

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/04/2024.

KARINA ALVES PINHEIRO FONTANIN

***Maytenus ilicifolia* e *Xanthomonas albilineans*:**
uma interação desvendada pela
interdisciplinaridade entre a química e a
genética

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira

Araraquara

2023

F681m	Fontanin, Karina Alves Pinheiro Maytenus ilicifolia e Xanthomonas albilineans : uma interação desvendada pela interdisciplinaridade entre a química e a genética / Karina Alves Pinheiro Fontanin. -- Araraquara, 2023 90 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientadora: Maysa Furlan Coorientadora: Tatiana Maria de Souza Moreira 1. Espinha Santa. 2. Xanthomonas albilineans. 3. Metabólitos. 4. Bactérias patogênicas. 5. Biossíntese. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Maytenus ilicifolia e Xanthomonas albilineans: uma interação desvendada pela interdisciplinaridade da química e genética"

AUTORA: KARINA ALVES PINHEIRO FONTANIN

ORIENTADORA: MAYSA FURLAN

COORDINADORA: TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA

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

Prof.ª Dr.ª MAYSA FURLAN (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JOAQUIM CORSINO (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal Mato Grosso do Sul - UFMS - Campo Grande

Prof. Dr. ALEX HAROLDO JELLER (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS - Dourados

Profa. Dra. HOSANA MARIA DEBONSI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biomoleculares / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto

Dr. JOÃO LUIZ BRONZEL JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 04 de abril de 2023

Este documento foi assinado digitalmente por Maysa Furlan.
Para verificar as assinaturas, vá ao site <https://portal.assinasp.imprensaoficial.com.br/Verificar/2F2A-11C7-A043-D758> ou vá até o site <https://portal.assinasp.imprensaoficial.com.br/Verificar/> e utilize o código abaixo para verificar se este documento é válido.



PROTOCOLO DE ASSINATURA(S)

O documento acima foi proposto para assinatura digital na plataforma Unesp. Para verificar as assinaturas clique no link: <https://portal.assinasp.imprensaoficial.com.br/Verificar/2F2A-11C7-A043-D758> ou vá até o site <https://portal.assinasp.imprensaoficial.com.br/Verificar/> e utilize o código abaixo para verificar se este documento é válido.

Código para verificação: 2F2A-11C7-A043-D758



Hash do Documento

9651E2E094CB1FF9C026E733A63CC01B4068B6AC089113AEB107B8AEB97724E8

O(s) nome(s) indicado(s) para assinatura, bem como seu(s) status em 05/04/2023 é(são) :

☒ Maysa Furlan - 060.031.118-01 em 05/04/2023 09:53 UTC-03:00

Tipo: Certificado Digital



Dados Curriculares

DADOS PESSOAIS

Nome: Karina Alves Pinheiro Fontanin

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

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

Estado Civil: Casada

Endereço residencial: Rua Sérgio dos Santos Pereira, 55 – Bloco F, apto 14

Jardim Alice - Indaiatuba

13346-240, SP - Brasil

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.

Dados Curriculares

Pós-Graduação

Curso: Doutorado em Química

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

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

Projeto: “Estudos das interações de *Maytenus ilicifolia* e microrganismo: análise química e expressão gênica”.

Orientadora: Maysa Furlan

Período: agosto de 2017 a março de 2023.

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 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

Dados Curriculares

Período: março de 2011 a julho de 2012.

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.

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

Monitoria de Química Analítica Qualitativa I

Instituição: Universidade Presbiteriana Mackenzie

Período: Fevereiro de 2010 a Junho de 2010

Prêmios

Diploma de honra ao mérito do Conselho Regional de Química – IV Região. Diploma de melhor aluno do curso no período de 2008 a 2011.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais

KARINA ALVES PINHEIRO FONTANIN; TATIANA MARIA SOUZA-MOREIRA; VANIA APARECIDA DE FREITAS FORMENTON MACEDO DOS SANTOS; ANDREW OLIVEIRA; SANDRO ROBERTO VALENTINI; CLESLEI FERNANDO ZANELLI; RAFAEL GUIDO; MAYSA FURLAN. Estudos da interação de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) e *Xanthomonas albilineans* envolvidos na formação de triterpenos quinonametídeos. In: 44^a REUNIÃO ANUAL VIRTUAL DA SBQ, 2021, Online. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2021. Disponível em: <<https://proceedings.science/rasbq-2021/papers/estudos-da-interacao-de-maytenus-ilicifolia--celastraceae--e-xanthomonas-albilineans-envolvidos-na-formacao-de-triterpen?lang=pt-br>>.

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 publicados e/ou submetidos a periódicos indexados

FURLAN, MAYSA & FONTANIN, KARINA ALVES PINHEIRO. Mulheres na ciência: um olhar para a pós-graduação e a área de materiais. **Revista Tecnologia e Tendências**, v. 11, n. 1, 3-13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.25112/rtt.v11i1.2330>.

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, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep36858>.

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

Dados Curriculares

santificam. In: SANTOS, L. C. dos; FURLAN, M, (Org.). **Produtos naturais bioativos**. São Paulo: Ed. Unesp, 2016.

Dedicatória

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

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

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

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

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 coorientadora Tatiana Maria de Souza Moreira por todos os conhecimentos transmitidos com tanta dedicação e pela imprescindível colaboração nas etapas fundamentais desse projeto.

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 marido 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 e 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.

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.

Aos técnicos e doutores dos laboratórios do NuBBe, João Bronzel e Juliana Rodrigues, por todos os ensinamentos e ajuda na utilização da cromatografia gasosa e líquida acoplados à espectrometria de massas.

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

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 pela colaboração em etapas fundamentais desse projeto.

Ao professor Rafael Guido, doutor Andrew Oliveira e Mariana Ortiz de Godoy do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo pela colaboração nas etapas tão importantes do projeto de pesquisa.

Às amigas queridas Bruna, Vania e Elen 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: Naira, Wellington, Weslei, e João, 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.

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

*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

Os trabalhos de biossíntese e compartimentalização em espécies da família Celastraceae realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Maysa Furlan trouxeram importantes elucidações no processo de formação dos triterpenos quinonametídeos, metabólitos secundários que mostram exclusivo acúmulo em espécies jovens dessa família e apresentam potencialidades biológicas, incluindo antitumoral, antimicrobiana e anti-inflamatória. Estudos biológicos recentes com foco na avaliação antimicrobiana desenvolvidos pelo nosso grupo em colaboração com o Prof. Rafael Guido do Instituto de Física da USP/São Carlos, demonstraram que os triterpenos quinonametídeos apresentam potencial atividade contra a bactéria *Xanthomonas albilineans*, a qual está presente no solo e é causadora da escaldadura das folhas em plantações de cana de açúcar trazendo limitações à produção de álcool e açúcar. Desta forma, o acúmulo dos triterpenos quinonametídeos pode estar relacionado a uma resposta da planta ao ataque de agentes infectantes como a *X. albilineans*, o que permitiria avaliar a sua via biossintética pela alteração do nível de expressão gênica responsável por dirigir a produção desses metabólitos. Com isso, o presente trabalho propõe avaliar a interação entre a espécie *M. ilicifolia* (Celastraceae) e a bactéria *X. albilineans* de forma a investigar se a biossíntese dos triterpenos quinonametídeos pode ser induzida e/ou otimizada pela ação do microrganismo. Os experimentos foram realizados pela interação entre cepas de *X. albilineans* e plântulas de *M. ilicifolia* e posterior análise dos extratos de raízes e folhas por cromatografia líquida de alta eficiência para detectar e quantificar os metabólitos de interesse. Outrossim, análises de expressão gênica da planta *in natura* e infectada foram realizadas para avaliar se houve alteração da expressão de genes conhecidos da via dos triterpenos em resposta à infecção. Os estudos demonstraram aumento da concentração em até 48 vezes para a pristimerina e até 44 vezes para a maitenina após infecção das plântulas de *M. ilicifolia* com *X. albilineans*, demonstrando que a interação planta/microrganismo pode potencializar a produção desta classe de substâncias, o que corrobora os resultados antibacterianos previamente obtidos. Por outro lado, não houve alteração significativa do nível de expressão dos genes que codificam a friedelina sintase e a oxidoredutase CYP712K4, indicando que a quantidade dessas enzimas pode não ser limitante para a via biossintética dos compostos em estudo.

Assim, os resultados do presente trabalho proporcionam a busca de outras enzimas que sejam determinantes para a biossíntese dos triterpenos quinonametídeos nas condições de estresse biótico.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, *Xanthomonas albilineans*, pristimerina, maitenina, biossíntese.

ABSTRACT

Studies dealing on biosynthesis and compartmentalization in species of the Celastraceae family carried out by the research group of Profa. Maysa Furlan brought important elucidation of the quinonemethide triterpenes pathway. These compounds are secondary metabolites that show exclusive accumulation in seedlings of Celastraceae species and show biological potentials, including antitumor, antimicrobial and anti-inflammatory. Recent biological studies focusing on antimicrobial evaluation developed by our research group, in collaboration with Prof. Rafael Guido from the Physics Institute of USP/São Carlos, demonstrated that the quinonemethide triterpenes show potential activity against *Xanthomonas albilineans*, which is present in the soil and infects sugarcane plantations, bringing limitations to the production of alcohol and sugar. Thus, the present work proposes to evaluate the *in vivo* interaction between *M. ilicifolia* (Celastraceae) and *X. albilineans* in order to study whether the biosynthesis of quinonemethide triterpenes can be induced and/or optimized by the action of such microorganism. These experiments were carried out by contact between *X. albilineans* strains and *M. ilicifolia* seedlings and subsequent analysis by high performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector to detect the presence and concentration of the metabolites of interest. Furthermore, gene expression analyzes of the *in natura* and infected plant were performed to evaluate whether there was variation of the expression of known genes of the triterpene pathway in response to infection. The studies showed an increase in the production up to 48 times of pristimerin and up to 44 times of maytenin after infection of *M. ilicifolia* seedlings with *X. albilineans*, demonstrating that the plant-microorganism interaction can potentiate the production of this class of compounds, which corroborates the antibacterial results previously obtained. Furthermore, there was no significant change in the expression level of the genes that encode friedelin synthase and CYP712K4 oxidoreductase, indicating that the amount of these enzymes may not be limiting for the biosynthetic pathway of the compounds under study. Thus, the results of this work provide the search for other enzymes that are crucial for the biosynthesis of quinonemethide triterpenes under biotic stress conditions.

Keywords: *Maytenus ilicifolia*, *Xanthomonas albilineans*, pristimerin, maytenin, biosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da pristimerina (1), maitenina (2) e do padrão positivo tetraciclina com os respectivos IC ₅₀ contra <i>Xanthomonas albilineans</i>	24
Figura 2. Estrutura química do 24- <i>nor</i> -D:A-friedo-oleanano.....	25
Figura 3. Biossíntese da friedelina e do ácido maitenóico, respectivamente precursor e intermediário na via biossintética dos TQMs.	26
Figura 4. Proposta de biossíntese dos TQMs.	27
Figura 5. Alteração das vias biossintéticas de espécies vegetais relacionada às interações ecológicas.	28
Figura 6. Folha de cana de açúcar infectada com <i>X. albilineans</i>	30
Figura 7: Estrutura química da friedelina (3).	38
Figura 8. Espectro de massas da pristimerina (1).	45
Figura 9. Espectro de massas da maitenina (2).	46
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H da pristimerina (1) e expansões (600 MHz, CDCl ₃).	47
Figura 11. Espectro DEPT-135 de RMN de ¹³ C da pristimerina (1) e expansão (150 MHz, CDCl ₃).	48
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H da maitenina (2) e expansões (600 MHz, CDCl ₃).	49
Figura 13. Espectro DEPT-135 de RMN de ¹³ C da maitenina (2) (150 MHz, CDCl ₃).	50
Figura 14: Cromatogramas dos padrões maitenina (2) e pristimerina (1) e dos extratos utilizando os sistemas de solvente: Hex:AcOEt (8:2), Hex:AcOEt (7:3), Hex:AcOEt (6:4) e DCM (A à F, respectivamente).	53
Figura 15: Teor relativo calculado a partir da área dos picos da pristimerina (1) e maitenina (2) nos extratos com sistemas de solvente Hex:AcOEt (8:2), Hex:AcOEt (7:3), Hex:AcOEt (6:4) e DCM.	54

Figura 16: Plântulas de <i>M. ilicifolia</i> após infecção com corte das folhas utilizando lâmina umedecida no inóculo de <i>X. albilineans</i>	55
Figura 17. Cromatogramas dos extratos das raízes obtidos após a infecção 1 (I1) das plântulas de <i>M. ilicifolia</i> durante o primeiro mês de infecção com <i>X. albilineans</i>	56
Figura 18: Plântulas de <i>M. ilicifolia</i> após infecção com corte do caule utilizando lâmina estéril e injeção de 100 µL do cultivo celular de <i>X. albilineans</i>	56
Figura 19. Cromatogramas dos extratos das raízes obtidos após a infecção 2 (I2) das plântulas de <i>M. ilicifolia</i> durante o primeiro mês de infecção com <i>X. albilineans</i>	57
Figura 20: Plântulas de <i>M. ilicifolia</i> após infecção com pipetagem de 100 µL da suspensão bacteriana na superfície de um corte feito acima do meristema apical com uma lâmina previamente mergulhada no inóculo de <i>X. albilineans</i>	58
Figura 21. Cromatogramas dos extratos das raízes obtidos após a infecção 3 (I3) das plântulas de <i>M. ilicifolia</i> durante o primeiro mês de infecção com <i>X. albilineans</i>	59
Figura 22. Teor relativo de pristimerina (1) e de maitenina (2) presente nos extratos das raízes obtidos após infecção das plântulas de <i>M. ilicifolia</i> durante o primeiro mês de infecção com <i>X. albilineans</i>	59
Figura 23. Biossíntese de pristimerina (1) e de maitenina (2) após infecção de 30 dias com <i>Xanthomonas albilineans</i>	60
Figura 24. Cromatogramas dos extratos obtidos das raízes das plântulas Mi1 (A), Mi2 (B), Mi4 (C), Mi5 (D), C1 (E), C2 (F) e C3 (G) antes da infecção com <i>Xanthomonas albilineans</i>	62
Figura 25. Cromatogramas dos extratos obtidos das raízes das plântulas Mi1 (A), Mi2 (B), Mi4 (C), Mi5 (D), C1 (E), C2 (F) e C3 (G) após infecção com <i>Xanthomonas albilineans</i>	63
Figura 26. Curva de calibração da pristimerina (1).....	65
Figura 27. Comparação das concentrações (mg/mL) de pristimerina (1) antes e após infecções com <i>Xanthomonas albilineans</i>	67

Figura 28. Curva de calibração da maitenina (2).....	69
Figura 29. Comparação das concentrações (mg/mL) de maitenina (2) antes e após infecções com <i>Xanthomonas albilineans</i>	71
Figura 30. Biossíntese de pristimerina (1) e de maitenina (2) em raízes de <i>M. ilicifolia</i> após infecção de 30 dias com <i>Xanthomonas albilineans</i> a partir do precursor comum, friedelina (3) presente nas folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i>	72
Figura 31. Cromatogramas dos extratos obtidos das folhas das plântulas Mi1 (A), Mi5 (B), C1 (C) e C2 (D) antes da infecção com <i>Xanthomonas albilineans</i>	73
Figura 32. Cromatogramas dos extratos obtidos das folhas das plântulas Mi1 (A), Mi5 (B), C1 (C) e C2 (D) após infecção com <i>Xanthomonas albilineans</i>	73
Figura 33. Curva de calibração da friedelina (3).....	75
Figura 34. Comparação das concentrações (mg/mL) de friedelina (3) antes e após infecções com <i>Xanthomonas albilineans</i>	77
Figura 35. Curvas de melting dos amplicons para as amostras de DNA da bactéria e do material vegetal usando os primers para detecção do DNA de <i>X. albilineans</i>	78
Figura 36. Biossíntese de pristimerina (1) e de maitenina (2) a partir dos precursores friedelina (3) e ácido maitenólico.....	79
Figura 37. Nível de expressão relativa de CYP712K4 nas raízes e folhas das plântulas infectadas e das plântulas de controle de <i>M. ilicifolia</i>	80
Figura 38. Nível de expressão relativa de MiFRS nas raízes e folhas das plântulas infectadas e das plântulas de controle de <i>M. ilicifolia</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros para os primers forward (F) e reverse (R) desenhados em <i>Primer3Plus</i>	41
Tabela 2: Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da pristimerina (1).	49
Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da maitenina (2).	51
Tabela 4. Sistemas de solvente utilizados nos extratos.	52
Tabela 5: Áreas dos picos integrados após tratamento dos cromatogramas das soluções padrão em LCSolution obtidos para a pristimerina (1).	64
Tabela 6: Médias das áreas dos picos integrados e concentração média (mg/mL) da pristimerina (1) das plântulas Mi1 , Mi2 , Mi4 , Mi5 , C1 , C2 e C3 antes e após a infecção com <i>X. albilineans</i>	66
Tabela 7: Áreas dos picos integrados após tratamento dos cromatogramas das soluções padrão em LCSolution obtidos para a maitenina (2).	68
Tabela 8: Médias das áreas dos picos integrados e concentração média (mg/mL) da maitenina (2) das plântulas Mi1 , Mi2 , Mi4 , Mi5 , C1 , C2 e C3 antes e após a infecção com <i>X. albilineans</i>	70
Tabela 9: Média das áreas dos picos integrados após tratamento dos cromatogramas das soluções padrão em GCMSsolution obtidos através da razão entre friedelina (3) e o padrão interno colesterol.	74
Tabela 10: Médias das áreas dos picos integrados e concentração média (mg/mL) da friedelina (3) das plântulas Mi1 , Mi5 , C1 e C2 antes e após a infecção com <i>X. albilineans</i>	76

LISTA DE ABREVIATURA

AcOEt: acetato de etila

CC: cromatografia em coluna

CCDP: cromatografia em camada delgada preparativa

CDCl₃: clorofórmio deuterado

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CFU: do inglês, *colony-forming unit*

CG-EM: cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas

CHCl₃: clorofórmio

Cl:I: clorofórmio e álcool isoamílico

CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD-ESI: cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas que possui fonte de ionização por eletrospray (ESI)

CTAB: brometo de cetil trimetil amônio

CYP712K4: enzima oxidoredutase do tipo P450

δ: deslocamento químico

DCM: diclorometano

DEPT: “distortionless enhancement by polarization transfer”

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: nucleotídeos de DNA

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

H₂O: água

HCl: ácido clorídrico

Hex: hexano

Hz: hertz

IC₅₀: 50% da concentração inibitória

λ : comprimento de onda

m/z : relação massa/carga

MeOH: metanol

MiFRS: enzima friedelina sintase de *Maytenus ilicifolia*

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NaCl: cloreto de sódio

OD600: densidade óptica a 600 nm

p.: página

P. A.: puro para análise

PCI: fenol:clorofórmio:álcool isoamílico

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDA: "Photodiode Array"

RLC: tampão de lise à base de hidrocloreto de guanidina

RNA: ácido ribonucleico

RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C : ressonância magnética nuclear de carbono treze

RPE: tampão de lavagem que remove traços de sais

rpm: rotações por minuto

RW1: tampão de lavagem que remove biomoléculas tais como carboidratos, proteína e ácidos graxos

Tris: triidroxiaminometano

TQMs: triterpenos quinonametídeos

SUMÁRIO

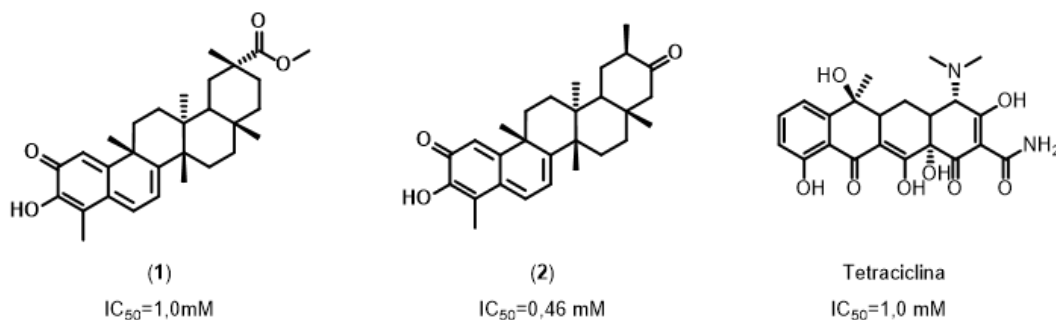
1 - INTRODUÇÃO	24
1.1 - Triterpenos quinonametídeos	25
1.2 - Biossíntese dos triterpenos friedelânicos e quinonametídeos	25
1.3 - Interações interespecíficas na produção de metabólitos secundários	28
1.4 - <i>Xanthomonas albilineans</i>	30
2 - OBJETIVOS	32
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 - Material biológico	33
3.2 - Obtenção e identificação dos padrões de pristimerina (1) e maitenina (2) isolados e purificados das cascas das raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i>	33
3.3 - Padronização do sistema de solvente extrator	35
3.4 - Infecção das plântulas de <i>Maytenus ilicifolia</i> com <i>Xanthomonas albilineans</i>	35
3.5 - Quantificação de pristimerina (1) e maitenina (2) nas raízes de plântulas antes e após a infecção por <i>Xanthomonas albilineans</i>	37
3.6 - Quantificação de friedelina (3) nas folhas de plântulas antes e após a infecção por <i>Xanthomonas albilineans</i>	38
3.7 - Extração de DNA	39
3.8 - Confirmação da infecção com <i>Xanthomonas albilineans</i> por PCR	40
3.9 - Extração de RNA total	41
3.10 - Síntese de DNA complementar (cDNA)	42
3.11 - Análises de RT-qPCR	43
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 - Identificação estrutural dos padrões de pristimerina (1) e maitenina (2) isolados e purificados	45
4.2 - Análise por CLAE-DAD dos TQMs (1) e (2) nas cascas das raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i>	51
4.2.1 - Padronização do sistema de solvente extrator	51
4.2.2 - Avaliação do metabolismo secundário de <i>Maytenus ilicifolia</i> frente à infecção com <i>Xanthomonas albilineans</i>	55
4.3 - Análise química dos triterpenos quinonametídeos antes e após infestação com <i>Xanthomonas albilineans</i>	61

4.3.1 - Quantificação de pristimerina (1) e maitenina (2) nas raízes das plântulas antes e após a infecção por <i>Xanthomonas albilineans</i>	61
4.4.1.1 - Pristimerina (1)	64
4.4.1.2 - Maitenina (2).....	67
4.3.2 - Quantificação de friedelina (3) nas folhas das plântulas antes e após a infecção por <i>Xanthomonas albilineans</i>	71
4.4 - Detecção da infecção das plântulas de <i>Maytenus ilicifolia</i> com <i>Xanthomonas albilineans</i>	77
4.5 - Análise da expressão gênica das plântulas de <i>Maytenus ilicifolia</i> antes e após a infestação com <i>Xanthomonas albilineans</i>	78
5 - CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	84

1 - INTRODUÇÃO

A espécie *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como “espinheira-santa”, é empregada para aliviar dores de estômago, náuseas, úlceras e gastrites (Biral *et al.*, 2018; Niero; Faloni de Andrade; Cechinel Filho, 2011). As cascas das raízes, mostram o acúmulo de triterpenos quinonametídeos (TQMs), considerados marcadores químicos de espécies da família Celastraceae. Os TQMs demonstram diversas potencialidades biológicas, incluindo atividades antioxidantes (Carvalho *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010; Klaić; Morimoto; Silverman, 2012; Yang *et al.*, 2020), antiprotozoária (Dos Santos *et al.*, 2013; Núñez *et al.*, 2021), anti-inflamatória (Velooso *et al.*, 2017; Coppede *et al.*, 2014; Kim; Park; Kim, 2013; Zhan *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021), contraceptiva (Mannowetz; Miller; Lishko, 2017), antimicrobiana e antibacteriana (Inácio *et al.*, 2019; Morales *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021; Padilla-Montañó; Guerra; Moujir, 2021), antitumoral (Cevatemre *et al.*, 2018; Park; Kim, 2018; Hernandez *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021) e, em um trabalho recente ainda não publicado, a Dra Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos Santos, realizou ensaio antibacteriano contra *Xanthomonas albilineans*. Esses estudos mostraram que dois TQMs, pristimerina (**1**) (IC_{50} 1,0 mM) e maitenina (**2**) (IC_{50} 0,46 mM) (Figura 1) são potencialmente ativos, sendo a maitenina duas vezes mais ativa que o padrão positivo, tetraciclina (IC_{50} 1,0 mM). Esses estudos foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Prof. Rafael Guido do IFSC/USP/São Carlos (dados não publicados).

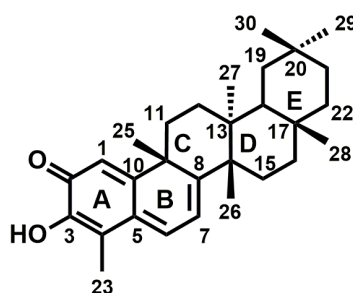
Figura 1. Estrutura química da pristimerina (**1**), maitenina (**2**) e do padrão positivo tetraciclina com os respectivos IC_{50} contra *Xanthomonas albilineans*.



1.1 - Triterpenos quinonametídeos

Os triterpenos quinonametídeos são conhecidos como celastrolídeos e apresentam nas suas estruturas químicas o núcleo 24-nor-D:A-friedo-oleanano (Gunatilaka; Fernando; Kikuchi, 1996), sendo que o sistema quinonametídeo apresenta insaturações e funções oxigenadas nos C-2 e C-3. Os triterpenos quinonametídeos classificados como 6-oxofenólico-nor-triterpenoide e 7-oxo-quinonametídeo são resultados das oxidações no C-6 e C-7, enquanto as insaturações adicionais em C-14 (15) dão origem aos 14 (15)-enoquinonametídeos. Além dessas características do sistema quinonametídeo, normalmente apresenta o C-29 oxidado a $-CO_2H$ ou a $-CO_2Me$ que, após descarboxilação, origina a série 29-nor. Os C-15, C-21, C-22, C-23 e C-28 também sofrem oxidações (Santos; Furlan; Amorim, 2016) (Figura 2).

Figura 2. Estrutura química do 24-nor-D:A-friedo-oleanano.



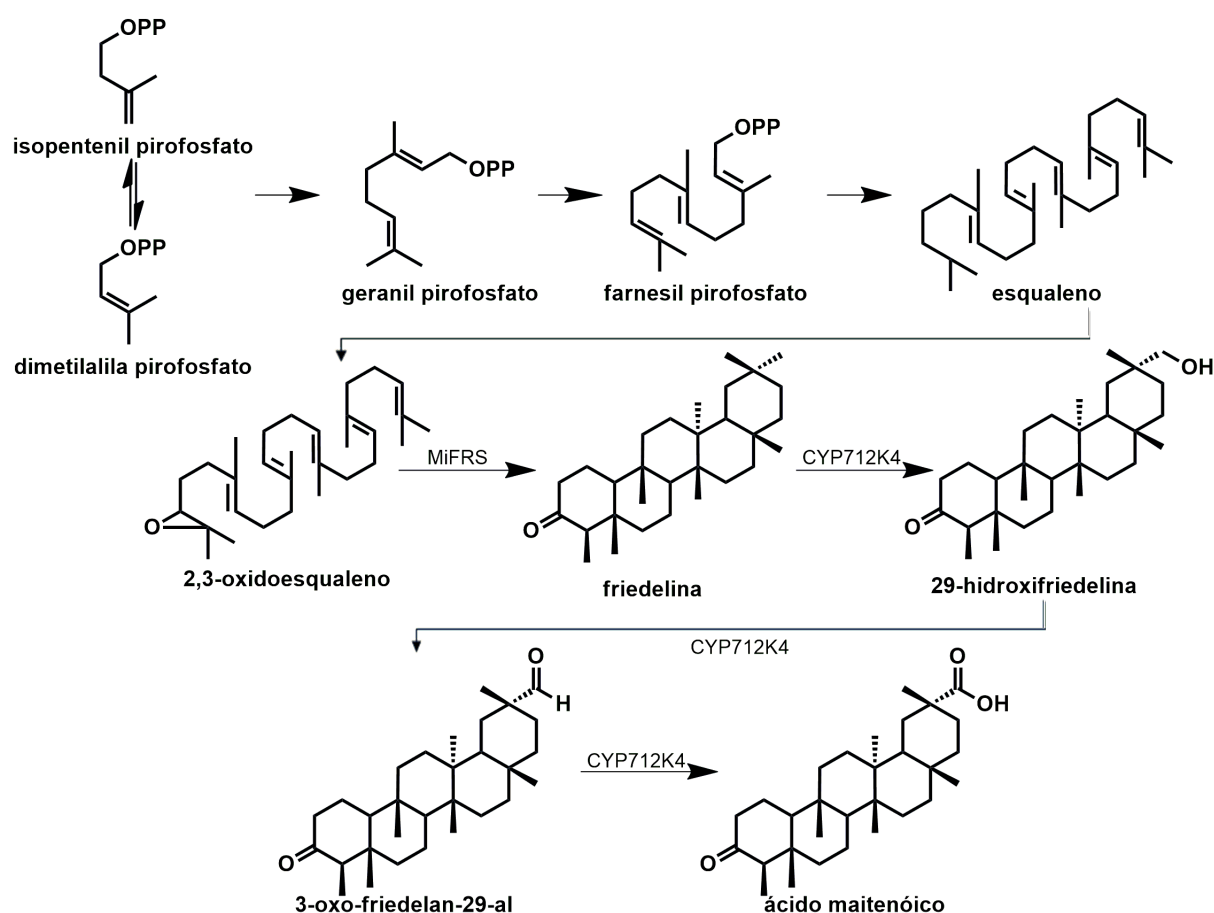
Fonte: Santos; Furlan; Amorim, 2016, p. 112.

1.2 - Biossíntese dos triterpenos friedelânicos e quinonametídeos

Os trabalhos de biossíntese dos TQMs até então desenvolvidos (Corsino *et al.*, 2000; Buffa Filho *et al.*, 2002; Buffa Filho *et al.*, 2004; Jeller *et al.*, 2004; Souza-Moreira *et al.*, 2016; Pina *et al.*, 2016; Inácio *et al.*, 2017; Souza-Moreira *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2018; Inácio *et al.*, 2019; Bicalho *et al.*, 2019; Mazzeu *et al.*, 2021) demonstraram a biossíntese compartimentalizada de triterpenos quinonametídeos nas raízes e friedelina nas folhas abrindo novas perspectivas de estudos, incluindo a análise proteômica, a qual, em trabalhos recentes, indicou que as raízes de *M. ilicifolia* apresentam elevado teor de proteínas de defesa (Paz *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2017; Santos, *et al.*, 2021). O alto teor dessas proteínas pode estar associado à necessidade de produção de metabólitos de defesa.

Experimentos de engenharia metabólica têm sido utilizados para a superexpressão das sequências codificadoras de enzimas envolvidas na biossíntese dos TQMs e de seus precursores. A produção do primeiro precursor, a friedelina, em sistema heterólogo constituído por *Saccharomyces cerevisiae* já é realidade (Alves *et al.*, 2018; Souza-Moreira *et al.*, 2016). Outrossim, a caracterização da CYP712K4, uma enzima identificada como oxidoredutase do tipo P450 de *M. ilicifolia*, responsável pelas etapas posteriores de oxidação da friedelina no C-29, levou à produção heteróloga do ácido maitenólico, um intermediário importante da via de biossíntese de TQMs (Bicalho *et al.*, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Biossíntese da friedelina e do ácido maitenólico, respectivamente precursor e intermediário na via biossintética dos TQMs.

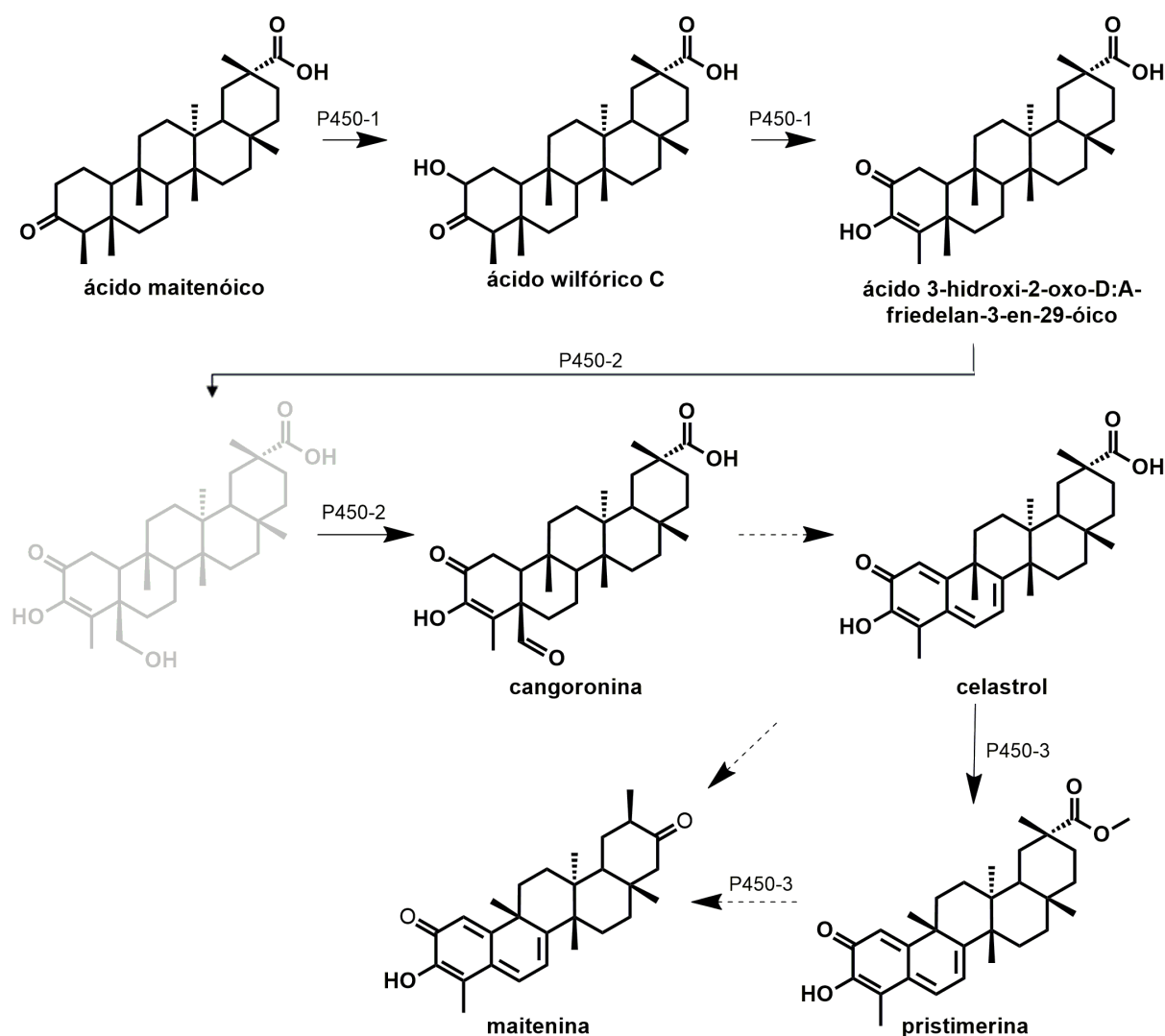


Fonte: Adaptado de Alves *et al.*, 2018; Bicalho *et al.*, 2019; Mazzeu *et al.*, 2021.

A via biossintética dos TQMs em plantas tem como precursor base a friedelina e as etapas de oxidação em várias posições são catalisadas por enzimas oxidoredutase do tipo citocromo P450 (Bicalho *et al.*, 2019). As enzimas citocromo

P450 já descritas apresentam importantes funções na biossíntese de TQMs como oxidações em diferentes posições do esqueleto triterpênico e propostas biossintéticas com oxidações no anel A dos triterpenos sugerem a origem do sistema quinonametídeo (Bicalho *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2021; Hansen *et al.*, 2020; Miettinen *et al.*, 2018; Thimmappa *et al.*, 2014; Seki; Tamura; Muranaka, 2015; Moses *et al.*, 2013) (Figura 4).

Figura 4. Proposta de biossíntese dos TQMs.



Proposta de biossíntese para os TQMs pela atividade combinada dos citocromos P450s. O metabólito secundário em cinza, ainda não foi identificado em plantas que produzem os TQMs. A seta tracejada indica várias etapas enzimáticas.

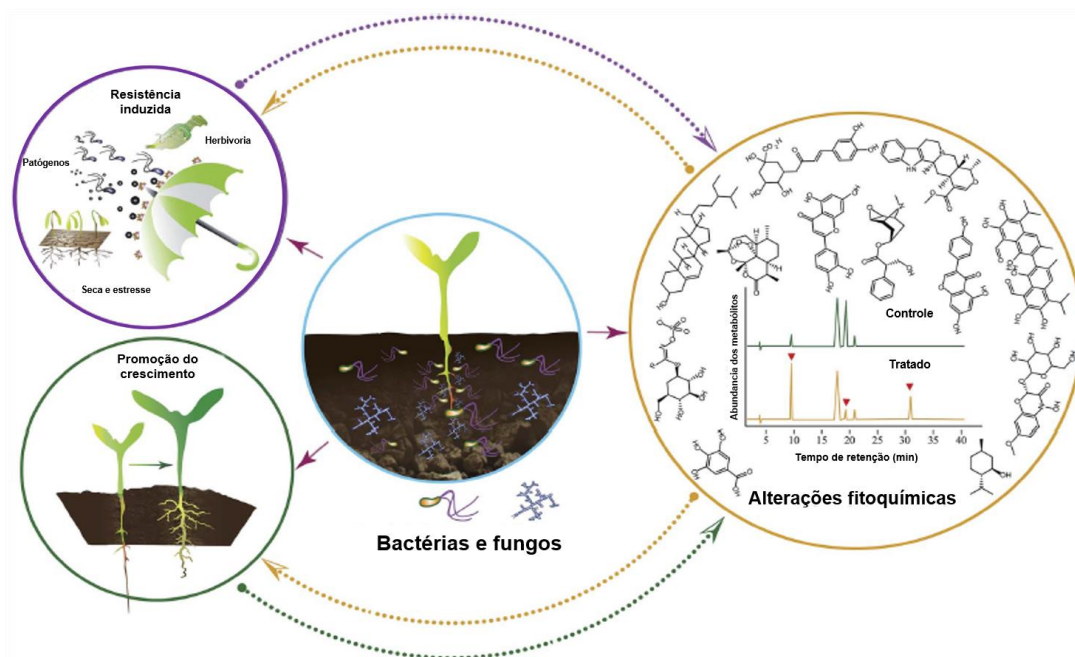
Fonte: Adaptado de Jeller *et al.*, 2004 e Bicalho *et al.*, 2019.

A compartimentalização dos TQMs nas raízes pode estar relacionada também a uma compartimentalização da expressão dos genes das proteínas envolvidas na síntese desses compostos visto que potencialmente geram uma resposta ao estresse metabólico, aumentando a tolerância da planta aos estresses bióticos e abióticos (Etalo; Jeon; Raaijmakers, 2018; Santos *et al.*, 2021; Abdul Haseeb *et al.*, 2022). Assim, a biossíntese dos TQMs pode desempenhar importante função biológica na proteção da *M. ilicifolia* contra patógenos presentes no solo.

1.3 - Interações interespecíficas na produção de metabólitos secundários

A expansão dos estudos em Química de Produtos Naturais ao longo dos anos tem demonstrado diferentes funções ecológicas dos metabólitos secundários de plantas que podem estar envolvidos na proteção e na atração de polinizadores. Os microrganismos que habitam os tecidos da planta podem induzir vias biossintéticas de tal forma a alterar o metaboloma da espécie vegetal ou induzir a bioprodução de metabólitos ainda desconhecidos (Figura 5). O entendimento da função biológica pode se dar pela caracterização genética e de enzimas envolvidas de forma a introduzir novas perspectivas sobre os mecanismos com que essas substâncias atuam na natureza (Etalo; Jeon; Raaijmakers, 2018).

Figura 5. Alteração das vias biossintéticas de espécies vegetais relacionada às interações ecológicas.



Fonte: Etalo; Jeon; Raaijmakers, 2018.

A rizosfera, ecossistema que compreende as raízes, solo e diversos microrganismos, é rica em substâncias que servem como fonte de carbono para o crescimento microbiano. Por outro lado, o microbioma da rizosfera colabora na defesa contra os patógenos de raiz, aquisição de nutrientes, promoção do crescimento, indução de resistência sistêmica contra patógenos e insetos herbívoros que se nutrem de material vegetal nas partes aéreas. Outrossim, pode aumentar a tolerância da planta ao estresse abiótico, como salinidade, seca e congelamento (Valette *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2022).

A interação ecológica entre vegetais e microrganismos da rizosfera é responsável por induzir a produção de metabólitos secundários, biossintetizados nas raízes, que exibem uma diversidade de atividades biológicas como resposta ao estresse biótico e abiótico e podem impulsionar a produção de substâncias de interesse agrícola e/ou farmacêutica. No entanto, ainda pouco se sabe como os microrganismos alteram a química das plantas. Contudo, há relatos na literatura sobre a importância da colonização de microrganismos na qual a colonização radicular é um passo fundamental para as associações benéficas e infecções por patógenos do solo. Tais interações envolvem a atração dos microrganismos por plantas e ativação da resistência induzida por plantas com evasão microbiana. Pesquisas mais recentes visam compreender a alteração no metabolismo dos organismos envolvidos nas interações simbióticas ou patogênicas a partir dos genes responsáveis pela transcrição de proteínas e enzimas vinculadas ao metabolismo primário e secundário de plantas (Chagas *et al.*, 2018; Abdul Haseeb *et al.*, 2022; Dhara; Raichaudhuri, 2021; Han *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2022; Etalo; Jeon; Raaijmakers, 2018).

Nas raízes de *Maytenus ilicifolia* há abundante presença de metabólitos, incluindo os terpenos quinonametídeos (Santos *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2021), alcaloides sesquiterpenicos piridínicos (Corsino *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021) e flavonoides (Santos, *et al.*, 2021). As enzimas responsáveis pela biossíntese de triterpenos, 2,3-oxidoesqualeno sintase e ciclização da friedelina (precursor dos triterpenos quinonametídeos), friedelina sintase, foram identificadas em análise histoquímica realizada por Santos, V.A.F.F.M e colaboradores (2021). Neste

trabalho, os triterpenos quinonametídeos foram encontrados nas camadas externas da periderme, região vegetal constituída por suberina associada a ceras, cutina e lignina que formam barreira protetora contra microrganismos patogênicos que habitam o solo (Santos *et al.*, 2021). Tais resultados, associados à atividade antimicrobiana que estas substâncias possuem, corroboram sua importante função biológica na proteção da espécie vegetal em resposta a estresses bióticos e abióticos.

1.4 - *Xanthomonas albilineans*

A escaldadura das folhas é uma doença vascular e letal que afeta folhas, caules e raízes da cana de açúcar. Dentre os sintomas apresentados por plantas infectadas, estão o aparecimento de estrias brancas e ressecamento das folhas (Figura 6). Essa doença vascular e letal é causada por bactérias *Xanthomonas albilineans* (Lin *et al.*, 2018). A contaminação das plantações ocorre por estacas e ferramentas de colheita infectadas (Mensi *et al.*, 2016), incidindo de forma astuciosa, pois as plantas infectadas podem apresentar os sintomas depois de estarem doentes por anos (Rott *et al.*, 2017). Estudos relatados na literatura demonstraram uma elevada variedade genética deste patógeno no mundo todo dentre as quais foram identificadas, no mínimo, três cepas sorológicas e diversas variantes virulentas associadas ao surto de escaldadura nas folhas. Destas linhagens foi isolada uma fitotoxina, a albicidina, responsável por inibir a diferenciação do cloroplasto interrompendo a fotossíntese (Rott *et al.*, 2017).

Figura 6. Folha de cana de açúcar infectada com *X. albilineans*.



Fonte: Rott, L. *et al.*, 2017.

Diante da tardia observação dos sintomas que contribui significativamente para o alastramento da escaldadura das folhas nas plantações de cana de açúcar, a rápida identificação do patógeno é essencial para impedir a disseminação da doença. Para tanto, vários estudos de detecção de *X. albilineans* utilizando técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidos (Lin *et al.*, 2018), sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) uma técnica que pode ser utilizada para detectar microrganismos invasores em estágios iniciais da infecção, a partir de um molde original de DNA ou RNA.

Outrossim, as funções celulares e teciduais são mediadas pela expressão gênica na qual o RNA é traduzido em uma proteína. O RNA possui a importante função de carregar a informação contida no DNA para o processo de transcrição e posterior tradução de proteínas específicas da célula tornando possível investigar a produção dos metabólitos secundários de interesse na espécie vegetal em estudo. Assim, o RNA isolado e purificado de fontes biológicas serve como molde para a síntese de cDNA e fornece perfis quantitativos e qualitativos de um polipeptídeo funcional utilizando a amplificação desse fragmento alvo pela PCR (Farrell, 2017).

5 - CONCLUSÃO

As análises de quantificação da pristimerina (1), maitenina (2) e friedelina (3) das plântulas de *Maytenus ilicifolia* indicaram que existe uma possível resposta metabólica induzida pelos estresses causados com as extrações e infecções com *Xanthomonas albilineans*. As plântulas utilizadas como controle também tiveram as concentrações desses metabólitos alteradas após a falsa infecção indicando a biossíntese destas substâncias como resposta do estresse gerado com as coletas de folhas e raízes para as extrações dos metabólitos, DNA e RNA realizadas durante este estudo. Contudo, as plântulas de trabalho mostraram concentração de (1) e de (2) significativamente elevada indicando o metabolismo ativo em defesa contra o patógeno visto que são potentes agentes antibactericidas. Além disso, a concentração de (3) é menor após o ensaio com meio de cultura para as plântulas de controle e de infecção com *X. albilineans* para as plântulas de trabalho indicando que esse metabólito, precursor dos TQMs, está sendo consumido para a produção dos metabólitos antimicrobianos, (1) e (2) e pode indicar resposta de defesa das plântulas contra o patógeno. Na plântula **Mi5** esses resultados são ainda mais expressivos nos quais o aumento de (1) e (2) chegam a 43 e 45 vezes maior, respectivamente. Enquanto isso, (3) passa a ter concentração 5 vezes menor mostrando o metabolismo dessa plântula ainda mais ativo na produção de (1) e (2). Estes resultados demonstraram a biossíntese compartimentalizada de (1), (2) e (3) nas raízes e folhas das plântulas de *M. ilicifolia* que, associada a potente atividade antibacteriana, estão diretamente relacionadas com o aumento das concentrações de (1) e (2) nas raízes e diminuição na concentração de (3) nas folhas de *M. ilicifolia*.

A confirmação da infecção obtida por PCR e a análise de expressão gênica corroboraram com a especificidade tecidual de (1), (2) e (3) nas raízes e folhas de *M. ilicifolia*. O nível de expressão do gene codificador CYP712K4 variou significativamente na raiz quando comparado antes e após a infecção com *X. albilineans*, enquanto o nível de expressão da MiFRS não variou significativamente. Além disso, o nível de expressão da CYP712K4 e da MiFRS não variou significativamente nas folhas demonstrando que a via biossintética está respondendo geneticamente à bactéria na raiz das plântulas. Contudo, o aumento da expressão do gene codificador CYP712K4 pode ser melhor avaliado com número

maior de indivíduos e coleta do material vegetal no mesmo período de tempo. Ademais, a resposta do mecanismo de defesa da planta à infecção e o aumento da produção de TQMs pode estar relacionado ao aumento da expressão de outra enzima da via metabólica das plântulas de *M. ilicifolia*, especialmente envolvidas nas etapas de oxidação dos anéis A e B do esqueleto carbônico dos TQMs. Portanto, novos estudos da via biossintética podem determinar outras enzimas codificadoras de genes envolvidos na biossíntese de TQMs.

REFERÊNCIAS

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

AMANI, J. et al. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69–71, 2011.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. v. 2017, p. 21, 2017.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. Vol. 1 ed. New York: John Wiley and Sons, Inc, 2004.

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, 2018.

CARVALHO, P. R. F. et al. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 367–372, 2005.

CEVATEMRE, B. et al. A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells *in vitro* and xenografts *in vivo* through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 129, p. 500–514, 1 mar. 2018.

CHAGAS, F. O. et al. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 5, p. 1652–1704, 2018.

COPPEDE, J. S. et al. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer

sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots *in natura*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 33–43, 2014.

CORSINO, J. et al. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137–140, 1998.

CORSINO, J. et al. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741–748, 2000.

DAUGROIS J.H., B.-N. The revisited infection cycle of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 6, n. 2, 2012.

DAVIS, M. J. et al. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease, **Plant Disease**, v. 78, n. 1, p. 78–82, 1994.

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

ETALO, D. W.; JEON, J. S.; RAAIJMAKERS, J. M. Modulation of plant chemistry by beneficial root microbiota. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 5, p. 398–409, 2018.

FARRELL, R. E. J. **RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization**. 5th. ed. Pensilvânia: Elsevier Inc., 2017.

GARCES, F. F.; GUTIERREZ, A.; HOY, J. W. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 121–126, 2014.

GUNATILAKA, A. A. L.; FERNANDO, H. C.; KIKUCHI, T. Triterpenoid Quinonemethides and Related Compounds (Celastroids). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 67, p. 1–123, 1996.

HANSEN, N. L. et al. Integrating pathway elucidation with yeast engineering to produce polypunonic acid the precursor of the anti-obesity agent celastrol. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–17, 2020.

HERNANDES, C. et al. Anticancer activities of the quinone-methide triterpenes maytenin and 22- β -hydroxymaytenin obtained from cultivated *Maytenus ilicifolia* roots associated with down-regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 760, 2020.

HUANG, Y. Y. et al. A review on phytochemicals of the genus Maytenus and their bioactive studies. **Molecules**, v. 26, n. 15, 2021.

JELLER, A. H. et al. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1977–1982, 2004.

KIM, H. J.; PARK, G. M.; KIM, J. K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p. 495–500, 2013.

KLAÍĆ, L.; MORIMOTO, R. I.; SILVERMAN, R. B. Celastrol analogues as inducers of the heat shock response. Design and synthesis of affinity probes for the identification of protein targets. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 5, p. 928–937, 2012.

LIN, L. H. et al. Molecular detection and prevalence of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, in China. **Crop Protection**, v. 109, n. January, p. 17–23, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MANNOWETZ, N.; MILLER, M. R.; LISHKO, P. V. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 22, p. 5743–5748, 2017.

MAZZEU, B. F. et al. The methionine 549 and leucine 552 residues of friedelin synthase from maytenus ilicifolia are important for substrate binding specificity. **Molecules**, v. 26, n. 22, 2021.

MENSI, I. et al. Breaking dogmas: The plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome, **Open Biology**, v. 4, n. 130116, p. 1–12, 2014.

MENSI, I. et al. Surface polysaccharides and quorum sensing are involved in the attachment and survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 2, p. 236–246, 2016.

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.

MORALES, S. A. T. et al. CONSTITUENTS FROM ROOTS OF *Maytenus distichophylla*, ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND TOXICITY FOR CELLS AND *Caenorhabditis elegans*. **Química Nova**, v. 43, n. 8, p. 1066–1073, 16 out. 2020.

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.

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, 1 jun. 2011.

PADILLA-MONTAÑO, N.; GUERRA, L. DE L.; MOUJIR, L. Antimicrobial activity and mode of action of celastrol, a nortriterpen quinone isolated from natural sources. **Foods**, v. 10, n. 3, 2021.

PARK, J. H.; KIM, J. K. Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, attenuates tumorigenesis in experimental colitis-associated colon cancer.

Phytomedicine, v. 42, n. March, p. 164–171, 2018.

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

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

ROTT, P. et al. Unravelling pathogenicity of Xanthomonas albilineans, the causal agent of sugarcane leaf scald. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, v. 27, p. 1–11, 2010.

ROTT, P. et al. Sugarcane leaf scald. **Florida sugarcane handbook**, p. 1–4, 2017.

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

SANTOS, V. A. D. 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, V. A. F. F. M. et al. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from Maytenus ilicifolia. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 991–995, 2012.

SANTOS, V. A. F. F. M. et al. Mapping Biochemical Pathways in Maytenus ilicifolia (Celastraceae) through Integrated Proteomics and Histochemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 32, n. 2, p. 237–248, 2021.

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.

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, 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. 1–9, 2018.

THIMMAPPA, R. et al. Triterpene Biosynthesis in Plants. 2014.

URASHIMA, A. S.; ZAVAGLIA, A. C. **Comparação de dois métodos diagnósticos de escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*) da cana-de-açúcar** *Summa Phytopathologica* scielo , , 2012.

VALETTE, M. et al. A common metabolomic signature is observed upon inoculation of rice roots with various rhizobacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 62, n. 2, p. 228–246, 2020.

VELOSO, C. C. et al. Pharmacological potential of maytenus species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 4, p. 533–540, 2017.

WANG, H. BO et al. Establishment of a qualitative PCR assay for the detection of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in sugarcane. **Crop Protection**, v. 130, n. May 2019, 2020.

WEI, J. et al. Integration of transcriptome and proteome analysis reveals the mechanism of freezing tolerance in winter rapeseed. **Plant Growth Regulation**, v. 96, n. 1, p. 103–118, 2022.

YANG, C. C. et al. Pristimerin inhibits MMP-9 expression and cell migration through attenuating NOX/ROS-dependent NF- κ B activation in rat brain astrocytes challenged with LPS. **Journal of Inflammation Research**, v. 13, p. 325–341, 2020.

ZHAO, Q. et al. Pristimerin protects against inflammation and metabolic disorder in mice through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 42, n. 6, p. 975–986, 2021a.

ZHAO, Q. et al. Effect of pristimerin on apoptosis through activation of ROS/endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated noxa in colorectal cancer. **Phytomedicine**, v. 80, n. October 2020, p. 153399, 2021b.

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