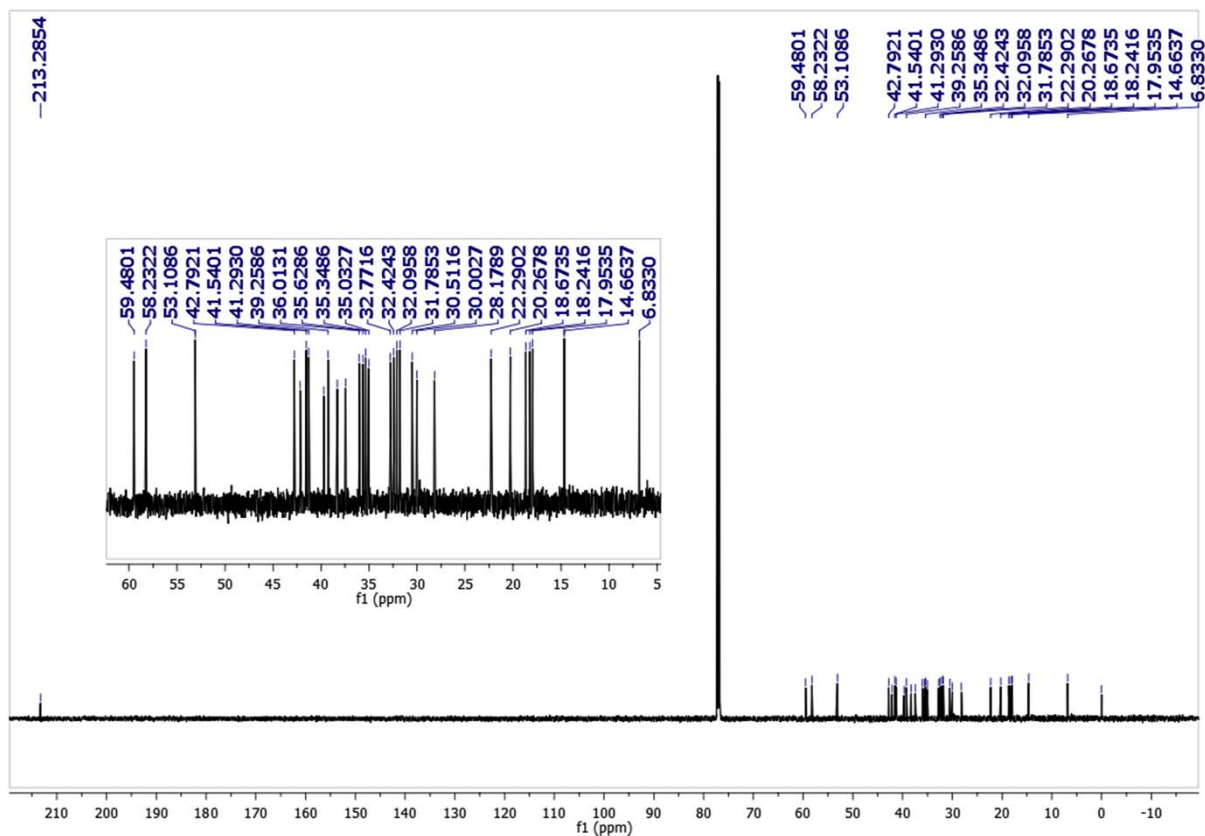
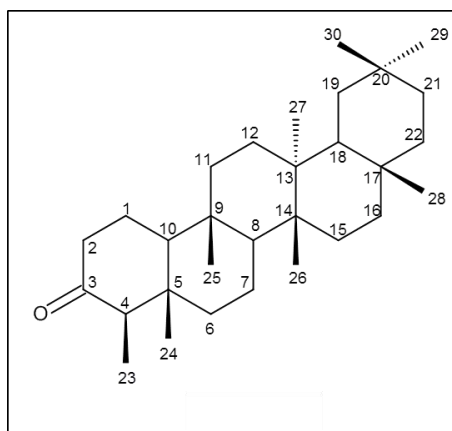


Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) de **1**.

Carbono	δ	Literatura	Carbono	δ	Literatura
1	22,3	22,3	16	36,0	36,0
2	41,5	41,5	17	30,0	30,0
3	213,3	213,2	18	42,8	42,8
4	58,2	58,2	19	35,3	35,3
5	42,1	42,1	20	28,1	28,1
6	41,2	41,3	21	32,7	32,7
7	18,2	18,2	22	39,2	39,2
8	53,1	53,1	23	6,8	6,8
9	37,4	37,4	24	14,6	14,6
10	59,4	59,4	25	17,9	17,9
11	35,6	35,6	26	20,2	20,2
12	30,5	30,5	27	18,6	18,6
13	39,7	39,7	28	32,1	32,1
14	38,3	38,3	29	35,0	35,0
15	32,4	32,4	30	31,8	31,8

Figura 12: Estrutura química de 1.

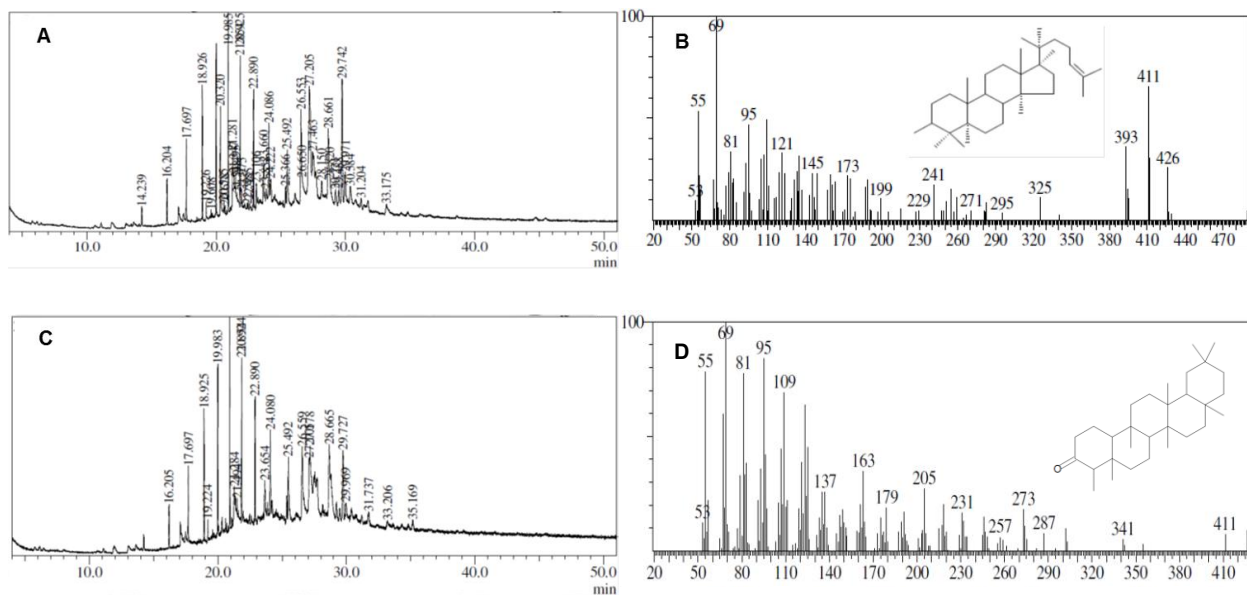


4.3 - Análise dos produtos obtidos a partir da extração de *Saccharomyces cerevisiae* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

4.3.1 - Gene Sintético

A Figura 13, p. 49 mostra os cromatogramas de íons totais (TIC) e espectros de massas dos produtos obtidos para o gene sintético de *K. daigremontiana*. A extração da levedura controle (Cromatograma A e espectro de massas B) e da levedura com o gene mutado (Cromatograma C e espectro de massas D), demonstrou a presença do lanosterol e da friedelina, respectivamente, nos tempos de retenção de 30,0 min e 35,2 min, ambos apresentando m/z 426.

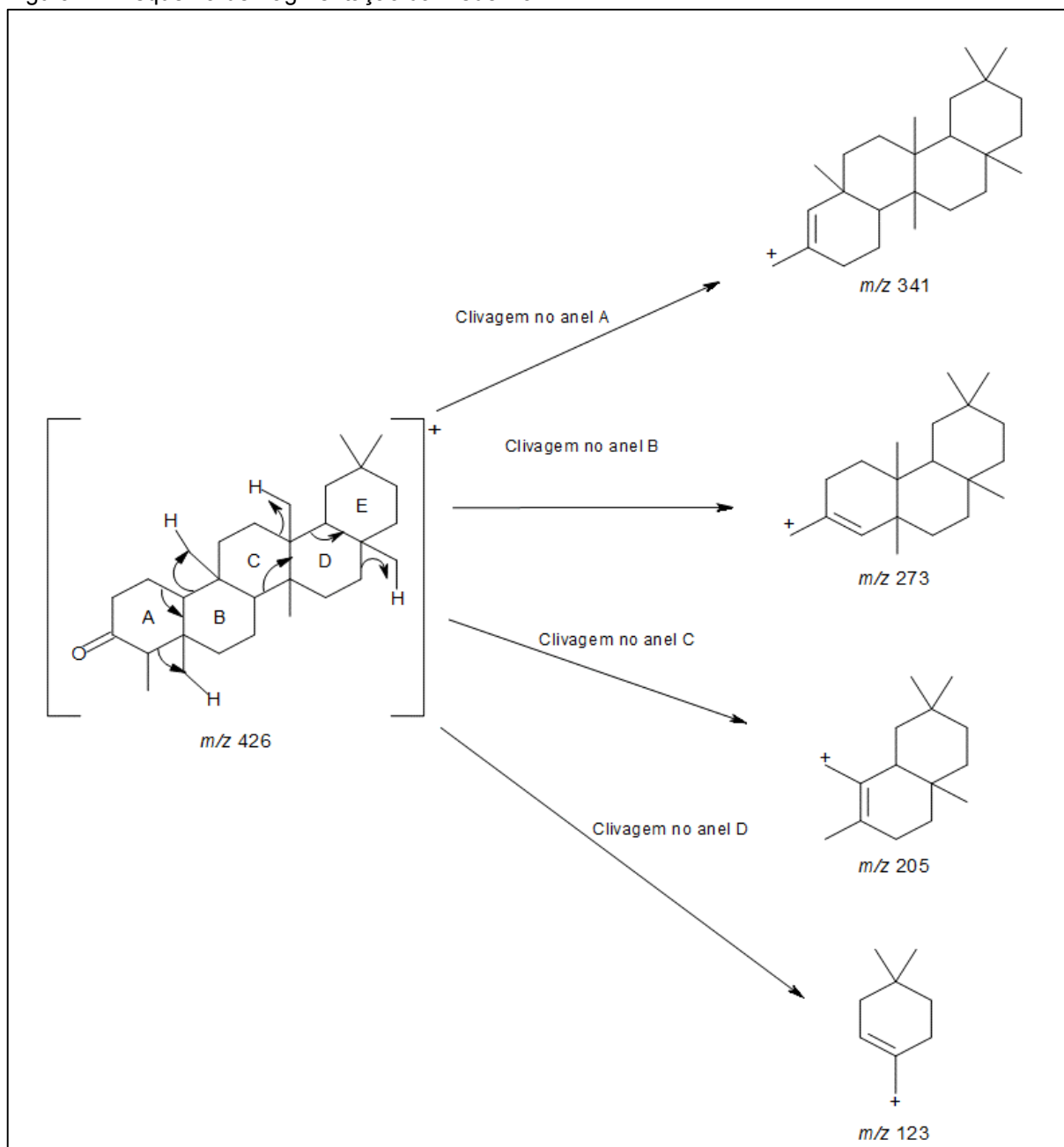
Figura 13: Cromatogramas de íons totais (TIC) e os espectros de massas das substâncias que apresentam $[M]^+$ com m/z 426 da linhagem controle e da amostra de extração da levedura com o vetor contendo o gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.



Legenda: A) Cromatograma (TIC) obtido da fração após a extração dos compostos da linhagem controle, com vetor pYES2 vazio. B) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 30,0 min e m/z 426, identificado como lanosterol. C) Cromatograma (TIC) obtido da linhagem com vetor pYES2 contendo a ORF do gene sintético de friedelina sintase. D) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 35,2 min e m/z 426, identificado como friedelina.

Apesar dos dois espectros apresentarem perfis de fragmentação semelhantes e íon molecular $[M]^+$ com m/z 426, o lanosterol (FUJINO e OHNISHI, 1979; SUZUKI et al., 2006), não apresenta fragmentação correspondente ao fragmento característico da friedelina com m/z 341. Esse íon ocorre pela fragmentação do anel A (CARVALHO, 2013) como mostrado na Figura 14, p. 50.

Figura 14: Esquema de fragmentação da friedelina.



Fonte: Carvalho, 2013.

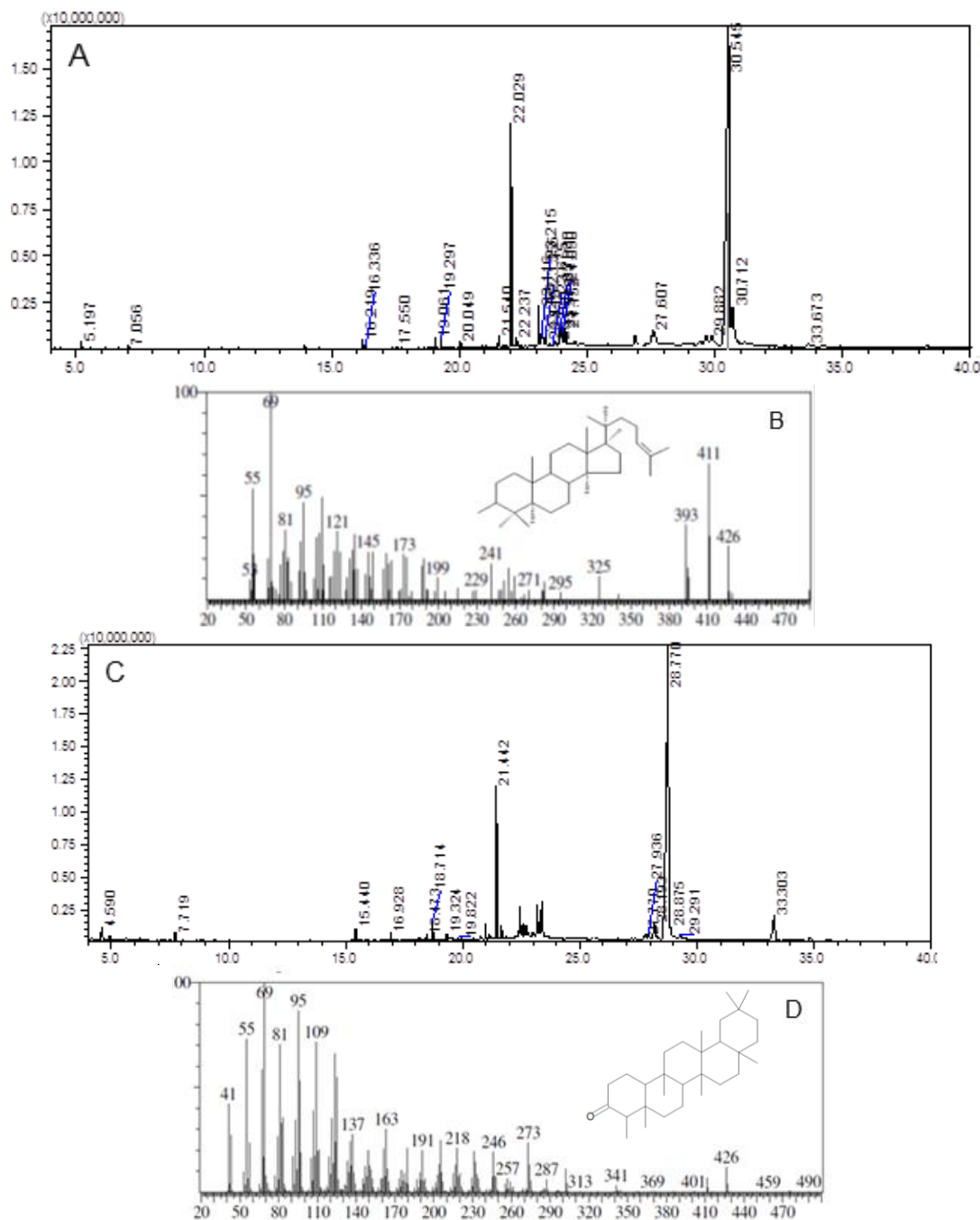
Por outro lado, também foi possível confirmar a presença do lanosterol (Figura 13, p. 49, Cromatograma A e espectro de massas B), com tempo de retenção 30,0 min e íon molecular $[M]^+$ com m/z 426, pela análise do fragmento m/z 393 referente a perda de um grupo metílico e água do anel A, típica fragmentação de álcool secundário, bem como o íon com m/z 325 referente a perda da cadeia alifática lateral a partir do fragmento com m/z 393.

Com base na análise do espectro de massas da friedelina (Figura 13 D, p. 44) foi possível observar fragmentos fundamentais discutidos anteriormente que corroboraram a presença da friedelina da levedura transformada contendo o vetor do gene sintético. Portanto, esses dados indicam que a clonagem e expressão da levedura contendo o gene mutado levou à produção heteróloga do composto alvo (friedelina).

4.3.2 - Gene da *Maytenus ilicifolia*

Da mesma maneira, a análise por cromatografia de íons totais (TIC) acoplada a espectrometria de massas (Figura 15 C e D, p. 52) do extrato obtido da levedura contendo o gene da friedelina sintase extraído de *Maytenus ilicifolia*, mostrou, no tempo de retenção igual a 33,303 min e $[M]^+$ com m/z 426, a presença da friedelina. Da mesma forma, a análise empregando as mesmas técnicas cromatográfica e espectrométrica (Figura 15 A e B, p. 52) do extrato obtido da linhagem controle indicou a presença do lanosterol, com o tempo de retenção de 30,545 min e $[M]^+$ com m/z 426.

Figura 15: Cromatogramas de íons totais (TIC) e os espectros de massas das substâncias que apresentam $[M]^+$ com m/z 426 da linhagem controle e da amostra de extração da levedura com o vetor contendo o gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.



Legenda: A) Cromatograma (TIC) obtido da fração após a extração dos compostos da linhagem controle, com vetor pYES2 vazio. B) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 30,5 min e m/z 426, identificado como lanosterol. C) Cromatograma (TIC) obtido da linhagem com vetor pYES2 contendo a ORF do gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*. D) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 33,3 min e m/z 426, identificado como friedelina.

4.4 - Análise das amostras das mutações sítio-dirigidas no gene da friedelina sintase por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As amostras das mutações sítio-dirigidas nos genes de friedelina sintase foram analisadas por CG-EM com a colaboração do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Todas as mutações apresentaram o ergosterol (Figura 17, Espectro A, p. 54) de íon molecular $[M]^+$ com m/z 396 e fragmentos característicos com m/z 363 e m/z 337 (DONG Y. et al., 2006), seus derivados e seu precursor, o lanosterol, de íon molecular $[M]^+$ com m/z 426 e fragmentos característicos com m/z 393 e m/z 325 (FUJINO e OHNISHI, 1979; SUZUKI et al., 2006). Essas substâncias fazem parte do metabolismo endógeno da levedura. No entanto, cada uma das mutações apresentou suas particularidades na produção de outras substâncias e estão descritas a seguir.

4.4.1 - Mutação do resíduo de leucina para valina

A partir das análises dos espectros de massas da mutação da leucina para a valina (Figura 16, p. 53) na posição 483 do gene sintético de *Kalanchoe daigremontiana*, observou-se uma mistura de manool e esclareol (Espectro B, p. 54), sesquiterpenos cuja formação participa da mesma rota biossintética dos triterpenos, taraxerol (Figura 17, Espectro C, p. 54) que apresenta íon molecular $[M]^+$ com m/z 426 e fragmentos característicos com m/z 189, m/z 204, m/z 269, m/z 284, m/z 287, m/z 302 e m/z 411 (SOUZA et al., 2001), β -amirina (Figura 17, Espectro D, p. 54) com íon molecular $[M]^+$ com m/z 426 e fragmentos característicos com m/z 218 e m/z 203 (WANG et al., 2010), e friedelina (Figura 17, Espectro E, p. 54) com íon molecular $[M]^+$ com m/z 426 e fragmentos característicos com m/z 341, m/z 273, m/z 205 e m/z 123 (CARVALHO, 2013) discutidos anteriormente (p. 50).

Figura 16: Mutação do resíduo de leucina para valina na posição 483 do gene sintético e 482 do gene da *M. ilicifolia*.

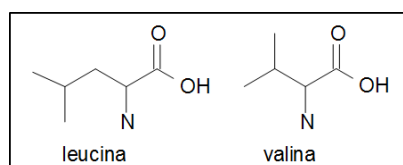
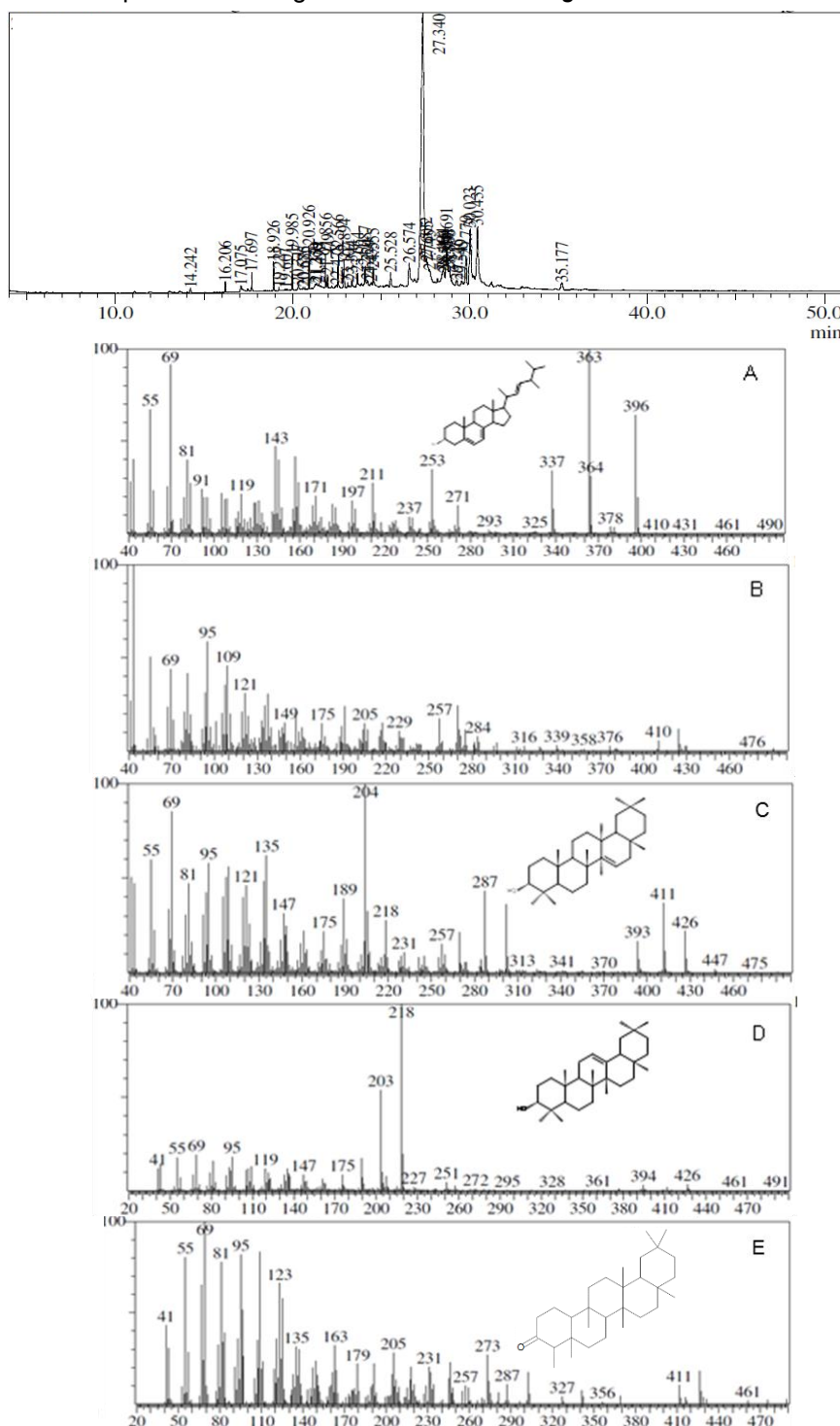


Figura 17: Cromatograma (TIC) e espectros de massas obtidos após a mutação na posição 483 do resíduo de leucina para valina no gene sintético de *K. daigremontiana*.

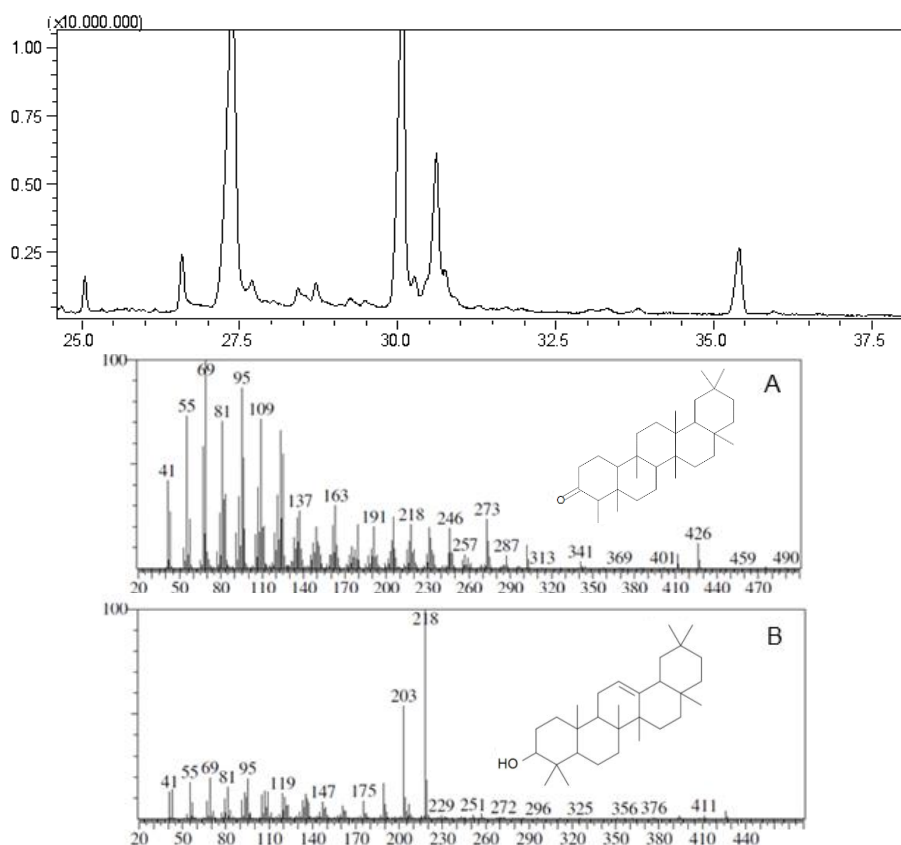


Legenda: A) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 27,3 min e m/z 396, identificado como ergosterol. B) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 23,3 min e m/z 412, identificado como mistura de manool e esclareol. C) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 30,0 min e m/z 426, identificado como taraxerol. D) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 30,4 min e m/z 426, identificado como β -amirina. E) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 35,2 min e m/z 426, identificado como friedelina.

Apesar do resíduo Ile483 do gene sintético não ser cataliticamente essencial na ciclização do 2,3-epoxiesqualeno, a substituição da cadeia lateral sec-butila por outra de isopropila proporciona uma sutil alteração estérica, que pode permitir um melhor alinhamento do substrato ao sítio ativo da enzima para a conversão do 2,3-epoxiesqualeno aos produtos ciclizados, taraxerol, β -amirina e friedelina.

No gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*, a mesma mutação produziu a friedelina e a β -amirina. O cromatograma do extrato e os espectros de massas dos produtos obtidos após a mutação estão apresentados na Figura 18, p. 55.

Figura 18: Cromatograma (TIC) e espectros de massas obtidos após a mutação na posição 482 do resíduo de leucina para valina no gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.



Legenda: A) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 36,1 min e m/z 426, identificado como friedelina. B) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 31,1 min e m/z 426, identificado como β -amirina.

4.4.2 - Mutação do resíduo de leucina para treonina

A mutação na posição 483 do gene sintético de *Kalanchoe daigremontiana* do resíduo de leucina por um de treonina (Figura 19, p. 56) não produziu friedelina, apenas a β -amirina conforme observado no cromatograma e espectros de massa (Figura 20, p. 56). Dessa forma, pode-se verificar o efeito estérico das alterações de aminoácidos nesta mesma posição visto que, o resíduo treonina, de tamanho ligeiramente maior devido a presença do oxigênio na cadeia lateral juntamente com a ausência de estabilização de sua carga negativa, permite que os padrões alternativos de dobramento enzima-substrato facilite a desprotonação prematura impedindo assim, a formação da friedelina, substância de maior quantidade de rearranjos na ciclização do 2,3-epoxiesqualeno na formação dos triterpenos.

Figura 19: Mutação do resíduo de leucina para treonina na posição 483 do gene sintético e 482 do gene da *M. ilicifolia*.

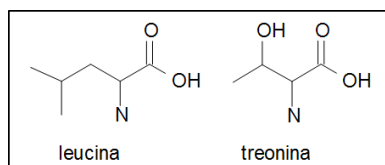
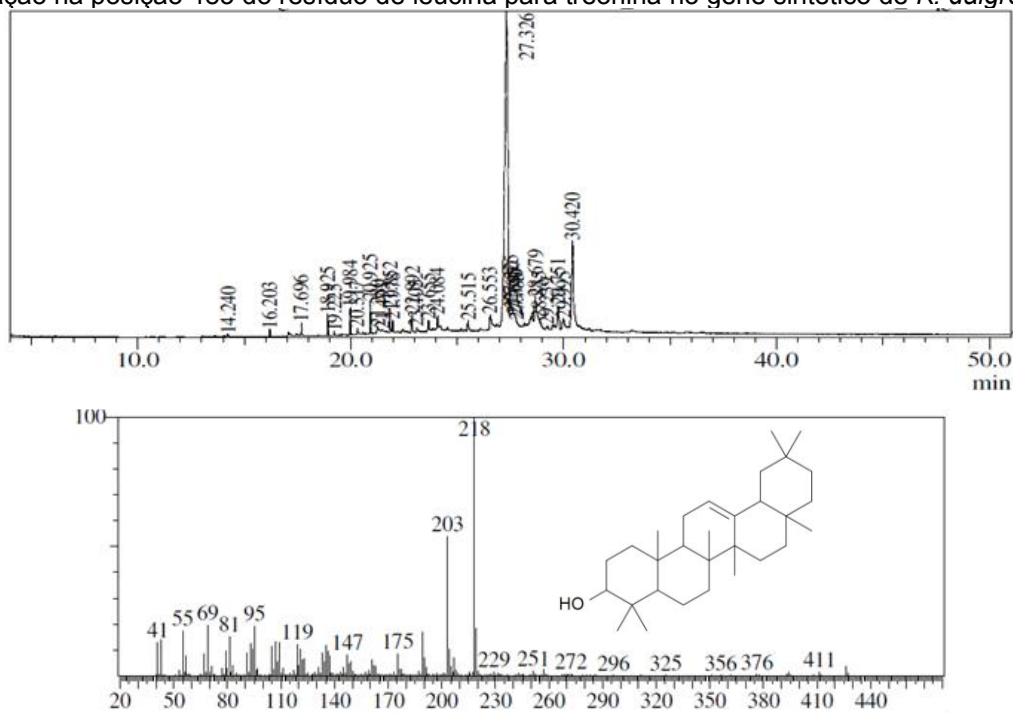
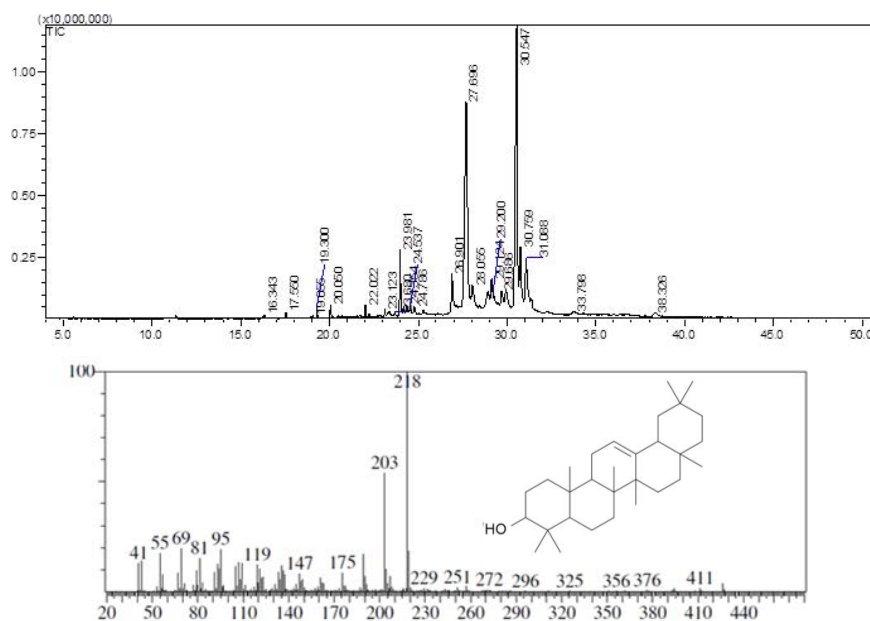


Figura 20: Cromatograma (TIC) e espectro de massas (EI) da β -amirina ($t_R = 30,4$ min) obtido após a mutação na posição 483 do resíduo de leucina para treonina no gene sintético de *K. daigremontiana*.



No gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*, a mutação do resíduo de leucina para treonina na posição 482 produziu a β -amirina como observado no cromatograma do extrato e nos espectros de massas dos produtos obtidos após a mutação (Figura 21, p. 57).

Figura 21: Cromatograma (TIC) e espectro de massas da β -amirina ($t_R=31,1$ min) obtido após a mutação na posição 482 do resíduo de leucina para treonina no gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia*.



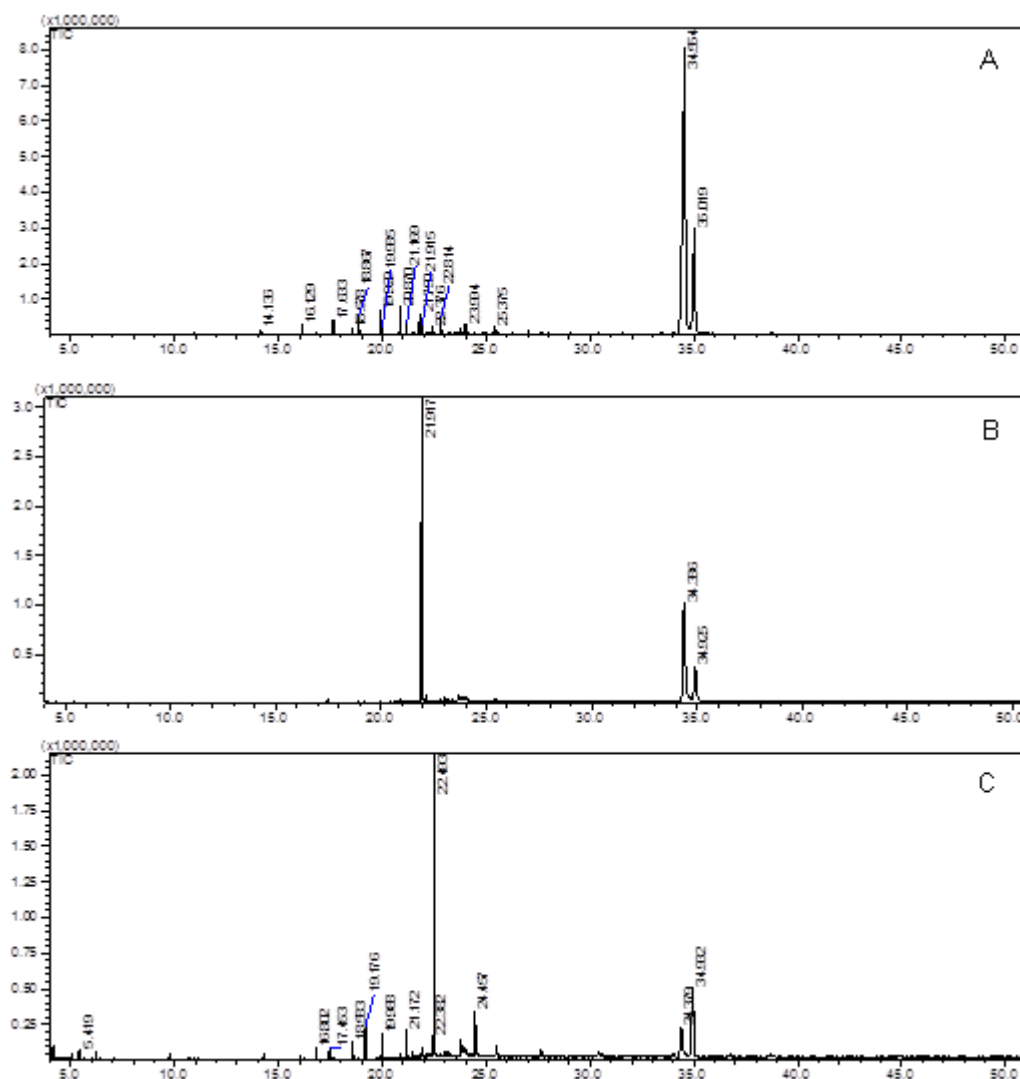
A produção de triterpenos e de sesquiterpenos nesses mutantes indica desvio da rota biossintética, que inicialmente levaria a biossíntese dos esteroides, mais precisamente o ergosterol. Foi observado que o gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia* mostrou-se mais específico, uma vez que o desvio da rota biossintética produziu a friedelina.

4.5 - Otimização cromatográfica das análises das amostras que produziram friedelina

Os cromatogramas resultantes das análises das amostras de leveduras com gene sintético e de seus mutantes apresentaram uma variedade de substâncias alifáticas (cadeias apolares), além de sinais de ergosterol e seus derivados em elevada concentração, o que prejudica a identificação das substâncias de interesse no extrato. Em vista disso, optou-se por aperfeiçoar o método de extração com limpeza e fracionamento da amostra.

Para o procedimento de limpeza, o extrato foi submetido a uma extração em fase sólida, utilizando sílica flash (800 mg) em gradiente da fase móvel utilizando Hex, Hex:CHCl₃ (1:1), CHCl₃ em ordem crescente de polaridade, obtendo-se três frações de cada amostra. As frações apresentaram quantidades de massas de 0,4 mg, 0,3 mg e 0,2 mg, respectivamente. Após análise prévia por CCDC, as frações foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A análise das frações Hex, Hex:CHCl₃ (1:1) e CHCl₃ por CG-EM (Figuras 22 e 23, ps. 59 e 60) indicou a presença de friedelina, friedelanol, β -amirina e esqualeno. Os cromatogramas (TIC) A, B e C obtidos (Figura 22, p. 59) revelaram boa resolução cromatográfica dos picos de interesse, visto que foi possível observar os metabólitos produzidos sem a interferência de impurezas ou subprodutos do metabolismo da levedura.

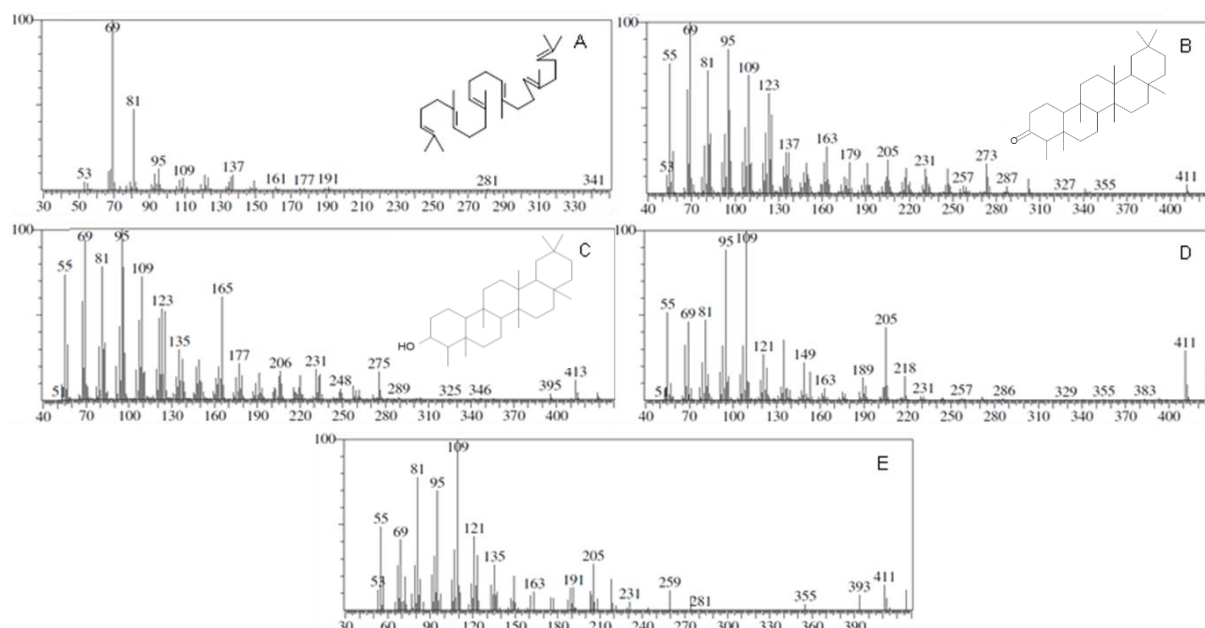
Figura 22: Cromatograma (TIC) obtido após a limpeza da amostra do mutante L483V (mutação na posição 483 do resíduo de leucina para valina).



Legenda: A) Fração em hexano. B) Fração em hexano/clorofórmio (1:1). C) Fração em clorofórmio.

A análise dos espectros de massas (Figura 23, A-E, p. 60) indicou a presença do friedelanol com íon molecular $[M]^+$ de m/z 428 e fragmentos característicos com m/z 413, m/z 275, m/z 206 e m/z 123 (Figura 23, Espectro C, p. 60). Também identificou-se o precursor dos triterpenos, esqualeno, com íon molecular $[M]^+$ de m/z 426 e fragmento característico com m/z 341 (Figura 23, Espectro A, p. 60). Essas análises confirmaram também a presença da friedelina nas três frações analisadas (Cromatogramas A, B, C e espectros de massas B) mostrando ainda estar concentrada na fração hexânica (Figura 22, Cromatograma A, t_R 35,0 min, p. 59).

Figura 23: Espectros de massas das substâncias presentes na amostra após a limpeza.



Legenda: A) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 21,9 min na fração hexano e 21,9 min na fração hexano:clorofórmio de m/z 426, identificado como esqualeno. B) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 35,0 min na fração hexano, 34,9 min na fração hexano:clorofórmio e 34,9 min na fração clorofórmio de m/z 426, identificado como friedelina. C) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 34,6 min na fração hexano, 34,4 min na fração hexano:clorofórmio e 34,4 min na fração clorofórmio de m/z 428, identificado como friedelanol. D) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 22,5 min na fração clorofórmio e m/z 426, identificado como mistura de quinonametideos do tipo friedelano. E) Espectro de massas (EI) do pico com tempo de retenção em 24,5 min na fração clorofórmio e m/z 426, identificado como mistura de esclareol e lupeol.

4.6 - Determinação dos teores relativos dos triterpenos identificados

Os triterpenos friedelina e β -amirina identificados na análise por CG-EM tiveram seus teores relativos calculados, utilizando a área percentual do pico correspondente no cromatograma de íons totais (TIC). Nos gráficos a seguir estão apresentadas as quantidades relativas desses triterpenos nos extratos obtidos do gene selvagem e após às mutações no gene sintético (Figura 24, p. 61) e com gene de *Maytenus ilicifolia* (Figura 25, p. 61).

Figura 24: Teores das substâncias obtidas do gene selvagem e após as mutações no gene sintético.

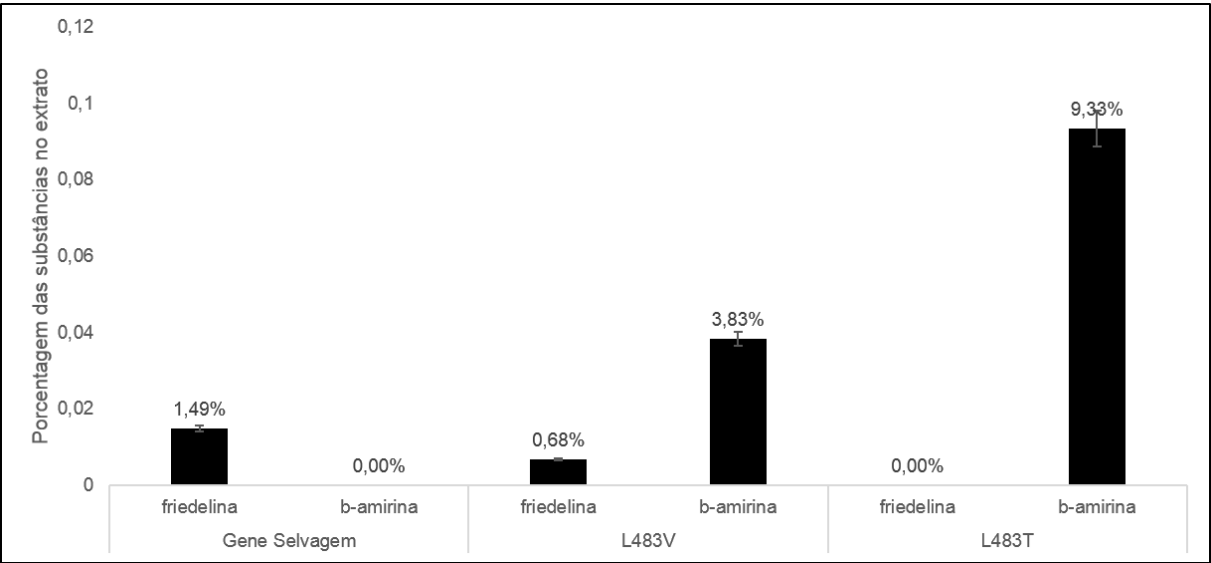
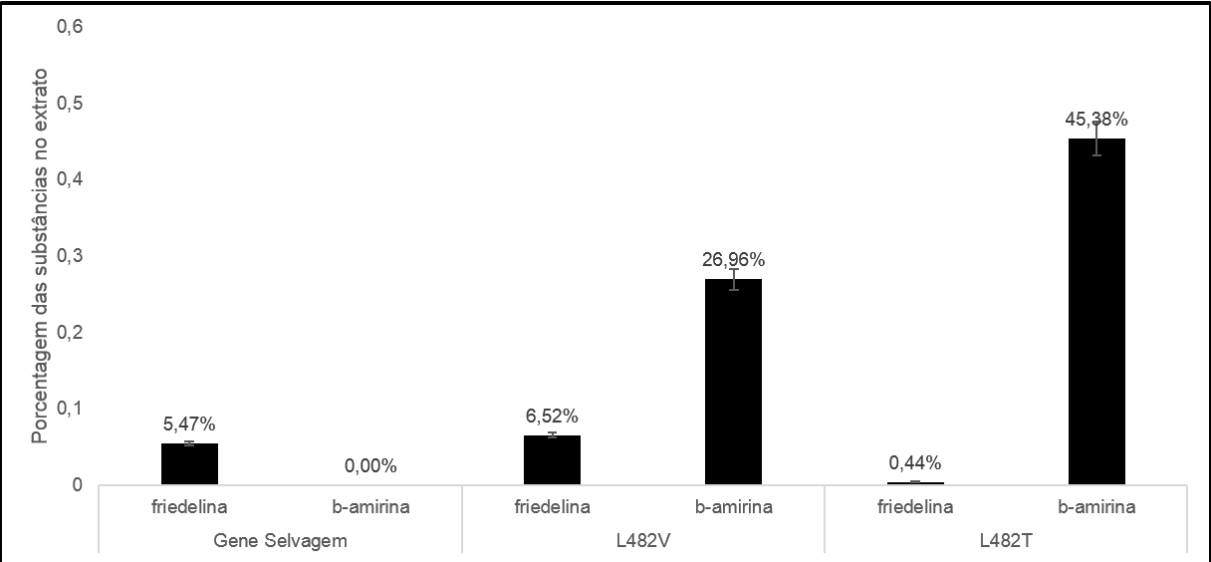


Figura 25: Teores das substâncias obtidas do gene selvagem e após as mutações no gene de *M. ilicifolia*.



Nas mutações do gene sintético de *Kalanchoe daigremontiana* somente o mutante L483V produziu a friedelina. As duas mutações produziram a β -amirina sendo que o maior acúmulo percentual deste metabólito se deu no mutante L483T, que não produziu a friedelina.

Já para as mutações do gene de *M. ilicifolia*, o acúmulo percentual da friedelina foi maior em relação às mutações do gene sintético, principalmente no mutante L482V. De toda forma, a percentagem β -amirina também aumentou nas mutações do gene de *M. ilicifolia* (Figura 25, p. 61). Esses resultados demonstram que a substituição de uma leucina na posição 482 ou 483 para valina ou treonina, que são aminoácidos menores, pode estabilizar o carbocátion prematuramente levando à formação de β -amirina, um dos primeiros triterpenos formados após as etapas de biossíntese de triterpenos que envolve rearranjos de carbocátions (Figura 2, p. 25). Outrossim, a biossíntese da friedelina é aquela que envolve o maior número possível de rearranjos (Figura 2, p. 25) e pode requisitar outro(s) aminoácido(s) para melhor definir a especificidade para maior produção da friedelina. A especificidade substrato/proteína está sendo estudada com base em experimentos de modelagem molecular (docking) da enzima com os aminoácidos avaliados nesse trabalho pelo grupo de pesquisa do Prof. Rafael Guido do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP).

5 - CONCLUSÃO

Mutações sítio-dirigidas foram realizadas no resíduo de leucina da posição 483 do gene de friedelina sintase de *K. daigremontiana* obtido sinteticamente (L483T e L483V) e da posição 482, correspondente, no gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia* (L482T e L482V). As análises da expressão funcional dos mutantes do gene da friedelina sintase permitiram a identificação de alterações na especificidade de produção desta enzima. Os produtos formados dos mutantes confirmam o desvio da rota metabólica da formação do lanosterol para a formação da friedelina, da β -amirina e do taraxerol e para os sesquiterpenos manool e esclareol.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determinação da publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 02 jul. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 dez. 2012.

AUSUBEL, F. M. (Ed.). **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 2004. v. 3.

BUFFA FILHO, W.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, S. I. V.; FRANÇA, S. C. *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**, v. 204, n. 6, p. 137-146, 2004.

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 85-89, 2002.

CARVALHO, J. C. B. **Estudo químico e biológico de espécies vegetais caboverdianas *Echium hypertropicum* Webb e *Echium stenosisiphon* Webb subsp. *stenosisiphon***. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

CARVALHO, P. R. F. **Estudo químico, biológico e biossintético dos triterpenos quinonametídeos de *Salacia campestris***. 2002. 181 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2002.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 367-372, 2005.

CHANG, C.; CHEN, Y.; TSENG, S.; LIU, Y.; WEN, H.; LI, W.; HUANG, C.; KO, C.; WANG, T.; WU, T. The cysteine 703 to isoleucine or histidine mutation of the oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* generates an iridal-type triterpenoid. **Biochimie**, v. 94, n. 11, p. 2376-2381, 2012.

CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinomethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741-748, 2000.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO,

R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.

DONALD, K. A. G.; HAMPTON, R. Y.; FRITZ, I. B. Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3341-3344, 1997.

DONG, Y.; STEFFENSON, B. J.; MIROCHA, C. J. Analysis of ergosterol in single kernel and ground grain by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4121-4125, 2006.

FUJINO, Y.; OHNISHI, M. Characterization and composition of sterols in the free and esterified sterol fractions of *Aspergillus oryzae*. **Lipids**, v. 14, n. 7, p. 663-668, 1979.

GULLO, F. P.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, V. A. F. F. M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S. A.; SILVA, A. C. A. P.; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/340787.

HART, E. A.; HUA, L.; DARR, L. B.; WILSON, W. K.; PANG, J.; MATSUDA, S. P. T. Directed evolution to investigate steric control of enzymatic oxidosqualene cyclization. An isoleucine-to-valine mutation in cycloartenol synthase allows lanosterol and parkeol biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 9887-9888, 1999.

HERRERA, J. B. R.; WILSON, W. K.; MATSUDA, S. P. T. A tyrosine-to-threonine mutation converts cycloartenol synthase to an oxidosqualene cyclase that forms lanosterol as its major product. **Journal of the American Chemical Society**, n. 122, p. 6765-6766, 2000.

JELLER, A. H.; SILVA, D. H. S. S.; LIÃO, L. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1977-1982, 2004.

JOUBERT, B. M.; HUA, L.; MATSUDA, S. P. T. Steric bulk at position 454 in *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol synthase influences b-ring formation but not deprotonation. **Organic Letters**, n. 2, 339-341, 2000.

KUSHIRO, T.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y. Beta-amyrin synthase: cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 1, p. 238-244, 1998.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. London: Oxford Science Publications, 1994.

MATSUDA, S. P. T.; DARR, L. B.; HART, E. A.; HERRERA, J. B. R.; MCCANN, K. E.; MEYER, M. M.; PANG, J.; SCHEPMANN, H. G.; WILSON, W. K. Steric bulk at cycloartenol synthase position 481 influences cyclization and deprotonation. **Organic Letters**, n. 2, p. 2261-2263, 2000.

MEYER, M. M.; XU, R.; MATSUDA, S. P. T. Directed evolution to generate cycloartenol synthase mutants that produce lanosterol. **Organic Letters**, n. 4, p. 1395-1398, 2002.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 553-556, 2009.

OTERO, J. M.; VONGSANGNAK, W.; ASADOLLAHI, M.; OLIVARES-HERNANDES, R.; MAURY, J.; FARINELLI, L.; BARLOCHER, L.; ØSTERÅS, M.; SCHALK, M.; CLARK, A.; NIELSEN, J. Whole genome sequencing of *Saccharomyces cerevisiae*: from genotype to phenotype for improved metabolic engineering applications. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2010.

ROBERTS, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 387-395, 2007.

ROHMER, M. Methylerythritol phosphate pathway. In: MANDER, L. N.; LIU, H.-W. (Ed.). **Comprehensive natural products chemistry II**. Kidlington: Elsevier Science, 2010. v. 1, p. 515-555.

SANTOS, V. A. F. F. M.; SANTOS, D. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; ZANONI, M. V. B.; FURLAN, M. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 15, p. 6956-6973, 2010.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. S.; GALOTTA, A. L. A. Q.; SANTOS, M. P. S. S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 4, 439-442, 2001.

SUZUKI, M.; XIANG, T.; OHYAMA, K.; SEKI, H.; SAITO, K.; MURANAKA, T.; HAYASHI, H.; KATSUBE, Y.; KUSHIRO, T.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y. Lanosterol synthase in dicotyledonous plants. **Plant Cell Physiology**, v. 47, n. 5, p. 565-571, 2006.

van DIJKEN, J. P.; BAUER, J.; BRAMBILLA, L. J.; DUBOC, P.; FRANCOIS, J. M.; GANCEDO, C.; GIUSEPPIN, M. L. F.; HEIJNEN, J. J.; HOARE, M.; LANGE, H. C.; MADDEN, E. A.; NIEDERBERGER, P.; NIELSEN, J.; PARROU, J. L.; PETIT, T.; PORRO, D.; REUSS, M.; van RIEL, N.; RIZZI, M.; STEENSMA, H. Y.; VERRIPS, C. T.; VINDELØV, J.; PRONK, J. T.;. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9/10, p. 706-714, 2000.

VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, N. M.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 243-244, 2006.

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

WESTFALL, P. J.; PITERA, D. J.; LENIHAN, J. R.; ENG, D.; WOOLARD, F. X.; REGENTIN, R.; HORNING, T.; MELIS, D. J.; OWENS, A.; FICKES, S.; DIOLA, D.; BENJAMIN, K. R.; KEASLING, J. D.; LEAVELL, M. D.; MCPHEE, D. J.; RENNINGER, N. S.; NEWMAN, J. D.; PADDON, C. J. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 3, p. E111-E118, 2012.

WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P. R.; RAHMAN, S. K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1189-1208, 1989.

WU, T.; CHANG, C. Enzymatic formation of multiple triterpenes by mutation of tyrosine 510 of the oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. **ChemBioChem**, v. 5, p. 1712-1715, 2004.

WU, T.; GRIFFIN, J. H. Conversion of a plant oxidosqualene-cycloartenol synthase to an oxidosqualene-lanosterol cyclase by random mutagenesis. **Biochemistry**, v. 41, p. 8238-8244, 2002.

WU, T.; CHANG, C. Enzymatic formation of multiple triterpenes by mutation of tyrosine 510 of the oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. **ChemBioChem**, v. 5, p. 1712-1715, 2004.

WU, T.; LIU, Y.; CHANG, C. Histidine residue at position 234 of oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* simultaneously influences

cyclization, rearrangement, and deprotonation reactions. **ChemBioChem**, v. 6, p. 1177-1171, 2005.

WU, T.; LIU, Y.; CHIU, F.; CHANG, C. Phenylalanine 445 within oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* influences C-ring cyclization and deprotonation reactions. **Organic Letters**, v. 8, n. 21, p. 4691-4694, 2006a.

WU, T.; LIU, Y.; CHANG, C.; YU, M.; WANG, H. Site-saturated mutagenesis of histidine 234 of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase demonstrates dual functions in cyclization and rearrangement reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 6414-6419, 2006b.

WU, T.; YU, M.; LIU, Y.; CHANG, C.; WANG, H.; DIAU, E. Tryptophan 232 within oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* influences rearrangement and deprotonation but not cyclization reactions. **Organic Letters**, v. 8, n. 7, p. 1319-1322, 2006c.

WU, T.; WANG, T.; CHANG, C.; LIU, Y.; SHIE, W. Importance of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase tyrosine 707 residue for chair-boat bicyclic ring formation and deprotonation reactions. **Organic Letters**, v. 10, n. 21, p. 4959-4962, 2008a.

WU, T.; WEN, H.; CHANG, C.; LIU, Y. Protein plasticity: a single amino acid substitution in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase generates protosta-13(17),24-dien-3 β -ol, a rearrangement product. **Organic Letters**, v. 10, n. 12, p. 2529-2532, 2008b.

WU, T.; CHANG, C.; LIU, Y.; WANG, T. *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase: a chemistry–biology interdisciplinary study of the protein’s structure–function–reaction mechanism relationships. **The Chemical Record**, v. 8, p. 302-325, 2008c.

WU, T.; CHANG, Y.; CHANG, C.; WEN, H.; LIU, Y.; LI, W.; WANG, T.; SHIE, W. Alteration of the substrate’s prefolded conformation and cyclization stereochemistry of oxidosqualene-lanosterol cyclase of *Saccharomyces cerevisiae* by substitution at phenylalanine 699. **Organic Letters**, v. 12, n. 3, p. 500-503, 2010.

WU, T.; CHANG, Y.; LIU, Y.; CHANG, C.; WEN, H.; LI, W.; SHIE, W. Mutation of isoleucine 705 of the oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* affects lanosterol’s C/D-ring cyclization and 17 α/β -exocyclic side chain stereochemistry. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 1092-1097, 2011.