

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

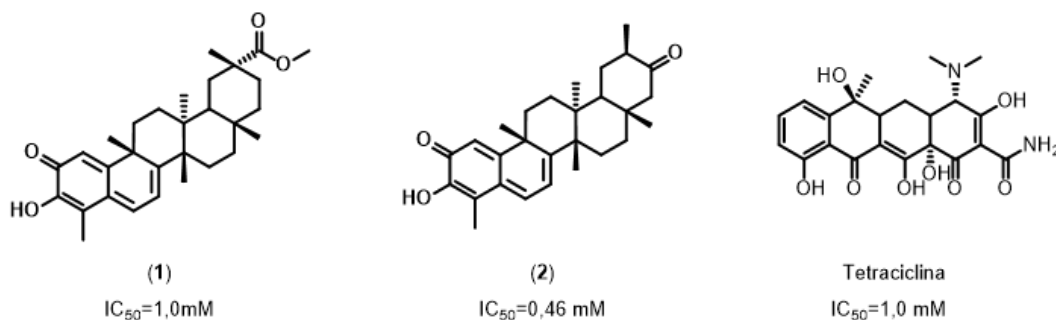
1 - INTRODUÇÃO	24
1.1 - Triterpenos quinonametídeos	25
1.2 - Biossíntese dos triterpenos friedelânicos e quinonametídeos	25
1.3 - Interações interespecíficas na produção de metabólitos secundários	28
1.4 - <i>Xanthomonas albilineans</i>	30
2 - OBJETIVOS	32
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 - Material biológico	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).

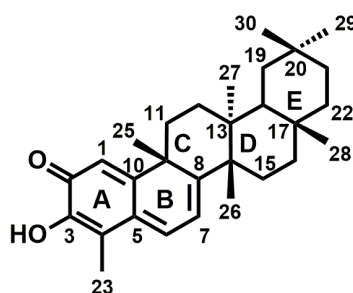
Figura 1. Estrutura química da pristimerina (**1**), maitenina (**2**) e do padrão positivo tetraciclina com os respectivos IC_{50} contra *Xanthomonas albilineans*.



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 -CO₂H ou a -CO₂Me 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.



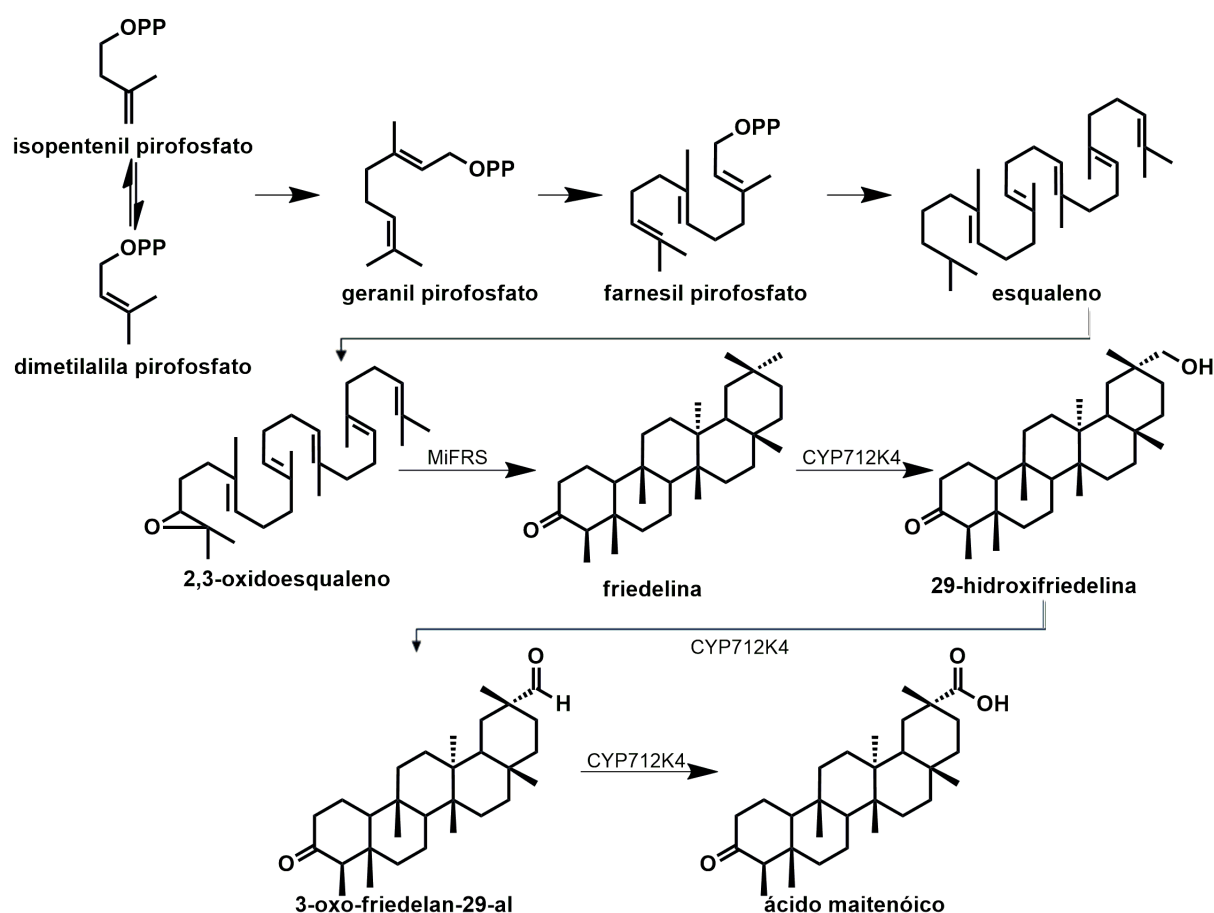
Fonte: Santos; Furlan; Amorim, 2016, p. 112.

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.

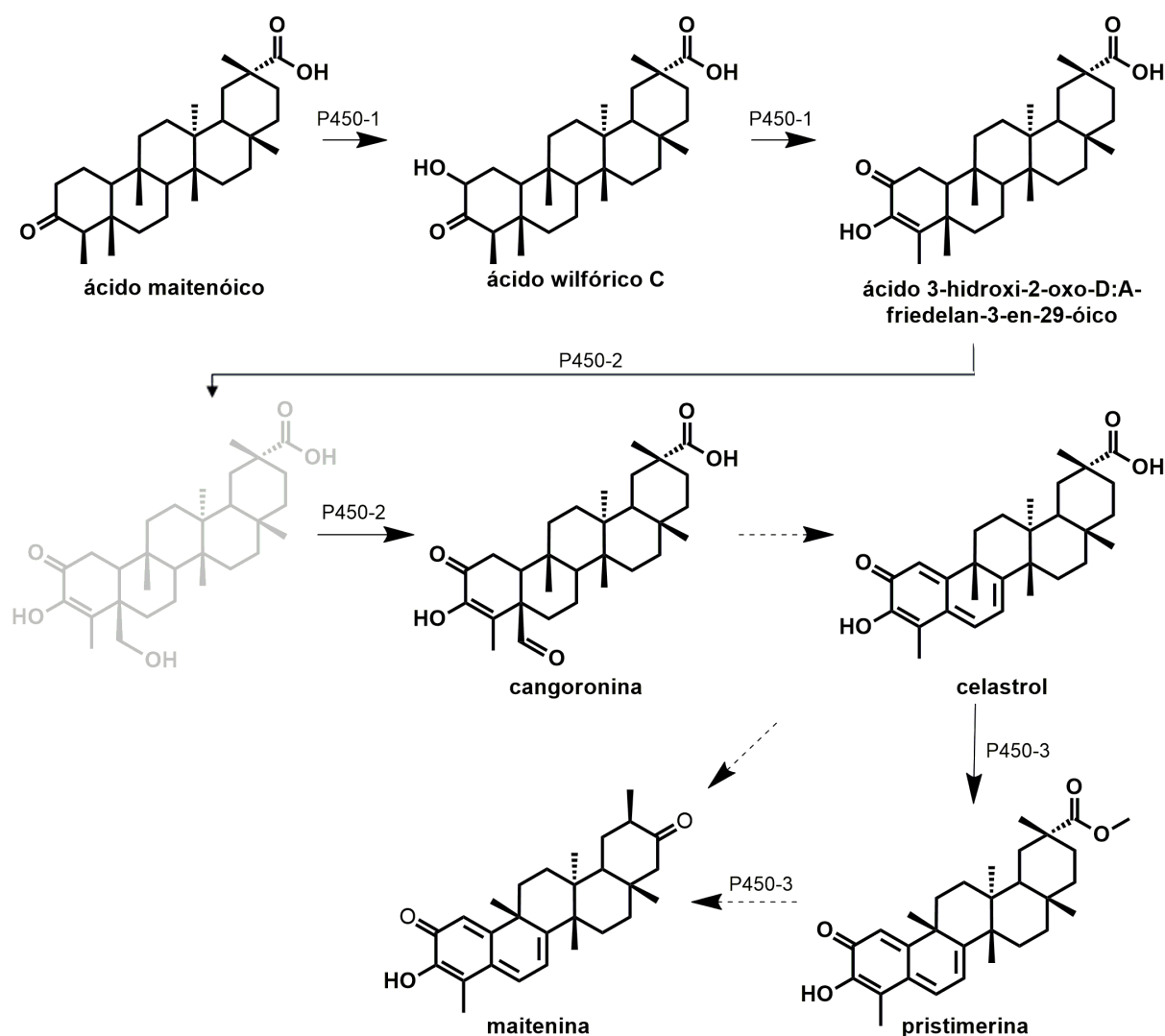


Fonte: Adaptado de Alves *et al.*, 2018; Bicalho *et al.*, 2019; Mazzeu *et al.*, 2021.

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.

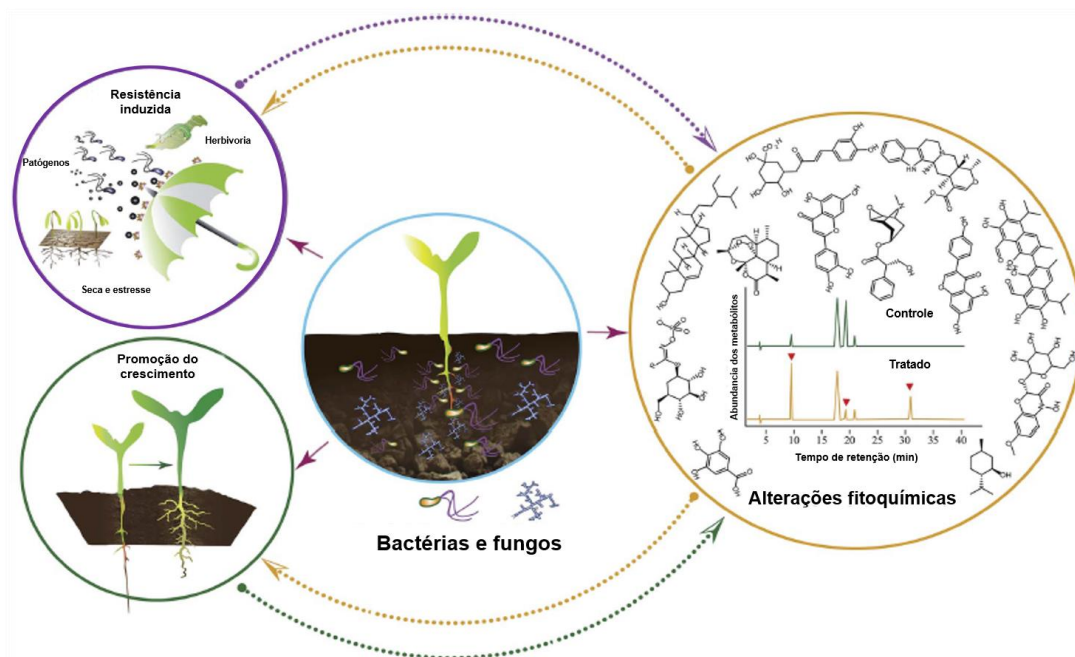
Fonte: Adaptado de Jeller *et al.*, 2004 e Bicalho *et al.*, 2019.

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).

2 - OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo avaliar se a biossíntese dos triterpenos quinonametídeos (TQMs) pode ser induzida e/ou otimizada pela interação entre a espécie *Maytenus ilicifolia* e a bactéria *Xanthomonas albilineans*. Os objetivos específicos foram:

- ✓ Isolar e purificar os padrões pristimerina e maitenina para análises quantitativas dos extratos de raízes de *M. ilicifolia*.
- ✓ Avaliar a presença dos triterpenos quinonametídeos em plântulas de *M. ilicifolia* por meio de técnicas cromatográficas qualitativas e quantitativas para a detecção e determinação da concentração dos triterpenos quinonametídeos antes e após infecção com a bactéria *X. albilineans*.
- ✓ Avaliar o nível de expressão gênica das sequências codificadoras de enzimas conhecidas da via dos TQMs a partir do mRNA de amostras das plântulas não infectadas e infectadas a fim de correlacionar modificações da expressão com alterações na produção desses compostos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Material biológico

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizada a espécie de bactéria gram-negativa *Xanthomonas albilineans* Xa11, gentilmente cedida pelo laboratório do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Rafael Guido. As células foram mantidas congeladas em glicerol 20% a -70°C. Após descongelamento, foram repicadas em meio XAS (-do inglês, *Xanthomonas albilineans selective media* (sacarose 1%, peptona 0,5%, fosfato de potássio dibásico 0,05%, sulfato de magnésio 0,025% e sulfito de sódio 0,005%) (Garces; Gutierrez; Hoy, 2014; Davis *et al.*, 1994) sólido e foram mantidas a 28 °C por 2-5 dias. Inóculos líquidos foram realizados no mesmo meio de cultura e incubados da mesma forma, sob agitação constante.

As espécies da planta jovem (5-7 anos) de *Maytenus ilicifolia* foram cultivadas na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Departamento de Biotecnologia em 01 de dezembro de 2017. Amostras das plântulas utilizadas nos testes de infecção foram coletadas em 18 de dezembro de 2019. A exsicata encontra-se sob a manutenção e preservação da Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira, a qual é membro do comitê Técnico Temático de Apoio à Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira.

3.2 - Obtenção e identificação dos padrões de pristimerina (1) e maitenina (2) isolados e purificados das cascas das raízes de *Maytenus ilicifolia*

Os padrões de pristimerina (1) e maitenina (2) (Figura 1, p. 24) foram obtidos seguindo a metodologia previamente desenvolvida (Dos Santos *et al.*, 2013). Sendo assim, 431,18 g de cascas das raízes de *M. ilicifolia* foram submetidas à trituração em moinho de facas e extração em diclorometano P. A. (DCM) como solvente extrator que foi, posteriormente, recuperado por rotaevaporação resultando em 5,845 g do extrato bruto. Após secagem em capela com fluxo de ar contínuo, o extrato foi ressuspendido em acetato de etila P. A. (AcOEt) e submetido a análise por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) para o isolamento dos padrões. A placa de sílica foi submetida a 3 eluições no sistema de solvente hexano

P. A. (Hex) e AcOEt P. A. (7:3) obtendo-se 5 frações das quais as frações majoritárias correspondentes a maitenina (3,95 g) e pristimerina (1,84 g) foram recortadas extraindo-as da sílica com metanol P. A. (MeOH) e AcOEt P. A. (9:1). Após a extração, as frações foram filtradas a vácuo e secas em capela com fluxo de ar contínuo.

Essas frações contendo **(1)** e **(2)** foram purificadas por cromatografia em coluna (CC) utilizando uma coluna de 18 cm x 1,5 cm de diâmetro para a fração **1** (F1) e de 20 cm x 1,5 cm de diâmetro para a fração **2** (F2), empregando sílica como adsorvente e fase móvel com Hex P. A. e AcOEt P. A. em gradiente de polaridade decrescente. A F2 deu origem à 11 subfrações, sendo que as subfrações **4** e **5** também foram submetidas à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) em escala preparativa utilizando um cromatógrafo Shimadzu constituído por sistema binário de bombas LC – 6 AD, detector PDA SPD – M20 A, coluna Phenomenex® C18 10 µm (250 mm x 21,2 mm) e $\lambda = 254$ nm/420 nm e sistema de solventes MeOH:H₂O (7:3) em fluxo de 8 mL x min⁻¹. A separação da F1 por CC deu origem a 10 subfrações, sendo que as subfrações **4** e **5** (545,1 mg) foram identificadas como maitenina (**2**). A purificação da F2 por CLAE-DAD em escala preparativa levou ao isolamento de 409,6 mg da pristimerina (**1**).

Os padrões **(1)** e **(2)**, obtidos das cascas das raízes de *M. ilicifolia* foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (CLAE-DAD-ESI) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio um (RMN de ¹H) e de carbono treze (RMN de ¹³C). A identificação por CLAE-DAD-ESI foi realizada em sistema LC Shimadzu®, com bomba LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20AHT, módulo de comunicação CBM-20A hifenado a um espectrômetro de massas Amazon SL Bruker® que possui fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador Ion Trap (CLAE-DAD-ESI). Os cromatogramas e espectros de massas foram registrados e reprocessados utilizando software DataAnalysis versão 4.1. A identificação de **(1)** e de **(2)** por RMN de ¹H e de ¹³C foi realizada pela comparação dos espectros experimentais com espectros relatados na literatura (Dos Santos *et al.*, 2013) e os dados foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 600 (14,1 T)

operando a 600 MHz com crioprobe na frequência do ^1H e 150 MHz na frequência do ^{13}C . As amostras foram analisadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3).

3.3 - Padronização do sistema de solvente extrator

A fim de substituir a extração com diclorometano por um sistema de solvente não clorado, fez-se quatro extrações em diferentes sistemas de solvente utilizando hexano e acetato de etila (8:2, 7:3 e 6:4), incluindo a extração com diclorometano para comparação utilizando 21,0 g de cascas de raízes de *Maytenus ilicifolia*, os quais foram submetidos a *clean up* em cartucho C18 Chromabond® C18ec e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) em escala analítica com cromatógrafo Shimadzu®, com sistema de bombas binário LC-20 AT, detector PDA SPD-M20 A, auto-injetor SIL-20 A, um controlador CBM-20 A e coluna Phenomenex® C18 5 μm (150 mm x 4,6 mm). A fase móvel isocrática empregada foi $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:20) em fluxo de $1,0 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$ e volume de injeção de 20 μL totalizando 40 minutos de análise. Os cromatogramas foram registrados e reprocessados utilizando software LCsolution, os quais tiveram a área dos picos referentes a pristimerina (**1**) e maitenina (**2**) avaliados nos comprimentos de onda de 420 nm a fim de determinar o teor dessas substâncias em cada extração.

3.4 - Infecção das plântulas de *Maytenus ilicifolia* com *Xanthomonas albilineans*

A infecção de plântulas de *M. ilicifolia* foi realizada em colaboração com o Dra. Mariana Ortiz de Godoy e o Prof. Dr. Rafael Guido no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos.

Uma colônia única foi cultivada em meio líquido XAS. O caldo foi suplementado com os antimicrobianos: cicloexamida (1 mg/mL), cefalexina (0,25 mg/mL), novobiocina (0,30 mg/mL) e kasugamicina (0,5 mg/mL), após esterilização em autoclave. Após incubação por 5 dias a 28 °C, o cultivo foi semeado em placas de Petri contendo meio XAS ágar 1,5% para confirmar o isolamento da bactéria. As amostras de trabalho foram produzidas repetindo esse procedimento. Dessa forma, o cultivo celular foi mantido a 28 °C até que atingisse densidade óptica a 600 nm

(OD600) do meio entre 0,8 e 1,0 por aproximadamente quatro dias com saturação do meio alcançada em 7 dias. Foram diluídas alíquotas em 1:100 para realizar a injeção nas plantas. É estimado uma concentração da unidade formadora de colônias (em inglês, *colony-forming unit* - CFU) em torno de 10^6 bactérias/mL.

Os testes de infecção de *Maytenus ilicifolia* por *Xanthomonas albilineans* foram realizados seguindo três procedimentos: 1 **(I1)**. a partir do corte das folhas com lâmina umedecida no inóculo. Segundo estudos (Rott *et al.*, 2010; Daugrois J.H., 2012; Mensi *et al.*, 2014), a escaldadura das folhas, causada pela *X. albilineans*, é uma doença vascular que inicialmente percorre o xilema das plantações de cana de açúcar, portanto, em 2 **(I2)**. pela injeção de 100 µL do cultivo celular, após excisão do caule realizado com lâmina estéril e 3 **(I3)**. pipetou-se 100 µL da suspensão bacteriana na superfície de um corte feito acima do meristema apical com uma lâmina previamente mergulhada na suspensão do inóculo (Garces; Gutierrez; Hoy, 2014). O estilete foi esterilizado em água sanitária 40% entre as inoculações. A cada sete dias de infecção, aproximadamente 15 mg das raízes foram coletadas para análise cromatográfica em CLAE-DAD para identificação e avaliação do teor de **(1)** e de **(2)** nos extratos obtidos a partir das cascas das raízes utilizando Hex:AcOEt (8:2) como solvente extrator. Esses extratos foram ressuspensos em 3,0 mg/mL. Todos os extratos foram analisados na mesma condição do Tópico “3.5 - Quantificação de pristimerina **(1)** e maitenina **(2)** nas raízes de plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*”, p. 37. Após a avaliação desses testes, sete plântulas de trabalho (**Mi1**, **Mi2**, **Mi3**, **Mi4**, **Mi5**, **Mi6** e **Mi7**) e três plântulas de controle (**C1**, **C2** e **C3**) foram selecionadas para as análises química e biológica antes e após infecção com *X. albilineans*. As plântulas de trabalho foram inoculadas com a bactéria enquanto as plântulas de controle tiveram o mesmo tratamento, porém foram inoculadas com o meio de cultura líquido XAS sem bactéria. Contudo, a plântula 3 (**Mi3**) não resistiu a infecção com *X. albilineans* e as plântulas 6 (**Mi6**) e 7 (**Mi7**) não resistiram os estresses causados pelas extrações antes da infecção com *X. albilineans*. Dessa forma, não foi possível continuar os ensaios de quantificação, detecção da infecção e análise da expressão gênica com esses indivíduos. As plântulas de trabalho (**Mi1**, **Mi2**, **Mi4** e **Mi5**) e as plântulas de controle (**C1**, **C2** e **C3**) tiveram folhas (30 mg/5,0 mL de solvente) e

raízes (90 mg/15,0 mL de solvente) coletadas para as análises de quantificação de (1), (2) e (3), análise da expressão gênica (aproximadamente 100 mg de folhas e 50 mg de raízes) e detecção da infecção (aproximadamente 100 mg de folhas) antes e após o período de infecção e de administração do controle.

3.5 - Quantificação de pristimerina (1) e maitenina (2) nas raízes de plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*

Os extratos obtidos a partir das cascas das raízes utilizando Hex:AcOEt (8:2) como solvente extrator das plântulas foram ressuspensos em triplicata na concentração de 1,0 mg/mL para as amostras da pré infecção **C1**, **C2** e **C3**. Dessas mesmas amostras da pré infecção **Mi2**, **Mi4** e **Mi5** foram ressuspensos em 5,0 mg/mL e **Mi1** teve de ser diluída 12x (0,08 mg/mL). As amostras de pós infecção, **Mi2**, **Mi4** e **C3** foram ressuspensas em 1,0 mg/mL, **Mi1** foi diluída 6x (0,17 mg/mL), **Mi5** foi diluída 2x (0,5 mg/mL) e as amostras **C1** e **C2** diluídas 3x (0,3 mg/mL). Todas essas amostras e os padrões foram analisados por CLAE-DAD em escala analítica em um cromatógrafo Shimadzu®, com sistema de bombas binário LC-20 AT, detector PDA SPD-M20 A, auto-injetor SIL-20 A, um controlador CBM-20 A, coluna Phenomenex® C18 5 µm (150 mm x 4,6 mm) e $\lambda = 420$ nm. A fase móvel isocrática empregada foi MeOH:H₂O:ácido fórmico (83:17:0,1) em fluxo de 1,0 mL x min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL totalizando 25 minutos de análise. Os cromatogramas foram registrados e reprocessados no software LCsolution.

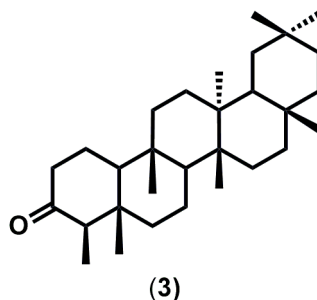
Os padrões de (1) e de (2) previamente isolados e purificados a partir das cascas das raízes de *M. ilicifolia* foram utilizados para a obtenção das soluções padrão na quantificação pelo método de padronização externa a partir da construção de curvas analíticas para as soluções de (1) e de (2). Para a construção dessas curvas de calibração, preparou-se duas soluções estoques, pela diluição de 3 mg de padrão em 3 mL de MeOH:H₂O (95:05). A partir das soluções estoques foi preparada a solução de trabalho (5 mL) contendo a mistura dos padrões na concentração de 0,5 mg/mL, a qual foi utilizada para preparar sete soluções em triplicata dentro de uma faixa de concentração de 0,05 a 4,0 mg/mL que foram injetadas em CLAE-DAD. A pristimerina (1) e a maitenina (2) foram identificadas nas

amostras a partir do tempo de retenção nas mesmas condições cromatográficas em que padrão foi analisado.

3.6 - Quantificação de friedelina (3) nas folhas de plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*

A friedelina (3) (Figura 7), precursor comum dos triterpenos quinonametídeos, foi quantificada pelo método de padronização interna a fim de avaliar a expressão do metabolismo secundário desde o precursor comum da pristimerina (1) e da maitenina (2) nas plântulas *in natura* e infectadas com *X. albilineans*.

Figura 7: Estrutura química da friedelina (3).



Fonte: Bicalho *et al.*, 2019.

Para isso, as folhas (30 mg) das plântulas de *M. ilicifolia* foram maceradas em gral e pistilo com auxílio de nitrogênio líquido utilizando Hex e AcOEt na proporção 8:2 como solvente extrator antes e após a infecção com *X. albilineans*. Os extratos obtidos foram submetidos a centrifugação em minicentrífuga MiniSpin® da Eppendorf a 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante de cada amostra foi analisado por CG-EM Shimadzu, QP2020 com coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Na metodologia empregou-se uma temperatura de 270 °C no injetor, temperatura inicial de 200 °C por 3 min, rampa de aquecimento de 200 a 290 °C (10 °C/min), temperatura da interface de 290 °C por 18 min, vazão do gás de arraste de 1,0 mL/min e temperatura da fonte de ionização de 270 °C. O volume de injeção utilizado foi de 1 µL com modo de injeção do tipo Split 1:10. A aquisição dos dados foi realizada por monitoramento seletivo de íon (SIM) de massa/carga m/z 273 totalizando 30 minutos de análise. Os cromatogramas foram registrados e

reprocessados no software GCMSsolution v. 4.41. As plântulas **Mi1**, **Mi5**, **C1** e **C2** que ainda possuíam folhas após a infecção com *X. albilineans* tiveram a concentração de **(3)** calculada. As amostras foram analisadas em triplicata com concentração de 1,0 mg/mL para as amostras da pré infecção **Mi1**, **Mi5** e **C1**. Dentre as amostras da pré infecção, **C2** foi diluída 2x (0,5 mg/mL) e as amostras da pós infecção foram ressuspensas a 1,0 mg/mL.

O padrão comercial (SIGMA-ALDRICH®) de **(3)** com grau de pureza de 97% foi utilizado para a obtenção das soluções padrão na quantificação pelo método de padronização externa com construção da curva analítica a partir da solução de trabalho em 0,5 mg/mL preparada e diluída em CHCl₃:Hex (1:1), em triplicata, na faixa de concentração de 0,005 a 0,10 mg/mL (0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10 mg/mL) que foram injetadas em CG-EM. O colesterol foi utilizado como padrão interno na concentração de 0,02 mg/mL nas soluções padrão e amostras. A friedelina **(3)** foi identificada nas amostras a partir do tempo de retenção nas mesmas condições cromatográficas em que padrão foi analisado (aproximadamente 24,1 minutos).

3.7 - Extração de DNA

Amostra de folhas de *M. ilicifolia* inoculadas com *X. albilineans* foram incubadas em meio Wilbrink modificado (MWB, 1% de sacarose, 0,5% de peptona, 0,05% de fosfato de potássio dibásico, 0,025% de sulfato de magnésio, 0,005% de sulfito de sódio, 0,5% de brometo de potássio, 0,01% de cicloheximida e 0,0002% de benomil) (Davis *et al.*, 1994). Após 48h em 30 °C, os pellets dos inóculos foram coletados, congelados, pulverizados e o DNA foi extraído (Urashima; Zavaglia, 2012). O controle de DNA genômico vegetal sem inoculação de *X. albilineans* foi extraído após congelamento em nitrogênio líquido e pulverizado com almofariz e pistilo. O controle de DNA genômico da bactéria foi extraído após inoculação em meio MWB por 48 h a 30 °C.

As culturas foram centrifugadas a 4.000 x g durante 20 minutos. A extração do DNA foi realizada de acordo com Amani *et al.* (2011) com as seguintes modificações: os materiais celulares da planta e da bactéria foram ressuspensos em

tampão de lise CTAB (2% brometo de cetil trimetil amônio, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8 e 20 mM EDTA) pré-aquecido e mantido a 65 °C por 1 h. Subsequentemente, adicionou-se 1 volume (500 µL) de solução clorofórmio e álcool isoamílico, Cl:I, (24:1) e as fases resultantes foram separadas por centrifugação (16.000 x g durante 10 min). A fase aquosa isolada foi lavada com o mesmo volume de Cl:I. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado seguido de incubação a -20 °C a *overnight*. e lavado com etanol 70% (Amani *et al.*, 2011). Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em água ultrapura e tratadas com RNase A (Invitrogen®) a 37 °C por 1 h, lavadas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (PCI, 25:24:1, v/v/v). O DNA foi precipitado por adição de etanol absoluto gelado e acetato de amônio 7,5 M à fase aquosa. Após lavagem com etanol 75%, o DNA foi seco, ressuspendido em Tris-EDTA pH 8,0 (Ausubel *et al.*, 2004), analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio com visualização sob luz ultravioleta e quantificado por espectrofotometria a 260 nm (Nanodrop 2000, Agilent Technologies®).

3.8 - Confirmação da infecção com *Xanthomonas albilineans* por PCR

A infecção bacteriana em *M. ilicifolia* foi confirmada por PCR utilizando Power SYBR Green master mix (Applied Biosystems®) para análise de tamanho do fragmento amplificado (amplicons) de 80 a 160 pares de bases (Tabela 1, p. 41) em um termociclador 7500 qPCR (Applied Biosystems®) (Wang *et al.*, 2020). Cada uma das amostras de DNA extraído das folhas de *M. ilicifolia* controles, plantas inoculadas com *X. albilineans* e das bactérias isoladas foram submetidas a reações separadas com os pares de primers para proteína 40S da planta controle (número de acesso GenBank KX147273) e da sequência do cluster de genes envolvidos na produção de albicidina, alb1 (Genbank número de acesso AJ586576.1) (Garces; Gutierrez; Hoy, 2014). Separadamente para cada sequência, foi utilizado o programa online *Primer3Plus* da *Biotoools* (https://biotoools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) para determinação dos primers forward e reverse de acordo com os seguintes parâmetros: amplicons de 80 a 160 pares de bases (pb), tamanho dos primers de 19 a 21 pb, temperatura de

melting (T_m) dos primers de 59 a 61 °C, porcentagem de citosina e guanina de 50 a 60% e probabilidade de grampo de CG de 1.

Tabela 1: Primers forward (F) e reverse (R) utilizados para detecção da infecção com *X. albilineans* e quantificação do nível de expressão dos genes das plântulas de *M. ilicifolia*.

Primers	Sequencia 5'→3'	Amplicons	Referência
Mi40S_F	ACTTTTGGGGGATGGACTTC	160 pb	Souza-Moreira et al., 2016
Mi40S_R	TCCTCTTGACCTGATTTGGG		Souza-Moreira et al., 2016
alb1_F	ACACCCTGGACAATGGCTAC	116 pb	Este estudo
alb1_R	GAAGATGGCGTTCATGTGTG		Este estudo
MiFRS_F	CCTCCAAGAGCCAAAACTG	83 pb	Souza-Moreira et al., 2016
MiFRS_R	CCATAGGGTTGAGCATCTCC		Souza-Moreira et al., 2016
MiCYP712K4_F	GTTGGAGAGGATGTGGAAGG	145 pb	Este estudo
MiCYP712K4_R	GGCTTTGACTTGTTTCTGG		Este estudo

As reações foram realizadas com 1 µL de 100 ng/µL de DNA, 10 µL de 2x SYBR Green master mix e 0,5 µM dos primers forward e reverse para cada gene separadamente e água até completar volume final de 20 µL. As condições de PCR foram estabelecidas com uma etapa inicial a 50 °C por 2 min, seguido de 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento e polimerização a 60 °C por 1 min com uma fase de dissociação no último ciclo. Duas réplicas foram testadas separadamente.

Os fragmentos alvos foram amplificados por PCR em tempo real e, após checagem da eficiência dos primers, foram utilizados para confirmação da infecção das plântulas de *M. ilicifolia* com *X. albilineans* e para análise da expressão genica das sequências codificadoras da friedelina sintase MiFRS e CYP712K4 nas folhas e raízes das plântulas de *M. ilicifolia*.

3.9 - Extração de RNA total

Aproximadamente 100 mg de folhas e raízes congeladas de cada indivíduo de *M. ilicifolia* foram separadamente trituradas em gral com auxílio de pistilo (ambos previamente tratados para remoção de RNases) com nitrogênio líquido e submetidas

à extração do RNA total utilizando “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen®) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O material vegetal foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL, onde foram adicionados 450 µL do tampão de lise à base de hidrocloreto de guanidina (RCL) contendo 1% de β-mercaptoetanol e, em seguida, o tubo foi agitado em um vórtex. O material lisado foi transferido para uma coluna de separação e centrifugado por 2 min na máxima velocidade, à temperatura ambiente. O sobrenadante do filtrado foi transferido para um tubo de centrífuga de 1,5 mL e misturado imediatamente por pipetagem com meio volume de etanol (225 µL). A mistura foi transferida para uma coluna de purificação onde o RNA foi retido na membrana por meio de centrifugação (10.000 rpm, 15 s). Em seguida, foram adicionados 700 µL do tampão RW1 na coluna e nova centrifugação foi realizada. O filtrado foi descartado e foram adicionados 500 µL do tampão RPE na coluna de purificação. Após centrifugação do tubo por mais 15 s e adição do mesmo volume da solução (500 µL do tampão RPE), foi feita outra centrifugação de 2 min. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e centrifugada por 1 minuto na velocidade máxima (13.200 rpm), para remoção de resíduos do tampão RPE. A coluna foi colocada em um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram adicionados 30 µL de água ultrapura livre de RNase e o tubo foi centrifugado por 1 min a 10.000 rpm.

Um volume de 2 µL de cada RNA extraído foi utilizado para quantificação em espectrofotômetro e avaliação da qualidade por eletroforese capilar no equipamento Bioanalyzer (modelo 2000, Agilent Technologies®) e a concentração de RNA foi determinada usando um espectrofotômetro Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific®). Posteriormente, o mRNA foi isolado do RNA total usando grânulos Oligo(dT) magnéticos.

3.10 - Síntese de DNA complementar (cDNA)

Antes da síntese de cDNA, o RNA total extraído foi tratado com DNase I (1 U/µL, Sigma-Aldrich®) a fim de eliminar traços de DNA genômico que pudessem interferir no processo de quantificação. Para tanto, foram utilizados, no mínimo, 1000 ng de RNA total, mantendo a proporção de 1 volume de DNase I para 10 volumes de solução. As reações foram preparadas com 1x do tampão (10X) e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 1 volume da

solução de parada (Stop Solution) para ligar os íons de cálcio e magnésio a fim de inativar a DNase I aquecendo a reação a 70 °C por 10 minutos.

A síntese do cDNA foi realizada com o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems®) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O volume final da reação foi de 50 µL, sendo utilizado, no mínimo, 1 µg do RNA total tratado com DNase I. Em um tubo de 200 µL foram adicionados: 5 µL de tampão RT (10X), 5 µL de primers randômicos RT (10X), 2 µL de dNTPs (100 mM), 3 µL da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), o RNA e água (H₂O Milli-Q autoclavada) para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®) com a seguinte ciclagem: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 s (Farrell, 2017).

3.11 - Análises de RT-qPCR

A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada usando iniciadores específicos do gene (Tabela 1, p. 41) desenhados conforme o item “3.8 - Confirmação da infecção com *Xanthomonas albilineans*”, p. 40 para amplificar fragmentos de aproximadamente 110-160 pb do cDNA da proteína ribossômica 40S como gene de referência interna e um par de primers para comparar o nível de expressão gênica da friedelina sintase (número de acesso GenBank KX147270) e oxidoredutase CYP712K4 (número de acesso GenBank MK829814) em folhas e raízes.

As reações de PCR foram preparadas em uma solução geral contendo 0,5 µM de iniciadores MiCYP712K4_F e MiCYP712K4_R (20 ng/µL, cada par em uma reação separada), 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific®), 1 µL de cDNA sintetizado individualmente e 7 µL de H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: “hot start” de 50° C por 2 min, seguido de 1 ciclo de 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 1 min e extensão final de 95° C por 15 s, 60° C por 1 min e 95° C por 15 s. A análise do nível relativo de expressão gênica foi calculada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Ct = limite do ciclo, que corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da

amplificação) em duas réplicas de três (antes da infecção) ou duas (após a infecção) réplicas biológicas (Livak; Schmittgen, 2001). Os indivíduos controles, expostos ao tratamento de infecção, mas sem inoculação bacteriana, também foram avaliados. A significância estatística foi calculada usando o teste t. Os valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

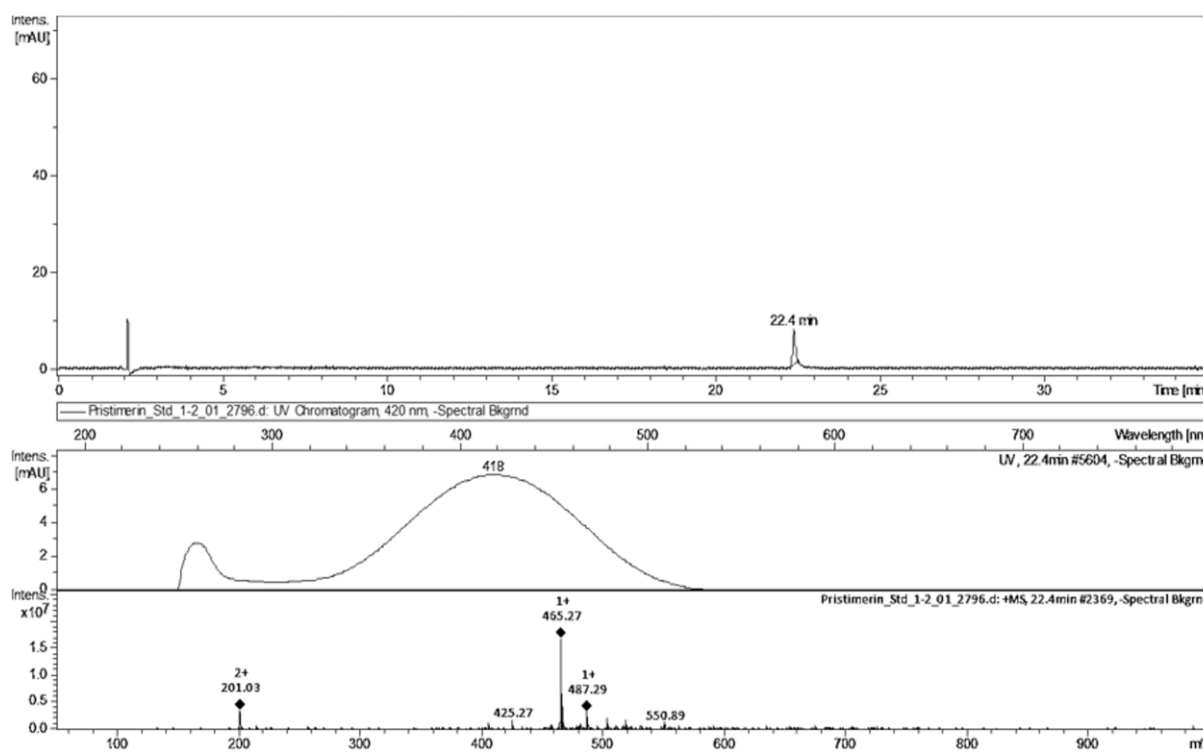
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os triterpenos quinonametídeos pristimerina (**1**) e maitenina (**2**) são constituintes majoritários dos extratos das cascas de raízes de *Maytenus ilicifolia*. Estes TQMs foram isolados e purificados para serem utilizados como padrões nas quantificações dos extratos das cascas das raízes antes e após a infecção com *Xanthomonas albilineans*, com o objetivo de avaliar o metabolismo de (**1**) e de (**2**), uma vez que são potentes agentes antibacterianos contra essa linhagem de bactéria em *M. ilicifolia*. Para isso, foi desenvolvido um método cromatográfico que possibilitou a identificação e quantificação pelo método do padrão externo utilizando mix de padrões de (**1**) e de (**2**) e análises cromatográficas com CLAE-DAD no comprimento de onda de 420 nm.

4.1 - Identificação estrutural dos padrões de pristimerina (**1**) e maitenina (**2**) isolados e purificados

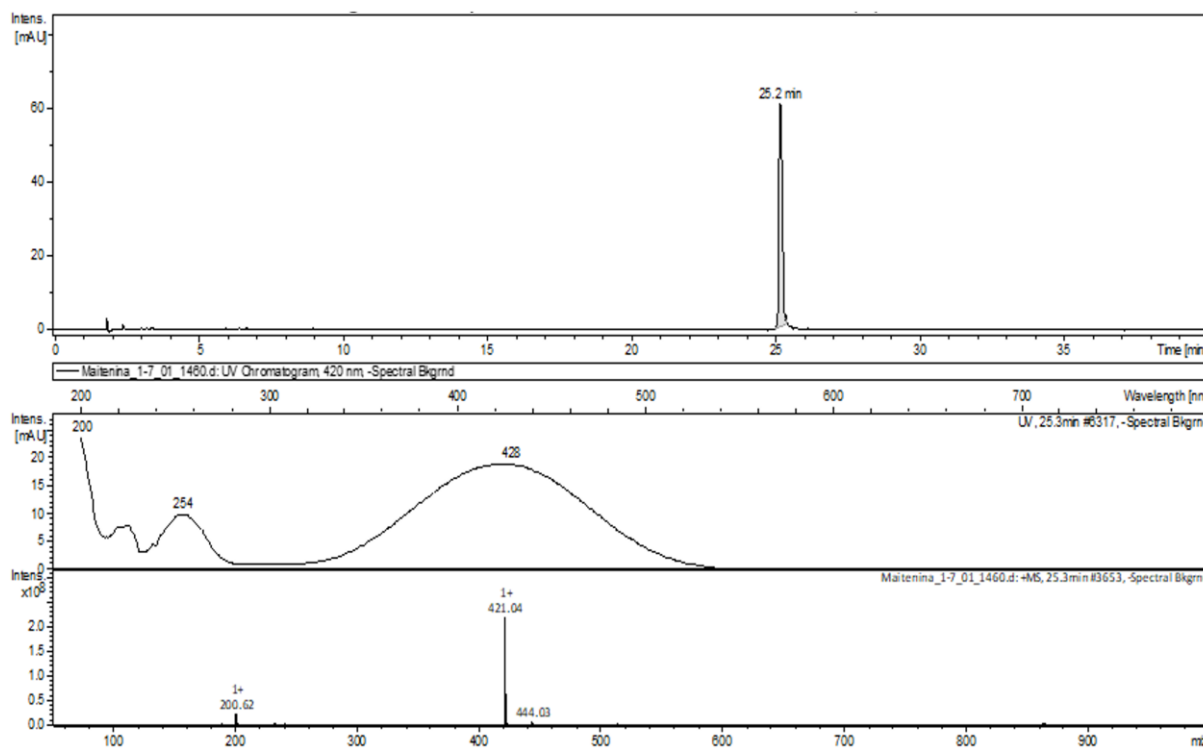
O espectro de massas de baixa resolução (Figura 8) para (**1**), apresentou sinal referente à molécula protonada em m/z 465,27 $[M+H]^+$ de fórmula molecular $C_{30}H_{40}O_4$.

Figura 8. Espectro de massas da pristimerina (**1**).



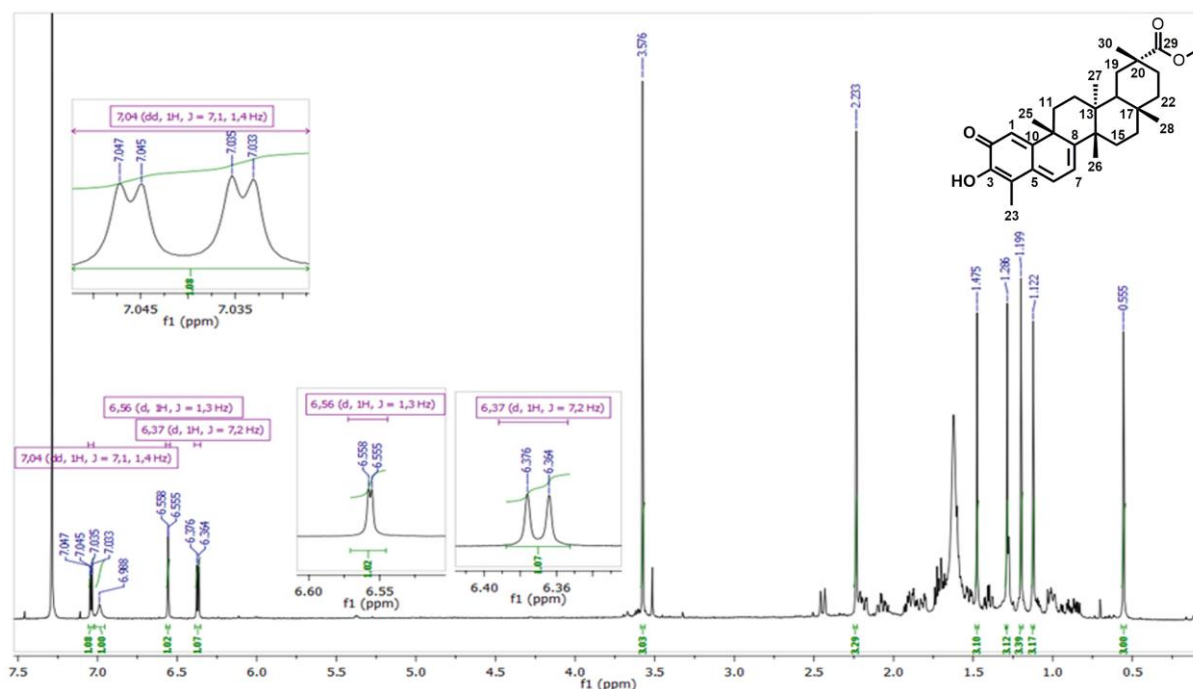
O espectro de massas de baixa resolução (Figura 9) para **(2)**, apresentou sinal referente à molécula protonada em m/z 421,04 $[M+H]^+$ de fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_3$.

Figura 9. Espectro de massas da maitenina **(2)**.



Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C de **(1)** e de **(2)** foram comparados com dados da literatura (Dos Santos *et al.*, 2013). A Figura 10, p. 47 e a Figura 11, p. 48 representam o espectro de RMN 1H e de ^{13}C para o padrão de **(1)**, respectivamente.

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H da pristimerina (**1**) e expansões (600 MHz, CDCl_3).

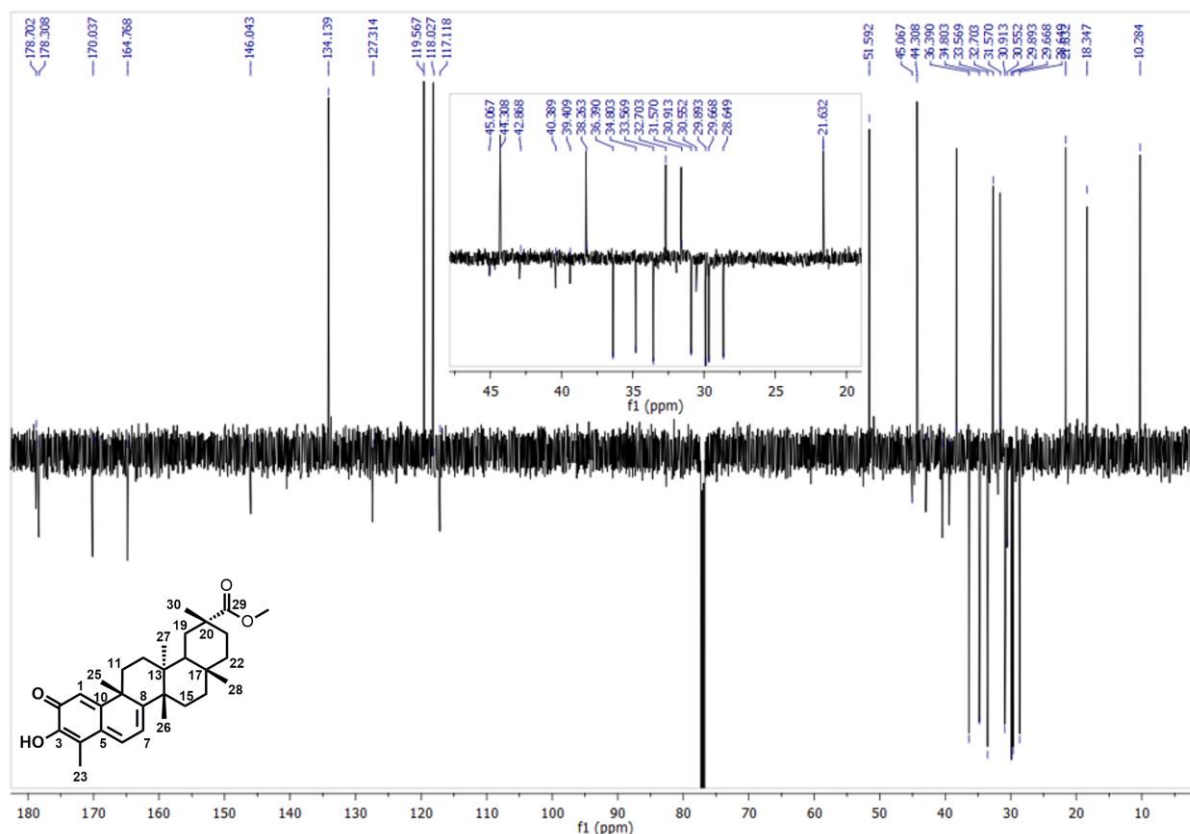


No espectro de RMN de ^1H foram observados dois dupletos em δ 6,37 (1H, $J=7,2$ Hz) e δ 6,56 (1H, $J=1,3$ Hz) além de um duplo duplete em δ 7,04 (1H, $J=7,1$ e 1,4 Hz). Estes sinais foram atribuídos aos H-7, H-1 e H-6, respectivamente, os quais são sinais típicos do sistema quinonametídeo que caracteriza esta classe de substâncias.

O sinal em δ 2,23 (3H) é característico de grupo metílico sob ligação dupla, o qual foi atribuído a H-23 e o simpleto em δ 3,58 (3H) corresponde a hidrogênios de grupo metoxílico de éster. Foi observado, também, um simpleto largo em δ 6,99 característico de H do grupo hidroxílico.

Os sinais em δ 1,48, δ 1,29, δ 1,20, δ 1,12 e δ 0,56, integrando para 3 hidrogênios cada, foram atribuídos aos H dos grupos metílicos H-25, H-26, H-30, H-28 e H-27, respectivamente.

Figura 11. Espectro DEPT-135 de RMN de ^{13}C da pristimerina (**1**) e expansão (150 MHz, CDCl_3).



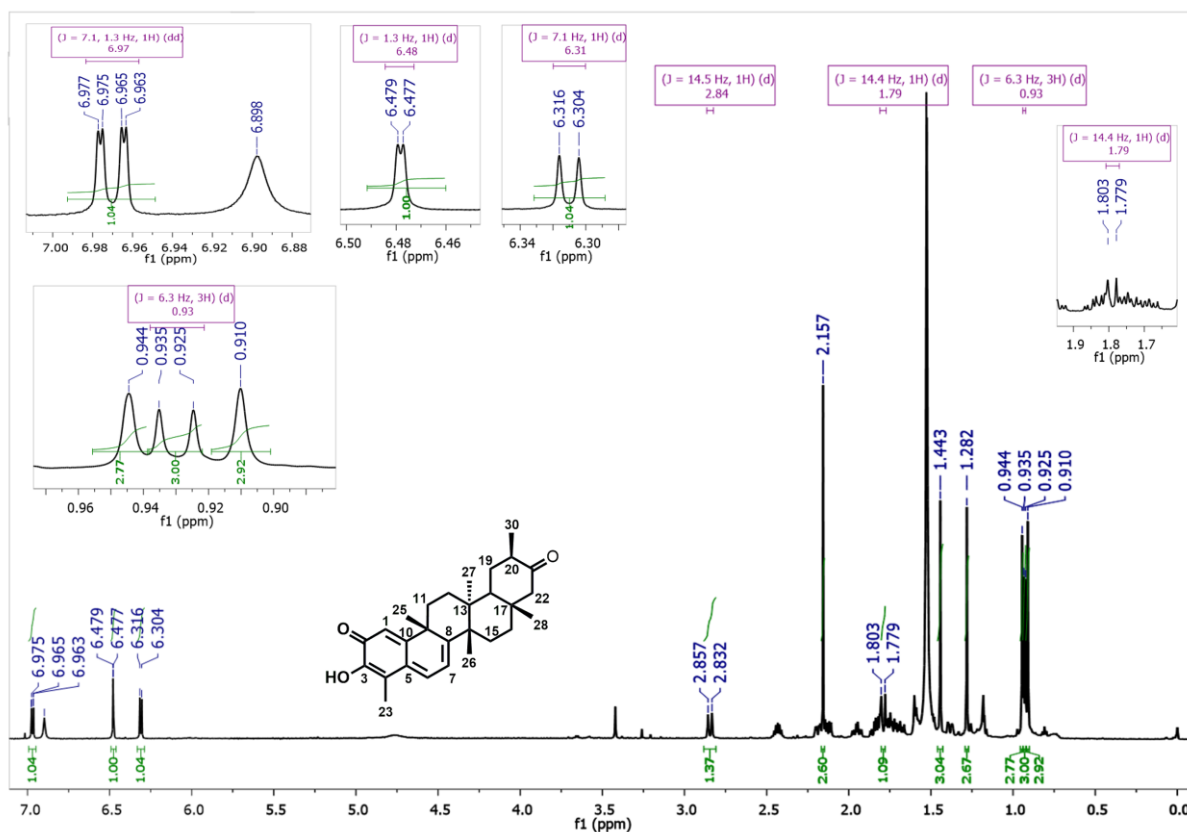
O espectro DEPT-135 de RMN de ^{13}C (Figura 11, p. 48) de (**1**) apresentou 30 sinais, sendo que em δ 178,70 foi observado um sinal característico de carbono carboxílico de éster, atribuído a C-29. Na região de δ 45,0 a δ 10,0 foram observados sinais típicos de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários, os quais foram caracterizados e comparados com dados descritos na literatura (Dos Santos *et al.*, 2013) e se encontram descritos na Tabela 2, p. 49.

Tabela 2: Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da pristimerina (**1**).

Carbono	δ	δ Literatura	Carbono	δ	δ Literatura
1	119,57 (CH)	119,56	16	36,39 (CH_2)	36,39
2	178,31 (C)	178,34	17	30,55 (C)	30,53
3	146,04 (C)	146,02	18	44,31 (CH)	44,32
4	117,12 (C)	117,10	19	30,91 (CH_2)	30,90
5	127,31 (C)	127,43	20	40,39 (C)	40,41
6	134,14 (CH)	134,02	21	29,89 (CH_2)	29,88
7	118,03 (CH)	118,12	22	34,80 (CH_2)	34,80
8	170,04 (C)	170,03	23	10,28 (CH_3)	10,22
9	42,87 (C)	42,93	25	38,26 (CH_3)	38,25
10	164,04 (C)	164,76	26	21,63 (CH_3)	21,62
11	33,57 (CH_2)	33,57	27	18,35 (CH_3)	18,32
12	29,67 (CH_2)	29,66	28	31,57 (CH_3)	31,58
13	39,41 (C)	39,42	29	178,70	178,72
14	45,07 (C)	45,04	30	32,70 (CH_3)	32,36
15	28,65 (CH_2)	28,65	CH₃O em 29	51,59 (CH_3)	51,53

A Figura 12, p. 49 e a Figura 13, p. 50 apresentam o espectro de RMN ^1H e de ^{13}C para o padrão de maitenina (**2**), respectivamente.

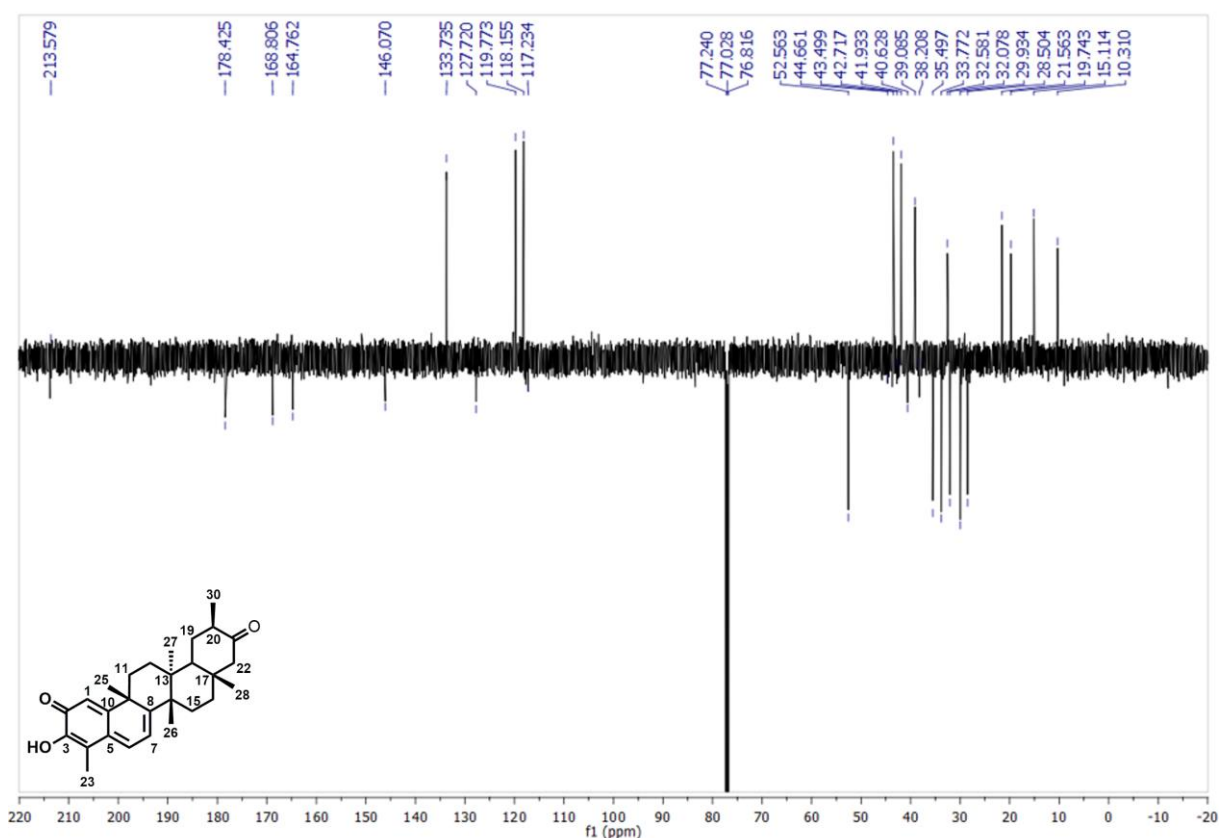
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H da maitenina (**2**) e expansões (600 MHz, CDCl_3).



O espectro de RMN de ^1H de **(2)** apresenta dois dupletos em δ 6,31 (1H, $J=7,1$ Hz), δ 6,48 (1H, $J=1,3$ Hz) atribuídos aos H-7, H-1, respectivamente, um duplo duplete em δ 6,97 (1H, $J=7,1$ e $1,3$ Hz), atribuído ao H-6 e um simpleto em δ 2,16 (H-23) característico de grupo metílico sob ligação dupla. Tais sinais corroboram a presença do sistema quinonametílico.

Também são observados quatro simpletos em δ 1,44, δ 1,28, δ 0,91 e δ 0,94, atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos C-25, C-26, C-27, e C-28, respectivamente. Cada um desses sinais apresenta integração para 3 hidrogênios. Os dupletos observados em δ 2,84 e δ 1,79 ($J=14,5$ Hz, cada), integrando para 1 hidrogênio cada atribuído ao grupo metilênico H-22. O duplete observado em δ 0,93 ($J=6,3$ Hz) integrando para 3 hidrogênios foi atribuído ao hidrogênio metílico C-30.

Figura 13. Espectro DEPT-135 de RMN de ^{13}C da maitenina **(2)** (150 MHz, CDCl_3).



O espectro DEPT-135 de RMN de ^{13}C (Figura 13, p. 50) apresentou 28 sinais, sendo que, o sinal em δ 213,58, típico de carbono carbonílico, foi atribuído a C-21. Os sinais na região δ 53,0 a δ 10,0, foram atribuídos aos carbonos saturados e

comparados com a literatura como mostrado na Tabela 3, p. 51 (Dos Santos *et al.*, 2013).

Tabela 3: Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da maitenina (2).

Carbono	δ	δ Literatura	Carbono	δ	δ Literatura
1	119,77 (CH)	119,77	16	35,50 (CH_2)	35,50
2	178,43 (C)	178,40	17	38,21 (C)	38,17
3	146,07 (C)	146,08	18	43,50 (CH)	43,53
4	117,23 (C)	117,15	19	32,08 (CH_2)	32,05
5	127,72 (C)	127,74	20	41,93 (CH)	41,88
6	133,73 (CH)	133,57	21	213,58	213,54
7	118,15 (CH)	118,12	22	52,56 (CH_2)	52,52
8	168,81 (C)	168,64	23	10,31 (CH_3)	10,24
9	42,72 (C)	42,70	25	39,09 (CH_3)	39,03
10	164,76 (C)	164,69	26	21,56 (CH_3)	21,54
11	33,77 (CH_2)	33,78	27	19,74 (CH_3)	19,70
12	29,93 (CH_2)	29,93	28	32,58 (CH_3)	32,54
13	40,63 (C)	40,62	29	-	-
14	44,66 (C)	44,64	30	15,11 (CH_3)	15,06
15	28,50 (CH_2)	28,50			

Os padrões (1) e (2) purificados e identificados foram utilizados nas análises de quantificação a fim de avaliar a produção dos mesmos frente à infestação com *X. albilineans*.

4.2 - Análise por CLAE-DAD dos TQMs (1) e (2) nas cascas das raízes de *Maytenus ilicifolia*

4.2.1 - Padronização do sistema de solvente extrator

Os extratos obtidos em diferentes sistemas de solvente utilizando hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt) foram avaliados quanto ao rendimento e comparados ao extrato com diclorometano (DCM). A Tabela 4, p. 52 apresenta os sistemas de solventes utilizados para a obtenção dos extratos juntamente com as massas de material vegetal, de extrato e rendimento da extração.

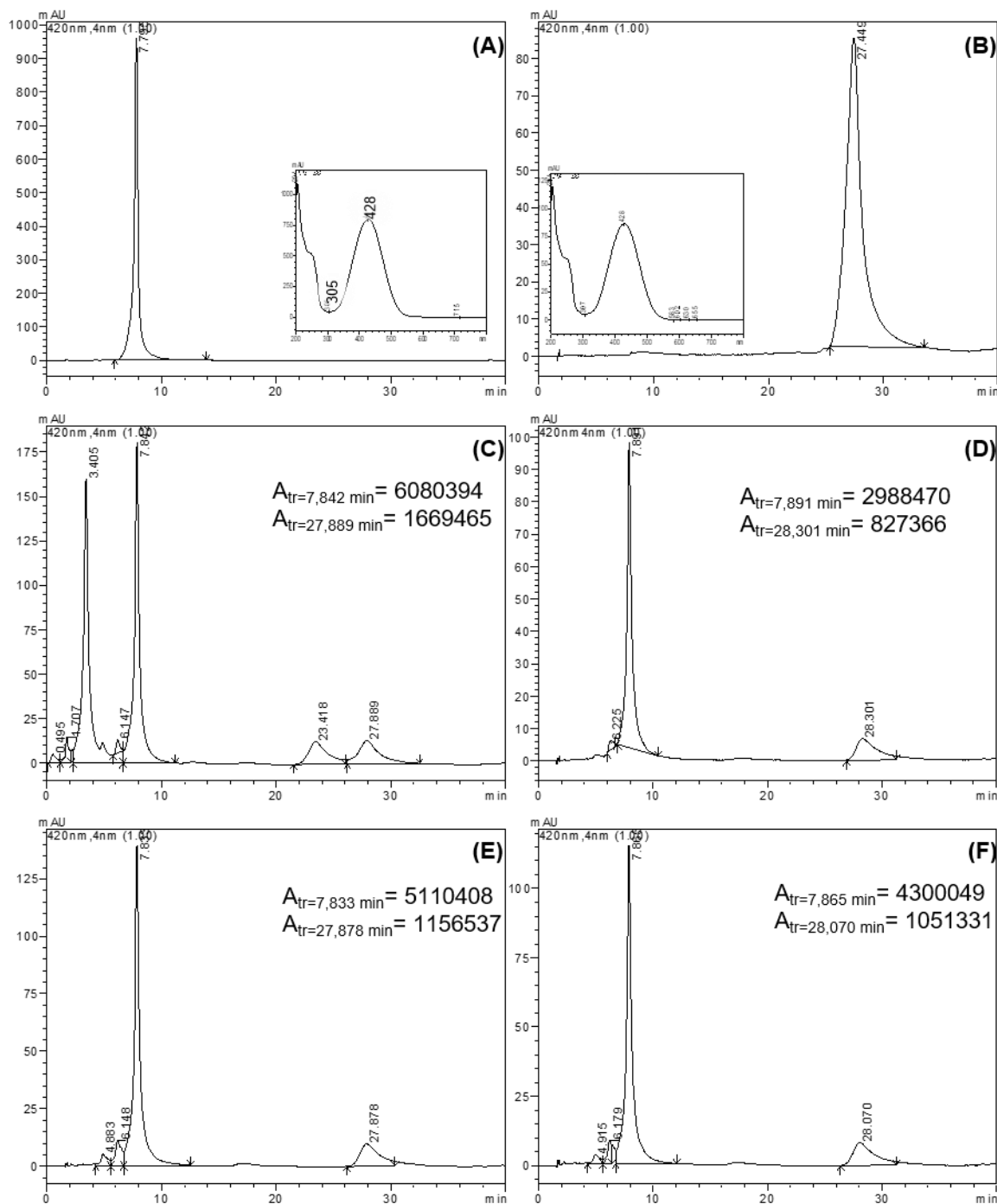
Tabela 4. Sistemas de solvente utilizados nos extratos.

Extrato	Massa de material vegetal (g)	Massa de extrato (mg)	Rendimento (%)
Hex:AcOEt (8:2)	20,97	705,5	3,36
Hex:AcOEt (7:3)	21,00	732,4	3,49
Hex:AcOEt (6:4)	20,97	840,7	4,01
DCM	21,00	979,4	4,66

A partir das massas de material vegetal utilizados na extração e de extrato, foi possível observar que o rendimento de extração para o sistema de solvente Hex:AcOEt (6:4) apresentou um valor mais próximo daquele obtido utilizando-se DCM.

A fim de determinar o teor de **(1)** e **(2)** presentes, os extratos foram analisados por CLAE-DAD. Os cromatogramas registrados e reprocessados nos comprimentos de onda de 420 nm forneceram as áreas dos picos referentes a **(1)** e **(2)** avaliados (Figura 14, p. 53) na determinação do teor de **(1)** e **(2)** nos extratos.

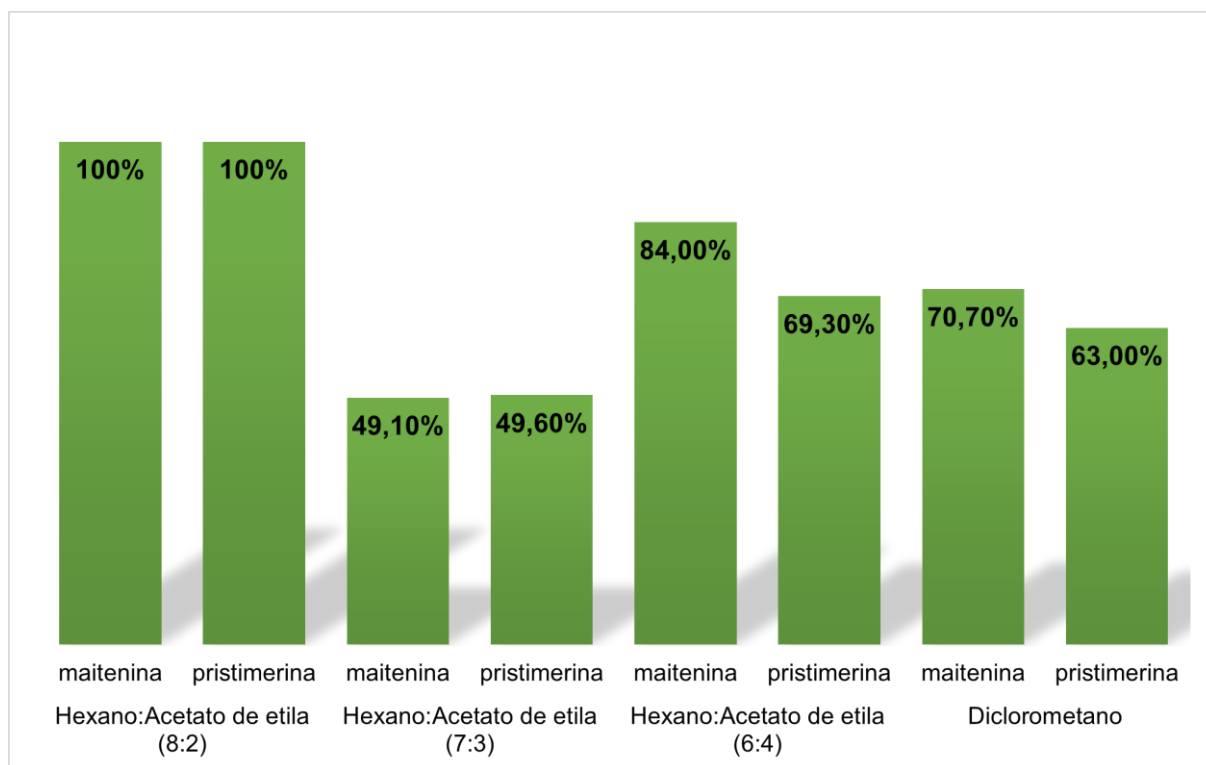
Figura 14: Cromatogramas dos padrões maitenina (2) e pristimerina (1) e dos extratos utilizando os sistemas de solvente: Hex:AcOEt (8:2), Hex:AcOEt (7:3), Hex:AcOEt (6:4) e DCM (A à F, respectivamente).



Legenda: Tempo de retenção da maitenina: (A)= 7,795 min; (C)= 7,842 min; (D)= 7,891 min; (E)= 7,833 min; (F)= 7,865 min. Tempo de retenção da pristimerina: (B)= 27,449 min; (C)= 27,889 min; (D)= 28,301 min; (E)= 27,878 min; (F)= 28,070 min.

A partir da área dos picos relacionados à (1) e à (2) fez-se o cálculo do teor relativo dessas substâncias para cada extrato (Figura 15, p. 54).

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.



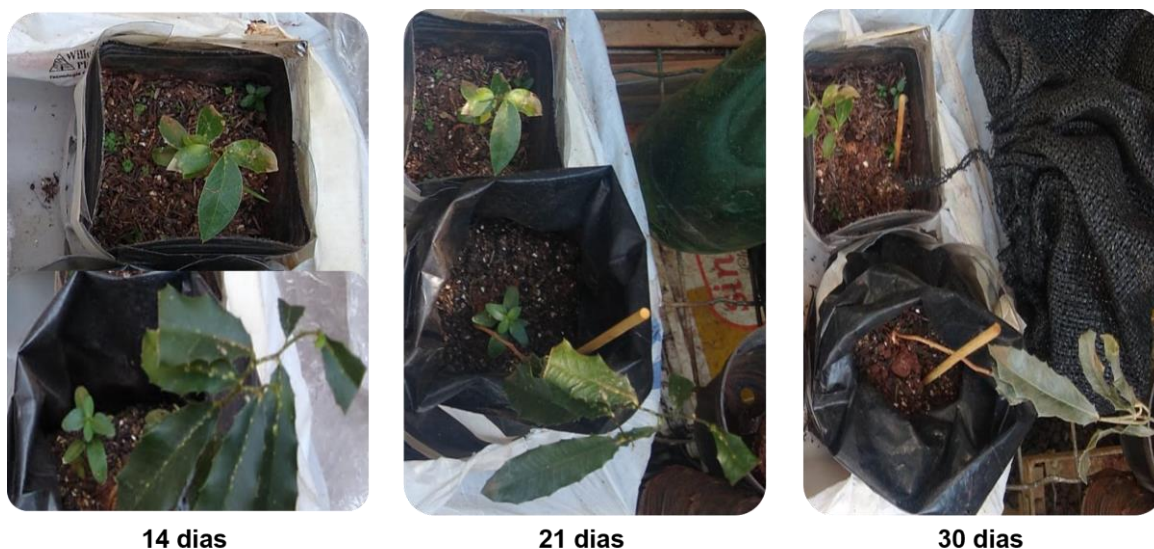
Foi possível observar maior teor de (1) e de (2) nos extratos com o sistema de solvente Hex:AcOEt (8:2). Por outro lado, a extração com Hex:AcOEt (6:4) é mais seletiva para (1) e (2) e em maior teor quando comparado com a extração em Hex:AcOEt (7:3) e DCM.

Embora a extração com Hex:AcOEt na proporção 8:2 não se mostrou ser seletiva para (1) e (2), foi estabelecida como sistema de solvente ideal para as análises das plântulas do teste de infecção (I1, I2 e I3) e para a quantificação de (1), (2) e (3) antes e após a infecção com *X. albilineans* por promover a concentração máxima de (1) e de (2). Além disso, permite a identificação de outros metabólitos secundários presentes nos extratos durante a análise do metabolismo das plântulas antes e após a inoculação com *X. albilineans*.

4.2.2 - Avaliação do metabolismo secundário de *Maytenus ilicifolia* frente à infecção com *Xanthomonas albilineans*

Os extratos das raízes das plântulas de *M. ilicifolia*, obtidos durante o teste de infecção foram analisados por CLAE-DAD, tiveram os teores relativos de pristimerina (1) e de maitenina (2) calculados utilizando a área percentual dos picos correspondentes nos cromatogramas obtidos após os três testes de infecção realizados. No primeiro teste de infecção (I1), as plântulas apresentaram folhas secas nas pontas a partir do 14º dia de inoculação e, ao final dos 30 dias, estavam esbranquiçadas (Figura 16).

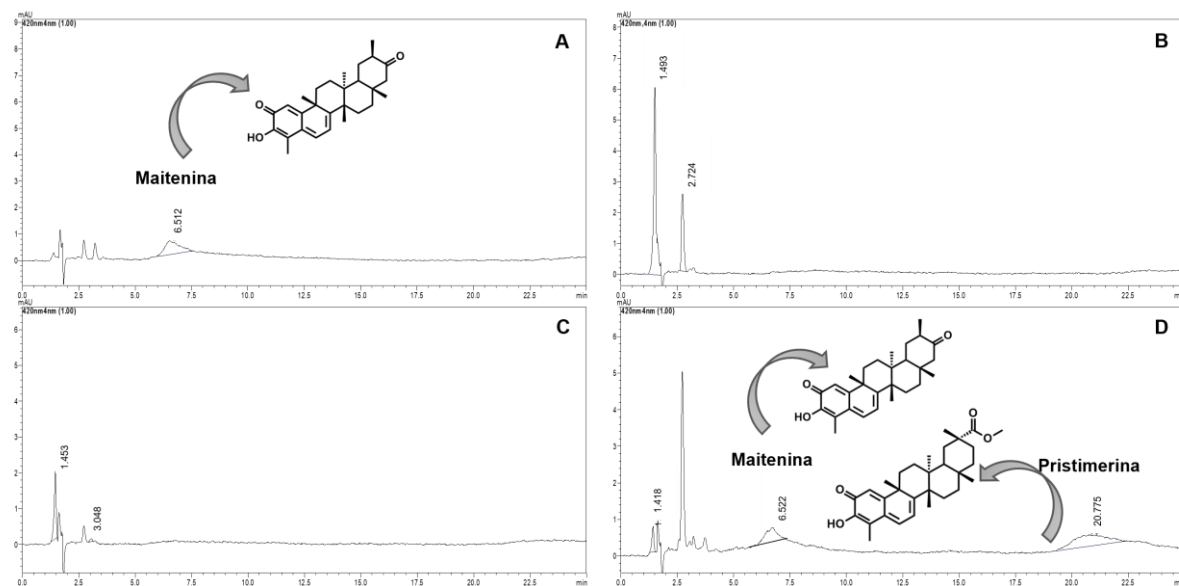
Figura 16: Plântulas de *M. ilicifolia* após infecção com corte das folhas utilizando lâmina umedecida no inóculo de *X. albilineans*.



Fonte: Foto própria do autor.

Ademais, nos cromatogramas dos extratos obtidos a partir das raízes da plântula foi possível identificar a maitenina (2) apenas na primeira semana de infecção, enquanto a pristimerina (1) passou a ser detectada no estágio final de avaliação da infecção (Figura 17, p. 56). Considerando a proposta da via metabólica de *M. ilicifolia* (Figura 4, p. 27), na qual (1) leva à bioprodução da (2) pode-se supor que a produção de (1) com 30 dias de infecção seja uma resposta metabólica contra a *X. albilineans*. Assim, foi possível observar o início da resposta metabólica apenas nos estágios finais de infecção quando comparada com I2 e I3.

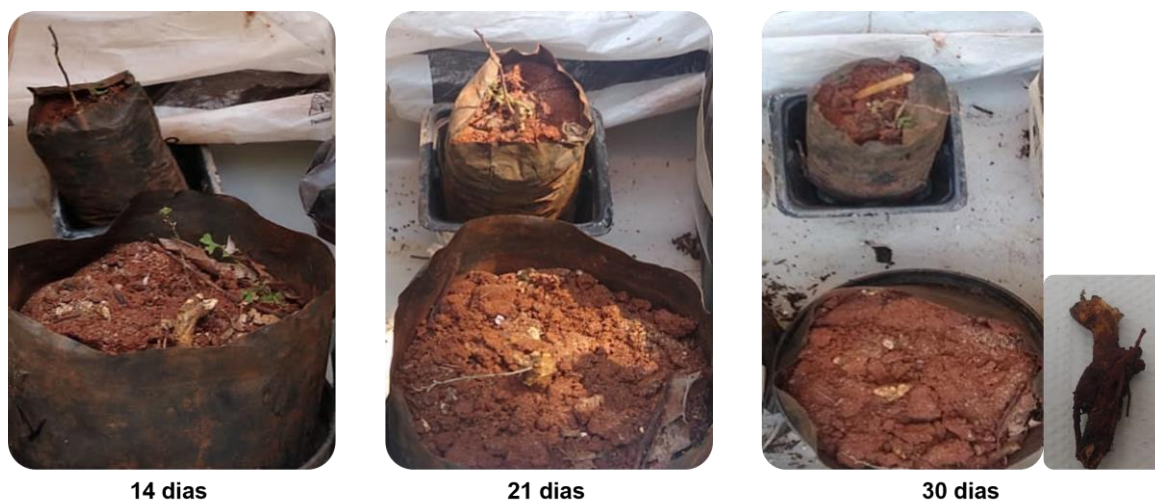
Figura 17. Cromatogramas dos extratos das raízes obtidos após a infecção 1 (I1) das plântulas de *M. ilicifolia* durante o primeiro mês de infecção com *X. albilineans*.



Legenda: (A)= Cromatograma do extrato das raízes com 7 dias de infecção com *X. albilineans*; (B)= Cromatograma do extrato das raízes com 14 dias de infecção com *X. albilineans*; (C)= Cromatograma do extrato das raízes com 21 dias de infecção com *X. albilineans*; (D)= Cromatograma do extrato das raízes com 30 dias de infecção com *X. albilineans*. Tempo de retenção da maitenina: (A)= 6,512 min; (B)= 6,522 min. Tempo de retenção da pristimerina: (D)= 20,775 min.

Em relação ao segundo teste de infecção (I2), as plântulas perderam suas folhas a partir de 14 dias de infecção e ao final dos 30 dias, aparentemente apresentaram-se murchas e secas (Figura 18).

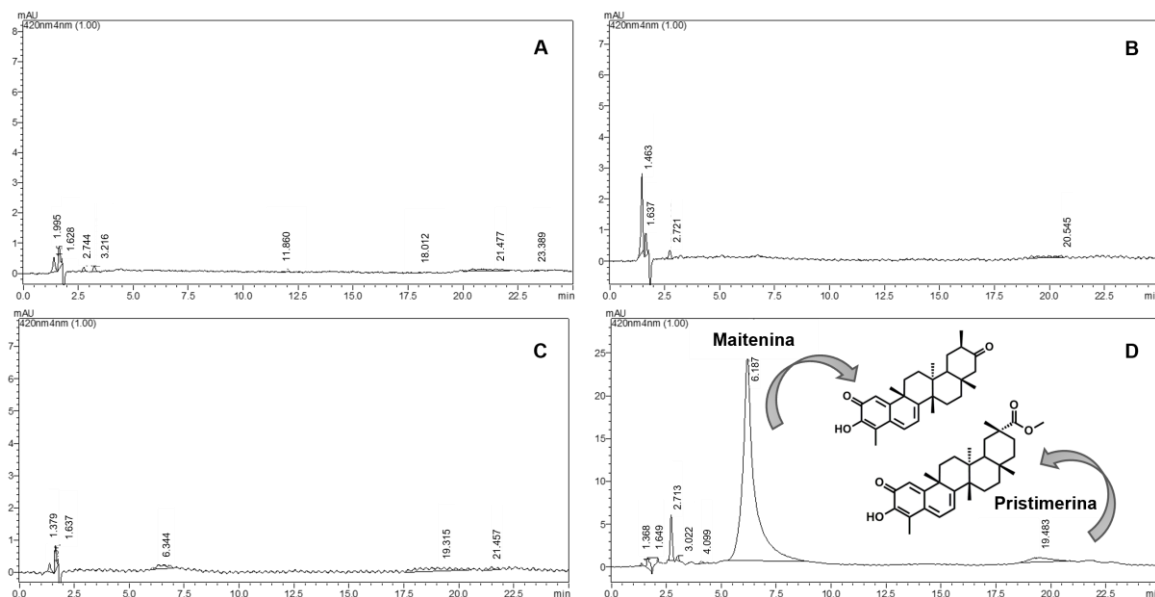
Figura 18: Plântulas de *M. ilicifolia* após infecção com corte do caule utilizando lâmina estéril e injeção de 100 μ L do cultivo celular de *X. albilineans*.



Fonte: Foto própria do autor.

Os cromatogramas dos extratos obtidos a partir das raízes da plântula mostrou grande acúmulo de maitenina (**2**). A pristimerina (**1**) foi detectada no estágio final da infecção, 30 dias (Figura 19).

Figura 19. Cromatogramas dos extratos das raízes obtidos após a infecção 2 (**12**) das plântulas de *M. ilicifolia* durante o primeiro mês de infecção com *X. albilineans*.



Legenda: (A)= Cromatograma do extrato das raízes com 7 dias de infecção com *X. albilineans*; (B)= Cromatograma do extrato das raízes com 14 dias de infecção com *X. albilineans*; (C)= Cromatograma do extrato das raízes com 21 dias de infecção com *X. albilineans*; (D)= Cromatograma do extrato das raízes com 30 dias de infecção com *X. albilineans*. Tempo de retenção da maitenina: (D)= 6,187 min. Tempo de retenção da pristimerina: (D)= 19,483 min.

No terceiro teste de infecção (**13**), as folhas apresentaram a ação da bactéria e, após 14 dias de infecção se mostraram mais secas. No entanto, aos 21 dias de infecção um novo caule começou a brotar e ao final de 30 dias, uma nova folha surgiu nesse caule. Além disso, houve uma leve diminuição do ressecamento das folhas (Figura 20, p. 58) demonstrando recuperação gradual do material vegetal frente à infecção com *X. albilineans*.

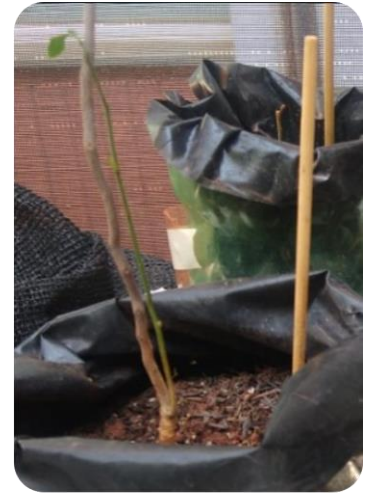
Figura 20: Plântulas de *M. ilicifolia* após infecção com pipetagem de 100 μ L da suspensão bacteriana na superfície de um corte feito acima do meristema apical com uma lâmina previamente mergulhada no inóculo de *X. albilineans*.



14 dias



21 dias

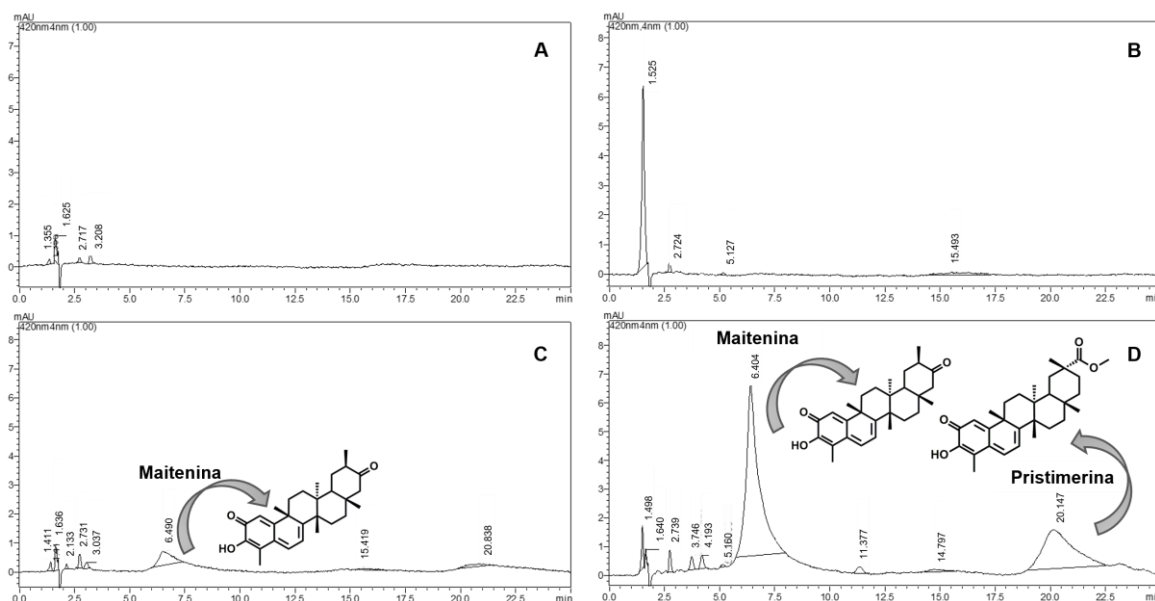


30 dias

Fonte: Foto própria do autor.

Os cromatogramas dos extratos obtidos das raízes da plântula após a 13 mostraram aumento da produção de maitenina a partir de 21 dias de infecção e a pristimerina passou a ser detectada no estágio final da infecção de 30 dias (Figura 21, p. 59).

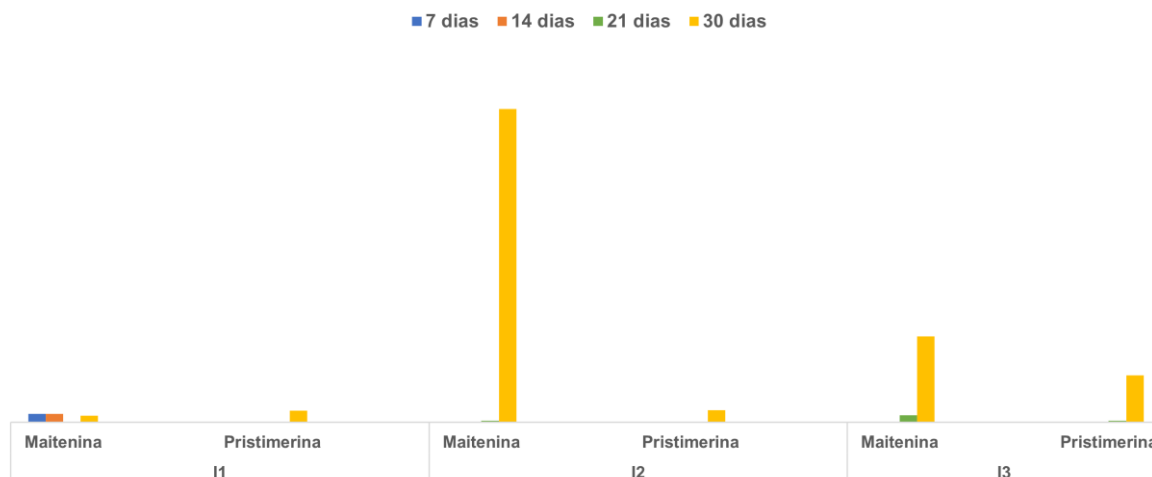
Figura 21. Cromatogramas dos extratos das raízes obtidos após a infecção 3 (I3) das plântulas de *M. ilicifolia* durante o primeiro mês de infecção com *X. albilineans*.



Legenda: (A)= Cromatograma do extrato das raízes com 7 dias de infecção com *X. albilineans*; (B)= Cromatograma do extrato das raízes com 14 dias de infecção com *X. albilineans*; (C)= Cromatograma do extrato das raízes com 21 dias de infecção com *X. albilineans*; (D)= Cromatograma do extrato das raízes com 30 dias de infecção com *X. albilineans*. Tempo de retenção da maitenina: (C)= 6,490 min (D)= 6,404 min. Tempo de retenção da pristimerina: (D)= 20,147 min.

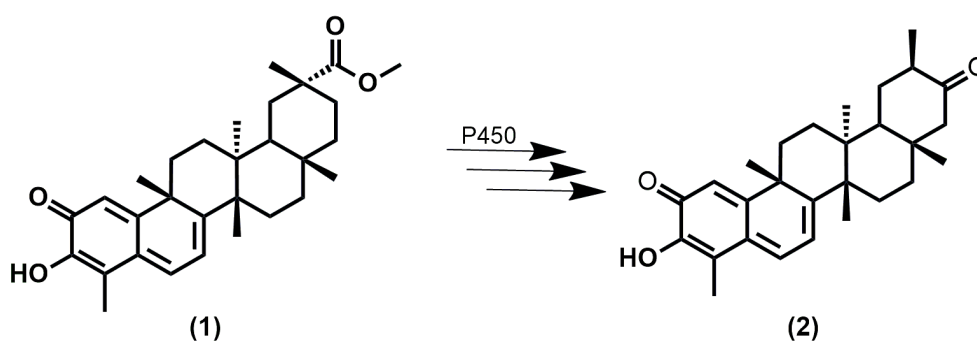
No gráfico a seguir estão apresentadas as quantidades relativas de (1) e de (2) nos extratos obtidos das raízes de *M. ilicifolia* infectadas com *X. albilineans* (Figura 22).

Figura 22. Teor relativo de pristimerina (1) e de maitenina (2) presente nos extratos das raízes obtidos após infecção das plântulas de *M. ilicifolia* durante o primeiro mês de infecção com *X. albilineans*.



Nas formas de infecção **I2** e **I3** foi possível observar que houve maior produção dos triterpenos quinonametídeos (**1**) e (**2**), agentes antibacterianos contra essa linhagem de bactéria em *M. ilicifolia*, (**1**) com $IC_{50}=1,0mM$ e (**2**) com $IC_{50}=0,46mM$, especialmente de (**2**) que apresentou ser mais potente nos testes *in vitro* realizados (resultados não publicados e mostrados na Figura 1, p. 24), É interessante destacar que os resultados do acúmulo o dos TQMs (**1**) e (**2**) em *M. ilicifolia* após as infecções, são coerentes com os resultados obtidos nos testes biológicos desses metabólitos contra *Xanthomonas albilineans*, uma vez que a maitenina (**2**) mostrou aumento expressivo no estágio final de infecção, que pode ser atribuído a resposta de defesa da plântula contra o patógeno. Além disso, a pristimerina (**1**) mostra menor acúmulo, que pode estar associado a seu consumo na produção da maitenina (**2**) (Figura 23).

Figura 23. Biossíntese de pristimerina (**1**) e de maitenina (**2**) após infecção de 30 dias com *Xanthomonas albilineans*.



Fonte: Jeller et al., 2004.

Com base nos resultados do teste de infecção, as plântulas de trabalho (**Mi1**, **Mi2**, **Mi4** e **Mi5**) foram inoculadas com *X. albilineans* e as plântulas de controle (**C1**, **C2** e **C3**) inoculadas com o meio de cultura XAS isento de bactéria após a recuperação do estresse causado pelas extrações de pré infecção. Assim, as plântulas **Mi1** e **Mi5** que se mostraram mais desenvolvidas e apresentando novas folhas foram infectadas com *X. albilineans* pelo meristema apical (**I3**), enquanto **Mi2** e **Mi4** pelo caule (**I2**) devido à maior rigidez do ápice do caule e ausência de folhagem. Do mesmo modo, as plântulas de controle **C1** e **C2** foram inoculadas com meio de cultura XAS pelo meristema apical (**I3**) e **C3** foi inoculada com o mesmo meio de cultura líquido pelo caule (**I2**). Os extratos obtidos das plântulas de trabalho

e de controle foram avaliados com 30 dias de infecção, auge de produção de (1) e de (2) como observados na Figura 22, p. 59.

4.3 - Análise química dos triterpenos quinonametídeos antes e após infecção com Xanthomonas albilineans

4.3.1 - Quantificação de pristimerina (1) e maitenina (2) nas raízes das plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*

Os extratos das cascas das raízes de *M. ilicifolia* obtidos antes e após a infecção com *X. albilineans* foram analisados por CLAE-DAD, seguindo a metodologia descrita em “3.5 - Quantificação de pristimerina (1) e maitenina (2) nas raízes de plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*”, p. 37.

Os cromatogramas obtidos a partir dos extratos das raízes das plântulas selecionadas para o desenvolvimento do trabalho (**Mi1**, **Mi2**, **Mi4** e **Mi5**) e das plântulas de controle (**C1**, **C2** e **C3**), antes (Figura 24, p. 62) e após a infecção com *X. albilineans* (Figura 25, p. 63), foram registrados e reprocessados de tal forma que as áreas dos picos referentes a (1) e (2) avaliadas no comprimento de onda de 420 nm determinaram a concentração de (1) e de (2) presentes nos extratos.

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 *Xanthomonas albilineans*.

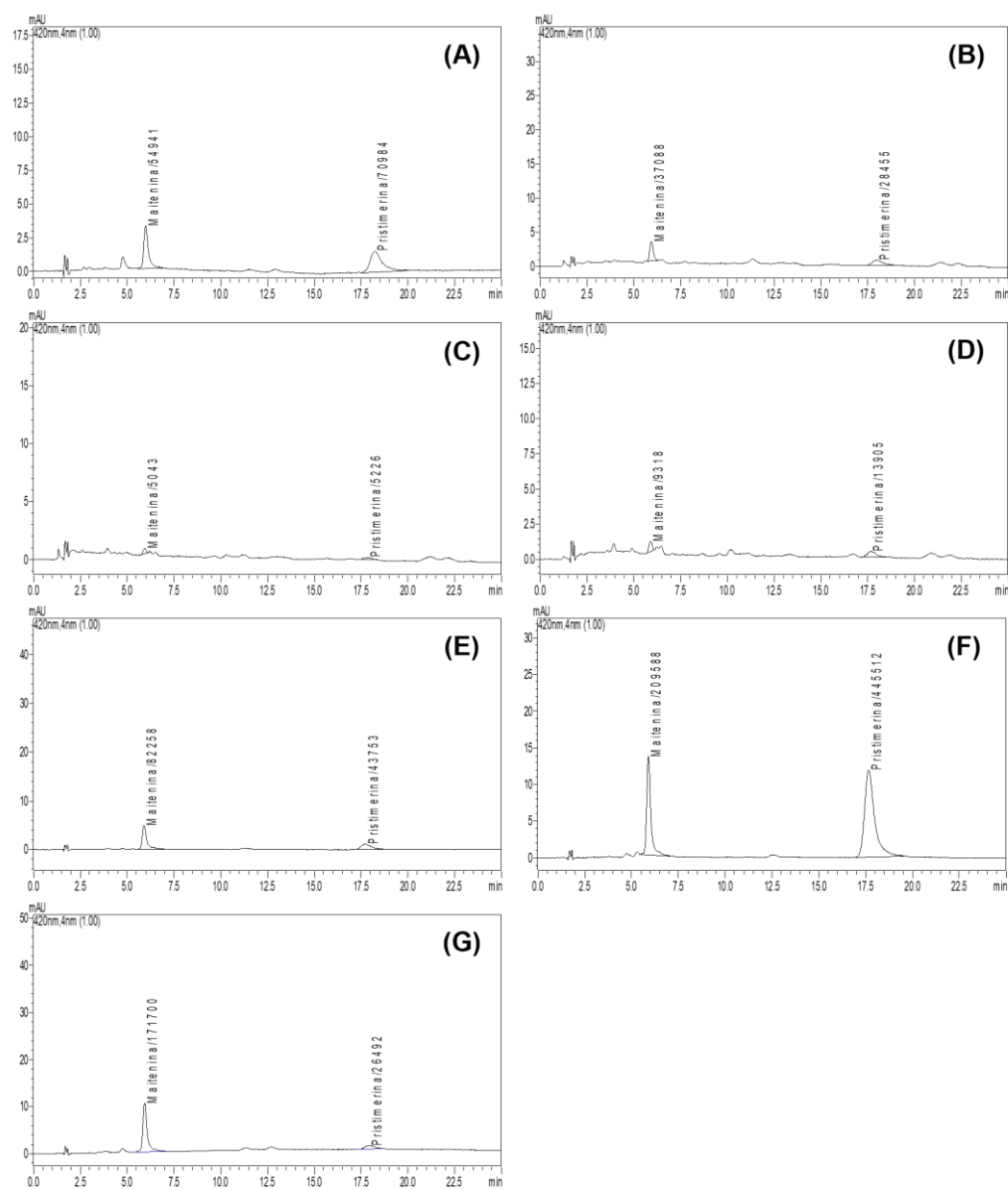
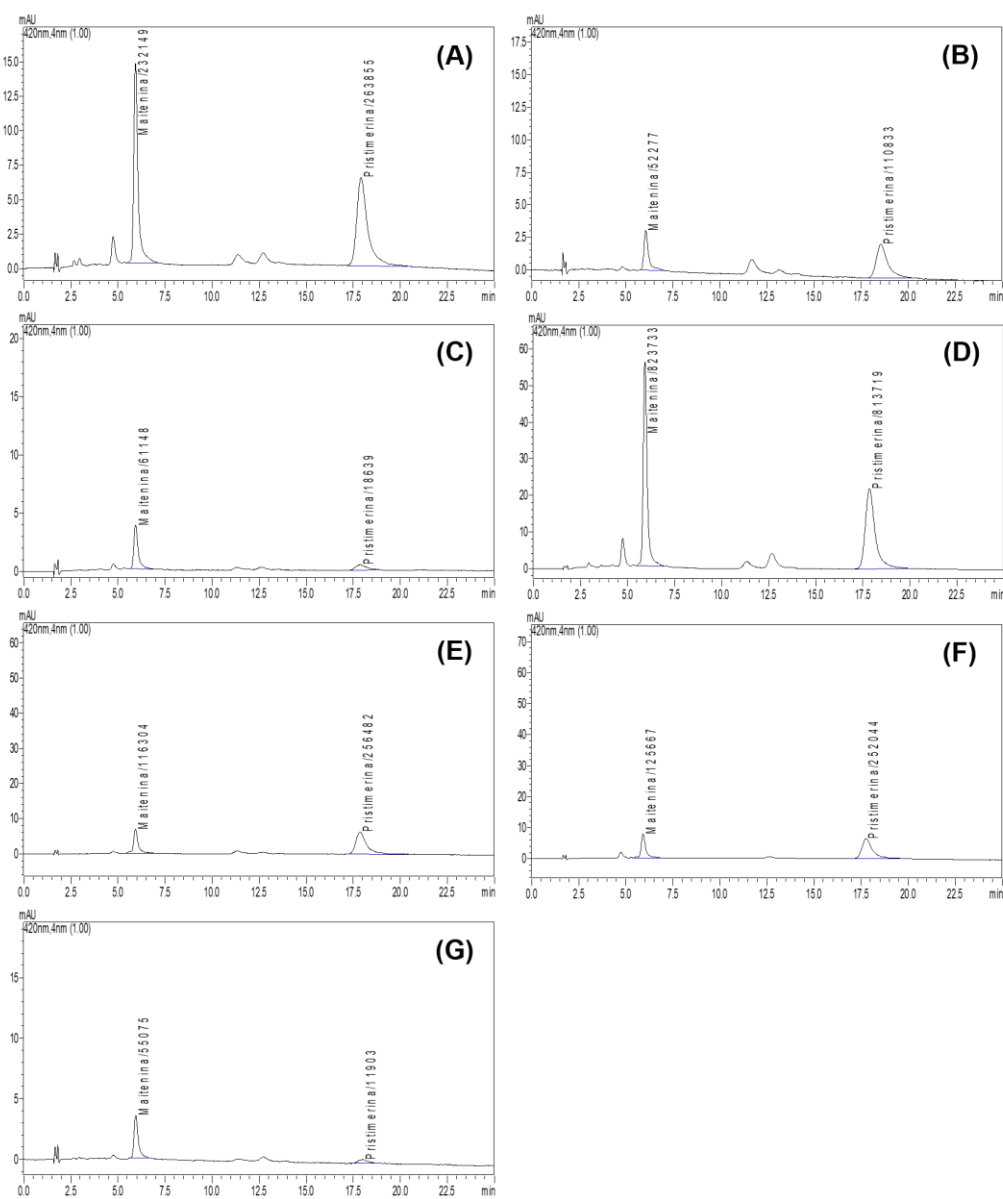


Figura 25. Cromatogramas dos extratos obtidos das raízes das plântulas Mi1 (A), Mi2 (B), Mi4 (C), Mi5 (D), C1 (E), C2 (F) e C3 (G) após infecção com *Xanthomonas albilineans*.



A boa resolução cromatográfica dos picos garante a identificação e quantificação de (1) e de (2) presente nos extratos mostrando a seletividade do método instrumental de separação (Anvisa, 2017).

4.4.1.1 - Pristimerina (1)

O padrão (1) previamente isolado e purificado a partir das cascas das raízes de *M. ilicifolia* e identificado por experimentos de RMN e CLAE-DAD-EM foi utilizado para preparar sete soluções em triplicata para cada ponto de amostragem juntamente com o padrão (2) formando o mix de soluções dentro de uma faixa de concentração de 0,05 a 4,0 mg/mL. As soluções foram injetadas em CLAE-DAD conforme descrito no item “3.5 - Quantificação de pristimerina (1) e maitenina (2) nas raízes de plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*” na p. 37. As medições foram integradas e aplicadas na construção da curva analítica para as soluções de (1). A curva de calibração foi obtida a partir das médias aritméticas das respostas das injeções realizadas em triplicata das soluções padrão de (1) (Tabela 5).

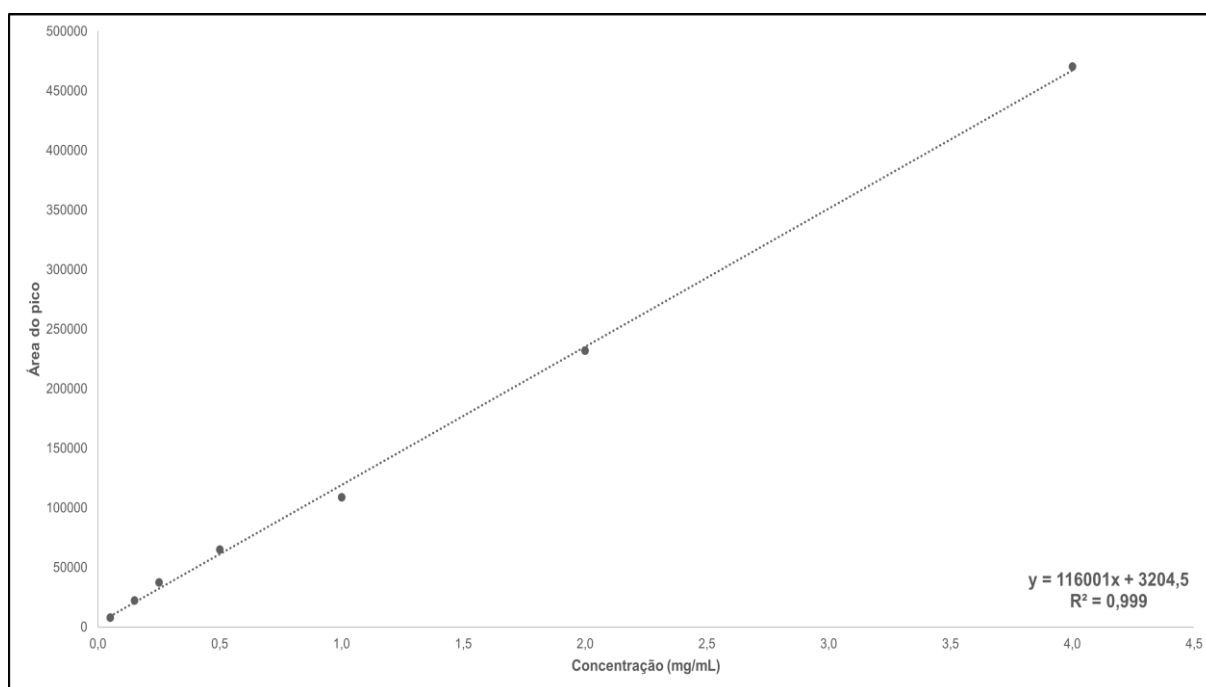
Tabela 5: Áreas dos picos integrados após tratamento dos cromatogramas das soluções padrão em LCSolution obtidos para a pristimerina (1).

Concentração (mg/mL)	Áreas dos picos	Média	DPR* (%)
0,05	8060; 7924; 7929.	7971	0,97
0,15	22297; 22857; 21888.	22347	2,18
0,25	37547; 37367; 37770.	37561	0,54
0,50	64306; 65992; 65308.	65202	1,24
1,00	108178; 109074; 109793.	109015	0,74
2,00	232154; 231767; 232502.	232141	0,16
4,00	469547; 470904; 470757.	470403	0,16

*DPR: desvio padrão relativo.

Os desvios padrão relativos calculados para (1) demonstraram a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos que avaliam a precisão do método e do procedimento experimental realizados (Anvisa, 2017).

A curva de calibração de (1) (Figura 26, p. 65) foi obtida pela média aritmética das áreas dos picos correspondentes a cada concentração das soluções padrão e demonstrou ótima linearidade da resposta do detector com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9990.

Figura 26. Curva de calibração da pristimerina (**1**).

A equação da reta de regressão de y (área do pico) em x (concentração) foi estimada pelo método dos mínimos quadrados para (**1**). Calculou-se a concentração de (**1**) antes e após a infecção com *X. albilineans* (Tabela 6, p. 66) presente nos extratos a partir da média das áreas dos picos obtidos como resposta.

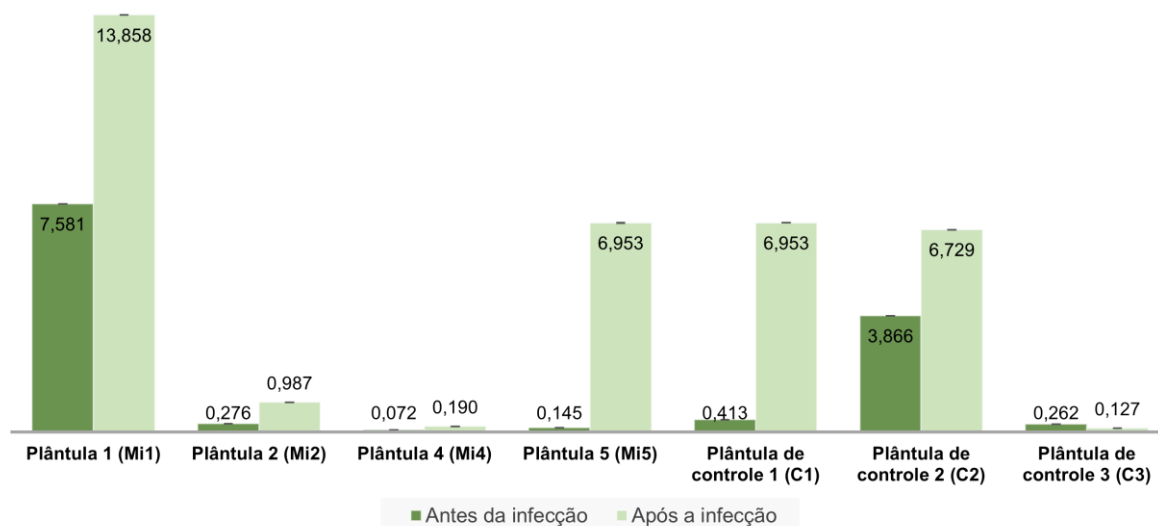
Tabela 6: Médias das áreas dos picos integrados e concentração média (mg/mL) da pristimerina (1) das plântulas **Mi1**, **Mi2**, **Mi4**, **Mi5**, **C1**, **C2** e **C3** antes e após a infecção com *X. albilineans*.

Plântula 1 (Mi1)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
70078	$0,632 \times F^* (12) = 7,581 \pm 0,007$	264711	$2,310 \times F^* (6) = 13,858 \pm 0,008$
Plântula 2 (Mi2)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
28786	$0,276 \pm 0,006$	111265	$0,987 \pm 0,005$
Plântula 4 (Mi4)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
5198	$0,072 \pm 0,0002$	18785	$0,190 \pm 0,007$
Plântula 5 (Mi5)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
13573	$0,145 \pm 0,003$	400084	$3,477 \times F^* (2) = 6,953 \pm 0,014$
Plântula de controle 1 (C1)			
Antes inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
44748	$0,413 \pm 0,008$	257004	$2,243 \times F^* (3) = 6,729 \pm 0,004$
Plântula de controle 2 (C2)			
Antes inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
445304	$3,866 \pm 0,002$	251492	$2,196 \times F^* (3) = 6,587 \pm 0,004$
Plântula de controle 3 (C3)			
Antes inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
27229	$0,262 \pm 0,006$	11525	$0,127 \pm 0,003$

*F: fator de diluição das amostras.

As concentrações de (1) aumentaram em praticamente todas as plântulas, exceto no indivíduo controle 3 (**C3**) após os estresses causados com as extrações e infecções com *Xanthomonas albilineans*. Porém, as plântulas infectadas com a *X. albilineans* tiveram esse aumento da concentração bem mais acentuado quando comparadas às plântulas de controle sugerindo que os TQMs são metabolizados como resposta ao estresse das extrações e das infecções com a bactéria (Figura 27, 67).

Figura 27. Comparação das concentrações (mg/mL) de pristimerina (**1**) antes e após infecções com *Xanthomonas albilineans*.



A plântula 5 (**Mi5**) infectada com a *X. albilineans* teve um aumento expressivo da concentração de (**1**), de cerca de 48 vezes maior em relação à plântula antes da infecção, sendo que **Mi1** foi o indivíduo que teve o maior valor de produção, porém **Mi5** apresentou maior aumento. Em relação aos controles, observou-se também o aumento da concentração em **C1** e **C2**, sendo 16 e 2 vezes maior que as plântulas antes do processo de inoculação apenas do meio de cultura. Por outro lado, **C3** reduziu pela metade a produção de (**1**).

4.4.1.2 - Maitenina (**2**)

Os mesmos cromatogramas obtidos a partir dos extratos das raízes de plântulas de trabalho (**Mi1**, **Mi2**, **Mi4** e **Mi5**) e das plântulas de controle (**C1**, **C2** e **C3**) antes (Figura 24, p. 62) e após a infecção com *X. albilineans* (Figura 25, p. 63) foram registrados e reprocessados de tal forma que as áreas dos picos referentes a (**2**) avaliada no comprimento de onda igual a 420 nm determinaram a concentração de (**2**) presentes nos extratos. Os picos de (**2**) foram identificados e quantificados apresentando boa seletividade com relação a (**1**) e (**2**) (Anvisa, 2017).

O padrão (2) previamente isolado e purificado a partir das cascas das raízes de *M. ilicifolia* e identificado por experimentos de RMN e CLAE-DAD-EM foi utilizado para preparar sete soluções em triplicata para cada ponto de amostragem juntamente com o padrão (1) formando o mix de soluções dentro da faixa de concentração de 0,05 a 4,0 mg/mL. As soluções foram injetadas em CLAE-DAD conforme descrito no item “3.5 - Quantificação de pristimerina (1) e maitenina (2) nas raízes de plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*” na p. 37. As medições foram integradas e aplicadas na construção da curva de calibração de padronização externa para as soluções de (2). A curva de calibração foi obtida a partir das médias aritméticas das respostas das injeções realizadas repetidamente das soluções padrão preparadas em triplicata para cada ponto de amostragem para (2) (Tabela 7).

Tabela 7: Áreas dos picos integrados após tratamento dos cromatogramas das soluções padrão em LCSolution obtidos para a maitenina (2).

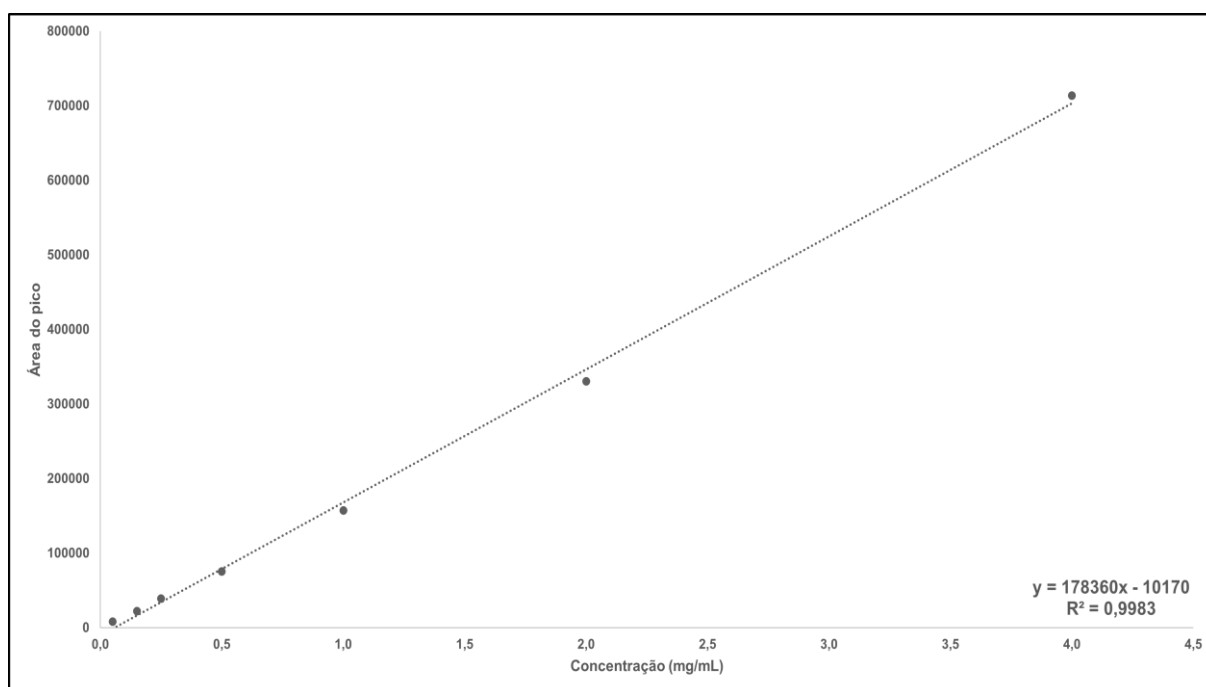
Concentração (mg/mL)	Áreas dos picos	Média	DPR* (%)
0,05	8192; 7997; 8178.	8122	1,34
0,15	22582; 22635; 22160.	22459	1,16
0,25	39024; 39910; 39042.	39325	1,29
0,50	75847; 74852; 75366.	75355	0,66
1,00	157559; 157623; 156490.	157224	0,40
2,00	330204; 330558; 330361.	330374	0,05
4,00	714323; 713385; 714026.	713911	0,07

*DPR: desvio padrão relativo.

Os desvios padrão relativo calculados para (2) demonstraram a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos que avaliam a precisão do método e do procedimento experimental realizados (Anvisa, 2017).

A curva de calibração de (2) (Figura 28, p. 69) foi obtida pela média aritmética das áreas dos picos correspondentes a cada concentração das soluções padrão e demonstrou ótima linearidade da resposta do detector com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9983.

Figura 28. Curva de calibração da maitenina (2).



A equação da reta de regressão de y (área do pico) em x (concentração) foi estimada pelo método dos mínimos quadrados para (2). Dessa forma, calculou-se a concentração de (2) (Tabela 8, p. 70) nos extratos obtidos antes e após a infecção com *X. albilineans* a partir da média das áreas dos picos obtidos como resposta.

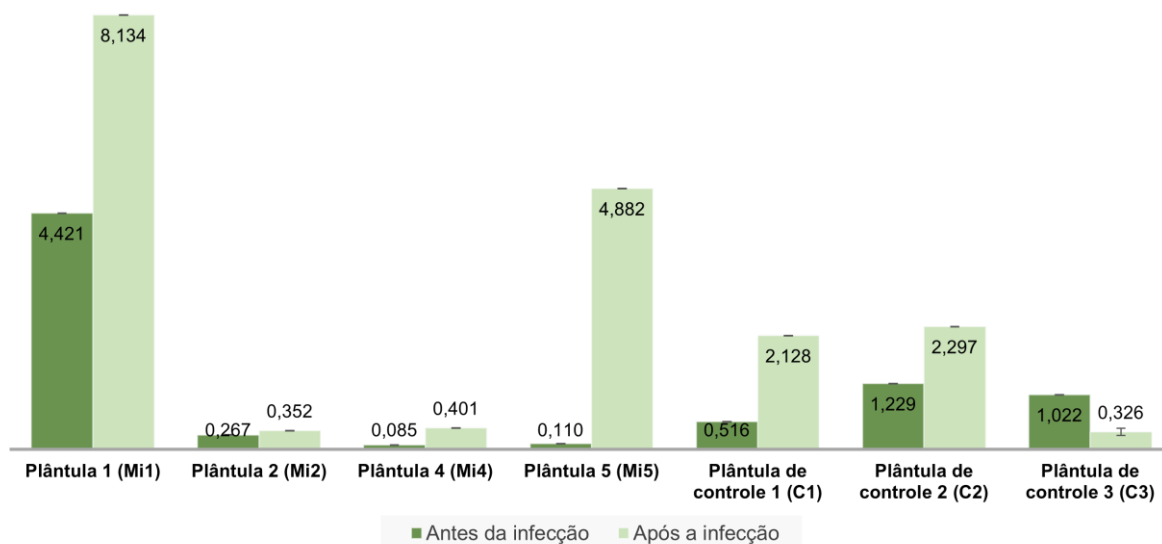
Tabela 8: Médias das áreas dos picos integrados e concentração média (mg/mL) da maitenina (2) das plântulas **Mi1**, **Mi2**, **Mi4**, **Mi5**, **C1**, **C2** e **C3** antes e após a infecção com *X. albilineans*.

Plântula 1 (Mi1)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
55543	$0,368 \times F^* (12) = 4,421 \pm 0,003$	231634	$1,356 \times F^* (6) = 8,134 \pm 0,003$
Plântula 2 (Mi2)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
37471	$0,267 \pm 0,004$	52526	$0,352 \pm 0,001$
Plântula 4 (Mi4)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
5002	$0,085 \pm 0,0002$	61353	$0,401 \pm 0,003$
Plântula 5 (Mi5)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
9404	$0,110 \pm 0,0004$	425171	$2,441 \times F^* (2) = 4,882 \pm 0,002$
Plântula de controle 1 (C1)			
Antes da inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
81915	$0,516 \pm 0,004$	116336	$0,709 \times F^* (3) = 2,128 \pm 0,002$
Plântula de controle 2 (C2)			
Antes da inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
209036	$1,229 \pm 0,003$	126403	$0,766 \times F^* (3) = 2,297 \pm 0,004$
Plântula de controle 3 (C3)			
Antes da inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
172125	$1,022 \pm 0,003$	54667	$0,326 \pm 0,065$

*F: fator de diluição das amostras.

As concentrações de (2) aumentaram em todas as plântulas após os estresses causados com as extrações e infecções com *Xanthomonas albilineans*. Contudo, as plântulas infectadas com a *X. albilineans* tiveram maior aumento da concentração quando comparadas às plântulas de controle sugerindo que os TQMs são metabolizados como resposta ao estresse das extrações e das infecções com a bactéria (Figura 29, 71).

Figura 29. Comparação das concentrações (mg/mL) de maitenina (**2**) antes e após infecções com *Xanthomonas albilineans*.



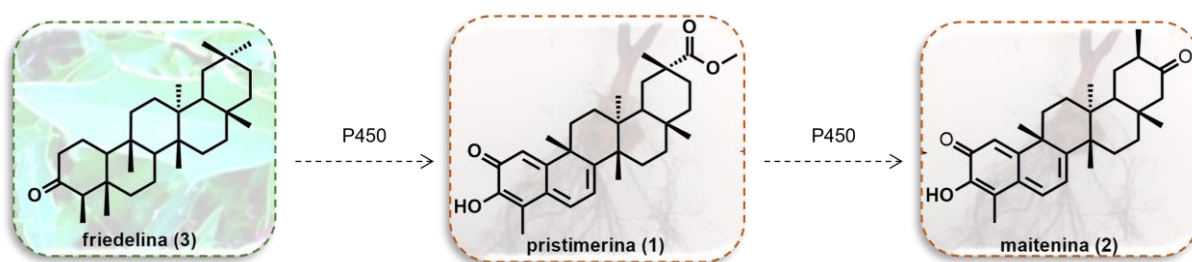
Assim como para (**1**), a produção de (**2**) foi maior em (**Mi1**) e (**Mi5**), tendo também uma nítida diferença entre a quantidade produzida pelo indivíduo (**Mi1**) e um aumento mais expressivo (44 vezes maior) da produção no indivíduo (**Mi5**). Os controles (**C1**) e (**C2**) apresentaram aumento 4 e 2 vezes de (**2**), respectivamente, sendo que o (**C3**) reduziu a produção em 3 vezes. O aumento das concentrações de (**1**) e de (**2**) mostraram que a biossíntese dessas substâncias foram favorecidas após a infecção com *Xanthomonas albilineans*. Diante disso, a quantificação da friedelina (**3**), precursor comum desses TQMs, é capaz de decifrar o metabolismo desses TQMs nas plântulas de *M. ilicifolia* como resposta contra a inoculação.

4.3.2 - Quantificação de friedelina (**3**) nas folhas das plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*

A friedelina (**3**) é precursor comum da pristimerina (**1**) e da maitenina (**2**) presente exclusivamente nas folhas de *M. ilicifolia*. A translocação da friedelina, exigindo alto consumo energético (Corsino *et al.*, 2000), associada a atividade antimicrobiana e atividade antibacteriana de (**1**) e de (**2**) é capaz de decifrar o potencial da resposta de defesa das plântulas frente à infecção com *X. albilineans* (Figura 30, p. 72). Dessa forma, a quantificação de (**3**) é fundamental para avaliar se

a infecção com *X. albilineans* promove a biossíntese de **(1)** e de **(2)** a partir do consumo do precursor comum **(3)**. Com esse objetivo, foram obtidos extratos das folhas de *M. ilicifolia* antes e após a infecção com *X. albilineans* que foram analisados por CG-EM seguindo a metodologia descrita em “3.6 - Quantificação de friedelina **(3)** nas folhas de plântulas antes e após a infecção por *Xanthomonas albilineans*”, p. 38.

Figura 30. Biossíntese de pristimerina **(1)** e de maitenina **(2)** em raízes de *M. ilicifolia* após infecção de 30 dias com *Xanthomonas albilineans* a partir do precursor comum, friedelina **(3)** presente nas folhas de *Maytenus ilicifolia*.



Proposta de biossíntese para os TQMs pela atividade combinada dos citocromos P450s. A seta tracejada indica várias etapas enzimáticas.

Os cromatogramas obtidos a partir dos extratos das folhas das plântulas de trabalho (**Mi1** e **Mi5**) e plântulas de controle (**C1** e **C2**) antes (Figura 31, p. 73) e após a infecção com *Xanthomonas albilineans* (Figura 32, p. 73) foram registrados e reprocessados de tal forma que as áreas dos picos referentes a **(3)** com tempo de retenção igual a 24,2 minutos determinaram a concentração de **(3)** presentes nos extratos das folhas de *M. ilicifolia*.

Figura 31. Cromatogramas dos extratos obtidos das folhas das plântulas Mi1 (A), Mi5 (B), C1 (C) e C2 (D) antes da infecção com *Xanthomonas albilineans*.

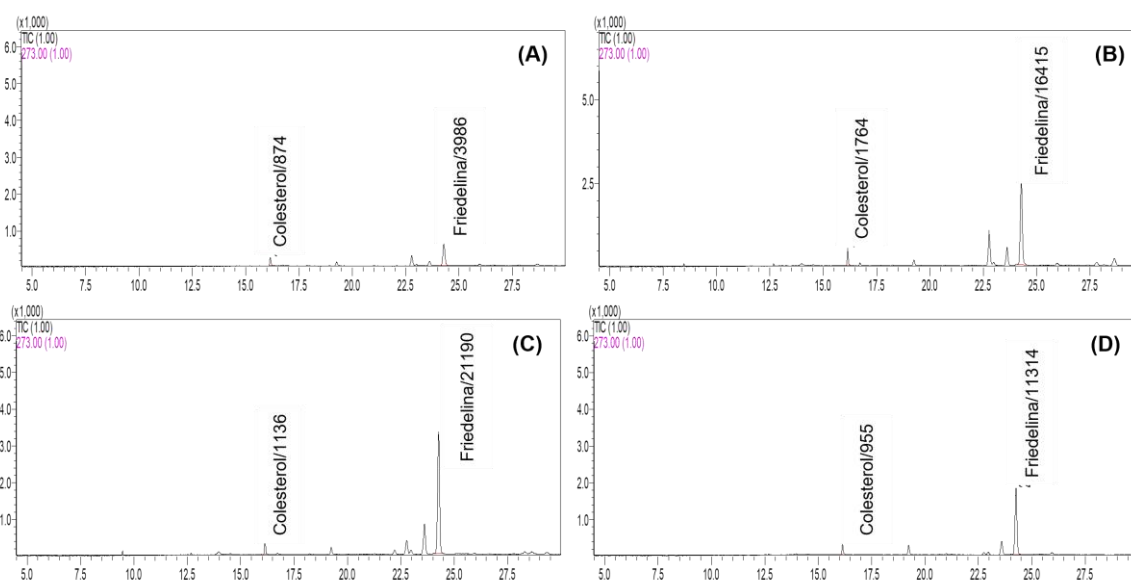
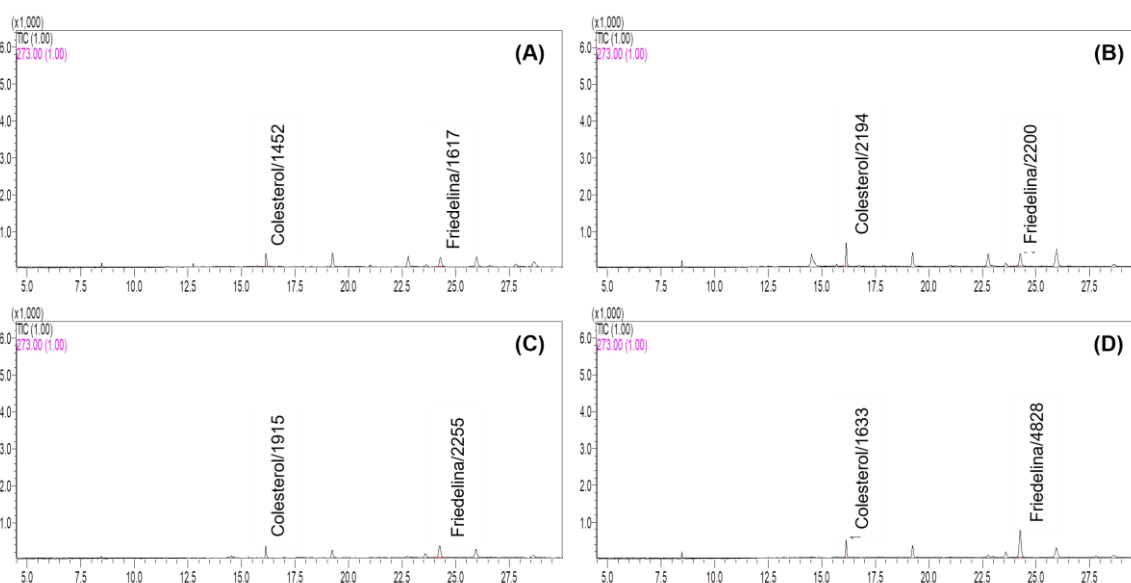


Figura 32. Cromatogramas dos extratos obtidos das folhas das plântulas Mi1 (A), Mi5 (B), C1 (C) e C2 (D) após infecção com *Xanthomonas albilineans*.



A boa resolução cromatográfica dos picos garante a identificação e quantificação de (3) presente nos extratos mostrando a seletividade do método instrumental de separação.

A curva de calibração foi obtida utilizando o colesterol como padrão interno a partir da média das razões entre os valores das áreas do pico referente à friedelina (3) e colesterol *versus* a concentração de friedelina (3) para cada ponto de amostragem para (3) (Tabela 9).

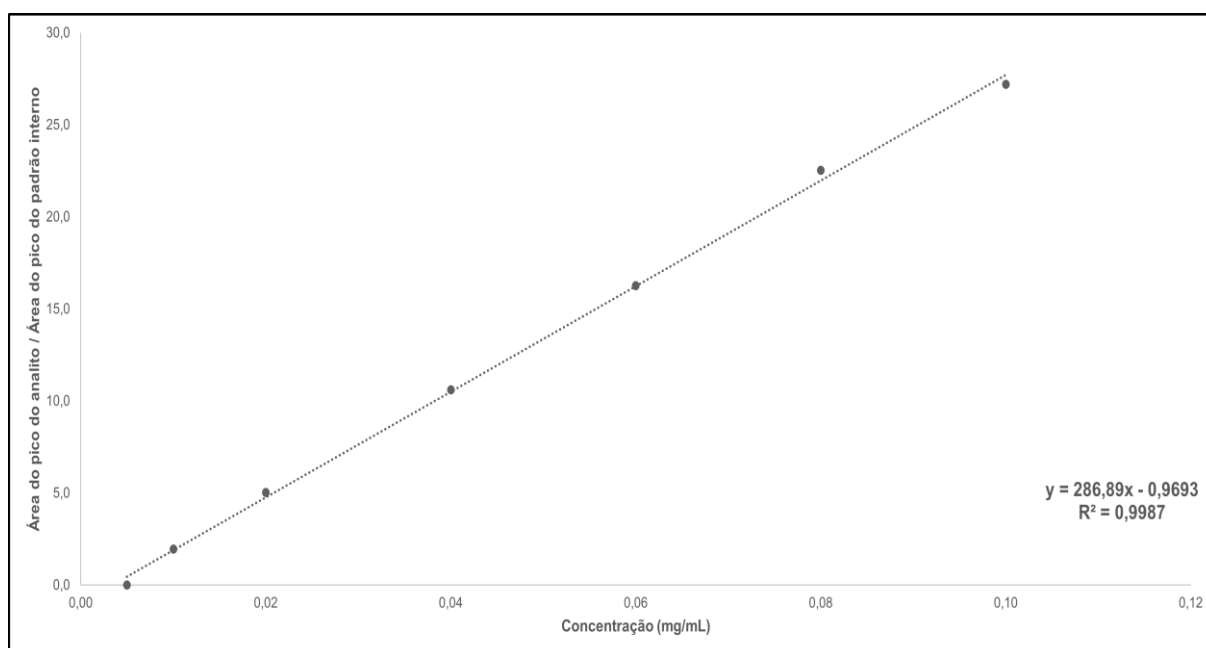
Tabela 9: Média das áreas dos picos integrados após tratamento dos cromatogramas das soluções padrão em GCMSsolution obtidos através da razão entre friedelina (3) e o padrão interno colesterol.

Concentração (mg/mL)	Média (área do pico de (3) / área do pico do colesterol)	DPR* (%)
0,005	0,01	4,9
0,01	1,96	7,1
0,02	5,03	2,5
0,04	10,60	0,9
0,06	16,26	4,3
0,08	22,54	8,5
0,10	27,20	3,0

Os desvios padrão relativo calculados para (3) demonstraram a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos que avaliam a precisão do método e do procedimento experimental realizados (Anvisa, 2017).

A curva de calibração de (3) (Figura 33, p. 75) obtida pela média aritmética entre a razão das áreas dos picos correspondentes à friedelina (3) e o padrão interno colesterol para cada concentração das soluções padrão de (3) demonstrou ótima linearidade da resposta do detector com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9987.

Figura 33. Curva de calibração da friedelina (3).



A equação da reta de regressão de y (área do pico) em x (concentração) foi estimada pelo método dos mínimos quadrados para (3). Calculou-se a concentração de (3) antes e após a infecção com *X. albilineans* (Tabela 10, p. 76) presente nos extratos a partir da média das áreas dos picos obtidos como resposta.

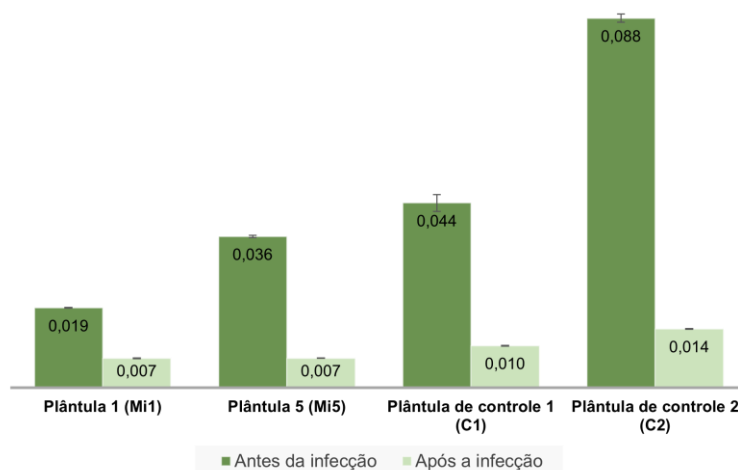
Tabela 10: Médias das áreas dos picos integrados e concentração média (mg/mL) da friedelina (3) das plântulas **Mi1**, **Mi5**, **C1** e **C2** antes e após a infecção com *X. albilineans*.

Plântula 1 (Mi1)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
4,6	0,019 ± 0,0001	1,1	0,007 ± 0,0001
Plântula 5 (Mi5)			
Antes da infecção com <i>X. albilineans</i>		Após infecção com <i>X. albilineans</i>	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
9,4	0,036 ± 0,0003	1,0	0,007 ± 0,00004
Plântula de controle 1 (C1)			
Antes inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
11,7	0,044 ± 0,002	2,0	0,010 ± 0,0001
Plântula de controle 2 (C2)			
Antes inoculação com meio de cultura XAS		Após inoculação com meio de cultura XAS	
Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)	Média das áreas dos picos	Concentração média (mg/mL)
11,6	0,044 x F* (2)= 0,088 ± 0,001	2,9	0,014 ± 0,0001

*F: fator de diluição das amostras.

As concentrações de (3) diminuíram em todas as plântulas após os estresses causados com as extrações e infecções com *Xanthomonas albilineans*, podendo estar correlacionadas com a utilização da friedelina para a produção dos quinonametídeos, cuja concentração encontra-se maior nesses mesmos indivíduos. As plântulas infectadas com a *X. albilineans* tiveram a concentração bem menor quando comparadas às plântulas de controle (Figura 34, p. 77). Tais observações permitem sugerir que (3) está sendo metabolizada para produzir (1) e (2) como resposta ao estresse das extrações e das infecções com a bactéria (Figura 30, p. 72).

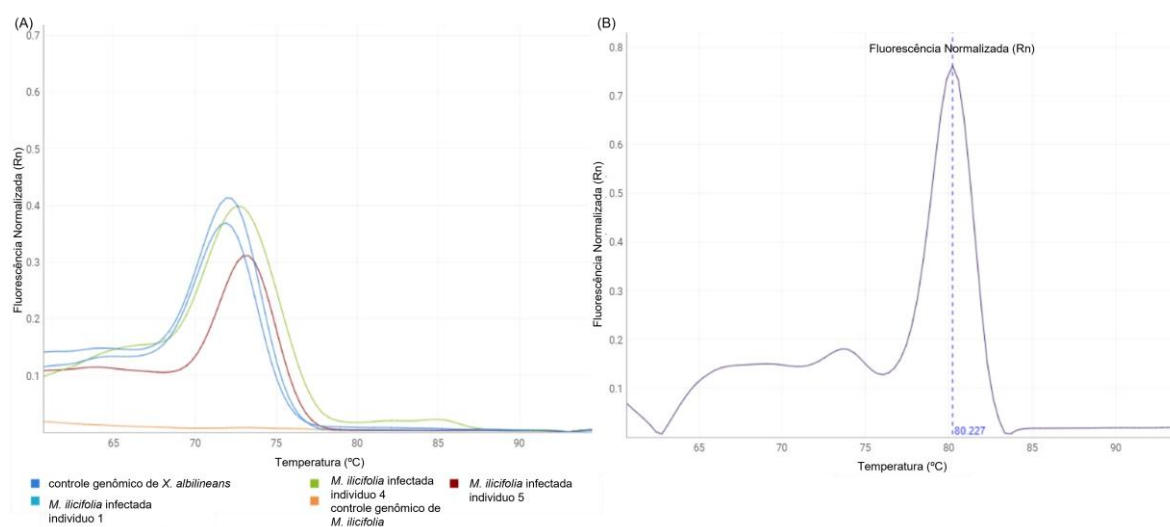
Figura 34. Comparação das concentrações (mg/mL) de friedelina (**3**) antes e após infecções com *Xanthomonas albilineans*.



4.4 - Detecção da infecção das plântulas de *Maytenus ilicifolia* com *Xanthomonas albilineans*

As plântulas de trabalho (**Mi1**, **Mi4** e **Mi5**) e de controle (**C1** e **C2**) que possuíam folhas após o período de infecção tiveram o DNA extraído conforme descrito no item 3.7 - Extração de DNA, p. 39 e analisado. A confirmação da infecção foi obtida pelo método de PCR utilizando SYBR Green. A amplificação do fragmento alvo com par de primers *alb* foi observada para as amostras de DNA das células de pellets do meio de cultura MWB da bactéria controle e da bactéria crescida a partir das folhas incubadas após a infecção (Figura 35, p. 78). Uma única curva de melting indicou a especificidade de amplificação de um único fragmento entre as amostras com o mesmo par de primers. O fragmento de DNA vegetal foi amplificado com Mi40S (Figura 35-B, p. 78), mas ao usar primers *alb* não houve amplificação (Figura 35-A, p. 78). Como controle, o Mi40S não amplificou nenhuma amostra de DNA de células bacterianas centrifugadas e as mesmas reações de PCR controle sem DNA também não amplificaram.

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 *X. albilineans*.



Legenda: (A)= Curvas de melting do controle de crescimento do DNA genômico de *X. albilineans*, células peletizadas após a incubação das folhas e DNA vegetal amplificado utilizando par de primers *alb*. (B)= Curvas de melting do controle de DNA genômico de *M. ilicifolia* utilizando o par de primers Mi40S.

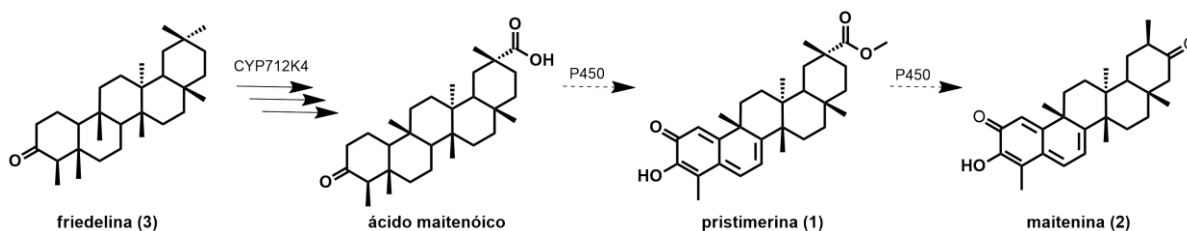
A sensibilidade e especificidade da PCR, bem como a utilização de um corante de afinidade de fita dupla como Power SYBR Green e um par de primers específico são validados para a detecção de infecções por *Xanthomonas spp* em espécies de plantas economicamente importantes como a cana de açúcar, o principal hospedeiro (Wang *et al.*, 2020). A mesma estratégia foi aplicada com sucesso ao presente estudo e confirmou a infecção das plântulas já observada visualmente, trazendo certeza para a análise dos efeitos na via biossintética do TQM como possível resposta à infecção por *X. albilineans*.

4.5 - Análise da expressão gênica das plântulas de *Maytenus ilicifolia* antes e após a infecção com *Xanthomonas albilineans*

A presença da friedelina nas folhas e dos TQMs nas raízes de *M. ilicifolia* foi demonstrada anteriormente, porém a via biossintética completa dessa segunda classe de substâncias ainda não foi descrita (Figura 36, p. 79). Foram confirmados, até o momento, os genes codificadores MiFRS e CYP712K4 responsáveis pela biossíntese dos precursores de TQMs, friedelina e ácido maitenóico,

respectivamente, por meio de sua sequência codificadora e caracterização funcional em *Saccharomyces cerevisiae* (Souza-Moreira *et al.*, 2016; Bicalho *et al.*, 2019b). Portanto, a análise da expressão gênica das sequências codificadoras de MiFRS e CYP712K4 nas folhas e raízes podem corroborar com a análise da especificidade tecidual dos metabólicos identificados em *M. ilicifolia*. Além disso, a infecção por *X. albilineans* em *M. ilicifolia* pode expor qual parte da via está respondendo geneticamente à bactéria e pode ser avaliada posteriormente para determinar outros genes codificadores das enzimas envolvidas na biossíntese de TQMs.

Figura 36. Biossíntese de pristimerina (1) e de maitenina (2) a partir dos precursores friedelina (3) e ácido maitenólico.



Proposta de biossíntese para os (1) e (2) pela atividade combinada dos citocromos P450s. A seta tracejada indica várias etapas enzimáticas.

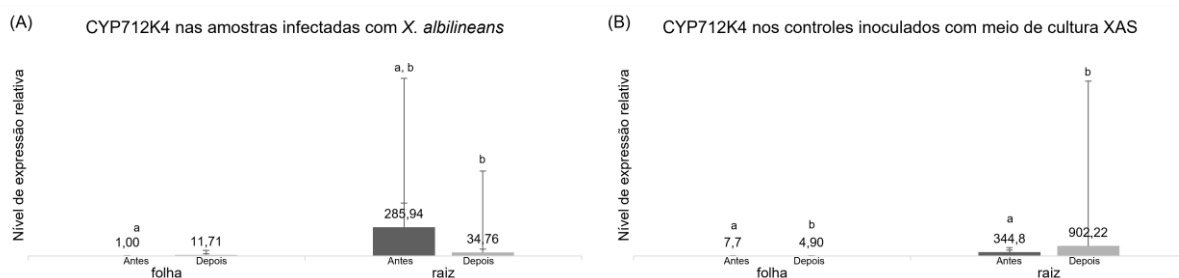
Inicialmente, o nível de expressão de MiFRS e CYP712K4 foi normalizado com a sequência codificadora da proteína ribossômica 40S e o calibrador utilizado foram as amostras de folhas antes da infecção.

Pela análise do nível de expressão destes genes, confirmou-se a compartimentalização da expressão da oxidoredutase que modifica friedelina nas raízes de *M. ilicifolia*. As amostras apresentaram nível maior de expressão da enzima CYP712K4 estatisticamente significativo na raiz quando comparado com a folha (Figura 37, p. 80). É possível observar que existe expressão de MiFRS nas raízes semelhante ou sem diferença estatística em relação às folhas na maioria dos indivíduos (Figura 38, p. 81). Contudo, a expressão de CYP712K4 nas folhas, em todas as situações e indivíduos foi menor que a expressão nas raízes (Figura 37, p. 80).

Ao avaliar o nível de expressão da enzima CYP712K4 após a infecção, observou-se que ele não aumentou, mas sim diminuiu (Figura 37-A, p. 80). Contudo,

nas amostras de controle, aquelas que passaram por um processo semelhante às amostras infectadas com *X. albilineans*, mas sem serem contaminadas, o nível de expressão da CYP712K4 aumentou, porém não foi estatisticamente significativo na raiz (Figura 37-B, p. 80).

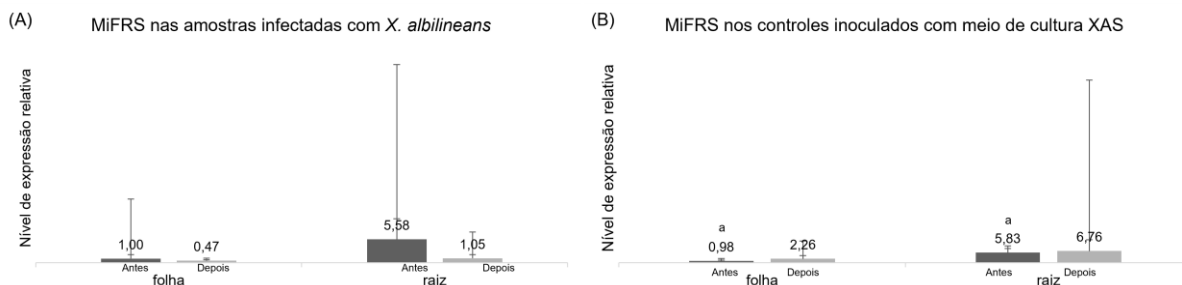
Figura 37. Nível de expressão relativa de CYP712K4 nas raízes e folhas das plântulas infectadas e das plântulas de controle de *M. ilicifolia*.



Legenda: **(A)**= Nível de expressão relativa de CYP712K4 nas raízes e folhas das plântulas antes e depois da infecção com *X. albilineans*: em **a** ocorre variação estatística significativa das amostras de folha e de raiz antes da infecção de *M. ilicifolia* e em **b** ocorre variação estatística significativa das amostras de raiz antes e após a infecção de *M. ilicifolia*. **(B)**= Nível de expressão relativa de CYP712K4 nas plântulas de controle antes e após a inoculação com meio de cultura XAS: em **a** ocorre variação estatística significativa dos controles de folha e de raiz antes da infecção de *M. ilicifolia* e em **b** ocorre variação estatística significativa dos controles de folha e de raiz após a infecção de *M. ilicifolia*.

O nível de expressão do gene MiFRS é maior significativamente na raiz apenas nas amostras de controle, demonstrando que nem todos os indivíduos têm resposta equivalente da expressão desse gene (Figura 38-B, p. 81). Contudo, não foi observada variação estatisticamente significativa do nível de expressão do gene que codifica a friedelina sintase entre as amostras antes ou depois da infecção nos indivíduos infectados e nos controles (Figura 38-A, p. 81).

Figura 38. Nível de expressão relativa de MiFRS nas raízes e folhas das plântulas infectadas e das plântulas de controle de *M. ilicifolia*.



Legenda: **(A)**= Nível de expressão relativa de MiFRS nas raízes e folhas das plântulas antes e depois da infecção com *X. albilineans*. **(B)**= Nível de expressão relativa de MiFRS nas raízes e folhas das plântulas de controle antes e após a inoculação com meio de cultura XAS: em **a** ocorre variação estatística significativa dos controles de folha e de raiz antes da infecção de *M. ilicifolia*.

Tais observações demonstram que a CYP712K4 pode não estar correlacionada a uma resposta do mecanismo de defesa da planta a infecção e o aumento da produção de TQMs pode estar relacionado ao aumento da expressão de outra(s) enzima(s) da via metabólica das plântulas de *M. ilicifolia*, especialmente aquelas envolvidas nas etapas de oxidação dos anéis A e B do esqueleto quinonametídeo (Figura 4, p. 27). Desta forma, o presente trabalho demonstrou que a espécie de *M. ilicifolia* tende a responder a estresse aumentando a proporção de TQMs produzidos pela raiz e que este aumento pode não estar correlacionado com o nível de expressão de genes que codificam enzimas que levam à produção das substâncias iniciais da via, friedelina e ácido maitenólico. Assim, o avanço dos estudos das etapas de biossíntese dos triterpenos quinonametídeos em curso pelo nosso grupo de pesquisa pode trazer novas comprovações ao estudo em epígrafe.

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.