

# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO DE COMPOSTOS E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE *Simaba maiana* Casar. E ANÁLISE  
FUNCIONAL DE CITOCROMOS P450 ENVOLVIDOS NA  
BIOSSÍNTESE DE MONOTERPENÓIDES EM *Arabidopsis  
thaliana***

Érica Verena Figueirêdo Cambui

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**ÉRICA VERENA FIGUEIRÊDO CAMBUI**

**Isolamento de compostos e atividades biológicas de *Simaba maiana* Casar. e  
análise funcional de citocromos P450 envolvidos na biossíntese de  
monoterpenóides em *Arabidopsis thaliana***

Maceió – AL  
2012

**ÉRICA VERENA FIGUEIRÊDO CAMBUI**

**Isolamento de compostos e atividades biológicas de *Simaba maiana* Casar. e  
análise funcional de citocromos P450 envolvidos na biossíntese de  
monoterpenóides em *Arabidopsis thaliana***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Doutor em Ciências*.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danièle Werck

Maceio– AL  
2012

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

- C383i Cambui, Erica Verena Figueirêdo.  
Isolamento de compostos e atividades biológicas de *Simaba maiana* Casar. e análise funcional de citocromos P450 envolvidos na biossíntese de monoterpenóides em *Arabidopsis thaliana* / Erica Verena Figueirêdo Cambui, 2012.  
172 f. : il. tabs., graf.
- Orientadores: Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana; Danièle Werck.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió ; Intitute of Plant Molecular Biology. Strasbourg, 2012.
- Bibliografia: f. 158-168.  
Apêndices: 169-172.
1. Citotoxicidade. 2. Dano Oxidativo. 3. Moluscicida. 4. Terpeno Sintases. 5. Flores. I. Título.

CDU: 547.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA




BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1384  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com


FOLHA DE APROVAÇÃO

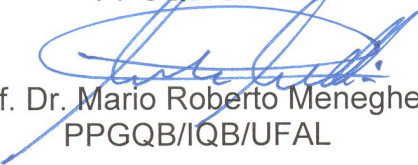
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Érica Verena Figueirêdo Cambui**, intitulada: **“Isolamento de Compostos e Atividades Biológicas de *Simaba maiana* Casar e Análise Funcional do Citocromo P450 Envolvido na Biossíntese de Monoterpenos em *Arabidopsis thaliana*”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 31 de julho de 2012, às 10 horas, na Sala de Aulas do PPGQB UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Orientador/Presidente - PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Danièle Werck  
Orientador- Institute of Plant Molecular Biology em Strasbourg

  
Prof. Dr. Alessandro Riffel  
PPGQB/UFAL

  
Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti  
PPGQB/IQB/UFAL

  
Prof. Dr. José Fernando Oliveira Costa  
FIOCRUZ/BA

  
Prof. Dr. Isis Martins Figueiredo  
IQB/UFAL

*Dedico esse trabalho a todas as  
pessoas, que assim como eu,  
enfrentaram inúmeros desafios  
em busca de um ideal.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão das bolsas de estudo no Brasil e na França.

Ao Prof. Antônio Euzébio Goulart, por ter me aceitado como orientanda, pelos ensinamentos, paciência e sábios conselhos.

A Prof. Danièle Werck por ter me recebido para fazer parte do seu grupo, por toda atenção, carinho e paciência.

Ao super querido, colega de laboratório em Strasbourg-França, Jean-François Ginglinger, por ter me recebido para fazer parte seu projeto, pela paciência ao me explicar todos os protocolos para o desenvolvimento dos nossos experimentos, me ajudar sempre quando eu estive “desnorteada” em território francês, além da disponibilidade para discutir sobre os resultados, pelas figuras, sugestões e correções do trabalho.

A querida Isis Torres, a I.C., agora mestranda e dona do HPLC. A mais inteligente, dedicada e esperta IC que eu tive a oportunidade de conhecer durante os meus anos trabalhando com pesquisa. Muito obrigada pela paciência e ajuda nos momentos em que eu chamava “Isi”, seja dentro e fora do laboratório. Aquela sua dancinha fez muito sucesso nos nossos experimentos e a alegria dos nossos sábados!

Ao grande amigo Charles dos Santos Estevam, que me serviu de exemplo e me incentivou desde a minha época de I.C. na Universidade Federal de Sergipe.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Pesquisa em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Sergipe, pelos 3 meses que estive trabalhando. O desenvolvimento dos protocolos não teria sido possível sem ajuda da equipe. Os meus agradecimentos especiais, aos amigos André Luiz dos Santos, Amanda Bion, Brancilene Araújo, Clésio Andrade, Vítor Araújo e Ximene Azevedo, pela amizade e cumplicidade nesses muitos anos.

As colegas do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas, Cenira Monteiro, Maria Beatriz Oliveira e Roberta Ferreira por terem contribuído em alguns experimentos.

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) pela realização de alguns experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Ressonância Magnética da Universidade Federal de Alagoas, pela realização dos experimentos de ressonância, em especial, ao Prof. Edson Bento, Adilson Rodrigues e Daniel Inácio pelas discussões sobre ressonância.

A Simone Fiuza Conceição, botânica da Universidade Federal do Recôncavo Baiano, pela colaboração, atenção e simpatia quando atendeu a minha solicitação para ajuda para o trabalho de caracterização botânica do pau-pra-tudo.

Ao Dr. Jonathan Gershenzon, Dr. Tobias Köllner, por terem recebido, a mim e a Jean-François, no Max Planck Institut für Chemische Ökologie em Jena na Alemanha, durante uma semana, para pudéssemos desenvolver parte do nosso trabalho.

Ao super querido Colorado Sandro Nornberg, pela amizade durante os trabalhos no Max Planck Institut für Chemische Ökologie em Jena na Alemanha e palavras de apoio no momento da escrita.

A Patricia Dekamura da Universidad de Buenos Aires na Argentina, pelas dicas e palavras amigas durante a elaboração da parte escrita do trabalho.

Ao amado Daniel Lira, pelas dicas tecnológicas, carinho e paciência de sempre, sem esquecer, da imensa ajuda com os espectros de infravermelho; e a Milena Duarte, pela introdução ao uso do HPLC e por tantos momentos divertidos em que estivemos juntas.

Aos colegas Allan Jhonn Freitas, Benisio Ferreira Filho, Carla Karine Barbosa, Cláudia Mattos, Daniel Moraes, Edjane Vieira, Élica Amara Guedes, Grazielly Silmara, Henrique Fonseca, Ihanara Lima, Inez Auad, Indrid Sofia Melo, Jaim Simões, João Gomes, Júnia Porto, Kirley Michelly Marques, Wbyratan Luis Silva, Lusitâneo Macuvele, Maria Amélia Lima, Maria Emília Menezes, Mariana Oliveira, Mikael Freitas, Natália Velasquez, Pedro Aquino, Thyago Ribeiro, Wanderson Barbosa, dentre muitos outros que passaram pelo Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas. Em especial, Ana Lucila Costa, Daniel Melo, Dannielle de Lima, Edilson Alves e Luciana Viana, que me ajudaram, orientaram e foram sempre muito amigos durante esses anos. Eu nunca esquecerei do momento em que vocês resolveram me “adotar” quando cheguei em Maceió.

A flor mais linda do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas, Margarida Teodoro e ao maravilhoso super herói Aldy Santos.

Aos colegas do Institut de Biologie Moléculaire des Plants em Strasbourg-França, Agnès Lesot, Carole Gavira, Dimitri Heintz, Elisabeth Blée, Fabienne Philippon, Frank Pinot, Jean-Etienne Bassard, Juliana Iglesias, Marta Ramel, Pascaline Ulmann, René Höfer, Sandrine Mathieu e Zhenhua Liu, em especial, aos meus amores Benoît Boachon, Bernard Grausem, Hugues Renault e Raphaël Lugan.

Aos professores do Instituto de Química e Biotecnologia, Fabiane Caxico, Josealdo Tonholo, Marília Oliveira Fonseca, Sônia Machado.

A Adriana de Lima Mendonça, Alessandro Riffel e Jhonnatan Duarte Freitas pelas correções do trabalho de qualificação.

Ao Prof. João Xavier, por toda ajuda e por ter me apresentado Martine, o meu anjo na França.



A Prof. Martine Schmitt e Alexandra Lopes da Faculté de Pharmacie da Université de Strasbourg-França, por terem me recebido em Strasbourg com todo carinho, sem esquecer da grande ajuda e cuidados na França.

A todos os que fazem parte da Secretaria de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, em especial, a Rejane Montenegro do Nascimento, por toda carinho, dedicação, amizade e pelo atendimento de excelência prestado a mim, e a todos os alunos regulares ou especiais.

Aos meus queridos da Aliança Francesa de Sergipe e Alagoas, Divamaria Moreira, Guilherme Serra, Ignez Barros, Ricardo Oliveira e Yann Hamonic. Se vocês não tivessem feito parte da minha vida, eu jamais teria conseguido sobreviver na França. Muito obrigada por todos os momentos, conselhos, dicas e aprendizado.

Aos grande amigos que moram em Sergipe, Andréa Rodrigues Souza, Bruno Trindade Cardoso, Felipe Trindade Cardoso, Jane Francisca Nascimento e Walker Souza por toda ajuda, incentivo e anos de amizade.

Aos amigos Antônio Bittencourt, Bruno Anderson Rocha, Diego Baracho, Eliane Campesatto e Thaís Soares, em especial aos irmãos mais lindos Osineide Cavalcante, Ozival Cavalcante, por toda ajuda, carinho, amizade e paciência. Muito obrigada de coração.

Aos amigos Alex Alexandre Carvalho, Antônio Medeiros e Francisco Silva, por toda ajuda e momentos vivenciados.

Ao amigo Francisco Fidelis de Moura, por toda ajuda, conselhos, palavras de incentivo e amizade.

A minhas amigas e confidentes que me acompanham, Diana Bordin desde Paris, e Inessa Lacativa, que esteve comigo no curso do CBAB-CABIO na Argentina.

Ao meu amigo e namorado, Fevzi Demir, por toda atenção, amor, paciência e compreensão.

A minha família pelo apoio e compreensão durante todos os anos de estradas pelas as quais eu já andei.

*"Tenho pensamentos que, se pudesse revelá-los e fazê-los viver, acrescentariam nova luminosidade às estrelas, nova beleza ao mundo e maior amor ao coração dos homens."*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO GERAL

Os metabólitos secundários são compostos que não são necessários para a sobrevivência do organismo, mas que apresentam-se relacionados com a interação do organismo com o seu ambiente. O presente trabalho estudou compostos do metabolismo secundário através do estudo químico e biológico dos extratos e frações *Simaba maiana* Casar. e a envolvimento dos genes candidatos (*TPS10*, *TPS14*, *CYP76C3* e *CYP71B31*) no metabolismo de monoterpenóides em *Arabidopsis thaliana*. Os extratos das raízes e caule de *Simaba maiana* foram testadas em ensaios de atividade antioxidante, moluscicida, inibição da linfoproliferação, inibição da produção de NO, anti-*Leishmania amazonensis* e anti-*Trypanosoma cruzi*. Os quatro genes candidatos (*CYP76C3*, *CYP71B31*, *TPS10* e *TPS14*) foram selecionados com o CYPedia, que calcula a co-expressão entre os genes de *Arabidopsis* com base no Affymetrix ATH1 microarray. Os extratos e frações de *Simaba maiana* mostraram uma baixa atividade antioxidante pelo método do DPPH, baixas concentrações de fenóis totais avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu, entretanto, uma boa atividade antioxidante pelo método de TBARS, usando três agentes de danos oxidativos (AAPH, FeSO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os extratos mostraram atividade moluscicida e citotóxica na concentração de 100 mg/mL. O extrato bruto do caule não foi ativo para as atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma*. Este extrato não inibiu a produção de NO, mas apresentou uma alta porcentagem da inibição da linfoproliferação. O alcalóide furoquinolínico esquiamina e a furanocumarina felopterina foram isolados da fração clorofórmica. Os genes candidatos mostraram um similar padrão de expressão nos estames, mais especificamente na parte superior dos filamentos. Na expressão heteróloga transitoriamente expressa em folhas de *Nicotiana benthamiana*, nos voláteis de *TPS10* e *TPS14* (sozinho) foram encontrados os enantiômeros R(-)-linalol e S(+)-linalol. No tampão de extração de discos de folhas, verificou-se que *CYP76C3* converte linalol em *E*-8-hidroxi-linalol e *E*-8-oxo-linalol, e *CYP71B31* em 1,2-epoxi-linalol. A análise do extrato metanólico dos discos foliares incubados em S(+)-linalol mostrou a utilização deste substrato por P450s convertendo para lilac álcool para ambos os P450s. Análises de flores em plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* mostraram pequenas diferenças, em que análises com extratos de flores frescas em UPLC-MS/MS no modo MRM, foi encontrado um composto com a mesma assinatura que linalol, no entanto, com tempo de retenção diferente e pode ser uma indicação de forma ligada do linalol.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade. Dano Oxidativo. Moluscicida. Flores. Terpeno Sintases.

## GENERAL ABSTRACT

Secondary metabolites are compounds that are not necessary for the survival of the organism, but which are to be related to the organism's interaction with its environment. This work studied compounds of secondary metabolism through the study of chemical and biological extracts and fractions *Simaba Maiana* Casar. and the involvement of candidate genes (*TPS10*, *TPS14*, and *CYP71B31* *CYP76C3*) in the metabolism of monoterpenes in *Arabidopsis thaliana*. The extracts from roots and stems of *Simaba Maiana* were tested in antioxidant activity, molluscicide, inhibition of lymphocyte proliferation, inhibition of NO production, anti-*Leishmania amazonensis* and anti-*Trypanosoma cruzi*. The four candidate genes (*CYP76C3*, *CYP71B31*, *TPS10* and *TPS14*) were selected with the CYPedia, which calculates the co-expression between genes based on the Arabidopsis Affymetrix ATH1 microarray. The extracts and fractions *Simaba Maiana* showed a lower antioxidant activity by DPPH method, low concentrations of total phenols measured by Folin-Ciocalteu, however, a good antioxidant activity by TBARS method, using three agents of oxidative damage (AAPH, FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The extract showed cytotoxic activity and molluscicidal concentration of 100 mg/mL. The crude extract of the stem was not active for leishmanicidal and trypanocidal. This extract did not inhibit NO production, but showed a high percentage of inhibition of lymphoproliferation. The skimmianine furoquinoline alkaloid and pellopterin furanocoumarin were isolated from chloroform fraction. The candidate genes showed a similar pattern of expression of the stamen, more specifically the top of the filaments. Heterologous expression in transiently expressed in leaves of *Nicotiana benthamiana*, in the volatiles of *TPS10* *TPS14* (alone) were found enantiomers R-(-)-linalool and S-(+)-linalool. In the extraction buffer leaf discs were found that *CYP76C3* converts linalool to *E*-8-hydroxy-linalool and *E*-8-oxo-linalool, and *CYP71B31* in 1,2-epoxy-linalool. The analysis of the methanol extract of the discs incubated in S-(+)-linalool showed the use of this substrate by P450s converting to lilac alcohol for both P450s. Analysis of flowers of *Arabidopsis* mutants showed minor differences, analyzes with extracts of fresh flowers in UPLC-MS/MS MRM mode, has been found a compound having the same signature as linalool, however with different retention time and may be is an indication of linalool bound.

**Keywords:** Cytotoxicity. Oxidative Damage. Molluscicide. Flowers. Terpene Synthases.

**Esse trabalho apresenta-se dividido em duas partes:**

**Parte A**

**Isolamento de compostos e atividades biológicas de *Simaba maiana* Casar.  
(*Simaroubaceae*)**

**O trabalho foi desenvolvido no Brasil, com bolsa de pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo nº140863/2008-7.**

**Parte B**

**Functional analysis of cytochromes P450 involved in the biosynthesis of  
monoterpenoids in *Arabidopsis thaliana***

**O trabalho foi desenvolvido na França, com bolsa de pesquisa da Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE) processo nº3840-10/7.**

## SUMÁRIO GERAL

<b>PARTE A Isolamento químico e atividades biológicas de <i>Simaba maiana</i> Casar. (Simaroubaceae) .....</b>	<b>15</b>
<b>PARTE B Functional analysis of cytochromes P450 involved in the biosynthesis of monoterpenoids in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>102</b>

## **Parte A**

**Isolamento de compostos e atividades biológicas de  
*Simaba maiana* Casar. (Simaroubaceae)**

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
2	<b>CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA</b> .....	26
3	<b>SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> ...	27
4	<b>ALCALÓIDES</b> .....	31
5	<b>CUMARINAS</b> .....	32
6	<b>CONSIDERAÇÕES SOBRE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS</b> ....	33
7	<b>IMUNOMODULADORES</b> .....	36
8	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
8.1	<b>Instrumentação e procedimentos gerais</b> .....	38
8.2	<b>Solventes</b> .....	39
8.3	<b>Preparação do extrato alcoólico</b> .....	39
8.4	<b>Procedimentos cromatográficos com o extrato vegetal</b> .....	42
8.4.1	Processo de partição líquido-líquido.....	42
8.4.2	Isolamento dos compostos da fração CHCl <sub>3</sub> .....	43
8.5	<b>Quantificação de Fenóis Totais – Método de Folin-Cioclatau (FCR)</b> .....	48
8.6	<b>8.6. Atividade Antioxidante</b> .....	48
8.6.1	Ensaio Quantitativo da Atividade Antioxidante – Método do Radical DPPH.....	49
8.6.1.2	Curva de Calibração do DPPH.....	49
8.6.1.3	Leitura das Medidas de Absorvância nas Amostras.....	49
8.6.2	Ensaio de TBARS.....	50
8.7	<b>Teste de Citotoxicidade</b> .....	51
8.8	<b>Avaliação da Atividade Moluscicida</b> .....	51
8.9	<b>Avaliação da Atividade Inibitória da Produção de óxido Nítrico (NO)</b> .....	52
8.10	<b>Atividade Inibitória de Linfoproliferação</b> .....	53
8.11	<b>Avaliação da Atividade anti-<i>Leishmania amazonensis</i></b> .....	54



<b>8.12</b>	<b>Avaliação da Atividade anti-<i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	55
<b>8.13</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	55
8.13.1	Atividade Antioxidante.....	55
8.13.2	Teste de Citotoxicidade.....	56
8.13.3	Avaliação da Atividade Moluscicida.....	56
8.13.4	Avaliação da atividade inibitória da produção de Óxido Nítrico (NO).....	56
8.13.5	Avaliação da Atividade anti- <i>Leishmania amazonensis</i> .....	56
8.13.6	Avaliação da Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	57
<b>9</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>9.1</b>	<b>Fitoquímica</b> .....	58
9.1.2	Identificação das substâncias.....	58
9.1.2.1	Identificação do composto FC2010.....	58
9.1.2.2	Identificação do composto FC02.....	63
<b>9.2</b>	<b>Atividades biológicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b> .....	65
9.2.1	Avaliação da atividade antioxidante – Método do radical DPPH e quantificação de fenóis totais – Método de Folin-Ciocalteu (FCR).....	65
9.2.2	Ensaio de TBARS – Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.....	68
9.2.3	Teste de Citotoxicidade.....	73
9.2.4	Avaliação da Atividade Moluscicida.....	75
9.2.5	Avaliação da Atividade Inibitória da Produção de óxido Nítrico (NO) e Atividade Inibitória de Linfoproliferação.....	76
9.2.6	Avaliação da Atividade anti- <i>Leishmania amazonensis</i> e anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	78
<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	80
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
	<b>APÊNDICES</b> .....	90

## RESUMO

No Brasil é comum o uso de plantas medicinais nativas para o tratamento de doenças. Os extratos de plantas são uma matriz complexa contendo centenas de metabólitos. Uma eficiente triagem dos extratos pode ser realizado através de um controle biológico e químico realizado simultaneamente. O objetivo deste trabalho é o estudo químico e biológico dos extratos e frações *Simaba maiana* Casar. Os extratos das raízes e caule foram testadas em ensaios antioxidante, moluscicida, inibição da linfoproliferação, inibição da produção de NO, anti-*Leishmania amazonensis* e anti-*Trypanosoma cruzi*. Os extratos e frações apresentaram uma baixa atividade antioxidante pelo método do DPPH, baixas concentrações de fenóis totais avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu, entretanto, uma boa atividade antioxidante pelo método de TBARS, usando três agentes de danos oxidativos (AAPH, FeSO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os extratos apresentaram atividade moluscicida e citotóxica na concentração de 100 mg/mL. O extrato bruto do caule não foi ativo para as atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma*. Este extrato não inibiu a produção de NO, mas apresentou uma alta porcentagem da inibição da linfoproliferação. O alcalóide furoquinolínico e a furanocumarina felopterina foram isolados da fração clorofórmica.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade. Dano Oxidativo. Moluscicida.

## ABSTRAT

In Brazil is common the use of native medicinal plants to treatment of diseases. Plant extracts are a complex matrix containing hundreds of metabolites. An efficient screening of the extracts can be achieved by biological and chemical monitoring performed simultaneously. The objective of this project is the chemical bioactivity of extracts and fractions of *Simaba maiana* Casar. The roots and stem extracts were tested in assays antioxidant, molluscicide, inhibition of lymphoproliferation, inhibition of NO production, anti-*Leishmania amazonensis* and anti-*Trypanosoma cruzi*. The extracts and fractions showed a low antioxidant activity by DPPH method, low concentrations of total phenols measured by Folin-Ciocalteu, however, a good antioxidant activity by TBARS method, using three agents (AAPH, FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) that induce damage oxidation. The extracts showed molluscicidal and cytotoxic activity in concentration of 100 mg/mL. The crude extract of the stem was not active in testing leishmanicidal and trypanocidal. This extract did not inhibit NO production, but have a high percentage inhibition of lymphoproliferation. The skimmianine furoquinoline alkaloid and pellopterin furanocoumarin were isolated from chloroform fraction.

**Key-words:** Cytotoxicity, damage oxidation, molluscicidal.

## ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
C.L.	Concentração letal
C.I.	Concentração Inibitória
DEPT	Distortion less Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2 difenil-1-picril hidrazila
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]
D <sub>2</sub> O	Água Deuterada
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
e.g.	<i>exempli gratia</i> - "por exemplo"
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
Hz	Hertz
i.e.	<i>id est</i> –"isto é"
IV	Infravermelho
IP	Percentual de Inibição
MeOH	Metanol
n-BuOH	<i>n</i> -butanol
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Hexano
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

RMN <sup>1</sup>H

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

UV

Ultravioleta

## 1 INTRODUÇÃO

O Homem ocupa um lugar especial na natureza pela sua enorme capacidade de sobreviver, adaptar-se e, principalmente, pela possibilidade de usar para sua conveniência o ambiente que o cerca e a diversidade biológica nele contida.

A diversidade biológica ou biodiversidade pode ser definida como a variedade e a variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais elas ocorrem (GUERRA e NODARI, 2004).

Na diversidade biológica, encontram-se os recursos genéticos, que compreendem as espécies de plantas, animais e microrganismos, todos esses componentes interagindo entre si e nos sistemas biológicos. Esta biodiversidade exerce influência ao nível de todos os componentes de um agroecossistema (LABRADOR MORENO e ALTIERI, 1994).

Os recursos genéticos de forma geral, segundo Valois et al. (2001), possuem interesse sócio-econômico real e potencial visando à utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins. Dessa forma, os recursos genéticos podem ser considerados como um reservatório no qual podem ser encontradas soluções para as diversas alterações ambientais pelas quais o mundo está passando; além de funcionar como matéria prima para o desenvolvimento da humanidade.

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006). Os produtos da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica (GUERRA e NODARI, 2004), entretanto tamanha a magnitude da biodiversidade brasileira que muito pouco foi investigado.

A utilização de plantas medicinais nativas no tratamento de enfermidades é uma prática exploratória e largamente difundida no Brasil. A maioria das espécies tem sido utilizada de forma extrativista e o crescimento da população humana, com a ocupação de áreas naturais, vêm aumentando a pressão destrutiva sobre esta

flora (ROSA e FERREIRA, 2001). No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (CAPASSO et al., 2000).

Considerando o metabolismo secundário, os vegetais produzem uma gama de substâncias (e.g., alcalóides, flavonóides, terpenos) que, além de desempenharem funções fisiológicas, resultam em interações entre plantas e animais. Estas substâncias químicas são de grande importância na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais (SILVA, 2004). Os metabólitos secundários são o resultado da especialização celular e suas manifestações durante certas fases do desenvolvimento do organismo produtor se devem à expressão diferencial dos genes (GOTTLIEB et al., 1996).

Todas as plantas produzem metabólitos secundários, que variam em qualidade e quantidade de espécie para espécie, até mesmo na quantidade dos metabólitos de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles têm sua síntese desencadeada por eventuais vicissitudes às quais as plantas estão expostas (e.g., estresse hídrico). Essa variação de compostos nas plantas pode estar relacionada a fatores genéticos, ecológicos e fisiológicos (BROWN JÚNIOR, 1988).

Os extratos vegetais constituem uma matriz bem complexa contendo centenas de metabólitos, que diferem em seus parâmetros físico e espectroscópicos. Por isso uma eficiente detecção e rápida caracterização têm papel fundamental na pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos. Muitas vezes as propriedades das plantas são relatadas pela população, as quais são confirmadas em sua maioria nos estudos científicos, comprovando a importância da pesquisa etnofarmacológica (NOLDIN, 2005). Uma triagem eficiente dos extratos é alcançada através do monitoramento biológico e químico realizados concomitantemente.

A análise orgânica instrumental tem permitido avanços significativos do conhecimento em áreas da química, bioquímica e farmacologia, a nível acadêmico e tecnológico. O desenvolvimento de novos equipamentos, de sistemas de programas de gerenciamento de dados e a expansão das possibilidades de aplicação de técnicas analíticas tem subsidiado o uso da análise orgânica instrumental na área

biotecnológica, com reflexos diretos e imediatos sobre a qualidade da informação gerada.

A utilização cada vez mais acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros, requerem uma completa investigação da segurança e eficácia, uma vez que tem crescido o número de evidências acerca da associação entre a exposição a determinados agente químicos e uma série de doenças e alterações metabólicas prejudiciais à saúde humana (RIBEIRO et al., 2003; VARANDA, 2006). Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas com a mesma finalidade (BRASIL, 2006).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por um público cada vez maior e vem recebendo incentivo da Organização Mundial da Saúde (OMS), que recomendou aos países membros que desenvolvessem pesquisas visando o uso da flora com propósitos terapêuticos (CASTRO et al., 2004). Em 2006, foram aprovados documentos de suma importância que norteiam aspectos de toda cadeia produtiva dos fitoterápicos no país, bem como seu uso como terapêutica oficial, dentre os quais, se destacam a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). No âmbito da Fitoterapia essa política tem por objetivo garantir à população brasileira o acesso ao uso racional das plantas medicinais, promovendo o uso da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e a sustentabilidade da indústria nacional.

Esse grande crescimento do uso das plantas medicinais é devido a estudos biológicos e químicos que comprovem a eficácia das plantas utilizadas. Assim, a importância das plantas medicinais relaciona-se a sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo (com mecanismo de ação inovador) devido à diversidade de constituintes presentes nestas (YUNES et al., 2001).

De acordo com Rosa (2000), o progresso da fitoterapia e a obtenção de fitofármacos dependem do acesso facilitado a plantas produtoras de substâncias



biologicamente ativas, mas tendo cautela na utilização desses, pois muitos deles necessitam de estudos mais detalhados sobre seus efeitos.

Normalmente são poucos os produtos de origem vegetal que possuem atividade farmacológica que foram isolados de extratos de plantas, mais escassos ainda são os estudos *in vivo* e *in vitro* de extratos derivados de plantas do Brasil, considerando a enorme biodiversidade oferecida pela nossa flora (KELLOFF et al., 2000).

Na região Nordeste, existe um predomínio de caatingas, associadas a carrascos e mata de altitude (matas de brejo), além de áreas de cerrado e de campo rupestre, mata atlântica e vegetação costeira, entre outras. Este cenário ocupa 18 % do território nacional (1.558.196 km<sup>2</sup>), onde vivem mais de 49 milhões de habitantes, dos quais, 27,2 milhões habitam a área rural (IBGE, 2012). A importância de se estudar esses agroecossistemas, visa não somente o conhecimento de seu perfil químico e a descoberta de novas substâncias úteis ao homem, mas também a sua preservação (PINTO et al., 2002; GUARIM NETO e MORAIS, 2003).

Diante do exposto, o interesse em estudar a *Simaba maiana* Casar. é fundamentado pelo o uso em grande escala por parte da população nordestina dessa espécie para fins medicinais.

## 2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA

Com distribuição pantropical, a família Simaroubaceae família de plantas (ordem Sapindales, subclasse Rosidae, classe Magnoliopsida), compreende 32 gêneros, onde os representantes são lenhosos, arbustos ou árvores cujas folhas alternas compostas ou inteiras, com ou sem espinhos. (JOLY, 1998).

De acordo com Saraiva et al. (2011), a família Simaroubaceae está relacionada botanicamente com Rutaceae, Meliaceae e Burseraceae, porém dentro desse grupo, ela encontra-se mais próxima à família Rutaceae no que se refere à composição química, anatomia da madeira, ausência de vasos condutores de resina na casca do caule e presença de estames livres em suas flores.

As espécies da família Simaroubaceae são conhecidas por suas propriedades medicinais, onde são utilizadas tradicionalmente para tratamento da malária, anti-helmínticos, antitumorais, obesidade, distúrbios gastrointestinais, antiinflamatória, antineoplásica e antiespasmódica (TOMA et al., 2002; MUHAMMAD et al., 2004)

Os constituintes químicos comuns encontrados em espécies do gênero *Simaba* são quassinóides (*i.e.*, triterpenos) e alcalóides, que provavelmente são responsáveis pela atividade antineoplásica, antimalárica, citotóxica, antipirética, antiúlcera, estimulante do sistema nervoso central, antiinflamatória, estimulante da propulsão intestinal e antiespasmódica (CABRAL et al., 1993; GRUPTA, 1995; MARCELLO et al., 2002a e b; MORETTI et al., 1994; POLONSKY et al., 1998; SARAIVA, 2004; OZEKI et al., 1998; WANI et al., 1978).

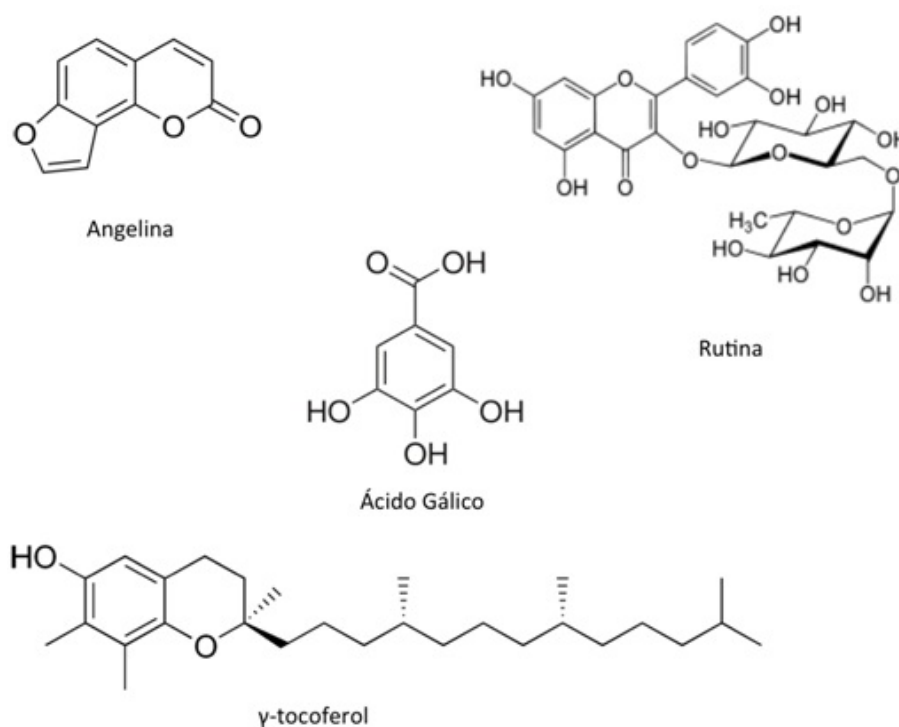
A *Simaba maiana* Casar. é conhecida na região Nordeste, mais precisamente no semi-árido baiano, como “pau-pra-tudo“, “pra tudo“ ou “para tudo“; sendo utilizada, pela população, como solução para todos os males segundo a tradição.

### 3 SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As substâncias fenólicas são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, contribuírem na pigmentação, podem se formar em condições de estresse (e.g., infecções, ferimentos, radiações UV), atuam como agente antipatogênico e em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (NACZK e SHAHIDI, 2004).

As substâncias fenólicas são largamente distribuídos na natureza e são encontrados em todo reino vegetal. Alguns grupos podem estar localizados em uma só espécie. Quimicamente, os fenólicos são definidos como compostos que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo outros grupos funcionais (LEE et al., 2005). Existem cerca de cinco mil fenóis, que estão divididos em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING e YOUNG, 1999; NACZK e SHAHIDI, 2004).

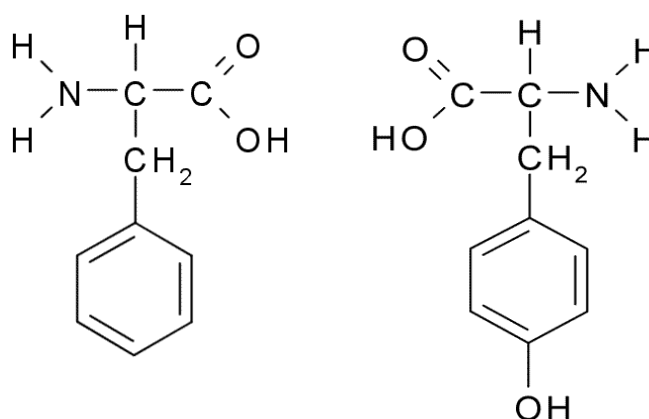
**Figura 01 Exemplo de algumas substâncias fenólicas.**



Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Devido às suas estruturas químicas heterogêneas, podem ser encontrados nas formas livres ou conjugados, podendo estar ligados a uma grande variedade de compostos naturais como a glicose, xilose e ramnose, por meio e ligações glicosídicas, o que aumenta ainda mais a sua variedade (BRAVO, 1998; PICCIN, 2004). A síntese das substâncias fenólicas pode ocorrer através de duas rotas biossintéticas: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, da qual se originam os fenilpropanóides; ou pela via do acetato-malonato que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A e produz fenólicos simples, dos quais se originam os flavonóides e seus derivados (CARVALHO et al., 2004). Na família dos fenólicas pouco distribuídos na natureza, encontra-se um número bem reduzido, embora com certa frequência que são os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (SOARES, 2002).

Os antioxidantes podem ser divididos de acordo com a atividade enzimática em duas classes: antioxidantes com atividade e sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como as substâncias fenólicas (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004). Esses compostos encontram-se largamente em plantas e formam um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina (figura 02).

**Figura 02 Estruturas da fenilalanina (esquerda) e L-tirosina (direita).**



Fonte: Autor, 2012.

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídico-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação (SHAHIDI, et al., 1992), por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOKE et al., 1998).

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (BRANCO, 2011; DECKER, 1998). O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (SHAHIDI et al., 1992).

Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias.

Os produtos naturais são utilizados no controle e tratamento de diversas doenças crônicas e na prevenção de inúmeras patologias associadas ao aumento de metabólitos oxi-redutores chamados de radicais livres (CALABRESE et al., 2007). Os radicais livres são favorecidos em sua síntese por vários fatores, dentre eles, a poluição ambiental, a radiação ultravioleta, infravermelho e ionizante, a má nutrição e o exercício físico (ARAÚJO et al., 2006; SCHRÖDER e KRUTMANN, 2005).

Alguns estudos sugerem que o aumento exacerbado de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas ao nitrogênio (ERNs)

com conseqüente reduçãõ dos nívéis antioxidantes gera um quadro orgânico conhecido como estresse oxidativo (SMOLKA, et al., 2000; JI, 1995). Muitas evidências tem apontado os radicais livres e outros oxidantes como os grandes vilões pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio da atividade do sistema imune e disfunções cerebrais; uma vez que o distúrbio entre a formação e a remoção de EROs e ERNs são associadas a esse processos patológicos (ATOUI et al., 2005, HERMES-LIMA e STOREY, 1998; PAWLAK et al., 1998).

Os radicais livres formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. O estresse oxidativo ocorre quando há falta de um equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, levando a danos celulares.

Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico, óxido nitroso, ácido nitroso, nitritos, nitratos e peroxidonitritos. O  $O_2$  envolvido no processo respiratório, em certas condições no organismo, pode ser transformado em ânion superóxido, radical hidroxil, oxigênio singletto e peróxido de hidrogênio. Todas essas variações estão, muitas vezes, associadas a circunstâncias patológicas, incluindo reações inflamatórias. Entretanto, também podem estar relacionadas a processos fisiológicos, como a resposta imune.

Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lipídios, ácidos graxos e proteínas (ALVES et al., 2010; STORZ et al., 1987; WOLFF et al., 1986). O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de  $O_2$  e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988).

## 4 ALCALÓIDES

São compostos nitrogenados, biologicamente ativos, encontrados em plantas (com maior ocorrência em angiospermas), animais marinhos e fungos. Os alcalóides que possuem um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são considerados como alcalóides verdadeiros e são classificados segundo o sistema anelar presente na molécula (HENRIQUES et al., 2004).

A presença de alcalóides está relacionada a uma gama de atividades biológicas como antimalárica, antitumoral, antiviral, tratamento do mal de Alzheimer, dentre outros (CARDOSO-LOPES et al., 2010; HENRIQUES et al., 2004). Os alcalóides tropânicos atropina e escopolamina são utilizados para diminuição de cólicas provocadas por cálculo renal, espasmos brônquicos, gastro-intestinais e como anestésicos locais (BACCHI, 2004).

O alcalóide mais conhecido é a cocaína, encontrada, por exemplo, em *Erythroxylon coca* Lam. Var. *Ipadu* Plowman, que ocorre no oeste da Amazônia, sendo cultivada e utilizada por grupos nativos do Peru, Brasil e Colômbia (BACCHI, 2004). A cocaína pode ser absorvida por todas as membranas e mucosas, aplicada localmente atua como anestésico local e é um estimulante potente do sistema nervoso central.

## 5 Cumarinas

As cumarinas são compostos amplamente encontradas em plantas, fungos e bactérias. Dentre as famílias mais citadas na literatura pelo conteúdo de cumarinas estão: Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thyneleaceae (KUSTER e ROCHA, 2004).

As cumarinas têm a sua origem biossintética no ácido *p*-hidroxi-cinâmico (*p*-cumárico) (ALBACI et al., 2008). Esses compostos possuem grupos di-hidroxilados em posição *orto*, como a escopolentina, e são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem os íons ferro. São compostos que absorvem fortemente a energia da região do ultravioleta (UV) e são altamente reativas sob incidência de luz (300-400 nm).

As furanocumarinas dos frutos de *Ammi visnaga* (L.) Lam. (Apiaceae), planta encontrada nos países do mar Mediterrâneo são as mais conhecidas sob o ponto de vista medicinal, sendo a quelina, o principal representante com ação vasodilatadora e broncodilatadora (KUSTER e ROCHA, 2004). Devido a essa atividade vasodilatadora, essas furanocumarinas têm sido utilizadas no tratamento da impotência masculina. Elas estão ainda relacionadas com o tratamento de doenças cutâneas (e.g., psoríase) associado à exposição à radiação ultravioleta, de maneira a induzir a pigmentação da pele. Entretanto, as furanocumarinas, como a grande maioria das cumarinas, ao absorver um fóton, formam um estado tripleto excitado, que pode reagir com moléculas como bases pirimídicas ou com oxigênio no estado fundamental, formando o oxigênio singleto ou radicais tóxicos (e.g., radicais superóxido e hidroxil) que são potencialmente causadores de mutações em DNA, polímeros e lipídios.



## 6 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Doenças negligenciadas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (e.g., dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária e tuberculose) (BRASIL, 2010a). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas (BRASIL, 2010a). A cada dia, cerca de três mil pessoas morrem no mundo vítimas destas doenças. Um dos motivos para esse número elevado de óbitos é a falta de ferramentas adequadas para o diagnóstico e tratamento destas doenças.

Dentre as doenças mais negligenciadas está a esquistossomose. De etiologia infecciosa parasitária, é causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma* que vive na corrente sanguínea do hospedeiro definitivo, o homem. É a mais grave forma de parasitose por organismo multicelular, matando centenas de milhares de pessoas por ano em todo o mundo. A transmissão da doença depende da existência de hospedeiros intermediários, os caramujos. No Brasil, as três espécies envolvidas na transmissão da doença são *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, por ordem de importância (BRASIL, 2005).

A busca por um controle químico malacológico sintético e/ou extratos vegetais é constante. Os produtos ideais devem ser eficazes em baixas concentrações, ter baixo custo, não ser tóxico ao homem, aos outros animais e plantas, além de ser de fácil manipulação.

Além do tratamento dos pacientes infectados e de medidas educacionais voltadas para a população, uma forma de evitar a transmissão da esquistossomose é através do controle do vetor caramujo. Hoje, apenas a niclosamida encontra-se disponível comercialmente para uso em programas de controle, mas possui alto preço, custo operacional dispendioso e provoca danos ao ambiente (BRASIL, 2010b).

Outro grande problema de saúde pública é a doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana. A patologia é uma das consequências da infecção

humana produzida pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo e de várias fases, com diferentes estágios de desenvolvimento em diferentes hospedeiros. Esse protozoário apresenta-se sob as formas flagelada (epimastigota e tripomastigota) e a aflagelada (amastigota). As formas habituais de transmissão para o homem são: vetorial, através do contato do homem suscetível com as excretas contaminadas dos triatomíneos (*i.e.* barbeiros ou chupões); transfusional, transplacentária (congênita) e, mais recentemente, a transmissão pela via oral, pela ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi* (BRASIL, 2005). O parasita invade diferentes células hospedeiras que parasitadas se rompem, causando inflamação nos tecidos, o fígado e o baço aumentam de volume, e o coração sofre dilatação global (ALBARICI, 2006).

O *T. cruzi* infecta quase 150 espécies de 24 famílias de mamíferos domésticos e selvagens, incluindo os seres humanos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a prevalência da doença de Chagas é de 13 milhões de casos. A incidência anual é 200 mil casos em quinze países latino-americanos. No Brasil, os dados disponíveis (1995) indicam a infecção pelo *T. cruzi* em 4,2% da população rural e 1,3% do total da população do país (BRENER e ANDRADE, 2000). As condições precárias de habitação favorecem a disseminação da doença, sobretudo em áreas rurais.

Os fármacos mais usados no tratamento da tripanossomíase são compostos nitro-heterocíclicos nitrofuranos como nifurtimox e benznidazol, derivados nitroimidazólicos comercializados pela Bayer e Roche, respectivamente. São medicamentos utilizados na fase aguda, sem muitos resultados na fase crônica e com sérios efeitos colaterais (MARQUES, 2006).

As leishmanioses, por sua vez, representam um conjunto de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O protozoário é transmitido ao homem e outros mamíferos por insetos vetores conhecidos como flebotomíneos. O aumento elevado na taxa de co-infecção em pacientes HIV positivos e o desenvolvimento de resistência dos parasitos às drogas existentes tem aumentado a importância desta doença na saúde pública (LEANDRO e CAMPINO, 2003). De modo geral, essas enfermidades se dividem em tegumentares, menos graves, que atacam a pele e as mucosas, e viscerais, que atacam os órgãos internos, podendo levar a morte se não tratadas. A

Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2007).

O tratamento da doença conta com doses diárias de injeções de antimônio pentavalente (como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio ou anfotericina B) durante 20-30 dias (MARQUES, 2006).

## 7 IMUNOMODULADORES

Os organismos, diante do problema de destruir invasores infecciosos ou componentes próprios desregulados e conservar suas células normais intactas, desenvolveram um conjunto de mecanismos sensoriais e efetores mediados por receptores que são descritos como inatos e adaptativos. De acordo com Krensky et al. (2005) a imunidade natural (ou inata) não requer exposição pregressa e tem relativamente pouca especificidade, mas reage amplamente aos estímulos. A imunidade adaptativa (ou adquirida) é específica para cada antígeno, depende da exposição ou estimulação por um antígeno e pode ser muito específica. Os efetores principais da imunidade inata são os granulócitos, complemento, monócitos/macrófagos, células natural killer, mastócitos e basófilos; e os da adquirida, os linfócitos B e T.

O impacto dos componentes do sistema imunológico é enorme e as doenças imunológicas estão aumentando em proporções epidêmicas, existindo abordagens inovadoras e agressivas no desenvolvimento de novos tratamentos. Entre essas doenças são encontrados um grupo de distúrbios auto-imunes como, por exemplo, artrite reumatóide, diabetes melito tipo I, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla; tumores sólidos e neoplasias malignas hematológicas; doenças infecciosas; asma e vários distúrbios alérgicos (KRENSKY et al., 2005).

Imunomoduladores são fármacos que podem alterar (exacerbar ou reduzir) a resposta imune, modificando o curso das doenças. Dentre os imunomoduladores estão os imunobiológicos (biológicos), que podem ser definidos como: produtos biológicos derivados de seres vivos (e.g., humanos, animais, vegetais ou de microrganismos) que podem ser utilizados na cura, prevenção e tratamento de doenças em seres humanos. Já as proteínas imunomoduladoras provocam uma alteração da resposta biológica do organismo a um determinado estado patológico. Para Krensky et al. (2005), o grande segredo da imunomodulação é indução e a manutenção da tolerância imune, ou estado ativo da impossibilidade de reação antígeno-específica.

Assim, o objetivo desse trabalho foi o estudo fitoquímico e da atividade antioxidante, citotóxica, moluscicida, inibitória da produção de óxido nítrico, inibitória

de linfoproliferação, anti-*Leishmania amazonensis* e anti-*Trypanosoma cruzi* dos extratos, frações de *Simaba maiana* Casar.

## 8 MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1 Instrumentação e procedimentos gerais

Para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 G com  $F_{254}$  ( $\Phi=0,2$  mm, Merck Kieselgel) em folhas de alumínio, empregando-se como revelador solução de sulfato de cérico em ácido sulfúrico concentrado e câmara de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 360 nm.

As separações cromatográficas em coluna aberta foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 (70-230 e 230-400 mesh-ASTM, Merck), Sephadex LH-20 (300-1200 mm).

As separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em condições semi-preparativas foram realizadas em aparelho Shimadzu, VP series, equipado com detector UV/VIS Shimadzu SPDV-20AV, operando em comprimento de onda de 254, 300 e 400 nm, uma bomba LC-20AP e um injetor manual Rheodyne 7125 (Cotati, USA) com "loop" de 2 mL. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna RP-18 Shim-Pack PREP-ODS (H) (250 x 20 mm, 5  $\mu$ m), utilizando-se bomba ternária Shimadzu LC-20AD. Para as análises analíticas, foi utilizado aparelho Shimadzu, VP series, equipado com um detector UV-VIS SPD-10AV, operando em comprimento de onda de 300 nm, forno CTO 10AC VP, uma bomba LC-6AD e um injetor manual Rheodyne 7125 (Cotati, USA), com "loop" de 2  $\mu$ L, utilizando-se como fase estacionária uma coluna analítica Shim-pack C-18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), utilizando-se  $\text{CDCl}_3$  e MeOD como solventes e TMS como padrão interno.

Os espectros IV foram registrados em espectrômetro da marca Varian 660-IR/FT-IR Spectrometer, através da técnica de ATR.

Nos ensaios realizados na Fiocruz foi utilizado espectrofotômetro SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA. Os ensaios realizados no Laboratório de Farmacologia Antiviral e Celular da Universidade Federal de Alagoas foram

realizados em espectrofotômetro de microplaca Thermo Scientific – Multiskan Spectrum, e o ensaios realizados no Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Sergipe, em espectrofotômetro UV BEL photonics,1105.

## 8.2 Solventes

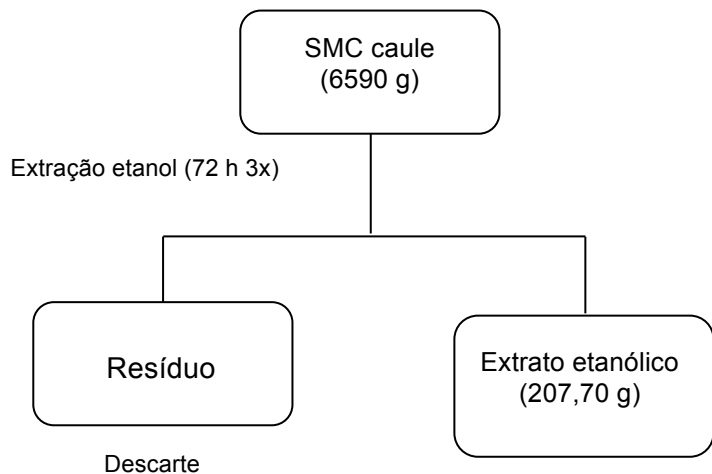
Foram utilizados solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água) todos comerciais destilados no laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas.

Os solventes utilizados nos testes biológicos foram de grau analítico e os utilizados para as análises em CLAE com grau de alto grau de pureza . A água utilizada no preparo das soluções foi purificada em um sistema MILLI-Q (Millipore Corporation). Os solventes deuterados  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , da marca Aldrich foram utilizados para preparação das substâncias destinadas a análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

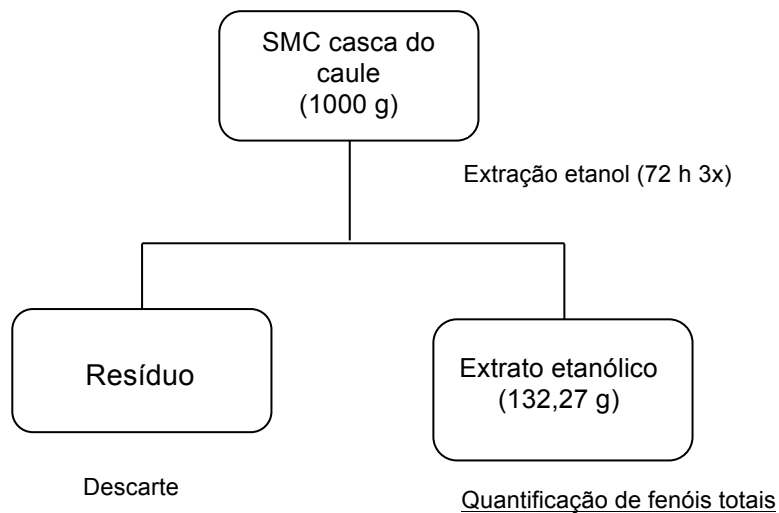
## 8.3 Preparação do extrato alcoólico

As raízes e caule da *Simaba maiana* Casar. (SMC) foram coletadas fora do período da floração no município de Itaguaçu da Bahia, Bahia, Brasil. A planta foi identificada comparativamente com um exemplar que está registrado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe sob nº 0461. A segunda coleta ocorreu no Povoado de Taquara, município de Morro de Chapéu (S11.555150°/W41.278312°), Bahia, Brasil. Um espécime está em fase de caracterização botânica no Herbário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia sob a responsabilidade da bióloga MSc. Simone Fiuza da Conceição.

O material vegetal coletado foi colocado em estufa (modelo MA-037) a 37°C, com renovação e circulação de ar por 48 horas até a completa desidratação. Depois de seco o material vegetal (casca do caule, caule, casca da raiz ou raiz), foi reduzido a pó foi extraído com etanol por percolação durante 72 h por 3 dias para cada parte da planta. O solvente foi removido por destilação a pressão reduzida com o uso de evaporador rotativo (BÜCHI).

**Esquema 01 Obtenção do extrato bruto da casca de *Simaba maiana* Casar.**

Fonte: Autor, 2012.

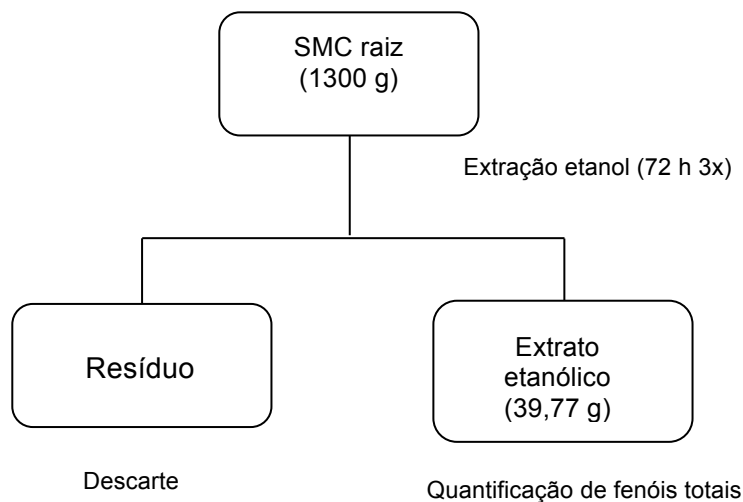
Quantificação de fenóis totaisTestes biológicos**Esquema 02 Obtenção do extrato bruto da casca do caule de *Simaba maiana* Casar.**

Fonte: Autor, 2012.

- Atividade antioxidante (DPPH e TBARS)



**Esquema 03 Obtenção do extrato bruto da raiz de *Simaba maiana* Casar.**

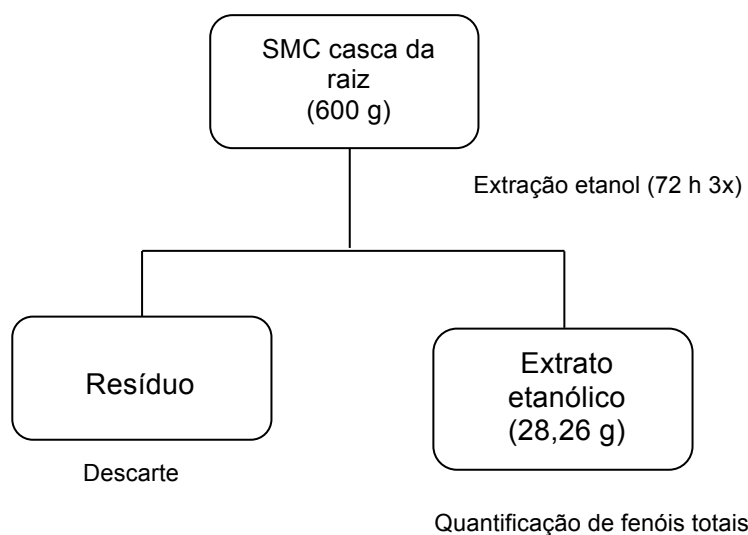


Fonte: Autor, 2012.

Testes biológicos

- Atividade antioxidante (DPPH e TBARS)

**Esquema 04 Obtenção do extrato bruto da casca da raiz de *Simaba maiana* Casar.**



Fonte: Autor, 2012.

Testes biológicos

- Atividade antioxidante (DPPH e TBARS)

## 8.4 Procedimentos cromatográficos com o extrato vegetal

O extrato vegetal foi submetido a um método sistemático de estudo que consistiu em:

- a) Processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, visando a obtenção de frações do extrato bruto.
- b) Ensaio biológico visando a localização do princípio ativo e seleção do extrato com atividade biológica.
- c) Cromatografia em coluna aberta, que dependendo da natureza do extrato ou fração, foi usada com diferentes eluentes e/ou suportes, seguida de cromatografia em camada delgada.
- d) Cromatografia de exclusão (SEPHADEX LH 20).
- e) Filtração das frações obtidas com sílica ativada .
- f) Purificação em CLAE.
- g) Caracterização estrutural dos compostos isolados.

### 8.4.1 Processo de partição líquido-líquido

O extrato foi suspenso em uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2) e submetido à extração sucessiva com hexano (*n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (AcOET) e *n*-butanol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O). O extrato etanólico e suas fases particionadas foram submetidos à determinação de fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, moluscicida, citotóxica, avaliação da atividade inibitória da produção de óxido nítrico, atividade inibitória de linfoproliferação, atividade anti-*Leishmania amazonensis* e anti-*Trypanosoma cruzi*.

#### 8.4.2 Isolamento dos compostos da fração $\text{CHCl}_3$

A fração  $\text{CHCl}_3$  do caule de *Simaba maiana* Casar. (17,55 g) foi submetida à fracionamento a vácuo em gel de sílica (350 g) e eluída com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH, fornecendo seis frações (Tabela 01).

**Tabela 01 Frações obtidas do fracionamento em gel de sílica da fração em  $\text{CHCl}_3$  (17,55 g) do caule de *Simaba maiana* Casar.**

Frações	Eluição	Massa; Rendimento
Ia	$\text{CHCl}_3$ 100%	6,77 g; 38,58%
IIa	$\text{CHCl}_3$ :MeOH 5%	1,95 g; 11,11%
IIIa	$\text{CHCl}_3$ :MeOH 15 %	2,06 g; 11,74%
IVa	$\text{CHCl}_3$ :MeOH 30 %	0,33 g; 1,88%
Va	$\text{CHCl}_3$ :MeOH 50 %	0,32 g; 1,82%
VIa	MeOH 100 %	0,68 g; 3,87%

Fonte: Autor, 2012.

A fração Ia (1 g) foi submetida à cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20 em metanol. Foram obtidas 66 frações, que foram analisadas por CCD e reveladas em sulfato cérico. As amostras de 38-47 (0,363 g) foram reunidas. A purificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com comprimento de onda de 254, 300 e 400 nm. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna semi-preparativa de fase reversa. O sistema de solventes utilizado consistiu em uma mistura de água:metanol (isocrático de 50%), com fluxo de 10 mL/min, sendo o tempo total de análise de 30 min.

As 10 frações recolhidas foram posteriormente analisadas por CLAE, com comprimento de onda de 300 nm, utilizando-se como fase estacionária uma coluna analítica de fase reversa. O sistema de solventes utilizado consistiu em uma mistura de água:metanol (sistema isocrático, com 60% de B) com fluxo de 1 mL/min, forno temperatura de 30 °C, sendo o tempo total de análise de 30 min. As frações semelhantes foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo a 35 °C.

Quatro frações foram consideradas como puras ou semi-puras. As frações FC100.7a e FC100.7 apresentaram o mesmo tempo de retenção, foram reunidas e denominadas FC2010 (27,8 mg). Após a evaporação do solvente, foi formado um sólido amorfo de cor amarela que foi encaminhado para análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D). As frações FC100.5 (15 mg), FC100.6 (10 mg) se apresentaram como puras em seus respectivos cromatogramas e após evaporação do solvente, como a anterior, formaram um sólido amorfo de cor amarela que foi encaminhado para análise de IV e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A fração ( $\text{CHCl}_3$  100% - tabela 01) (5,5 g) foi submetida a uma filtração em sílica (30 g), onde foram obtidas cinco frações (Tabela 02).

**Tabela 02 Frações obtidas do fracionamento em gel de sílica da fração em  $\text{CHCl}_3$  100% (5,5 g) proveniente da fração em  $\text{CHCl}_3$  (17,55 g) do caule de *Simaba maiana* Casar.**

Frações	Eluição	Massa; Rendimento
Ib	$\text{CHCl}_3$ 100%	2,00 g; 36,36%
IIb	$\text{CHCl}_3$ :AcOET 2%	0,53 g; 9,64%
IIIb	$\text{CHCl}_3$ :AcOET 5 %	0,44 g; 8%
IVb	$\text{CHCl}_3$ :AcOET 30 %	0,37 g; 6,72%
Vb	$\text{CHCl}_3$ :AcOET 50 %	0,16 g; 2,91%

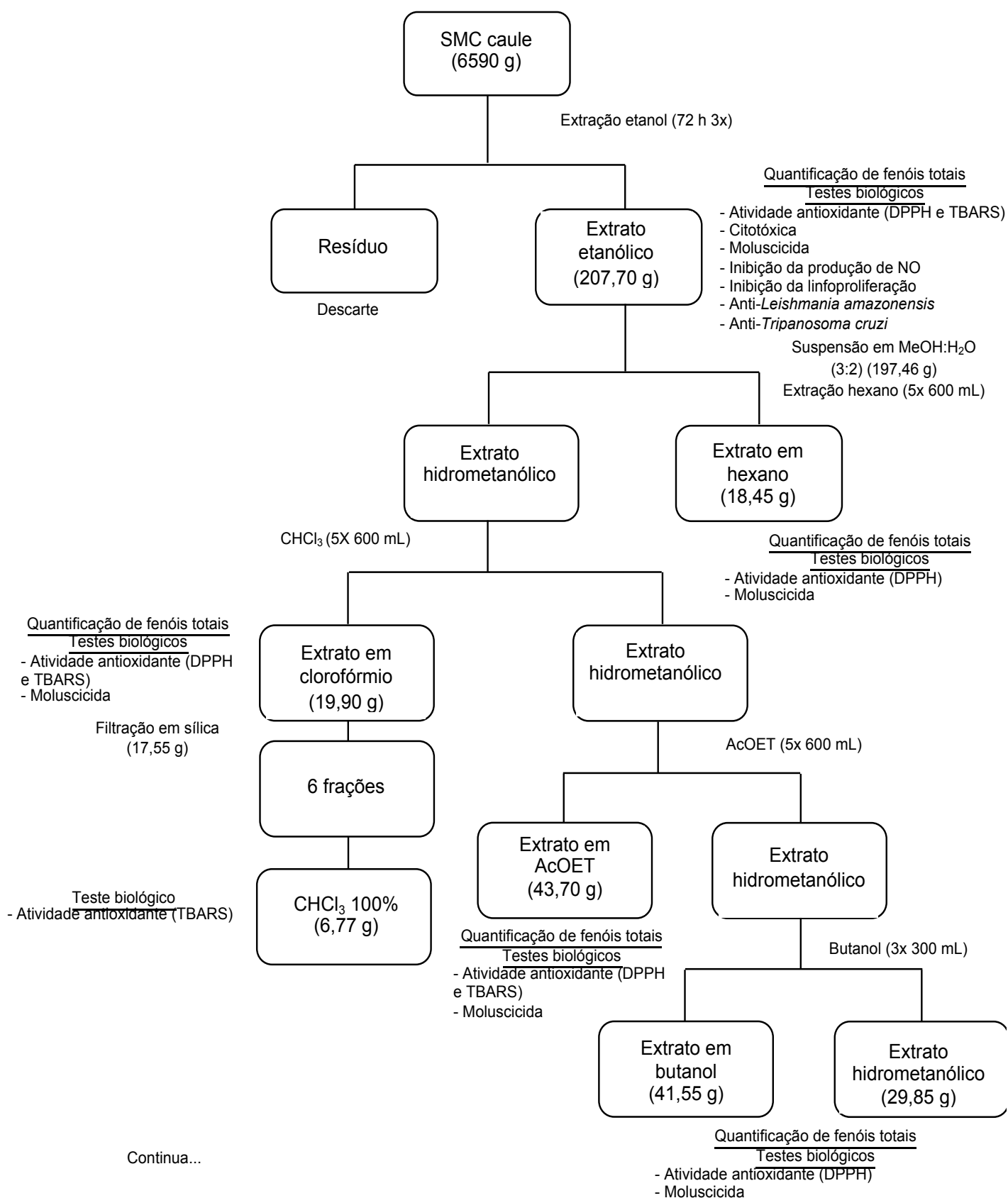
Fonte: Autor, 2012.

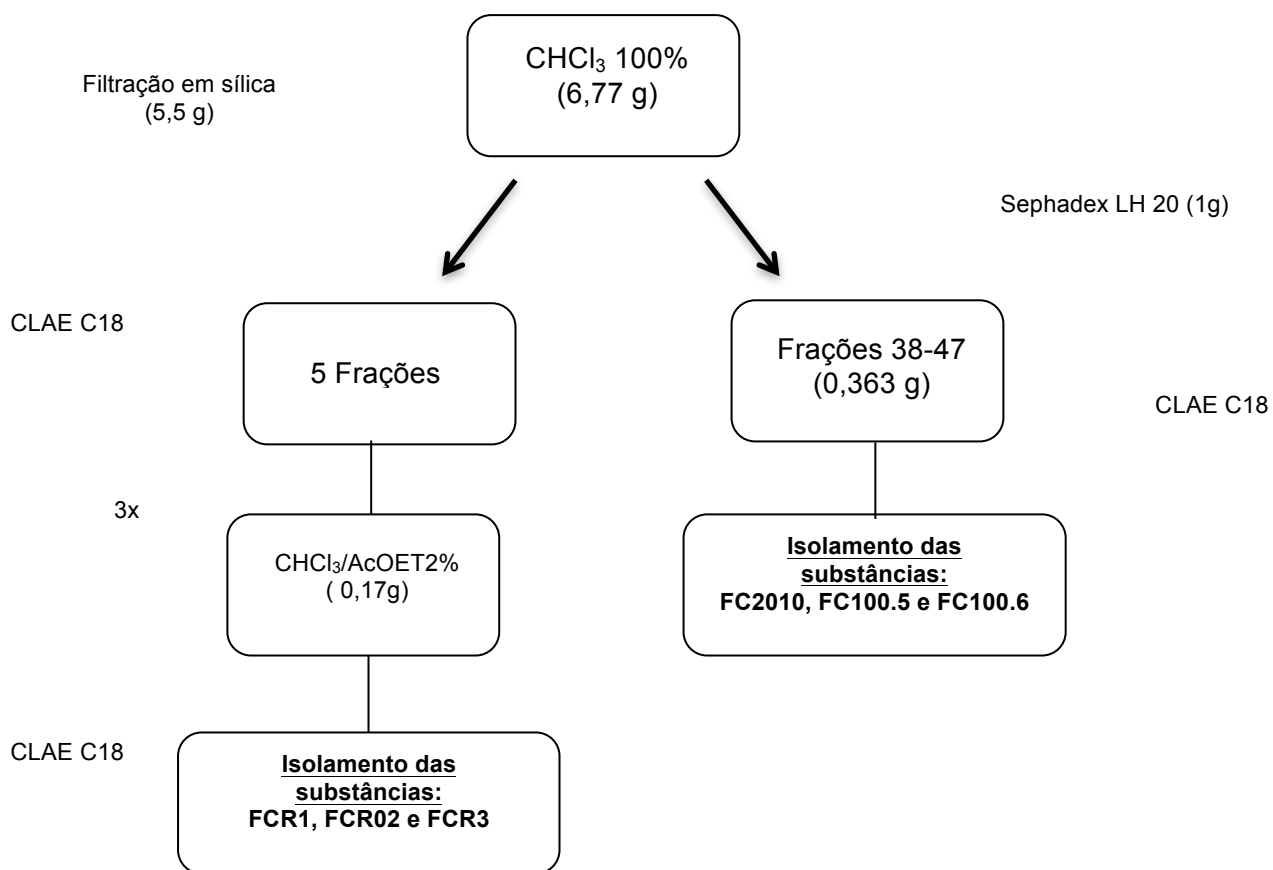
A fração IIb ( $\text{CHCl}_3$ ) foi selecionada para purificação em CLAE. Para cada purificação foram utilizadas 170 mg de amostra. A purificação em CLAE foi realizada com comprimento de onda de 300 nm. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna semi-preparativa de fase reversa. O sistema de solventes utilizado consistiu em uma mistura de água:metanol (gradiente de 50% em B por 10 min, 60% por 10 min e 100% por 10 min), com fluxo de 10 mL/min, sendo o tempo total de análise de 30 min.

As 10 frações recolhidas para cada repetição, foram posteriormente analisadas por CLAE, em um aparelho Shimadzu, CBM-20A, equipado com um detector UV-VIS SPD-20AV, operando em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 nm, uma bomba LC-6AD e um injetor manual Rheodyne 7125 (Cotati, USA), com "loop" de 2  $\mu\text{L}$ . Utilizou-se como fase estacionária uma coluna analítica de fase reversa Shim-

pack C-18 (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m). O sistema de solventes utilizado consistiu em uma mistura de água:metanol (sistema isocrático com 60% de B) com fluxo de 1 mL/min, forno com temperatura de 30 °C, sendo o tempo total de análise de 30 min. Foram selecionadas três frações FC01 (18 mg), FC02 (9 mg) e FC03 (10 mg) com aproximadamente o mesmo tempo de retenção, que após serem concentradas em evaporador rotativo a 35 °C, apresentaram-se como cristais associado a um sólido amorfo de cor branca. O sólido que foi encaminhado para análise de IV e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D).

**Esquema 5 Fluxograma completo da partição líquido-líquido, fracionamento e isolamento dos compostos do extrato do caule de *Simaba maiana* Casar.**





Fonte: Autor, 2012.

### 8.5 Quantificação de fenóis totais – Método de Folin-Ciocalteu (FCR)

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Pesquisa em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão-Sergipe, Brasil.

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras dos extratos da espécie estudada foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (SOUSA et al., 2007). Os extratos (10 mg) foram solubilizados em metanol formando um volume final de 10 mL. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 5 mL com água destilada. Após 2 horas, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes.

O teor de F.T. (fenóis totais) foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (20 a 380 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $C = 0,001A - 0,0194$ , onde  $C$  é a concentração do ácido gálico,  $A$  é a absorvância a 750 nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,9918$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 8.6 Atividade antioxidante

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Pesquisa em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão-Sergipe, Brasil.



### 8.6.1 Ensaio quantitativo da atividade antioxidante – Método do radical DPPH (2,2 difenil-1-picril hidrazila)

Análise quantitativa da atividade antioxidante foi realizada segundo metodologia encontrada na literatura (Brand-Williams et al., 1995, Sánchez-Moreno et al., 1998 e Thomazzi et al., 2010), com algumas modificações, monitorando-se a descoloração do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) pela transferência de elétrons das amostras, através da medida do decréscimo das absorvâncias de soluções de diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro, com o comprimento de onda de 515 nm e tendo como substâncias de referência (controles positivos), BHT (butil-hidroxitolueno) e ácido gálico.

#### 8.6.1.2 Curva de calibração do DPPH

Foram preparados 75 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. As concentrações foram de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 515 nm com todas as soluções, medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como branco o metanol. A equação da curva de calibração do DPPH foi  $C=110,547-0,02804A$ , onde C corresponde à concentração do DPPH no meio, A é a absorvância medida no comprimento de onda de 515 nm e o coeficiente de correlação  $R=0,9983$ .

#### 8.6.1.3 Leitura das medidas de absorvância nas amostras

As soluções estoque dos extratos de *Simaba maiana* Casar. e dos controles positivos (500 µg/mL) em metanol foram diluídas nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL. As medidas de absorvância das misturas foram feitas em 515 nm, no tempo 1, 5 e 10 min e depois, a cada 10 min até completar 60 min (Sousa et al., 2007). A mistura metanol e solução metanólica extrato foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância no tempo de 60 min para cada concentração testada foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes, calculado de acordo com Brand-Williams et al. (1995), conforme a equação:  $\%DPPH_{REM} = [DPPH]_T/[DPPH]_{T_0} \times 100$ , onde  $[DPPH]_T$

corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com extrato e  $[DPPH]_{T_0}$  a concentração inicial de DPPH. A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $IE_{50}$ ), foi calculada plotando o  $\%DPPH_{REM}$  no tempo de 60 min em oposição às concentrações do extrato. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/mL} \pm \text{desvio-padrão}$ . As absorvâncias em todas as concentrações testadas no tempo de 60 min foram convertidas em percentual de inibição (IP) determinada pela equação:  $IP = \frac{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco]) \times 100}{Abs_{controle}}$ , em que  $Abs_{controle}$  é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e  $Abs_{amostra}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra). Os resultados serão expressos em % de inibição.

#### 8.6.2 Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio TBARS foi estimado pela quantificação da peroxidação lipídica induzida por geradores de radicais livres em gema de ovo usada como substrato rico em lipídeos.

A gema do ovo foi homogeneizada 1% (v/v) em PBS (tampão fosfato) (pH 7,4). 1  $\mu\text{L}$  do homogenato foi acrescido de 100  $\mu\text{L}$  dos extratos ou controles positivos em diferentes concentrações (5, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) (SILVA, 2007). Para a indução da peroxidação lipídica foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução do agente indutor separadamente, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)) (0,17 M),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio) (0,4 M) ou  $\text{FeSO}_4$  (sulfato ferroso) (0,17 M). Foram utilizados como antioxidante de referência (controles positivos), TROLOX (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) e ácido gálico. A etapa reacional ocorreu por 30 min a 37°C. Após o aquecimento 500  $\mu\text{L}$  das amostras foram centrifugados com 500  $\mu\text{L}$  de TCA a 15% (ácido tricloroacético) por 2000 g por 10 min. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi misturado com 500  $\mu\text{L}$  de TBA (ácido tiobarbitúrico) (0,67%) e aquecido a 95 °C por 30 min. Após o aquecimento as absorvâncias das amostras foram mensuradas em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em % da atividade antioxidante.

## 8.7 Teste de citotoxicidade

Os ensaios foram realizados por Dra. Roberta Costa Ferreira no Laboratório de Farmacologia Antiviral e Celular da Universidade Federal de Alagoas, em Maceió-Alagoas, Brasil.

Para avaliar a citotoxicidade do extrato bruto de *Simaba maiana* Casar. foi utilizado o método de determinação da viabilidade celular por exclusão do Azul de Trypan (MASTERS, 2000; FRESHNEY, 2005).

As células (córnea de ovinos) da garrafa de cultivo foram “dispersadas” com tripsina-EDTA, centrifugadas, contadas e a concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  cels/mL. A seguir foi depositado 100  $\mu$ L da suspensão celular ( $1 \times 10^4$  células) em cada poço de uma microplaca de 96 poços que foi incubada por 24 horas a 37° C em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, para formação da monocamada celular. Após este período, o meio foi substituído por 200  $\mu$ L de meio novo puro (controle) ou contendo o extrato nas concentrações (10, 50 e 100  $\mu$ g/mL) e a placa foi novamente incubada. Após incubação de 48 horas, o meio foi desprezado, lavado com PBS (tampão fosfato) e as células foram “dispersas” com tripsina-EDTA (50  $\mu$ L/poço). Após 5 minutos em estufa, a tripsina foi inativada com 100  $\mu$ L de MEM (meio de cultivo) + 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e acrescentou-se uma alíquota de 150  $\mu$ l de Azul de Trypan (0,4%, Sigma- T 8154). Após 10 minutos, as células foram contadas em Câmara de Neubauer (100 células por poço). A viabilidade celular representa o percentual de células não coradas.

## 8.8 Avaliação da atividade moluscicida

Os ensaios foram realizados por MSc. Cenira Monteiro e a química Maria Beatriz de Oliveira Farias no Laboratório de Bioensaios do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas, em Maceió-Alagoas, Brasil.

Nos ensaios biológicos foram utilizados caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda, Planorbidae) criados em laboratório e descendentes de exemplares, não infectados por trematódeos, originários da região do Barreiro de Cima, zona periférica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Essa população caracteriza-se por possuir 5% de exemplares albinos (SANTOS, 2005).

Os caramujos foram mantidos em aquários de vidro, à temperatura ambiente, sistema de água corrente e desclorada durante 8 horas, com uma mistura de terra, areia e carbonato de cálcio. Como alimento recebiam alfaces frescas (*Lactuca sativa*).

O ensaio consistiu na imersão do caramujo adulto da espécie *B. glabrata* em uma solução aquosa dos extratos e frações de SMC, nas concentrações apropriadas, e observação por 96 horas, seguindo o protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1994).

No teste preliminar, foram utilizados 3 caramujos por concentração em duplicata. No bioensaio apurado, foram utilizados 5 caramujos por copo, mantendo sempre a relação de 25 mL de solução por caramujo, em que cada concentração (variando de 100 µg/mL a 5 µg/mL) foi testada em triplicata.

O extrato e frações que apresentaram atividade moluscicida (mínima de 40% a 100 µg/mL) foram utilizados nos ensaios apurados.

Paralelamente, foram realizados testes de controle branco, negativo e positivo, respectivamente, com água desclorada, DMSO (dimetil-sulfóxido) (0,1%) e niclosamida a 3mg/mL.

A morte dos caramujos foi considerada pela ausência de contrações musculares, descoloração, liberação de hemolinfa e deterioração dos tecidos do corpo. As desovas foram examinadas e contadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico, sendo consideradas mortas quando suas células tornavam-se opacas ou desagregavam-se.

### **8.9 Avaliação da atividade inibitória da produção de Óxido Nítrico (NO)**

O bioensaio foi realizado pelo grupo da professora Dra. Milena Botelho Pereira Soares no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), em Salvador-Bahia, Brasil.

Para avaliar o efeito do extrato bruto do caule de *Simaba maiana* Casar. quanto à Inibição da produção de óxido nítrico, foram utilizados macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos injetados com tioglicolato a 3% em salina (i.p.-

intraperitoneal). Uma lavagem peritoneal, com meio de cultura DMEM (Minimum Essencial Medium Eagle modificado - Sigma) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, foi realizada após um período de 4-5 dias da injeção do tioglicolato.

As células do exsudato peritoneal permaneceram incubadas em placas de cultura de 96 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) durante duas horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não-aderentes. As células aderentes foram estimuladas com LPS (lipopolisacardeo – Sigma, EUA, lipopolysaccharides 0111:B4) (500 ng/mL) e IFN-γ (interferon) (5 ng/mL) em meio DMEM completo, na presença ou não do extrato bruto do caule de *Simaba maiana* Casar. (100 µg/mL). O controle negativo consistiu de células aderidas, DMEM completo, LPS (500 ng/mL) e IFN-γ (5 ng/mL), e o positivo apenas de células aderidas e DMEM completo. Após 24 horas, 50 µL do sobrenadante de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para avaliação da quantidade de ntrito através do método de Griess (DING et al., 1988).

A reação de Griess consiste na adição de 50 µL do sobrenadante/poço com um volume igual do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloroeto naftiletileno diamina – NEED – 0,1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,3 M). A leitura das placas foi feita imediatamente em espectrofotômetro, e em comprimento de onda de 570nm.

#### **8.10 Atividade inibitória de linfoproliferação – Técnica da timidina tritiada**

Os ensaios foram realizados pelo grupo da professora Dra. Milena Botelho Pereira Soares no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), em Salvador-Bahia, Brasil.

Para avaliar a atividade inibitória da linfoproliferação do extrato bruto do caule de SMC, as células totais de baço de camundongo (BALB/c) foram cultivadas em meio DMEM completo em placas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  por poço), na presença ou não do extrato bruto do caule de SMC (100 µg/mL), e estimuladas com o mitógeno concavalina A (Con A – 1 µg/mL, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e lectina

de origem vegetal (*Canavalia ensiformis*), com propriedade de estimular a ativação policlonal de linfócitos. Cada amostra foi testada em triplicata.

As células foram incubadas em estufa úmida a 37°C em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, para formação da monocamada celular. Após 48 horas, adicionou-se timidina tritiada (10 µL de H-timidina) e incubou-se novamente as células em estufa sob as mesmas condições por 12 horas. Em seguida as células foram coletadas para quantificação da radioatividade beta, através da comparação da incorporação da timidina em culturas de células estimuladas com Con A somente, ou em presença do extrato vegetal.

### **8.11 Avaliação da atividade anti-*Leishmania amazonensis***

Os ensaios foram realizados pelo grupo da professora Dra. Milena Botelho Pereira Soares no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em Salvador-Bahia, Brasil.

Para os testes, foram utilizadas formas promastigotas (*i.e.*, flagelado extracelular) de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR-125 Leila Strain) obtidas de fase estacionária de cultura axênica (*i.e.*, livre de contaminantes) em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) completo, enriquecido com soro bovino fetal a 10% e gentamicina a uma concentração final de 50 µg/mL. Os parasitas foram incubados na presença do extrato bruto do caule de SMC (100 µg/mL) em 96 poços. Foram plaqueados 5x10<sup>6</sup> parasitas/poço, em volume final de 200 µL, sendo cada substância avaliada em triplicata.

Dois controles foram utilizados: um sem tratamento, consistindo apenas da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e um controle de leishmanias tratadas com Anfotericina B a 25 µg/mL, droga com atividade leishmanicida e tripanocida. Os parasitos foram incubados junto à droga por um período de 24 horas a 26 °C. Ao final do processo foi adicionado MTT (Brometo de Sal de Tetrazólio - (3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-brometodfeniltetrazolio) Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) e o material foi novamente incubado a 26°C por duas horas, após esse período, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade dos parasitos foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor de absorvância obtido.

### **8.12 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi***

O ensaio foi realizado pelo grupo da professora Dra. Milena Botelho Pereira Soares no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), em Salvador-Bahia, Brasil.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de cultura axênica em meio de cultura LIT completo. Os parasitas foram inoculados em placas de 96 poços em uma média de  $10^7$  parasitas/poço, em volume final de 200  $\mu$ L. Foi realizado um controle apenas com o parasita em meio de cultura LIT completo e outro tratado com Anfotericina B a 25  $\mu$ g/mL.

Os parasitos foram incubados por 24 horas a 26°C junto ao extrato bruto do caule de SMC (100  $\mu$ g/mL). Logo após foi adicionado o MTT e novamente incubado a 37 °C durante 3 horas, uma vez que o metabolismo desse sal demonstrou-se mais intenso nessa temperatura. A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro.

### **8.13 Análise estatística**

#### **8.13.1 Atividade antioxidante**

Os resultados expressos correspondem à média de três repetições (n=3)  $\pm$  desvio-padrão da média. Os valores encontrados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando os programas Microcal Origin, versão 8.0 e GraphPad Prism, versão 5.0.

### 8.13.2 Teste de citotoxicidade

A viabilidade celular foi verificada da seguinte maneira:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{células vivas} \times 100}{\text{células vivas} + \text{mortas}}$$

O valor células viáveis obtido foi calculado em relação ao grupo controle (100%). Os resultados foram avaliados e plotados em gráficos. Cada experimento foi realizado em triplicata.

$$\text{Viabilidade do teste (\%)} = \frac{\% \text{ de células vivas} \times 100}{\text{Viabilidade do controle (\%)}}$$

### 8.13.3 Atividade moluscicida

As atividades moluscicidas, expressas em Concentrações Letais (CL<sub>90</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>10</sub>) foram determinadas a partir dos dados obtidos nos ensaios biológicos com espécimes adultos de *B. glabrata*. Estas concentrações foram analisadas pelo método dos probitos no Programa PROBITCF em linguagem BASIC.

### 8.13.4 Avaliação da atividade inibitória da produção de NO (Óxido Nítrico)

A porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico de cada amostra foi determinada comparando os resultados obtidos com os resultados dos sobrenadantes da cultura de células estimadas não tratadas com drogas.

### 8.13.5 Avaliação da atividade anti-*Leishmania amazonensis*

Os percentuais de atividade anti-*L. amazonensis* foram definidos comparando os valores das absorvâncias dos poços incubados com os extratos e os valores do controle não tratado.



#### 8.13.6 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Os percentuais de atividade anti-*T. cruzi* foram determinados comparando os valores das absorvâncias dos poços incubados com os extratos e o valor do controle não tratado.

## 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 Fitoquímica

#### 9.1.2 Identificação das substâncias

Os fracionamentos dos extratos de SMC realizados por técnicas convencionais de cromatografia em coluna aberta não foram eficientes para o isolamento de substâncias; com isso, foi necessário o uso da cromatografia líquida de alta eficiência.

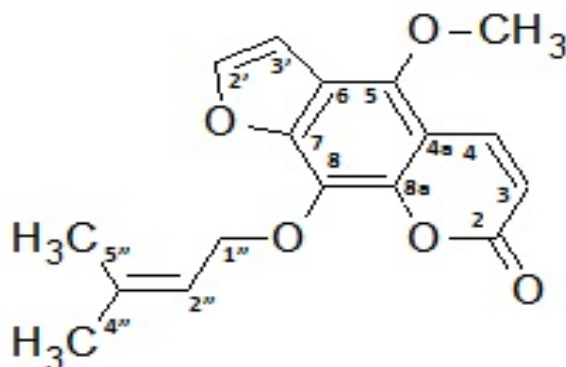
Dentre as substâncias isoladas FC100.5, FC100.6, FC2101, FC01, FC02 e FC03 provenientes da fração  $\text{CHCl}_3$ , não foi possível chegar à identificação de duas frações (100.5 e 100.6).

As substâncias isoladas da fração  $\text{CHCl}_3/\text{AcOET}$  2%, proveniente da fração  $\text{CHCl}_3$ , denominadas FC01, FC02 e FC03, após análises de RMN, apresentou os mesmos sinais para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e assim, foram agrupadas e consideradas como uma única substância a FC02.

##### 9.1.2.1 Identificação do composto FC2010

A linear furanocumarina (sólido amorfo de coloração amarela) (Figura 06) foi isolada da reunião das frações 38-47, provenientes da fração  $\text{CHCl}_3$  100% da fração clorofórmica do caule de *Simaba maiana* Casar. e sua estrutura foi determinada com base nos espectros IV e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e comparação com dados da literatura (BERGENDORFF et al., 1997; KANG et al., 2010).

**Figura 06** Estrutura do composto isolado da reunião das frações 38-47, provenientes da fração  $\text{CHCl}_3$  do extrato do caule de *Simaba maiana* Casar.



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto FC2010, quatro hidrogênios na região aromática formaram um par de dois sistemas AB (H-3,  $\delta$  6,30, d,  $J=9,93$  Hz e H-4,  $\delta$  8,11, d,  $J=9,93$  Hz; H-3',  $\delta$  6,99, d,  $J=2,29$  Hz e H-2',  $\delta$  7,64, d,  $J=2,29$  Hz) mostrando o típico padrão de uma furanocumarina linear.

A furanocumarina exibiu um sinal de hidrogênio relacionado a C4 que apareceu em  $\delta$  8,11, indicando a presença de O-R em C5 (HENEKA et al., 2005 e RAZDAN et al., 1987).

A presença de um tripleto em  $\delta$  5,60 (1H,  $J=7,55$  Hz), de um duplete em  $\delta$  4,87 (2H,  $J=7,55$  Hz), e dois simpletos em  $\delta$  1,78 (3H) e  $\delta$  1,70 (3H), sugeriu a presença de um grupo prenila em alguma posição.

O hidrogênio aromático em  $\delta$  7,60 – 7,96 (Marques, 2006) confirmou que o composto FC2010 era substituído em C-8.

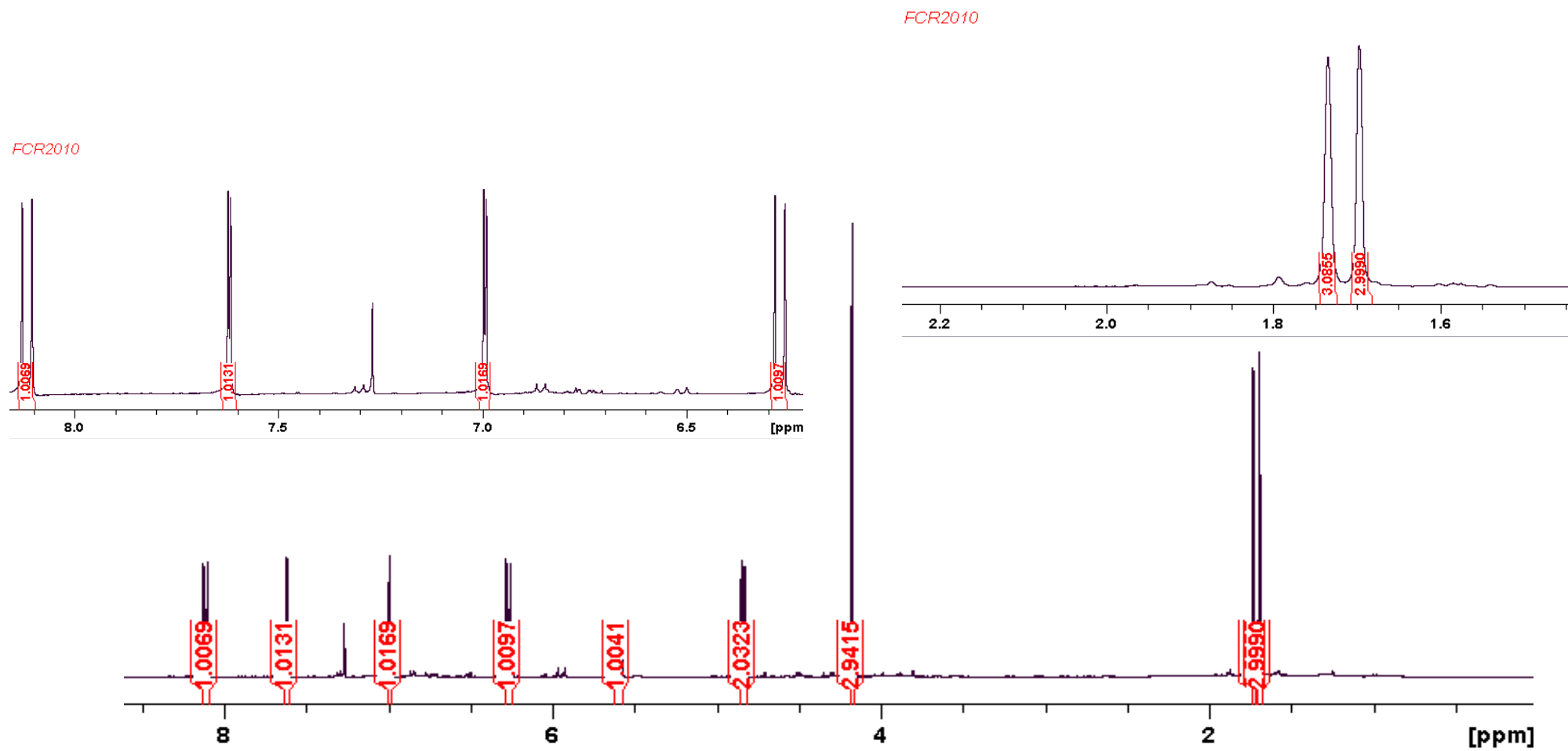
Os sinais observados no espectro de hidrogênio e carbonos (Figura 07 e 08) foram comparados com a literatura, conforme ilustrado na Tabela 03.

**Tabela 03 Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , deslocamento químico;  $J$ , Hz) para furanocumarina.**

H/C	FC2010 (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )		NIZAMUTDINOVA et al. (2008) (250/63 MHz, CDCl <sub>3</sub> )		BERGENDORFF et al. (1997) (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm)
2	-	160,58	-	160,60	-	160,50
3	6,30 (1H, d, $J=9,93$ )	112,80	6,25 (1H, d, $J=9,7$ )	112,70	6,24 (1H, d, $J=10,0$ )	112,80
4	8,11 (1H, d, $J=9,93$ )	139,42	8,09 (1H, d, $J=9,7$ )	139,30	8,17 (1H, d, $J=10,0$ )	139,40
5	-	144,36	-	144,30	-	144,30
6	-	114,65	-	114,50	-	114,50
7	-	150,83	-	150,70	-	150,80
8	-	126,92	-	126,80	-	126,80
8a	-	144,39	-	144,30	-	144,30
4a	-	107,61	-	107,50	-	107,50
2'	7,64 (1H, d, $J=2,29$ )	145,14	7,69 (1H, d, $J=2,3$ )	145,00	7,13 (1H, d, $J=2,3$ )	145,10
3'	6,99 (1H, d, $J=2,29$ )	105,08	6,96 (1H, d, $J=2,3$ )	105,00	7,74 (1H, d, $J=2,3$ )	105,00
1''	4,87 (2H, d, $J=7,55$ )	70,39	4,81 (2H, d, $J=7,3$ )	70,30	4,74 (1H, d, $J=7,5$ )	70,40
2''	5,60 (1H, t, $J=7,55$ )	119,88	5,57 (1H, t, $J=7,3$ )	119,80	5,45 (1H, t, $J=7,5$ )	119,80
3''	-	139,65	-	139,50	-	139,70
4''	1,78 (3H, s)	25,82	1,71 (3H, s)	25,70	1,70 (3H, s)	25,80
5''	1,70 (3H, s)	18,08	1,67 (3H, s)	18,00	1,62 (3H, s)	18,00
5-Ome	4,22 (3H, s)	60,79	4,14 (3H, s)	60,70	1,53 (3H, s)	60,70

Fonte: Autor, 2012.

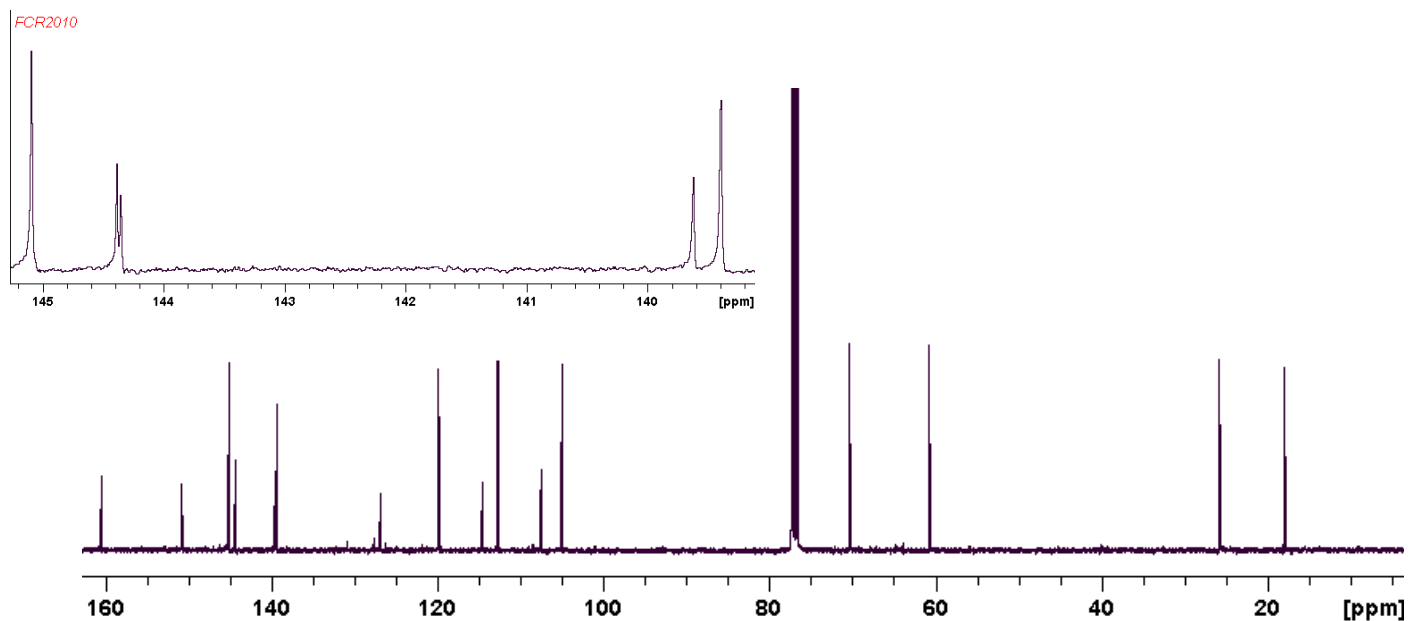
Figura 07 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) do composto FC2010.



Fonte: Autor, 2012.

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 08) indicou a presença de 17 carbonos, sendo de um de grupo metoxila, dois de grupos metila e um de grupo metileno.

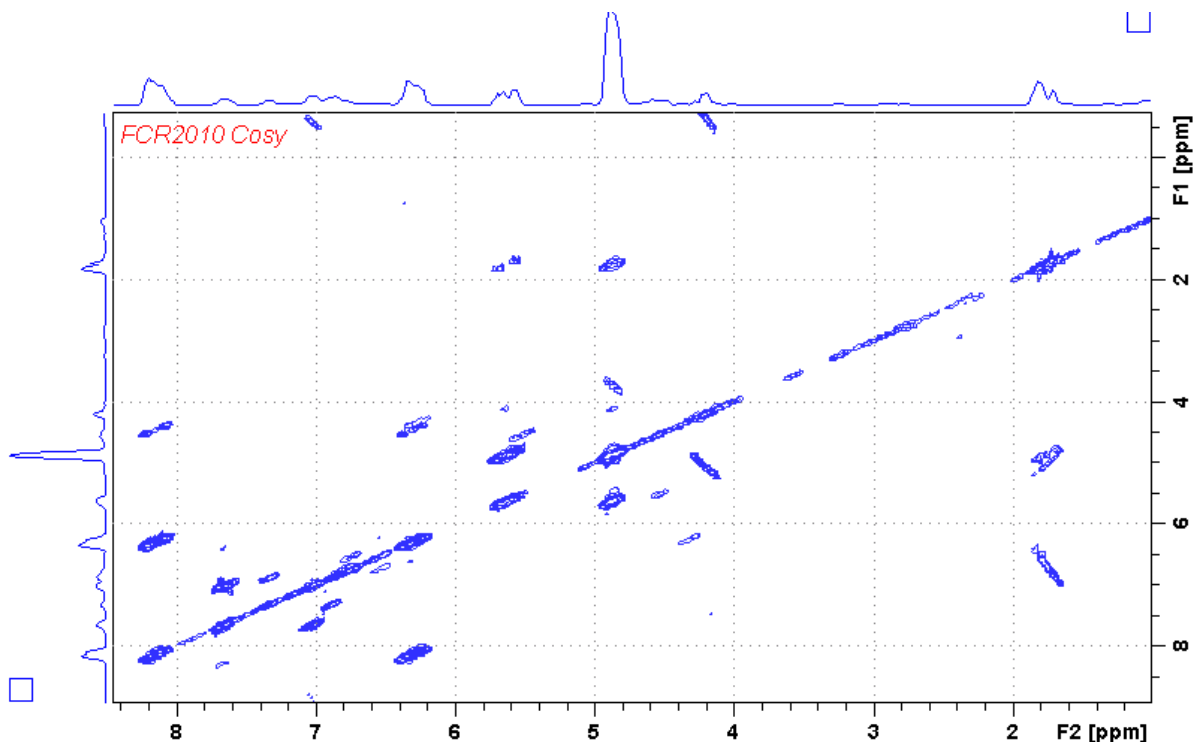
**Figura 08** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) do composto FC2010.



Fonte: Autor, 2012.

No experimento de COSY (Figura 09), observou-se as seguintes correlações: o sinal em  $\delta$  8,11 (H-4) com o sinal  $\delta$  6,30 (H-3);  $\delta$  5,60 (H-2'') com o sinal 4,87 (H-1''),  $\delta$  1,70 (H-5'') e  $\delta$  1,78 (H-2'').

Figure 09 Experimento de Cosy para o composto FC2010.



Fonte: Autor, 2012.

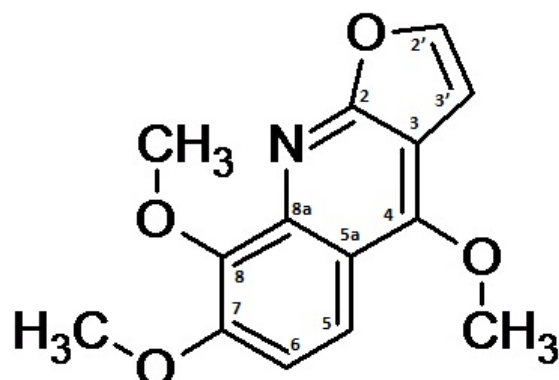
Com base em todos os dados obtidos, juntamente com os dados da literatura (Tabela 03), a substância FC2010 foi identificada como a furanocumarina felopterina.

A felopterina é um potente inibidor da ligação [ $^3\text{H}$ ] diazepam para o receptor benzodiazepínico, inibe a produção de NO, não é citotóxico, apresenta potencial terapêutico para inflamações como arterosclerose, dentre outros (BERGENDORFF, et al., 1997; KANG et al, 2010; NIZAMUTDINOVA et al., 2008).

#### 9.1.2.2 Identificação do composto FCR02

O alcalóide do tipo furanolínico (sólido de coloração branca) (Figura 10) foi isolado da fração  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}2\%$ , proveniente da filtração em sílica da fração  $\text{CHCl}_3100\%$  da fração clorofórmica do caule de *Simaba maiana* Casar. A sua estrutura foi determinada com base nos espectros de IV e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e comparação com dados da literatura (PAULINI et al., 1998; MARQUES, 2006).

Figura 10 Estrutura do composto isolado da fração  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}2\%$ , proveniente da fração  $\text{CHCl}_3$  do extrato do caule de *Simaba maiana* Casar.

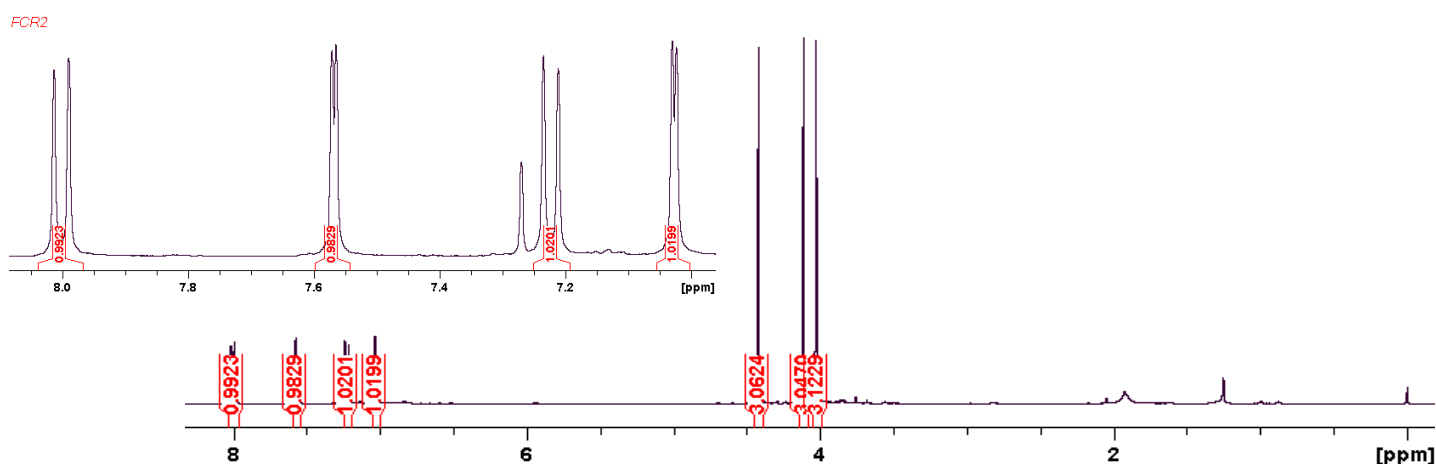


Fonte: Autor, 2012.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto FCR02 (Figura 11), observou-se sinais de 4 hidrogênios, sendo dois deles referentes a hidrogênios aromáticos, e dois hidrogênios referentes ao anel furânico, além de três sinais de hidrogênios característicos de grupos metoxila. Assim, os hidrogênios em  $\delta$  4,02,  $\delta$  4,11 e  $\delta$  4,42 estão substituídos nos carbonos da metoxilas nas posições C7, C8 e C4 respectivamente.

O sinal em  $\delta$  8,01 (1H, d,  $J=9,25$  Hz), foi atribuído ao H-5, que acopla com uma constante em *orto* de  $J=9,25$  Hz, com o hidrogênio H-6 ( $\delta$  7,22, 1H, d,  $J=9,25$  Hz). Os sinais em  $\delta$  7,57 (1H, d,  $J=2,7$  Hz) e  $\delta$  7,03 (1H, d,  $J=2,7$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3' respectivamente, pertencentes ao anel furânico (Tabela 04).

Figura 11 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) do composto FCR02.



Fonte: Autor, 2012.



**Tabela 04 Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , deslocamento químico; J, Hz) para o alcalóide furanolínico.**

FCR02 (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )			Paulini, et al. (1998) (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )		Marques (2006) (200/50 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	
H/C	$\delta$ (ppm), J (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
2	-	160,40	-	152,19	-	152,19
3	-	114,90	-	114,88	-	114,95
4	-	156,70	-	157,26	-	157,22
5a	-	102,10	-	102,05	-	102,08
5	8,01 (1H, d, J=9,25)	118,30	7,99 (1H, d, J=9,0)	118,14	8,00 (1H, d, J=9,4)	118,13
6	7,22 (1H, d, j=9,25)	111,90	7,21 (1H, d, J=9,0)	112,15	7,22 (1H, d, J=9,4)	112,23
7	-	142,10	-	142,03	-	142,13
8	-	141,60	-	141,39	-	141,51
8a	-	152,30	-	152,19	-	152,18
2'	7,57 (1H, d, J=2,7)	143,00	7,56 (1H, d, J=3,0)	143,02	7,58 (1H, d, J=2,8)	143,03
3'	7,03 (1H, d, J=2,7)	104,4	7,02 (1H, d, J=3,0)	104,62	7,05 (1H, d, J=2,8)	104,61
4-OCH <sub>3</sub>	4,42 (3H, s)	58,90	4,41 (3H, s)	58,99	4,44 (3H, s)	58,99
7-OCH <sub>3</sub>	4,02 (3H, s)	56,90	4,09 (3H, s)	56,82	4,11 (3H, s)	56,87
8-OCH <sub>3</sub>	4,11 (3H, s)	61,60	4,01 (3H, s)	61,66	4,04 (3H, s)	61,66

Fonte: Autor, 2012.

Assim, com base nos dados obtidos e com comparação com os dados da literatura, a substância FCR02 foi identificado como o alcalóide furanolínico esquimianina.

O alcalóide esquimianina está relacionado com atividade anti-colinesterásica, possui efeito citotóxico, demonstrou uma potente atividade imunomoduladora frente a *Leishmania braziliensis* (CARDOSO-LOPES et al., 2008; JANSEN et al., 2006; SANTOS, 2011).

## 9.2 Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*

### 9.2.1 Avaliação da atividade antioxidante – Método do radical DDPH e quantificação de fenóis totais – Método de Folin-Ciocalteu

Os testes *in vitro* foram realizados através do método de doseamento fotocolorimétrico do radical DPPH (de cor violeta) em um processo guiado pela redução e descoloração do DPPH em solução metanólica na presença das amostras (extratos, frações ou controles). A avaliação da redução dos radicais DPPH pela transferência de elétron proveniente da substância que foi analisada. Durante o tempo reacional (60 min), o descoloramento foi quantificado com leitura em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 515 nm.

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (IP) do extrato da casca da raiz, caule e suas frações em hexano, clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), acetato de etila (AcOET), butanol, metanol/água e dos controles positivos ácido gálico e butil-hidroxitolueno (BHT) na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  no tempo de 60 min, determinada no ensaio com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), estão apresentados na Tabela 05.

**Tabela 05 Atividade antioxidante da *Simaba maiana* Casar. (SMC) determinada através da redução do radical livre DPPH e concentração de fenóis totais (F.T.) determinada pelo Método de Folin-Ciocalteu**

AMOSTRAS	IP(%)*	IC <sub>50</sub>	F.T em mg EAG**/g extrato
SMC Casca da Raiz	46,74	36,13±1,70 <sup>d</sup>	45,20±2,65 <sup>AB</sup>
SMC Raiz	47,09	37,43±4,76 <sup>d</sup>	41,87±5,69 <sup>AB</sup>
SMC Casca do Caule	83,19	21,04±0,67 <sup>bc</sup>	59,70±2,12 <sup>B</sup>
SMC Caule	28,33	46,37±5,66 <sup>d</sup>	33,20±1,41 <sup>AB</sup>
Fração Hexânica	11,04	65,56±5,8 <sup>e</sup>	20,87±0,58 <sup>A</sup>
Fração $\text{CHCl}_3$	44,94	35,74±3,26 <sup>d</sup>	37,70±6,36 <sup>AB</sup>
Fração AcOET	46,24	32,86±2,51 <sup>cd</sup>	46,53±5,03 <sup>AB</sup>
Fração Butanólica	46,78	32,13±0,24 <sup>cd</sup>	49,20±8,49 <sup>AB</sup>
Fração Hidrometanólica	24,80	42,953±2,71 <sup>d</sup>	44,53±3,79 <sup>AB</sup>
Ácido Gálico	96,24	6,81±0,11 <sup>ab</sup>	x
BHT	96,21	2,62±0,36 <sup>a</sup>	x

Fonte: Autor, 2012.

IP e o IC<sub>50</sub>(30  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato foi calculado com o tempo de 60 minutos em triplicata.

\*\*Valores expressos em mg Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/g de extrato  $\pm$  desvio-padrão.

Valores indicados com a letra são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

SMC (*Simaba maiana* Casar.), BHT (Butil-hidroxitolueno), F.T. (Fenóis Totais), Método de Folin-Ciocalteu (FCR), IP (Atividade Antioxidante), IC<sub>50</sub> (Concentração do Radical DPPH em 50%) e EAG (Equivalentes em Ácido Gálico). As frações foram obtidas do extrato bruto do caule de SMC.

A fração em butanol, extrato SMC casca da raiz, fração AcOET e  $\text{CHCl}_3$  que apresentaram maior atividade redutora do radical, com IP 46,78%, 46,74%, 46,24% e 44,94% respectivamente, demonstrando que os extratos apresentaram um fraco potencial redox-protetor uma vez que os valores de IP são inferiores a 50% e quando comparados ao controle positivo ácido gálico com IP 96,24% e BHT 96,21%.

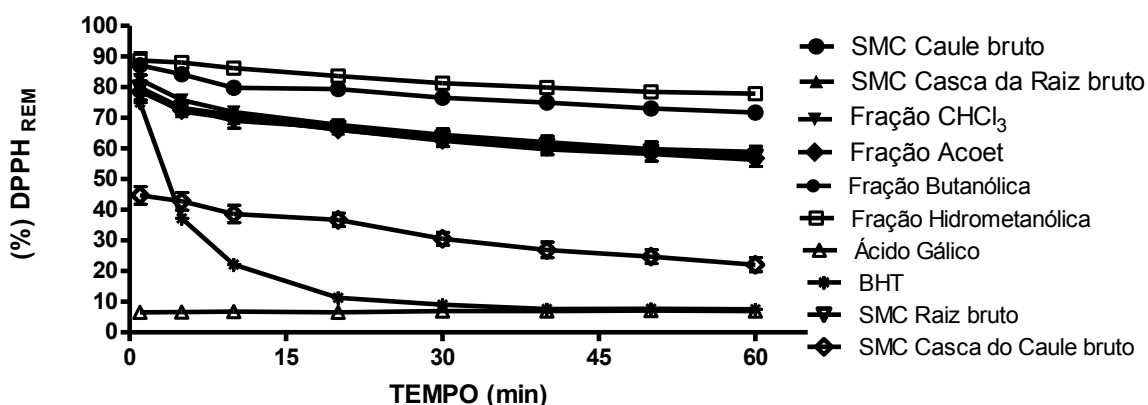
A quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração do radical DPPH em 50% (IC<sub>50</sub>) (Tabela 1), variou entre 65,56±5,8  $\mu\text{g/mL}$  (fração em hexano do caule) e 21,04±0,67  $\mu\text{g/mL}$  (extrato bruto da casca do caule). Ao se comparar os valores das amostras com os encontrados para as substâncias de referência ácido gálico (6,8±0,11  $\mu\text{g/mL}$ ) e BHT (2,3±0,36  $\mu\text{g/mL}$ ), pode-se observar que os extratos e frações de SMC avaliadas apresentaram uma fraca atividade, uma vez que quanto

maior redução de DPPH por extrato ou fração, menor será o seu  $IC_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método de Folin-Ciocalteu, expressos como mg de EAG por g de extrato são apresentados na Tabela 1. As concentrações de FT encontradas (caule  $59,70 \pm 2,12$  a  $20,87 \pm 0,58$  mg/EAG/g de extrato) são consideradas baixas quando comparadas a dados de outras espécies na literatura (SOUSA et al., 2007; KÄHKÖNEN et al., 1999).

O comportamento da descoloração do DPPH com os extratos, frações e com os controles positivos (ácido gálico e BHT) na concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$  está descrito no gráfico 01, através da curva dose resposta relativa ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH em função do tempo (min). Observou-se que todos os extratos e frações apresentaram reação lenta, atingindo somente cerca de 30% de consumo do DPPH no tempo de 50 minutos. Esses valores estão inferiores aos encontrados com os dados de Souza et al. (2007) e Argolo et al. (2004) que apresentam valores inferiores a 50%.

**Gráfico 01** Descoloração da solução do DPPH com os extratos, frações de *Simaba maiana* Casar. e controles positivos (ácido gálico e BHT) determinada espectrofotometricamente em 515 nm em solução metanólica de DPPH de concentração  $30 \mu\text{g/mL}$ .



Fonte: Autor, 2012.

A avaliação da capacidade redutora de radicais DPPH mostrou que os extratos e frações de SMC apresentaram fraca atividade antioxidante, sendo as fração em butanol, o extrato SMC da casca da raiz e as frações em AcOET e  $\text{CHCl}_3$  de maior atividade. Esse mecanismo de redução de radicais livres como o DPPH

envolve doação de hidrogênio. Baseado em dados da literatura é possível inferir; que a atividade antioxidante de extratos polares é dada pela presença de substância com hidroxilas (HARBONE e WILLIAMS, 2001; MENSOR et al., 2001).

O extrato e frações apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, foram os que obtiveram os melhores valores de IP. Alguns estudos (EINBOND et al., 2004; BANERJEE et al., 2005; CHOI et al., 2006) relatam que muitas atividades biológicas, assim como a antioxidante, são consequências do alto teor de compostos fenólicos. Dessa forma, a concentração de compostos fenólicos das amostras supracitadas está relacionada aos melhores efeitos destas na capacidade de sequestrar os radicais DPPH.

#### 9.2.2 Ensaio TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

A peroxidação lipídica (ou reação de lipoperoxidação) consiste no ataque das ERMOS (espécies reativas do metabolismo do oxigênio) a lipídeos de membranas. A reação é iniciada com a retirada de um hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana plasmática, pela ação da  $\text{OH}^\cdot$  ou pelo radical alcóxila ( $\text{LO}^\cdot$ ), formando-se o radical lipídico ( $\text{L}^\cdot$ ) (UCHIDA, 2000). Ao final da reação, vários subprodutos são formados. Esses compostos são geralmente aldeídos, como o malondialdeído (MDA), que é considerado o principal causador de danos oxidativos ao organismo (URSO e CLARKSON, 2003; UCHIDA, 2000).

A lipoperoxidação pode ser também catalizada por íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  na conversão dos hidroperóxidos lipídicos ( $\text{LOOH}$ ) a radicais  $\text{LO}^\cdot$  e  $\text{LOO}^\cdot$ . Esses são altamente reativos e inicializam uma nova cadeia de reações, denominadas reações de ramificação, que podem ser rápidas ou lentas, o que depende da valência do ferro.

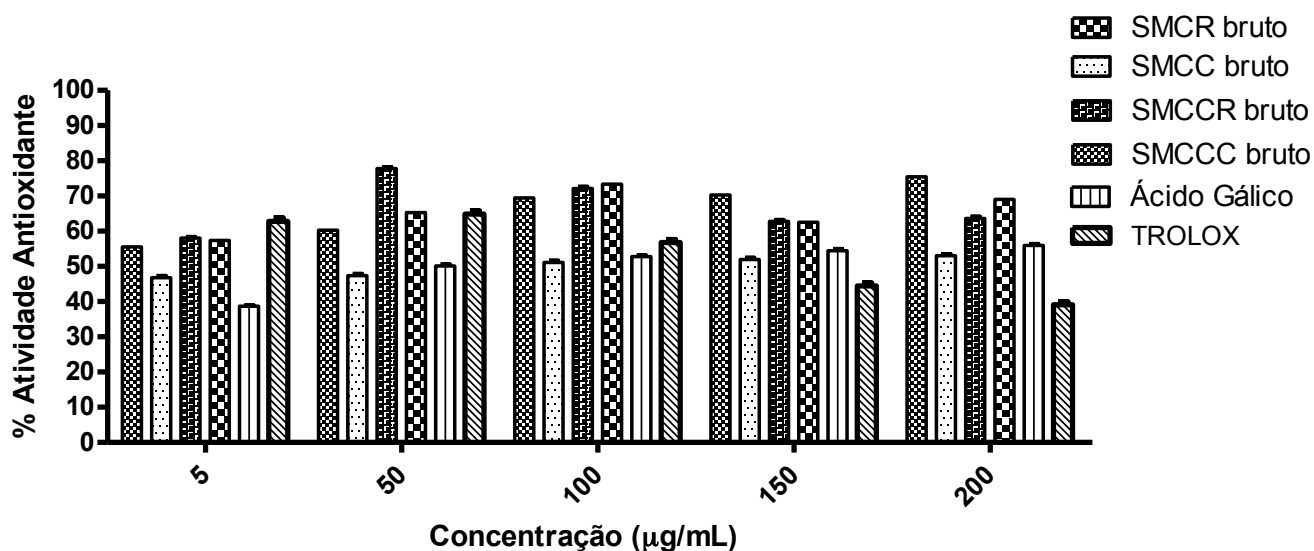
A diminuição da oxidação lipídica por radicais livres induzidos por três geradores (AAPH,  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi avaliada pelos níveis de redução na formação de TBARS.

As diferentes concentrações dos extratos brutos de SMC apresentaram comportamento bastante diferenciado. O SMCCR (casca da raiz) na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  reduziu o maior nível de formação de TBARS em mais de 75% (Gráfico 2). Ainda nessa concentração, o SMCR (raiz) apresentou cerca de 65% de redução.

Os dois extratos brutos obtiveram resultados, para essa concentração, de inibição do dano oxidativo por  $H_2O_2$  maior que os controles positivos ácido gálico (64,86%) e TROLOX (45,53%).

Na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , o extrato SMCCC (casca do caule) reduziu a formação de TBARS em maior quantidade (75,47%), seguido pelo SMCR (69,02%) e SMCCR (63,62%), que os valores mais elevados das substâncias de referência (Gráfico 02).

**Gráfico 02** Comportamento dos extratos brutos de *Simaba maiana* Casar. e dos controles positivos Ácido Gálico e TROLOX frente ao agente indutor de dano oxidativo  $H_2O_2$ \*.

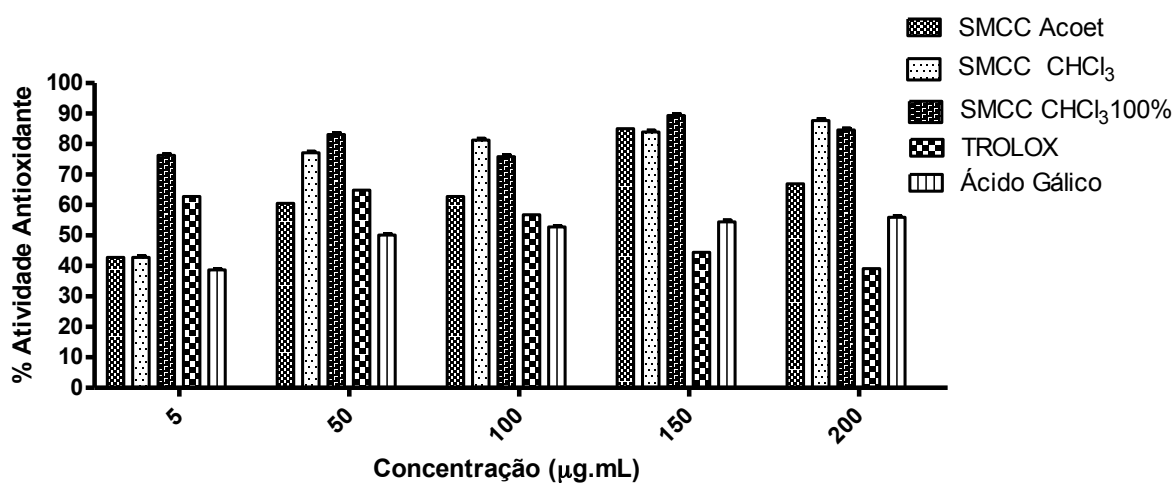


Fonte: Autor, 2012.

\*Os valores são significativos a  $p \leq 0,05$ . SMCR bruto (raiz), SMCC bruto (caule), SMCCR bruto (casca da raiz) e SMCCC bruto (casca do caule).

Para as frações provenientes do extrato bruto do caule de SMC, pode-se observar uma maior atividade antioxidante da fração  $CHCl_3$  100%, apresentando valor de inibição da formação de substâncias reativas em torno de 89,40% na concentração de 150  $\mu\text{g/mL}$  (Gráfico 03).

**Gráfico 03** Comportamento das frações de *Simaba maiana* Casar. e dos controles positivos Ácido Gálico e TROLOX frente ao agente indutor de dano oxidativo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\*.



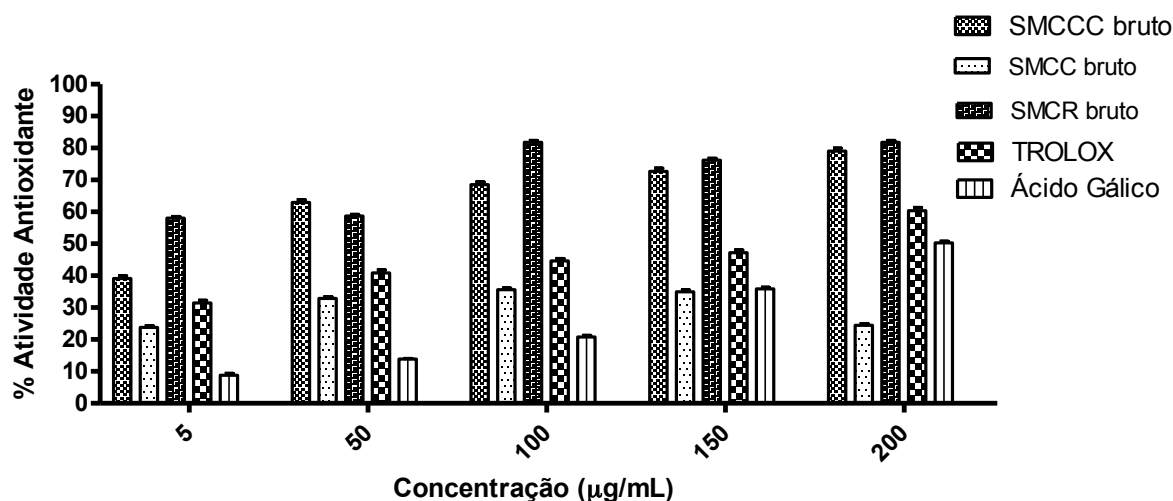
Fonte: Autor, 2012.

\*Os valores são significativos a  $p \leq 0,05$ . SMCC AcOET (fração AcOET do caule), SMCC CHCl<sub>3</sub> (fração CHCl<sub>3</sub> do caule) e SMCC CHCl<sub>3</sub> 100% (fração CHCl<sub>3</sub> 100% do caule).

As frações AcOET e CHCl<sub>3</sub> apresentaram resultados semelhantes para as concentrações de 150 e 200 µg/mL. Os valores de SMC apresentaram-se superiores aos dos controles ácido gálico e TROLOX, exceto nas concentrações de 5 µg/mL onde este último (62,79%) foi superior ao SMCC AcOET (42,83%) e 50 µg/mL, onde o TROLOX (64,86%) foi superior a SMCC AcOET (60,50%).

O AAPH é um azo composto capaz de gerar radicais livres a 37°C, onde esses radicais levam à lipoperoxidação da membrana. A indução pelo AAPH, apresenta como característica a geração de um carbono central radicalar que reage com oxigênio para formar um radical peroxil (BUDNI et al., 2007). Frente ao azo composto, os extratos brutos de SMC casca do caule (SMCCC) e raiz (SMCR) apresentaram na concentração de 200 µg/mL valores respectivamente de 81,13% e 81,82%. Mais uma vez os valores da atividade antioxidante dos extratos de SMC foram superiores aos dos controles ácido gálico (50,31%) e TROLOX (60,38%) (Gráfico 04).

**Gráfico 04** Comportamento dos extratos brutos de *Simaba maiana* Casar. e dos controles positivos Ácido Gálico e TROLOX frente ao agente indutor de dano oxidativo AAPH\*.



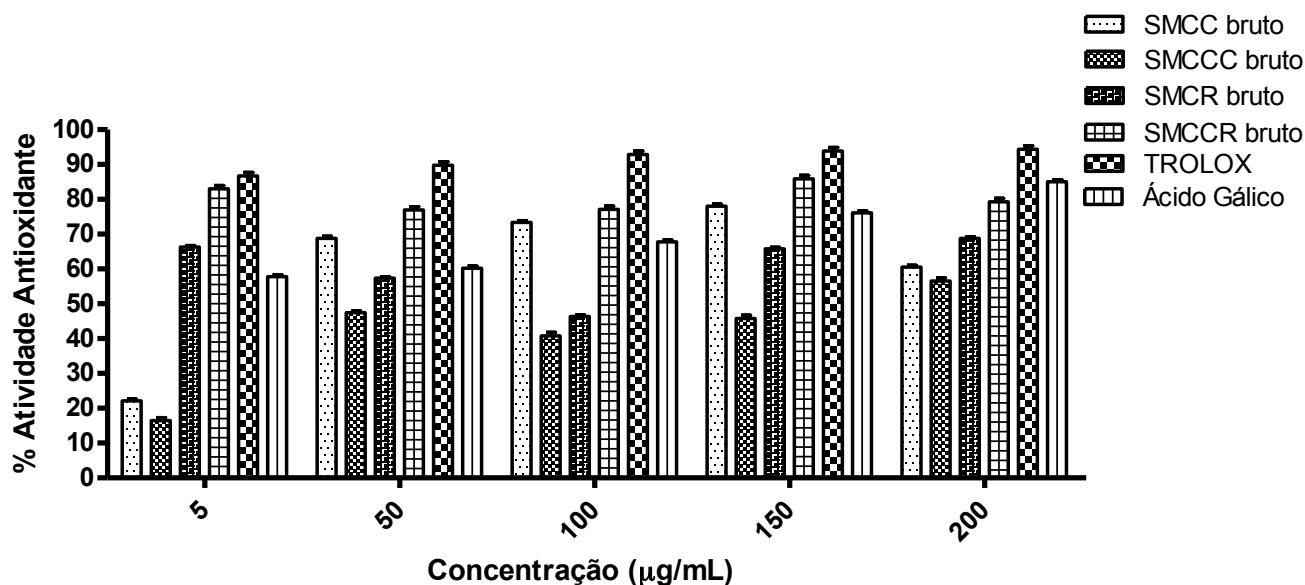
Fonte: Autor, 2012.

\*Os valores são significativos a  $p \leq 0,05$ . SMCCC (casca do caule), SMCC (caule) e SMCR (raiz).

Para as concentrações acima de 100 µg/mL, os extratos SMCC e SMCCR apresentaram valores de inibição de TBARS de cerca de 70% quando comparados aos controles (Gráfico 05). Entretanto, sob o efeito de  $\text{FeSO}_4$  como agente indutor do dano oxidativo em relação ao AAPH e  $\text{H}_2\text{O}_2$  os controles apresentaram comportamento diferenciado superando os extratos de SMC em proteção contra os danos.

Quando sais de ferro são adicionados a meio de cultura celular, podem reagir com oxigênio e formar radical ânion superóxido que ainda poderá sofrer dismutação a peróxido de hidrogênio, podendo iniciar a peroxidação lipídica. O mesmo pode ocorrer com a inibição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  levando diretamente à oxidação de lipídeos e proteínas, pela ação de seus subprodutos como o radical hidroxila (BUDNI et al., 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

**Gráfico 05** Comportamento dos extratos brutos de *Simaba maiana* Casar. e dos controles positivos Ácido Gálico e TROLOX frente ao agente indutor de dano oxidativo  $\text{FeSO}_4$ .



Fonte: Autor, 2012.

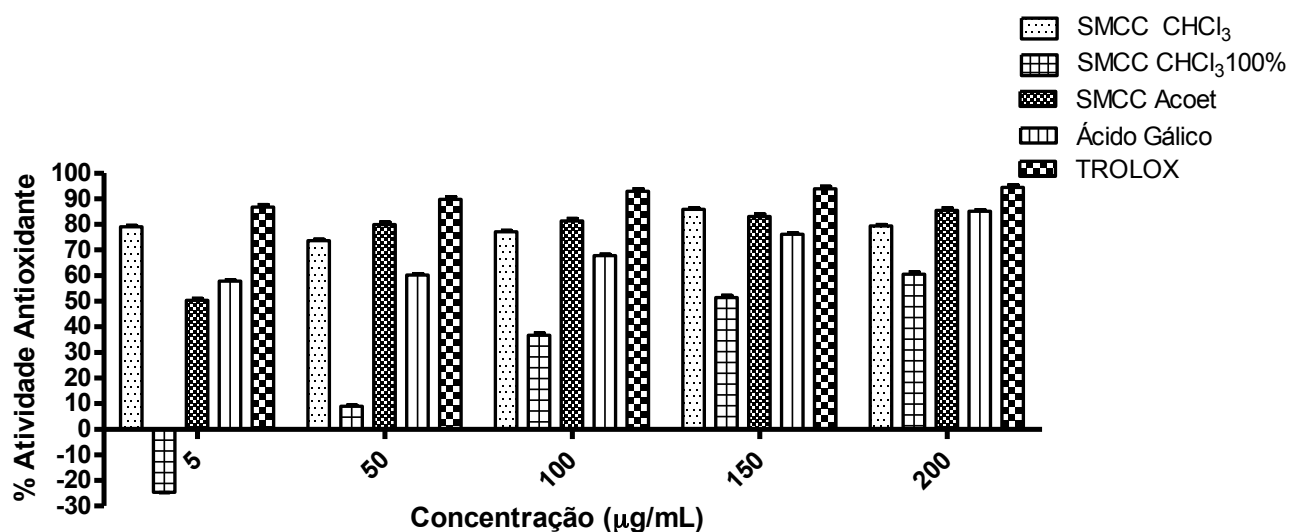
\*Os valores são significativos a  $p \leq 0,05$ . SMCC (caule), SMCCC (casca do caule), SMCR (raiz) e SMCCR (casca da raiz).

A fração SMCC  $\text{CHCl}_3$  100% apresentou atividade pró-oxidante na concentração de 5 µg/mL (Gráfico 06), sendo que a partir do momento que os valores de concentração foram aumentando, a fração passou a ter efeito antioxidante moderado, já que passou a inibir a formação de TBARS em 60,50% na concentração de 200 µg/mL.

As frações AcOET e  $\text{CHCl}_3$  apresentaram atividade antioxidante de 85,42% e 79,31% bem próximas do valor encontrado para o TROLOX (94,41%).



**Gráfico 06** Comportamento das frações de *Simaba maiana* Casar. e dos controles positivos Ácido Gálico e TROLOX frente ao agente indutor de dano oxidativo  $\text{FeSO}_4^*$ .



Fonte: Autor, 2012.

\*Os valores são significativos a  $p \leq 0,05$ . SMCC  $\text{CHCl}_3$  (fração clorofórmica do caule), SMCC  $\text{CHCl}_3$  100% (fração  $\text{CHCl}_3$  100% proveniente da fração clorofórmica do caule) e SMCC AcOET (fração acetato do caule).

Outros experimentos com frações e material isolado devem ser realizados para que esses resultados sejam confirmados e assim poder esclarecer a ação da *Simaba maiana* Casar. frente aos agentes causadores de danos causados em lipídeos.

### 9.2.3 Teste de Citotoxicidade

Citotoxicidade é um termo muito abrangente que, em linhas gerais, significa, morte celular induzida. Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO et al., 2000). Ainda de acordo com Rogero et al. (2003), o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais (e.g., vermelho neutro) solúveis em água e que passam através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo

de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996).

O teste de viabilidade celular (células epiteliais de córnea ovina) foi realizado de modo a racionalizar a pesquisa com fitofármacos, direcionando a busca de substâncias naturais mais ativos e com menor toxicidade ou ainda, com a possibilidade de apresentar risco-benefício maior que as drogas disponíveis no mercado farmacêutico atual.

Os extratos brutos de SMC foram testados em três diferentes concentrações 10, 50 e 100 µg/mL. Nesta última, todos os extratos apresentaram 100% de toxicidade celular (Tabela 06). Na concentração intermediária (50 µg/mL), o extrato da casca da raiz ainda apresenta-se muito tóxica com 100% das células não viáveis. Entretanto, os extratos da raiz (22,19%), caule (19,24%) e casca do caule (9,42%) apresentaram porcentagem de citotoxicidade moderada. Já na concentração de 10 µg/mL os valores foram baixos e variaram entre 15,30% (extrato bruto da casca da raiz) e 3,80% (extrato bruto da casca do caule).

**Tabela 06 Toxicidade celular (córnea ovina) de extratos brutos de *Simaba maiana* Casar. em porcentagem (%).**

EXTRATOS	TOXICIDADE (%)		
	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
SMC Casca da Raiz	15,30	100	100
SMC Raiz	10,61	22,19	100
SMC Caule	10,41	19,24	100
SMC Casca do Caule	3,80	9,42	100

Fonte: Autor, 2012.

Segundo Jansen et al. (2006) o alcalóide esquimianina também isolado no presente trabalho apresentou atividade citotóxica. Provavelmente, esse alcalóide esteja relacionado com esse resultado, ou ainda, pode estar correlacionado com outras substâncias presentes nos extratos, como os quassinóides (grupo de substâncias quase que exclusivo das espécies de Simaroubaceae), que apresentam atividade citotóxica (ALMEIDA, et. al., 2007).

#### 9.2.4 Atividade Moluscicida

O ensaio para avaliação da atividade moluscicida, utilizados neste trabalho, constitui uma importante alternativa para o controle do vetor dos parasitas da esquistossomose, por ser um teste rápido, barato e eficiente, uma vez que é recomendado pela OMS (MARSTON e HOSTETTMANN, 1985; HOSTETTMANN, 1989).

Segundo Hostettmann et al. (1980), os extratos são considerados bioativos em caramujos adultos quando a  $CL_{90}$  (concentração letal a 90% da população estudada) for inferior a 400  $\mu\text{g/mL}$ , porém, segundo a OMS, a atividade é considerada significativa quando a  $CL_{90}$  for inferior a 100  $\mu\text{g/mL}$  (WHO, 1965 e WHO, 1983). Assim, os extratos da SMC ao apresentarem porcentagem de mortalidade a 100  $\mu\text{g/mL}$  de 100% (dados não apresentados) foram submetidos ao tratamento estatístico para a obtenção de  $CL_{90}$ ,  $CL_{50}$  e  $CL_{10}$  (Tabela 07).

**Tabela 07 Atividade moluscicida dos extratos brutos de *Simaba maiana* Casar. em concentrações letais ( $CL_{10}$ ,  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ).\***

AMOSTRAS	$CL_{10}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CL_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
casca da raiz	28,90	43,69	66,06
raiz	9,19	26,3	77,66
casca do caule	26,78	35,98	48,33
caule	8,71	25,24	84,36

Fonte: Autor, 2012.

\*O tempo de exposição foi de 24 horas e o de observação 96 horas, com leitura e troca de água a cada 24 horas, além da remoção dos exemplares mortos.

Dentre os valores de  $CL_{90}$  dos extratos brutos testados frente ao *B. glabrata*, o extrato bruto da casca do caule (48,33  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido pelo extrato bruto da casca da raiz (66,06  $\mu\text{g/mL}$ ) foram os mais eficientes. Leyton et al. (2005), encontraram valores de  $CL_{50}$  (66,46 – 83,17  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $CL_{90}$  (149,90 – 220,90  $\mu\text{g/mL}$ ) mais elevados que os apresentados por este estudo, o que indica um bom efeito dos extratos de SCM para esse uso.

Em decorrência dos efeitos encontrados pelo extrato bruto do caule de SMC, foram testadas as suas frações em hexano,  $\text{CHCl}_3$ , AcOET,  $\eta$ -butanol e água/MeOH frente ao *B. glabrata* adulto (Tabela 08).

**Tabela 08 Atividade moluscicida das frações do extrato do caule de *Simaba maiana* Casar. em porcentagem (%) de mortalidade.\***

AMOSTRAS	Mort. (%) 50 µg/mL	Mort. (%) 100 µg/mL
hexânica	16,6	83,3
clorofórmica	16,6	66,6
acetato de etila	16,6	66,6
butanólica	0,0	66,6
hidrometanólica	0,0	33,3

Fonte: Autor, 2012.

\*O tempo de exposição foi de 24 horas e o de observação 96 horas, com leitura e troca de água a cada 24 horas, além da remoção dos exemplares mortos.

A metodologia preconizada pela OMS (WHO, 1965) considera que o extrato pode ser classificado como inativo, se levar de 0 a 30% de mortalidade, parcialmente ativo se levar de 40 a 60% de mortalidade e ativo se levar de 70 a 100% de mortalidade aos caramujos. Conforme tabela 4, a fração hexânica do caule apresentou o maior efeito moluscicida. Este resultado está de acordo com Pereira e Souza (1974), que indicaram uma maior eficiência para o extrato hexânico em *Anacardium occidentale* como moluscicida.

O uso de moluscicidas requer o entendimento sobre o mecanismo de ação dessas substâncias nos moluscos (SINGH et al., 1999). A elucidação desse processo necessita de estudos que revelem os detalhes referentes ao perfil fitoquímico do vegetal e a resposta fisiológica do molusco frente aos constituintes químicos (CANTANHEDE et al., 2010).

#### 9.2.5 Avaliação Inibitória de Linfoproliferação e de Inibição de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso produzido endogenamente por vários mamíferos que possui uma gama de funções, como a atuação em muitos processos fisiológicos entre eles, a regulação do sistema imune.

O extrato bruto do caule de SMC (100 µg/mL) não apresentou inibição significativa do radical NO (23,99%) em macrófagos induzidos por lipopolissacarídeos (Tabela 05).

**Tabela 05 Percentual de inibição da linfoproliferação e da inibição de óxido nítrico (NO) pelo extrato bruto do caule de *Simaba maiana* Casar.\***

EXTRATO (100 µg/mL)	INIBIÇÃO (%)	
	Linfoproliferação	Inibição de NO
SMC Caule	98,94	23,99

Fonte: Autor, 2012.

\*Inibição da Linfo. Con A – Fração com inibição  $\geq 80\%$  foi considerada ativa.

Ao se avaliar o potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth., Chagas et al. (2010) também observaram baixos índices para a inibição de NO em macrófagos ativados, já que os percentuais variaram de 14% (extrato aquoso) a 23% (extrato hidroalcoólico da casca).

Kang et al. (2010) estudaram furanocumarinas (inclusive a felopterinina) presentes no extrato etanólico de *Angelica dahurica* e detectaram o decréscimo nos níveis de NO quando mensurados pelo Reagente do Griess, o mesmo utilizado no presente trabalho. Compostos inibidores de NO geralmente apresentam potencial imunomodulador (COSTA, 2004). Entretanto, o mesmo extrato de SMC (100 µg/mL) ao ser submetido a ensaios de linfoproliferação por estimulação com antígeno e de reações mistas linfocitárias, apresentou 98,94% de atividade, resultado bastante significativo. Resultado semelhante foi encontrado por Chagas et al. (2010) para a linfoproliferação no extrato aquoso com 86%, em menor escala no extrato a frio da folha (38,5%), extrato a quente da folha (32,6%) e extrato hidroalcoólico da casca (32,6%) quando avaliados na concentração de 100 µg/mL, a mesma utilizada neste estudo.

A inibição da linfoproliferação celular em *C. laurifolia* estudada por Chagas et al. (2010) parece estar associada a uma atividade anti-inflamatória, já que a redução do crescimento celular implica em diminuição de receptores solúveis produzidos por estas células e de proteases que convertem precursores inativos em ativos (PUNZON et al., 2003). Assim, como os resultados encontrados no extrato bruto do caule de *Simaba maiana* Casar. são semelhantes aos supracitados, um “screening” da atividade anti-inflamatória deve ser realizado para uma melhor investigação dos efeitos encontrados.

Deve-se considerar ainda a possibilidade de uma ação inespecífica de substâncias presentes no extrato, uma vez que algumas moléculas podem estar agindo de forma a impedir que o mitógeno utilizado (concovalina A) ligue-se às moléculas que levariam a estimulação dos linfócitos, e não por um mecanismo direto de inibição de ativação linfocitária (COSTA, 2004). Assim, para se confirmar o efeito supressor, o extrato bruto do caule e as suas frações devem ser submetidos a ensaios de linfoproliferação por estimulação com antígeno e de reações mistas linfocitárias, nas quais poderá ser observada a existência de atividade.

#### 9.2.6 Avaliação da Atividade anti-*Leishmania amazonensis* e anti-*Trypanosoma cruzi*

Entre as estratégias utilizadas na busca de novas drogas eficazes contra a *L. amazonensis* e *T. cruzi* está a triagem de moléculas que atuam em alvos importantes da biologia das espécies envolvidas no processo de transmissão.

O extrato bruto do caule de SMC (100 µg/mL) não foi ativo no que confere às atividades leishmanicida e tripanocida (Tabela 06).

**Tabela 06 Extrato bruto do caule de *Simaba maiana* Casar. frente *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi***

EXTRATO (100 µg/mL)	INIBIÇÃO	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
SMC Caule	inativo	inativo

Fonte: Autor, 2012.

Para inibição da *Leishmania amazonensis*, frações foram considerados ativos e *Trypanosoma cruzi*

Ali et al. (2002) evidenciaram a inatividade do extrato etanólico de folhas e frutos de *Ziziphus spinachristi* frente a frente a *T. cruzi* e *T. brucei rhodesiense*. Segundo Rosas et al. (2007) as atividades tripanocidas dos diferentes extrato e frações de *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae) é devido a presença acentuada de triterpenos pentacíclicos, que é uma classe eficaz contra *T. cruzi*. Schinor et al. (2007) ao testar a viabilidade de extratos e compostos isolados de *Chresta scapigera* encontrou terpenos e alguns flavonóides ativos contra *L.*

*amazonensis* e dois flavonóides ativos contra *T. cruzi*. Resultado semelhante foi encontrado por Santos et al. (2011), que para a atividade anti-L. braziliensis o alcalóide esquimianina diminuiu a produção de NO, sendo uma potencial substância imunomoduladora .

Com isso, o isolamento de outros compostos provenientes dos extratos de SMC deve ser realizado, de modo que se possa confirmar ou não o resultado encontrado.

## 10 CONCLUSÕES

O desenvolvimento desse trabalho levou a obtenção de informações relevantes sobre diversos aspectos envolvidos:

- Foram isolados dois compostos (alcalóide esquimianina e a cumarina felopterina) provenientes da fração clorofórmica do extrato do caule de SMC;
- Os extratos e frações de SMC apresentaram uma fraca atividade antioxidante pelo método de redução do radical livre DPPH;
- Foram determinadas baixas concentrações de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Para os testes de TBARS, outros experimentos precisam ser realizados com frações e compostos isolados para que seja esclarecida a ação da SMC frente aos danos causados pelos agentes indutores de danos oxidativos;
- Os extratos brutos apresentaram atividade citotóxica na concentração de 100 µg/mL;
- Extratos e frações de SMC podem ser considerados bioativos frente ao invertebrado *B. glabrata*;
- O extrato bruto do caule inibiu a linfoproliferação, entretanto não foi eficiente ao inibir o radical óxido nítrico. De forma que outros testes devem ser realizados de modo a se confirmar o seu efeito imunossupressor
- O extrato bruto do caule não foi ativo no que se refere às atividades leishmanicida e tripanocida;
- Existe a necessidade de estudos complementares de purificação dos extratos para isolamento e identificação de compostos que possam ser responsáveis pela atividades encontradas.



## REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G. O.; et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 283-398, 1998.
- ALBARICI, T. R. **Estudo fitoquímico de *Rauia* sp. e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária dos extratos e substâncias isoladas**. 2006. 182f. Tese. (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- ALI, H.; et al. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 219-228, 2002.
- ALMEIDA, M. M. B.; et al. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.
- ALMEIDA NETO, J. X.; et al. Avaliação do efeito mutagênico da palma forageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do teste do micronúcleos em medula óssea de ratos (*Ratus norvegicus*, linhagem Wistar) in vivo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005.
- ALVES, C. Q.; et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ARGOLO, A. C. C.; et al. Antioxidant activity of leaf extrats from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, n. 95, p. 229-233, 2004.
- ATOUI, A. K.; et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 27, 2005.
- BACCHI, E. M. Alcalóides tropônicos. In: Simões, C. M. O. et al. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, 2004.
- BERGENDORFF, O.; et al. Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors in vitro. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1121-1124, 1997.
- BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1977.
- BRANCO, G. F. **Aplicação de técnicas fatoriais de planejamento no desenvolvimento de um módulo de avaliação da oxidação em óleos e emulsões**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, n. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, Brasília: Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

\_\_\_\_\_. Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010a.

\_\_\_\_\_. Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/moluscos\\_cap\\_7.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/moluscos_cap_7.pdf). Acesso em 10/06/2010b.

\_\_\_\_\_. Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6 ed. Série A. **Normas e manuais técnicos**. Brasília: SVS / MS, 2005.

\_\_\_\_\_. Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: SVS / MS, 2007.

BROWN JÚNIOR, K. S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônia**, v. 18, n. 1, p. 291-303, 2004.

BUDNI, P.; et al. Estudos preliminares da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas jovens e adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 394-8, 2007.

CABRAL, J. A.; et al. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 11, p. 1954-1961, 1993.

CARDOSO-LOPES, E. M.; et al. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. **Molecules**, n. 15, p. 9205-9213, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; et al. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: Simões, C. M. O. et al. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, 2006. pp 519-535.

CALABRESE, V., E.; et al. Redox Regulation of Cellular Stress Response in Aging and Neurodegenerative Disorders: Role of Vitagenes. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 4, p. 757-773, 2007.

CAPASSO, R.; et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, n. 58, p.71, 2000.

CASTRO, H. G.; et al. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.

CANTANHEDE, S. P. D.; et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 282-288, 2010.

CHAGAS, A. P.; et al. Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 1 p. 117-124, 2010.

CHOI, C. W.; et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Koean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, n. 163, p. 1161-1168, 2002.

CIAPETTI, G.; et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, n.17, p. 1259-1264, 1996.

CONSTANT, W. L; et al. A general method for the dereplication of flavonoid glycosides utilizing high performance liquid chromatography/mass spectrometric analysis. **Phytochemical Analysis**, n. 8, p. 176-180, 1997.

COSTA, J. F. O. **Investigação de atividades anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora em extratos de plantas do Semi-Árido Brasileiro**. 2004. Dissertação. (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia/FIOCRUZ, Salvador, 2004.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, n. 6, p. 241-8, 1998.

DING, A. H.; et al. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, n. 141, p. 2407-2412, 1988.

FILHO, V. C; YUNES. R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 15 ed. New York: John Wiley and Sons, 642 p., 2005.

GAINES, H.; et al. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, n. 195, p. 63-72, 1996.

GOTTLIEB, O.R.; et al. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: UFRJ, 268 p., 1996.

- GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso state Brazil: a review. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O. et al. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, 2004.
- GUPTA, M. P. **Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Andrés Bello, p. 515-516, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon: Oxford, 936 p., 2000.
- HENEKA, B.; et al. A furanocoumarin and polymethoxilated flavonoids from the Yucatec Mayan plant *Cassimiroa tetrameria*. **Phytochemistry**, n. 66, p. 649-652, 2005.
- HENRIQUES, A. T.; et al. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C. M. O. et al. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, 2004.
- HOSTETTMANN, K. **Economic and medicinal plant research**. In: Wagner, H.; Hikino, H.; Farnsworth, N. R. (Eds.) London: Academic Press, v. 3, p. 73, 1989.
- HOSTETTMANN, K.; et al. Molluscicidal properties of various saponins. **Planta Medica**, n. 44, p. 34-35, 1982.
- HOSTETTMANN, M. P.; et al (Eds.) **Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicin Plants from the Americas: proceedings of the IOCD/CYTED Symposium**, Panama City: Panama, 1997.
- HUANG, D.; et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores socio-demográficos e de saúde no Brasil**. Rio de Janeiro. (Estudos e pesquisas. Informação demográfica e socioeconômica, 25). Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic\\_sociosaude/2009/indicsaude.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/indicsaude.pdf). Acesso em: 10/06/2012.
- JANSEN, O.; et al. Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum A.* Juss. for their cytotoxic properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, n. 1-2, p. 241-245, 2006.
- JOLY, A. B. (1998). **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Nacional, 777 p.

KANG, S.W.; KIM, C. Y.; Rapid identification of furanocoumarins in *Angelica dahurica* using the online LC-NMR-MS and their nitric oxide inhibitory activity in RAW 264.7 cells. **Phytochemical Analysis**, n. 21, p. 322-327, 2009.

KELLOFF, G. J.; et al. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemoprevention Agents. **American Society for Nutrition Sciences**, p. 467-471, 2000.

KRENSKY, A. M.; CLAYBERGER, C. Granulysin: a novel host defense molecule. **American Journal of Transplantation**, n. 8, p. 1789-1792, 2005.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: Simões, C. M. O. et al. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

LABRADOR MORENO, J.; ALTIERI, M. Manejo y diseño de sistemas agrícolas sustentables. In: **HOJAS Divulgadoras**. Madrid: Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, n. 6-7, 52 p. 1994.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LEANDRO, C. e CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemo resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 22, p. 352-357, 2003.

LEE, G. R.; et al. **Wintrobe's clinical hematology**. 10 ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 1999.

LEE, S. J.; et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-7, 2005.

LEYTON, V. et al. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia: Série Zoologia**, v. 95, n. 2, p. 213-216, 2005.

MARCELLO, C. M. et al. Efeito hidrometanólico de *Simaba ferruginea* ST. Hil (Simaroubacea) sobre o tempo de sono barbitúrico e sobre o trato intestinal. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 17, 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá-MT: UFMT, 2002.

MARQUES, A. S. F. **Estudo Fitoquímico de três espécies de Rutaceae e avaliação biológica de produtos naturais em modelos celulares de bioquímicos de tripanosomatídeos**. 2006. 266f. Tese. (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. **Phytochemistry**, n. 24, p. 639-652, 1985.

MASTERS, J. R. W. **Animal Cell Culture** - A Practical Approach. 3 ed. London: Oxford University Press, 315 p., 2000.

MONTANARI, C. A.; BALZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-24, 2004.

MORETTI, C.; et al. Two new quassinoides from *Simaba multiflora* fruits. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 3, p. 440-444, 1994.

MUHAMMAD, I.; et al. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 772-777, 2004.

MYUNG-SOOK, C; et al. Dereplication of Saccharide and Polyol Constituents of Candidate Sweet-tasting Plants: Isolation of the Sesquiterpene Glycoside Mukurozioside IIb as a Sweet Principle of *Sapindus rarak*. **Phytochemical Analysis**, n. 8, p. 49-54, 1997.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n.1/2, p. 95-111, 2004.

NOLDIN, V. F. **Estudos fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferruginea* ST. HIL. e avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isolados**. 2005. 91f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

OMS, Organização Mundial de Saúde – Segundo relatório do comitê de especialistas. **O controle da esquistossomose**, Rio de Janeiro:Editora Fiocruz, (1994).

OZEKI, A.; et al. Citotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 6, p. 776-780, 1998.

OLIVEIRA, E. R. **O que é medicina popular**, São Paulo: Ed. Brasiliense, 92 p. 1995.

PAULINI, H.; et al. Mutagenicity and structure-mutagenicity relation ships of furoquinolines naturally occuring alkaloid of the Rutaceae. **Mutation Research**, n. 227, p.179-186, 1998.

PICCIN, E. **Determinação de polifenóis totais utilizando sistemas de análise por injeção em fluxo**. 2004. 98f. Dissertação. (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

PINTO, A.C.; et al. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, n. 25, p. 45-61, 2002.

POLONSKY, J.; et al. The antineoplastic quasinoids of *Simaba cuspidate* Spruce and *Ailonthus grandis* Prain. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 4, p. 503-509, 1998.

PUNZON, C.; et al. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 9, p.1293-9, 2003.

RAZDAN, T. K.; et al. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2063-2069, 1987.

ROGERO, S.O.; et al. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROGERO, O. E; et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Reseach**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROSA, S.G.T. **Germinação de sementes de espécies medicinais da flora do Rio Grande do Sul**. 2000. 140f. Tese. (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2000.

ROSA, S.G.T; FERREIRA, A.G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botânica Brasilica**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 2001.

ROSAS, L. V.; et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 663-670, 2007.

RIBEIRO, L.R.; et al. **Mutagênese ambiental**, 1 ed. Canoas: Editora Ulbra, 2003.

SÁNCHEZ- MORENO, C.; et al. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.76, p. 270-276, 1998.

SANTOS, A. F. **Determinação da atividade anti-esquistossomótica de extratos e substâncias puras obtidas de plantas**. 2005. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, (2005).

SANTOS, R. A. N. dos; et al. Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. **Parasitology**, n. 138, p. 1224-1233, 2011.

SARAIVA, R. C. G.; et al. Triterpenos e alcalóide isolados de *Simaba polyphylla* Cavalc. (Simaroubaceae). In: Congresso latinoamericano de Química/ reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 18/27, 2004. Salvador. **Anais...** Salvador, 2004.

SARAIVA, R. C. G.; et al. Anatomia foliar e caulinar de *Picrolemma spruce* Hook (Simaroubaceae). **Acta Amazônica**, v. 33, n. 2, p. 213-220, 2011.

SCHINOR, E.C.; et al. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 295-300, 2007.

SEBASTIÃO, F.P. J; et al. Analysis by GC-MS of the hexane extract of the aerial parts of *Aristolochia acutifolia* Duchtr. **Flavour and Fragrance Journal**, n.16, p. 85-88, 2001.

SHAHIDI, F.; et al. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n.1, p. 67-103, 1992.

SILVA, F.M. **Verificação da eficácia dos bioensaios com extratos aquosos no diagnóstico de potencial alelopático: contribuição ao estudo de espécies nativas brasileiras**. 2004. 142f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SILVA, F.M. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray drying de *Ilex paraguaiensis* A. St. Hil.-Aquifoliaceae (erva mate)**. 2007. 243f. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; et al. Fenóis Totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 22, p. 351-355, 2007.

STORZ, G.; et al. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 84, n. 2, p. 8917-8921, 1987.

THOMAZZI, S. M.; et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, n. 127, p. 451-456, 2010.

TOMA, W. et al. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained the bark wood *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 12, p. 1685-1696, 2000.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 15, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VALOIS, A. C. C.; et al. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.) **Recursos genéticos e melhoramento** – plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 1183 p., 2001.



WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; et al. (1978). Plant antitumor agents. XVI 6-alfa-seneciolyoxy-ceaparrionone, a new antileukenic quassinoid from *Simaba multiflora*. **Lloydia** 41(6):578-583.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**, Oxford: Blackwell Scientific Publication, p. 83-85, 1994.

WHO (World Health Organization). Memorando - molluscicide screening and evaluation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 33, n. 4, p. 567-581, 2000.

\_\_\_\_\_. Reports of the scientific working group on plant molluscicides. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 927-929, 1983.

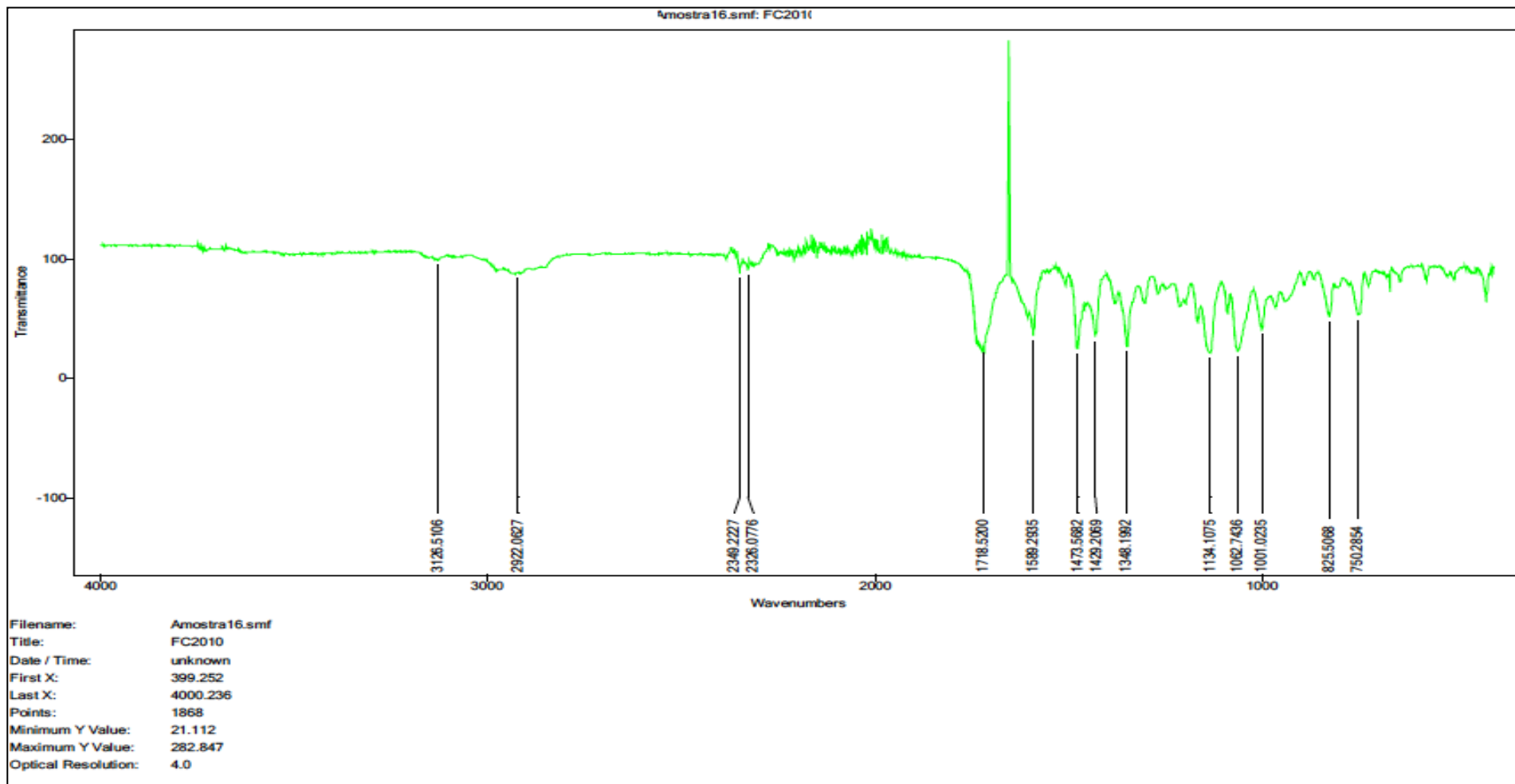
WOLFENDER, J. L; et al. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography Acta**, n. 794, p. 299-316, 1998.

WOLFF, S. P.; et al. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends in biochemical sciences**, v. 11, n. 2, p. 27-31, 1986.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Argos, 120 p., (2001)

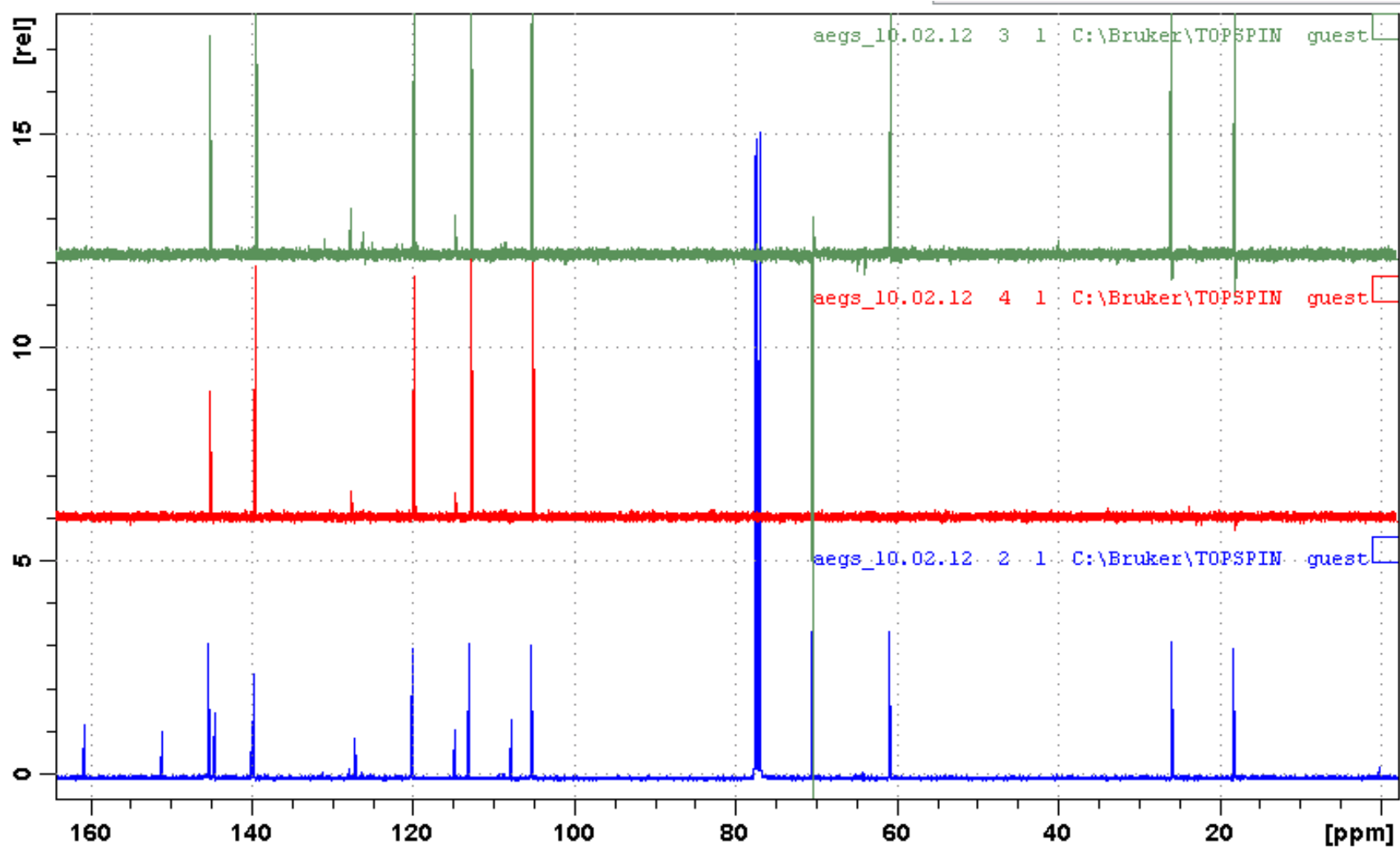
**APÊNDICE****A Composto isolado – FC2010 - Furanocumarina linear Felopterina**

Apêndice A1 Composto isolado FC2010 – Furanocumarina Felopterina - Espectro de Infravermelho.



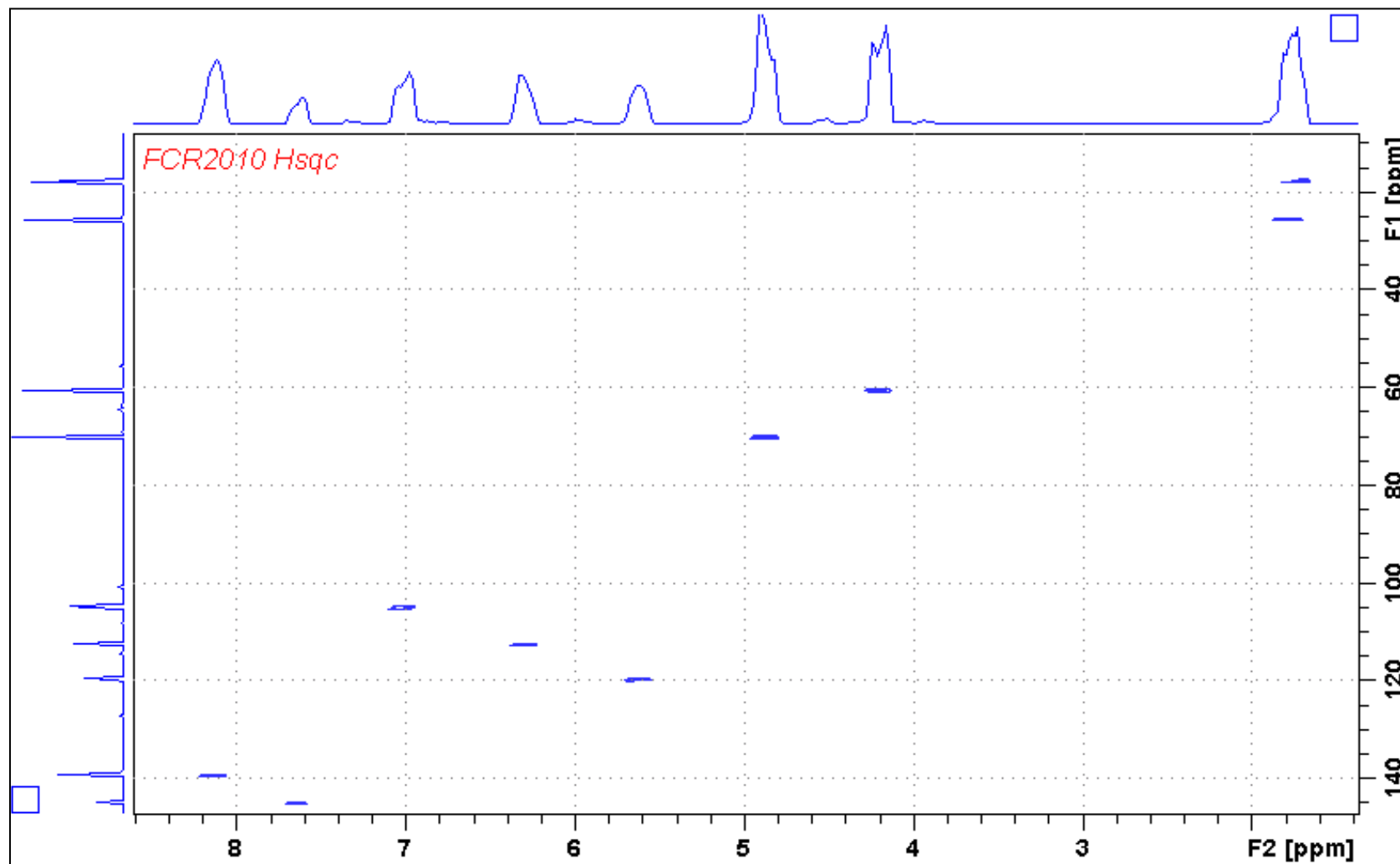
Fonte: Autor, 2012.

Apêndice A2 Composto isolado FC2010 – Furanocumarina Felopterina –Espectro de RMN - Dept 135°.



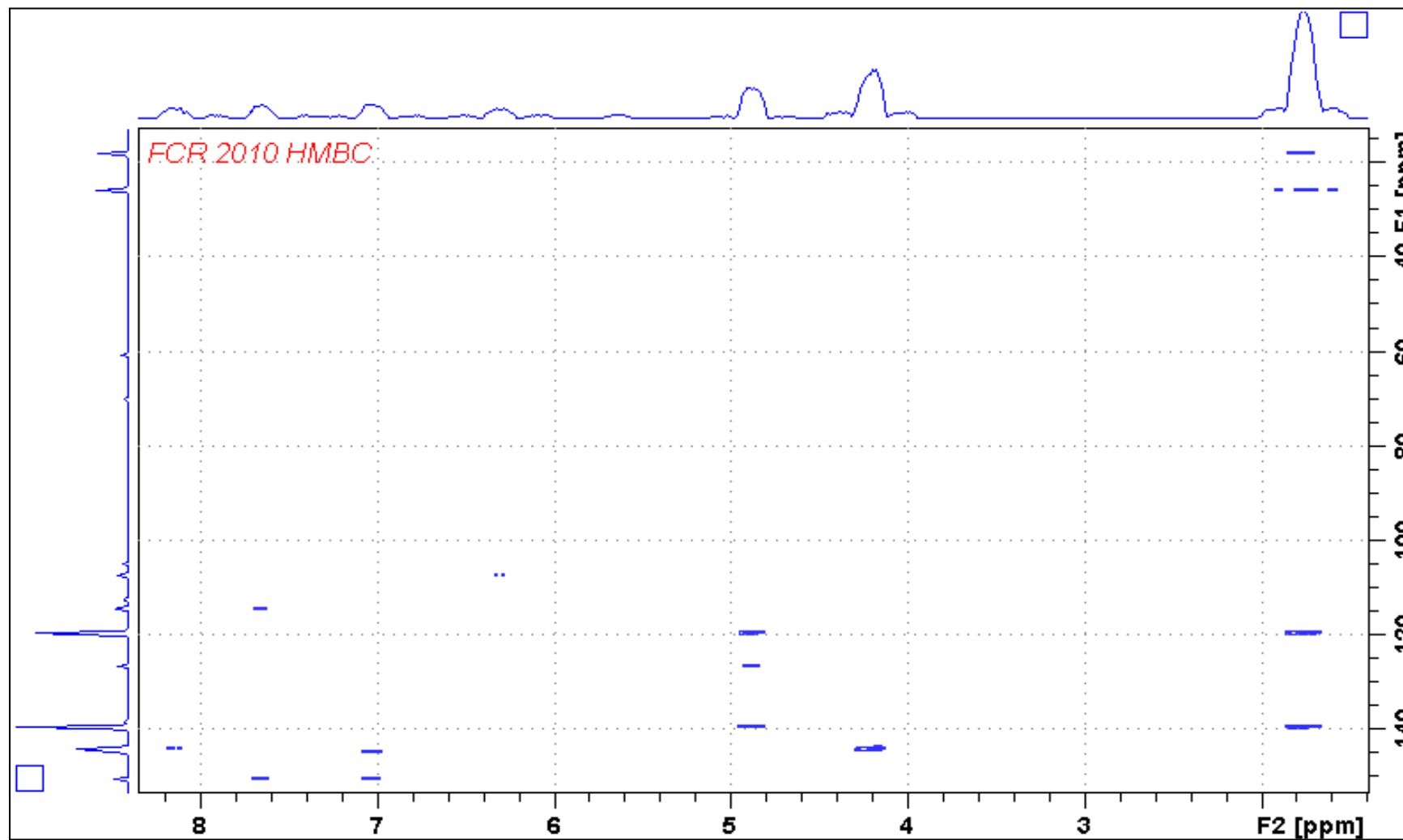
Fonte: Autor, 2012.

Apêndice A3 Composto isolado FC2010 – Furanocumarina Felopterina –Espectros de RMN – HSQC.



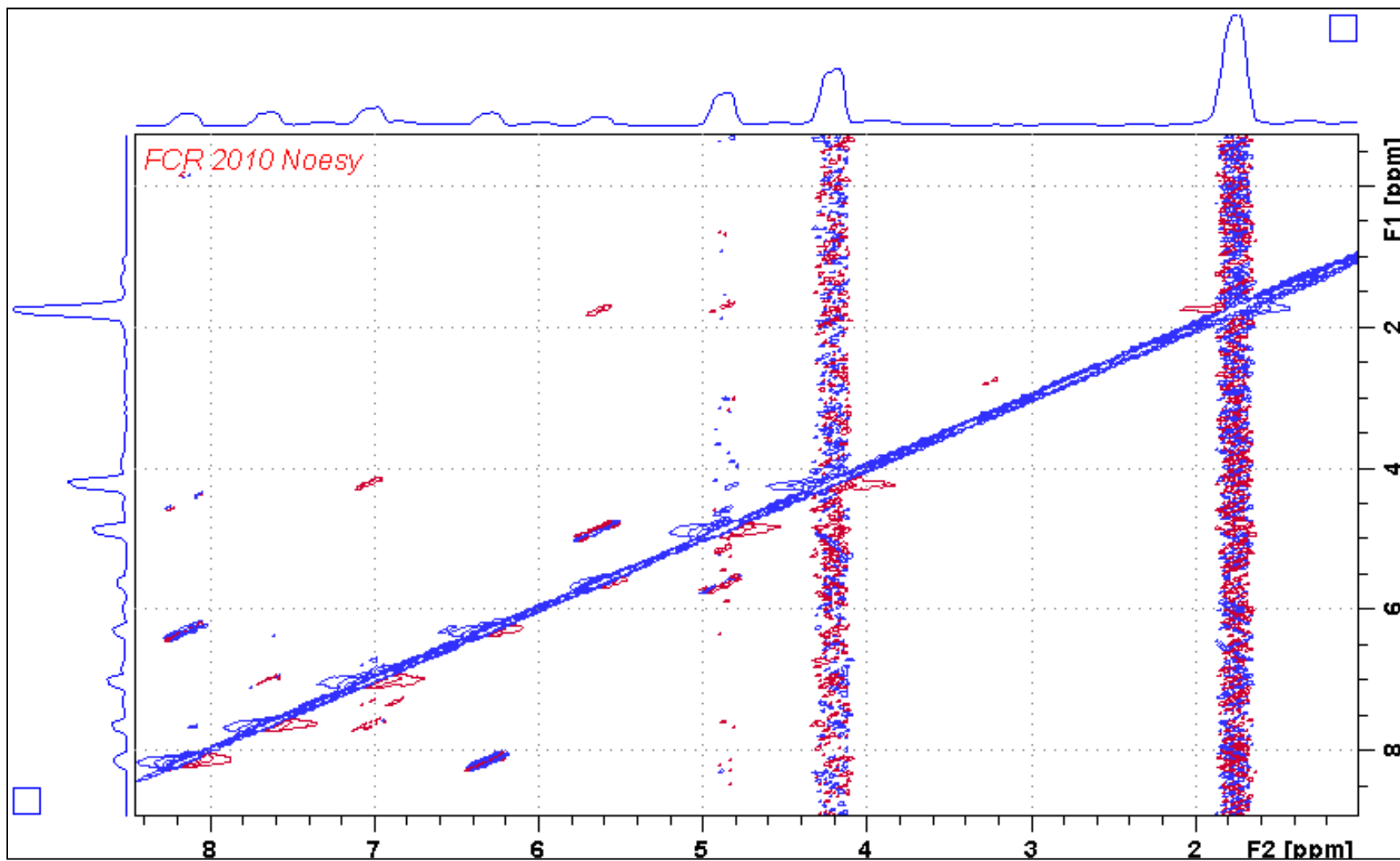
Fonte: Autor, 2012.

Apêndice A4 Composto isolado FC2010 – Furanocumarina Felopterina –Espectros de RMN – HMBC.



Fonte: Autor, 2012.

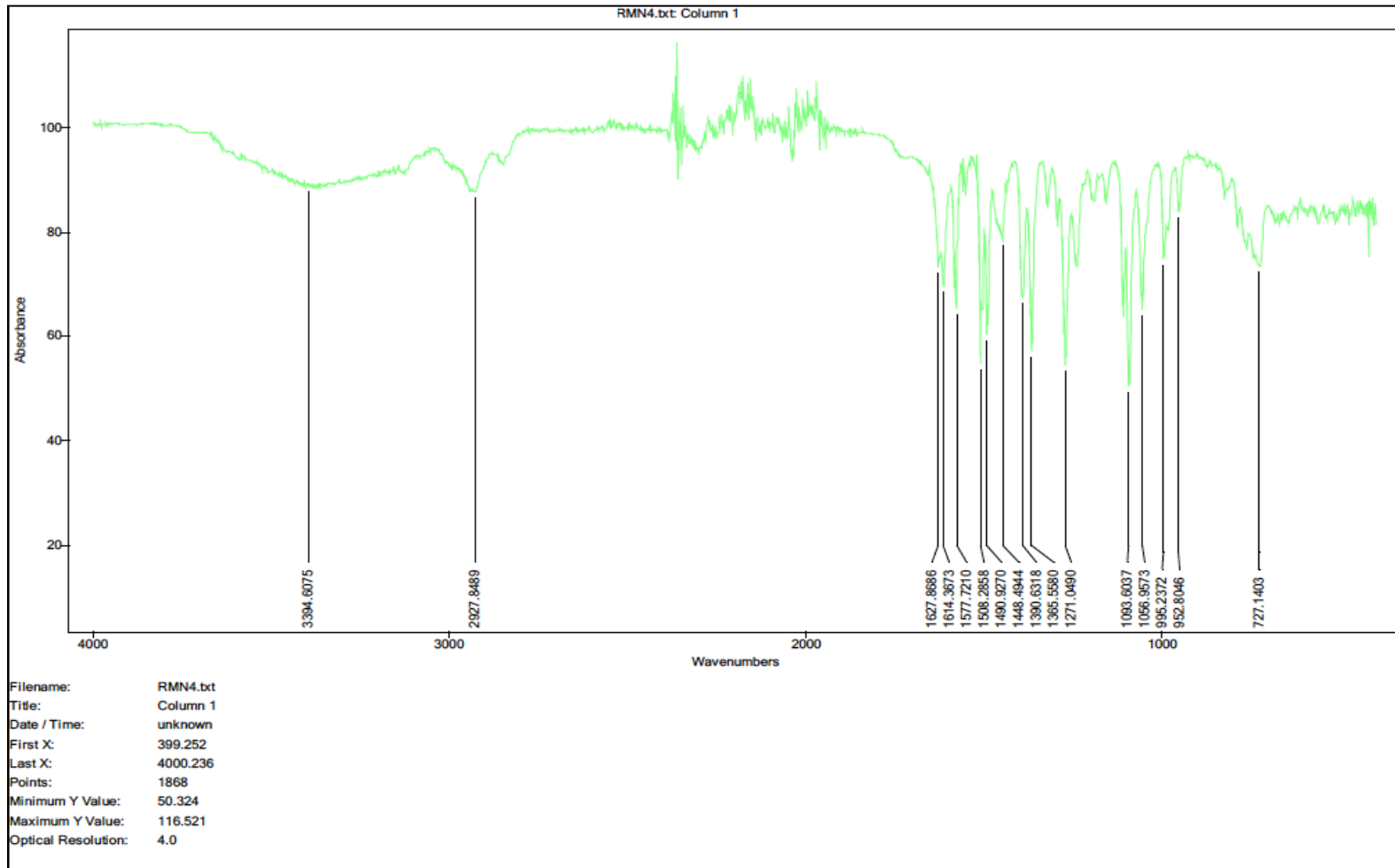
Apêndice A5 Composto isolado FC2010 – Furanocumarina Felopterina –Espectros de RMN – NOESY.



Fonte: Autor, 2012.

## Apêndice B Composto isolado – FC02 – Alcalóide Furoquinolínico Esquimianina

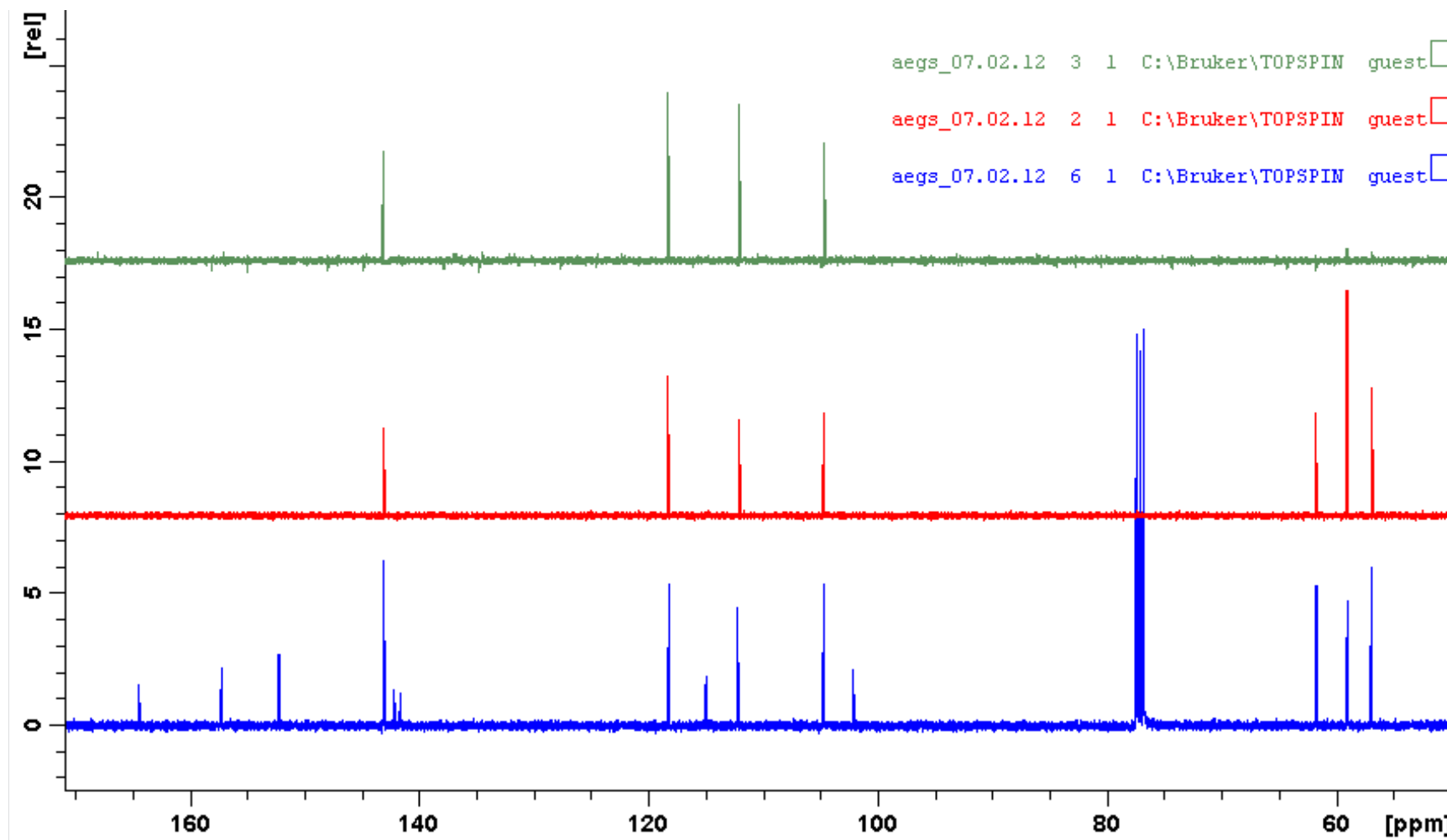
### Apêndice B1 Composto isolado FCR02 – Alcalóide furoquinolínico Esquimianina - Espectro de Infravermelho.



Fonte: Autor, 2012.

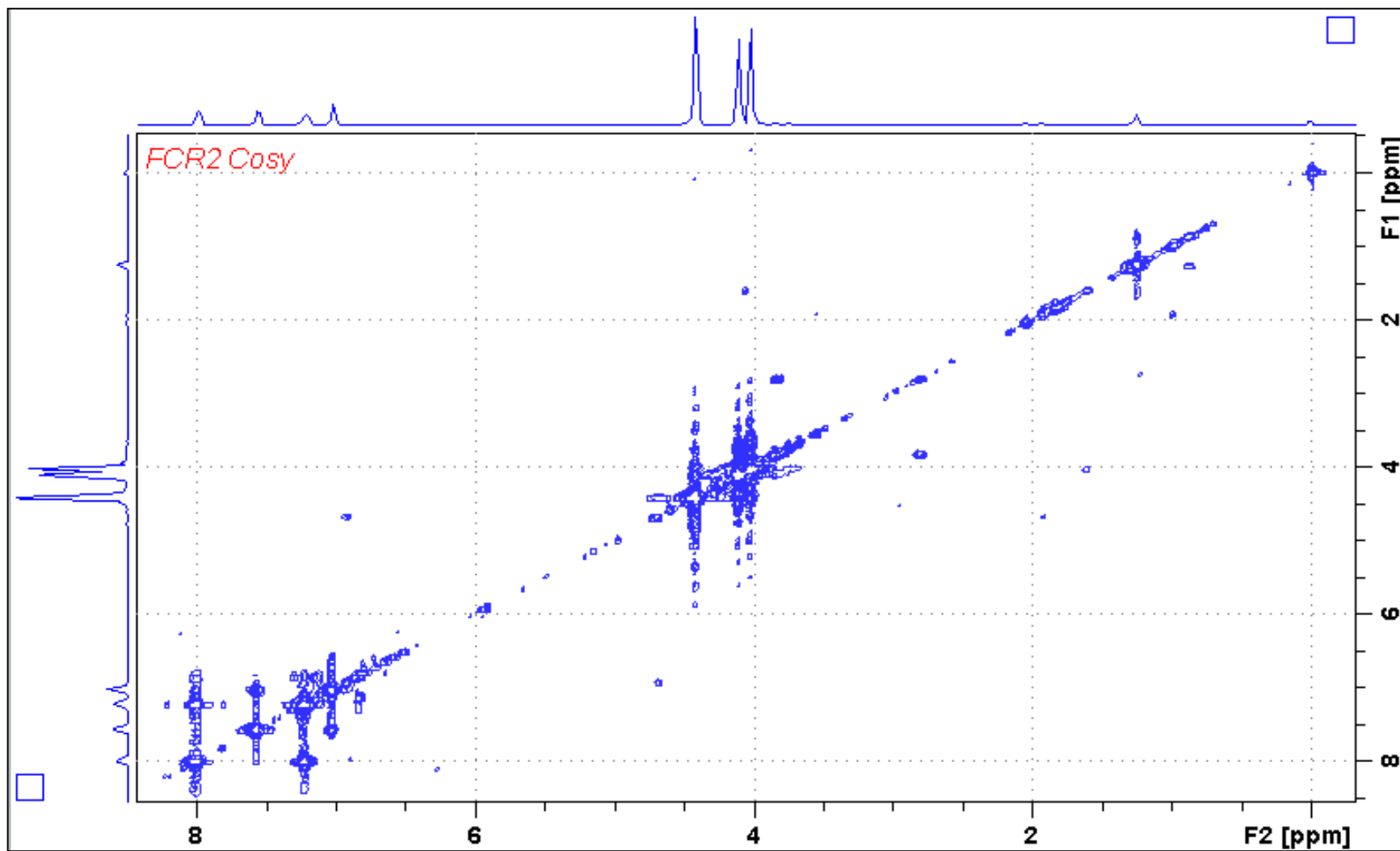


Apêndice B2 Composto isolado FCR02 – Alcalóide furoquinolínico Esquimianina - Espectro de RMN - Dept 135°.



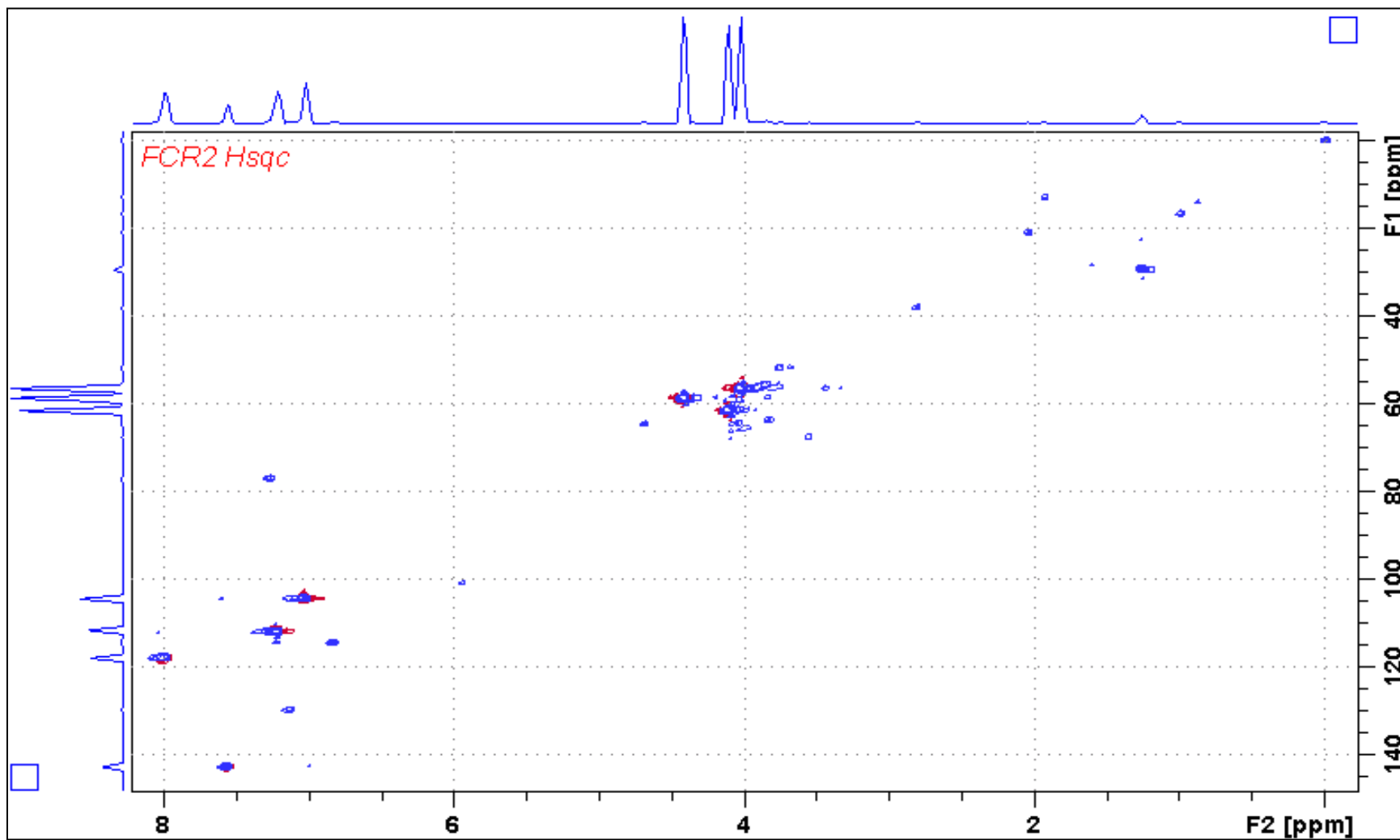
Fonte: Autor, 2012.

Apêndice B3 Composto isolado FCR02 – Alcalóide furoquinolínico Esquimianina - Espectro de RMN COSY.



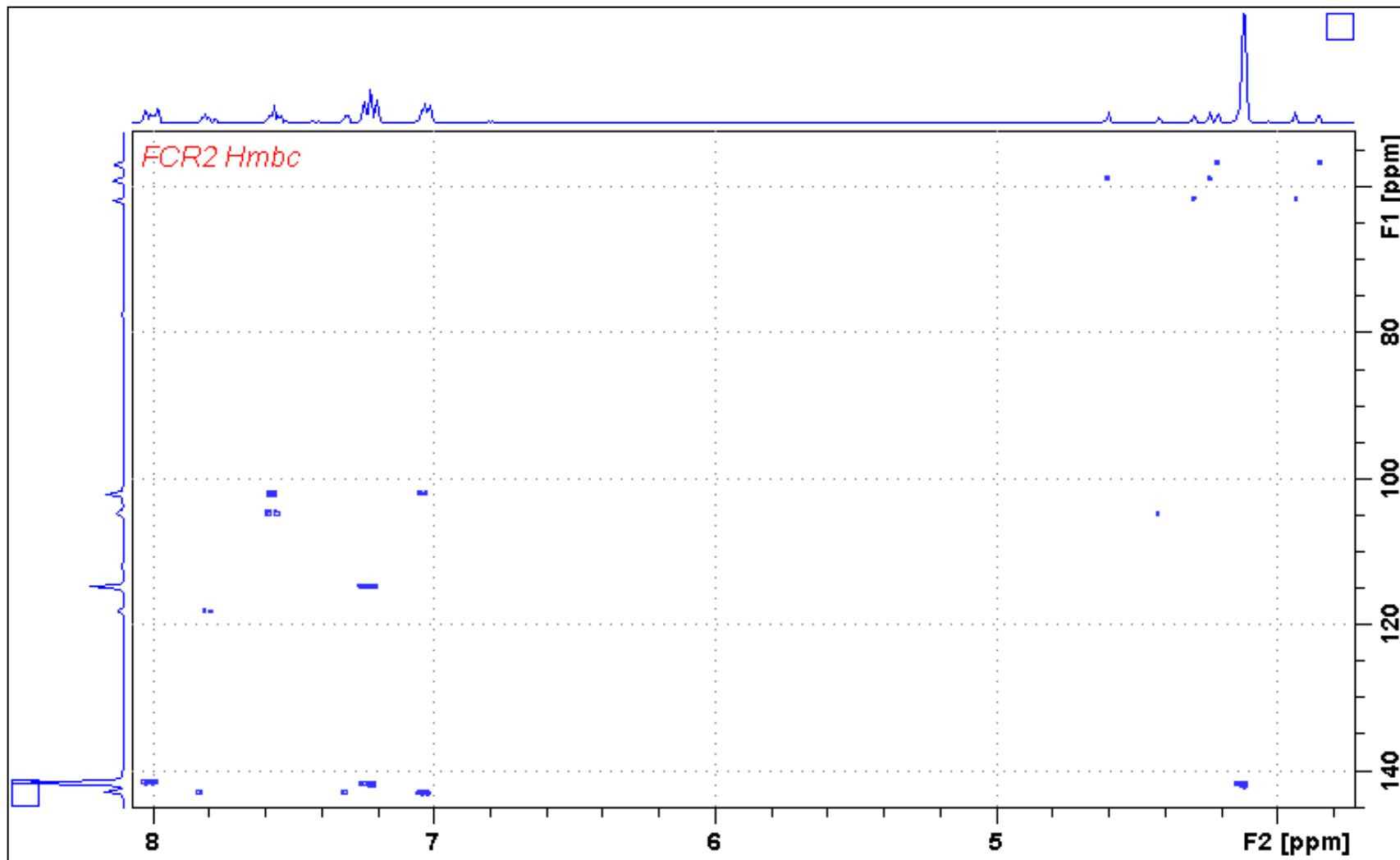
Fonte: Autor, 2012.

Apêndice B4 Composto isolado FCR02 – Alcalóide furoquinolínico Esquimianina - Espectro de RMN HSQC.



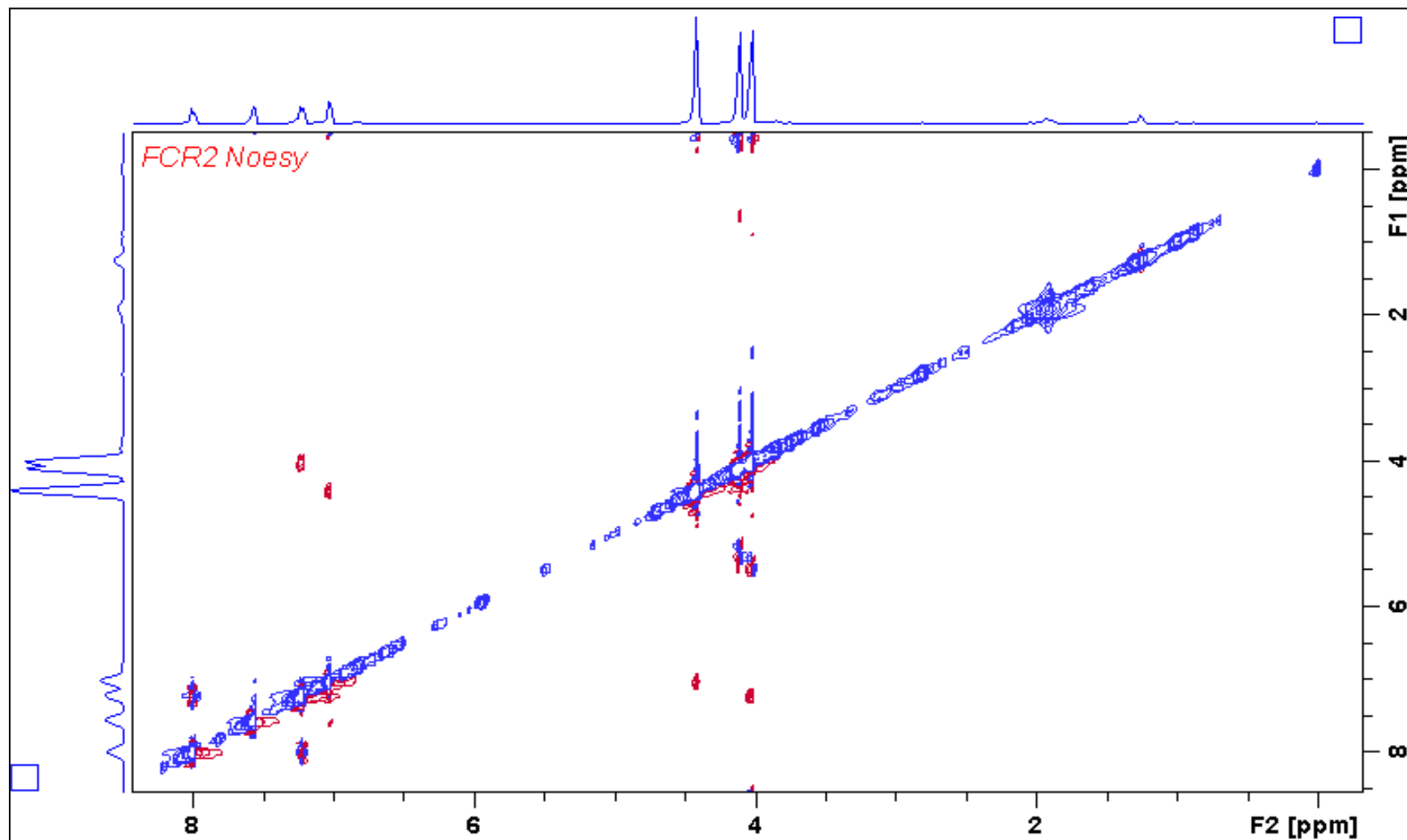
Fonte: Autor, 2012.

Apêndice B5 Composto isolado FCR02 – Alcalóide furoquinolínico Esquimianina - Espectro de RMN HMBC.



Fonte: Autor, 2012.

Apêndice B6 Composto isolado FCR02 – Alcalóide furoquinolínico Esquimianina - Espectro de RMN NOESY.



Fonte: Autor, 2012.

**Parte B**

**Functional analysis of cytochromes P450 involved in the biosynthesis of  
monoterpenoids in *Arabidopsis thaliana***

## CONTENTS

1	<b>INTRODUCTION</b> .....	109
2	<b>CYTOCHROMES P450 (CYP, P450)</b> .....	110
2.1	<b>Nomenclature and origin</b> .....	110
2.2	<b>Function of a P450</b> .....	111
3	<b>TERPENES</b> .....	117
3.1	<b>Terpenoids volatiles</b> .....	121
4	<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	123
4.1	<b>Plant growth</b> .....	123
4.2	<b>Monitoring of <math>\beta</math>-glucuronidase activity</b> .....	123
4.3	<b>RT-qPCR of candidate genes</b> .....	124
4.4	<b>Subcellular protein localization</b> .....	124
4.5	<b>Heterologous expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	125
4.5.1	<b>In vitro enzymatic assay</b> .....	125
4.5.1.1	<b>P450 quantification</b> .....	126
4.5.1.2	<b>Enzymatic actives</b> .....	126
4.5.2	<b>Terpenoids analyses of reconstituted pathways</b> .....	126
4.5.2.1	<b>Metabolite extration</b> .....	127
4.6	<b>Transient expression in the leaves of <i>Nicotiana benthamiana</i></b> ...	128
4.6.1	<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformation</b> .....	128
4.6.2	<b><i>Nicotiana benthamiana</i> leaf infiltration</b> .....	128
4.6.3	<b>Terpenoids analysis of reconstituted pathway</b> .....	129
4.6.3.1	<b>Incubation with substrates</b> .....	129
4.6.3.2	<b>Buffer liquid-liquid extraction</b> .....	129
4.6.3.3	<b>Tissue extraction</b> .....	129
4.6.3.4	<b>Volatile colection of <i>N. benthamiana</i> leaves</b> .....	130
4.7	<b>Mutant lines analyses</b> .....	130

4.7.1	KO insertion mutant <i>Arabidopsis</i> lines selection.....	130
4.7.2	Construction of over-expression <i>Arabidopsis</i> mutants.....	131
4.7.3	Volatile collection of <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	131
4.7.4	Tissue extraction.....	132
4.7.4.1	Tissue extraction (frozen).....	132
4.7.4.2	Tissue extraction (fresh).....	132
<b>4.8</b>	<b>Analytical methods based on GC and UPLC.....</b>	<b>132</b>
4.8.1	GC-FID.....	132
4.8.2	TD/GC-MS.....	133
4.8.2.1	Perkin Elmer thermodesorption.....	133
4.8.2.2	Perkin Elmer liquid injection.....	133
4.8.3	GC-MS (a).....	134
4.8.4	GC-MS (b).....	134
4.8.5	UPLC-MS/MS.....	135
<b>5</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>136</b>
<b>5.1</b>	<b>Candidate genes expression and localization.....</b>	<b>136</b>
<b>5.2</b>	<b>Heterologous expression.....</b>	<b>142</b>
5.2.1	In vitro assays with yeast microsomes.....	142
5.2.2	Monoterpenoids analysis in reconstituted pathways in yeast.....	143
5.2.3	Monoterpenoids analyses in reconstituted pathways in leaves of <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	147
5.2.4	Incubation with <i>Nicotiana benthamiana</i> leaf discs.....	150
<b>5.3</b>	<b>Mutant lines analyses.....</b>	<b>153</b>
5.3.1	The volatile emission of plants and flowers.....	153
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>157</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>158</b>
	<b>APPENDIX.....</b>	<b>169</b>



## ABSTRACT

Isoprenoids constitute a diverse group of natural products, and its pathway generates the primary and secondary metabolism in plants. All isoprenoids are synthesized via the two universal C5 precursors, by the action of terpene synthases (TPSs), which can be produced by two routes: the mevalonate (MVA) pathway and the methylerythritol phosphate (MEP) pathway. The TPS cyclization reaction may constitute the terminal step in a plant secondary metabolism pathway, but sometimes, it is common that some further modifications occur through the action of cytochrome P450. The *Arabidopsis* flowers emit a complex blend of volatile compounds that have a role as in attracting pollinators and in plant defense against herbivores. In this work, the aim was to determine the function of candidate P450s potentially involved in monoterpenoids metabolism. The four genes candidates (CYP76C3, CYP71B31, *TPS10* and *TPS14*) were selected with the CYPedia, which calculates co-expression between *Arabidopsis* genes based on Affymetrix ATH1 microarray. The candidate genes showed a very similar expression pattern in the stamens and more specifically in the upper part of the filaments. In the heterologous expression transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves, in volatiles of *TPS10* and *TPS14* (alone) were found R-(-)-linalool and S-(+)-linalool enantiomer. In the buffer of leaf discs extraction was found that CYP76C3 converts linalool into E-8-hydroxy-linalool and E-8-oxo-linalool and CYP71B31 into 1,2-epoxy-linalool. The analysis of methanol extracts leaf discs incubated in S-(+)-linalool showed the use of this substrate by P450s converting to lilac alcohol by the both P450. Analyses of flowers in mutants plants showed minor differences. The analyses with fresh flowers extracts in UPLC-MS/MS in MRM mode, was found a compound with the same signature that linalool, however, have different retention time and may be a form of linalool bound.

**Key-words:** Linalool. Flowers. Terpene synthase and P450

## RESUMO

Isoprenóides constituem um diverso grupo de produtos naturais e a sua via, gera os metabólitos primários e secundários em plantas. Todos os isoprenóides são sintetizados via dois universais precursores C5, que pela ação das terpeno sintases (TPSs), podem ser produzidos por duas rotas: via do mevalonato (MVA) e via do metil-eritritol fosfato (MEP). A reação de ciclização das TPS podem constituir o passo terminal na via do metabolismo secundário em plantas, mas, algumas vezes, é comum ainda, a sua modificação que ocorre pela ação do citocromo P450. As flores de *Arabidopsis* emitem uma complexa mistura de compostos voláteis que tem um papel na atração de polinizadores e na defesa de plantas contra herbívoros. Neste trabalho, o objetivo foi determinar a função dos genes candidatos potencialmente envolvidos no metabolismo de monoterpenóides. Os quatro genes candidatos (CYP76C3, CYP71B31, *TPS10* e *TPS14*) foram selecionados com o CYPedia, que calcula a co-expressão entre os genes de *Arabidopsis* com base no Affymetrix ATH1 microarray. Os genes candidatos mostraram um similar padrão de expressão nos estames, mais especificamente na parte superior dos filamentos. Na expressão heteróloga transitoriamente expressa em folhas de *Nicotiana benthamiana*, nos voláteis de *TPS10* e *TPS14* (sozinho) foram encontrados os enantiômeros R-(-)-linalol e S-(+)- linalol. No tampão de extração de discos de folhas, verificou-se que CYP76C3 converte linalol em *E*-8-hidroxi-linalol e *E*-8-oxo-linalol, e CYP71B31 em 1,2-epoxi-linalol. A análise do extrato metanólico dos discos foliares incubados em S-(+)-linalol mostrou a utilização deste substrato pelos P450s convertendo para lilac álcool por ambos P450s. Análises de flores em plantas mutantes mostrou pequenas diferenças. Nas análises com extratos de flores frescas em UPLC-MS/MS no modo MRM, foi encontrado um composto com a mesma assinatura que linalol, no entanto, com tempo de retenção diferente e pode ser uma forma ligada do linalol.

**Palavras-chave:** Linalol. Flores. Terpeno sintases e P450.

## ABBREVIATIONS

AcCoA	Acetyl coenzyme A
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
<i>CaMV</i>	Cauliflower mosaic virus
cDNA	Complementary DNA
Col-0	Columbia ecotype
C-terminal	Carboxy-terminus
CPR	Cytochrome P450 reductase
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic acid
ddH <sub>2</sub> O	Double-distilled water
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
e.g.	<i>exempli gratia</i> - "for example"
ER	Endoplasmic reticulum
ESI	Electrospray ionization
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FMN	Flavin mononucleotide
gDNA	Genomic DNA
GFP	Green fluorescent protein
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
i.e.	<i>id est</i> – "it/that is"
KO	knockout

MeJA	Methyl jasmonate
MEP	Methylerythritol phosphate pathway
MVA	Mevalonate pathway
M	Molar
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
N-terminal	Amino-terminus
OD	Optical density
OX	Over-expression
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEG	Polyethylene glycol
RNA	Ribonucleic acid
RFP	Red fluorescent protein
RT	Reverse transcription
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
SBSE	Stir bar supportive extraction
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBSV	Tomato Bushy Stunt Virus
T-DNA	Transfer DNA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethane-1,2-diamine
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
WS	Wassilewskija ecotype
WT	Wild type

## 1 INTRODUCTION

Metabolism consist of a complex biochemical network of biosynthetic pathways and is a series of reactions in organisms that are catalyzed by enzymes (NUGROHO and VERPOORTE, 2002). Rational engineering of complicated metabolic pathways involved in the production of plants secondary metabolites has been hampered by our knowledge of the biosynthetic pathways and their regulatory mechanisms leading to the formation of the desired compounds, e.g. terpenes (OKSMAN-CALDENTY et al., 2007). Plants are excellent organic chemists in nature and constantly respond to environmental changes by adjusting their capacity to produce natural products. The secondary metabolites are compounds with a restricted occurrence in taxonomic groups, that are not necessary for a cell (organism) to live, but play a role in the interaction of the cell (organism) with its environment, ensuring the survival of the organism in its ecosystem (VERPOORTE, 2000).

Isoprenoids (terpenes) constitute one of the most diverse groups of natural products, and its pathway generates both primary (sterols, carotenoids, hormones and chlorophylls) and secondary metabolites (monoterpenes, sesquiterpenes and triterpenes) that are of great importance to plant growth and survival. All isoprenoids are synthesized via the two universal C<sub>5</sub> (IPP and DMAPP) precursors, by the action of terpene synthases (TPSs), which can be produced by two routes: the mevalonate (MVA) pathway and the methylerythritol phosphate (MEP) pathway. Although a TPS cyclization reaction may occasionally constitute the terminal step in a plant secondary metabolism pathway, it is common that some further modifications occur through the action of cytochrome P450 (KIRBY and KEASLING, 2009).

The monoterpenes are C<sub>10</sub> compounds that offer significant advantages, such as herbicides, pesticides, antimicrobial agents, dietary anticarcinogens, flavoring agents, perfumes and pollinator attraction (CARTER et al., 2003; MAHMOUD and CROTEAU, 2002; UNSICKER et al., 2009). The availability of appropriate molecular tools and the economic importance of monoterpenes have prompted an interest in engineering this pathway in plants. In this work, the aim was to determine the function of candidate P450s potentially involved in monoterpenoids metabolism.

## 2 CYTOCHROMES P450 (CYP, P450)

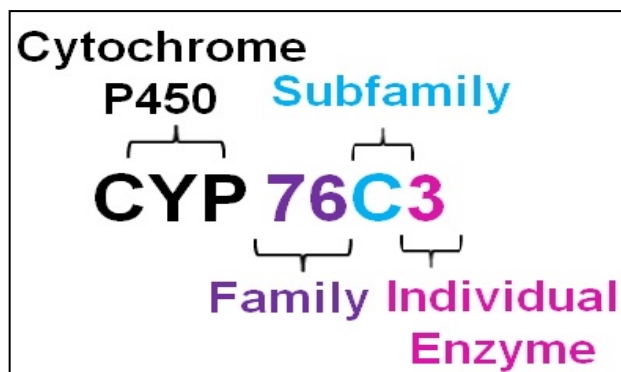
### 2.1 Nomenclature and origin

The Cytochromes P450s (CYPs) are membrane-bound hemoproteins, form one of the largest classes of enzymes, which possess high complexity, and were discovered about 60 years ago. They are involved in different biosynthetic and xenobiotic pathways in organisms of all kingdoms. P450s became one of the most intensively investigated biochemical systems.

The terminology P450 is not based on enzymatical function but from their character as heme proteins and describes originally the spectral properties that display a typical absorption peak at 450 nm of the reduced carbon monoxide-bound form (OMURA and SATO, 1964; BERNHARDT, 2006). Thus, the name Pigment absorbing at 450 nm (P450).

P450 genes are also named CYP for cytochrome P450 for all organisms according to their peptidic sequence similarities, gene organization and phylogeny. The classification of P450s is established in chronological order of submission to a nomenclature committee (See <http://drnelson.uthsc.edu/Nomenclature.html>). The individual enzymes are classified into families (proteins with more than 40% sequence identity) and subfamilies (more than 55%) (Figure 01). The sequence conservation among P450s of different families can be less than 20%.

**Figure 01 Example of P450 naming. The names for P450s in plants are starting from CYP71A1 to CYP99YZ, and then from CYP701A1 and above. In this case, the protein belongs to family 76, subfamily C, and is the 3 the individual enzyme.**



Source: Author, 2012.

The cytochrome P450 enzymes are defined by the presence in the prosthetic group of an iron (III) protoporphyrin-IX covalently linked to the protein by the sulfur atom of a proximal cysteine ligand. The most conserved part of the P450 sequence is in the region containing the Cys that acts as the thiolate ligand to the heme iron; so, this sequence is used as the identifier of P450s in gene banks (GUENGERICH, 2001). The gene analysis of the different cytochrome P450s indicates that all exhibit the same 10 amino acids, so-called "P450 signature", including the invariant cysteine residue that ligates the heme iron to the protein, Phe-XX-Gly-X<sub>b</sub>-XX-Cys-X-Gly, where the amino acid X<sub>b</sub> is usually a basic amino acid that plays a key role in interactions with the reductase partner (MEUNIER et al., 2004).

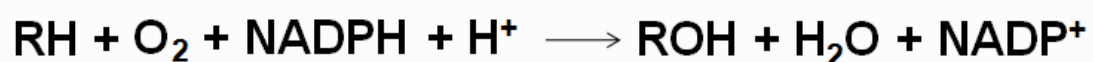
The origin of the P450 superfamily lies in prokaryotes, before the advent of eukaryotes and before the accumulation of molecular oxygen in the atmosphere (WERCK-REICHHART and FEYEREISEN, 2000). Plants are more diverse than animals in their P450s. At present, 5100 sequences of plant cytochrome P450s have been annotated and named, this number is significantly greater than in other taxa: 1461 in vertebrates, 2137 in insects, 2960 in fungi, 1042 in bacteria, 27 in archaea and two in mimivirus (NELSON, 2011; NELSON and WERCK-REICHHART, 2011). In higher plants, the cytochromes P450 are the third largest family of enzyme proteins. In *Arabidopsis thaliana*, there are 246 genes (P450s) and 28 pseudogenes in the genome (BAK et al., 2011).

## 2.2 Function of a P450

The P450s are known for their efficiency to catalyze a variety of reactions and convert chemicals to potentially reactive products as well as to make compounds less toxic. P450s use molecular oxygen (O<sub>2</sub>) as the primary oxidant, thereby operating at ambient conditions and thus presenting ideal systems for (green) organic synthesis, oxidize a vast range of substrates and are able to catalyze such reactions (more than 20) like hydroxylations, N-, O- and S-dealkylations, epoxidations, deaminations, desulphurations, dehalogenations, peroxidations, ring expansions and N-oxide reductions (DENISOV et al., 2005; HANNEMANN et al., 2006; HARRIS and LOEW, 1998; HELDT and PIECHULLA, 2011). Also, they often may exhibit exquisite substrate specificity as well as regio- and/or stereoselectivity.

The regiospecificity of P450 enzymes is important for the production of fine chemicals, as an alternative way to introduce modifications (CANKAR et al., 2011). This diversity of catalyzed reactions and acceptable substrates attracted researchers from different fields to study cytochrome P450 systems (BERNHARDT, 2006; DENISOV et al., 2005; HANNEMANN et al., 2006).

In the monooxygenase reaction, the two electrons are transferred from NAD(P)H via an electron transfer chain. From the O<sub>2</sub> molecule (heterolytic cleavage), one of its oxygen atoms is incorporated into the substrate (RH), the remaining oxygen atom is reduced to yield water molecule (H<sub>2</sub>O), and hence both oxygen atoms are incorporated into two different molecules.



The living systems use enzymes, as P450, that can modify dioxygen to a form capable of performing the desired oxidation reactions, because molecular oxygen, itself, is unreactive toward organic molecules at low temperatures (HARRIS and LOEW, 1998; MEUNIER et al. 2004).

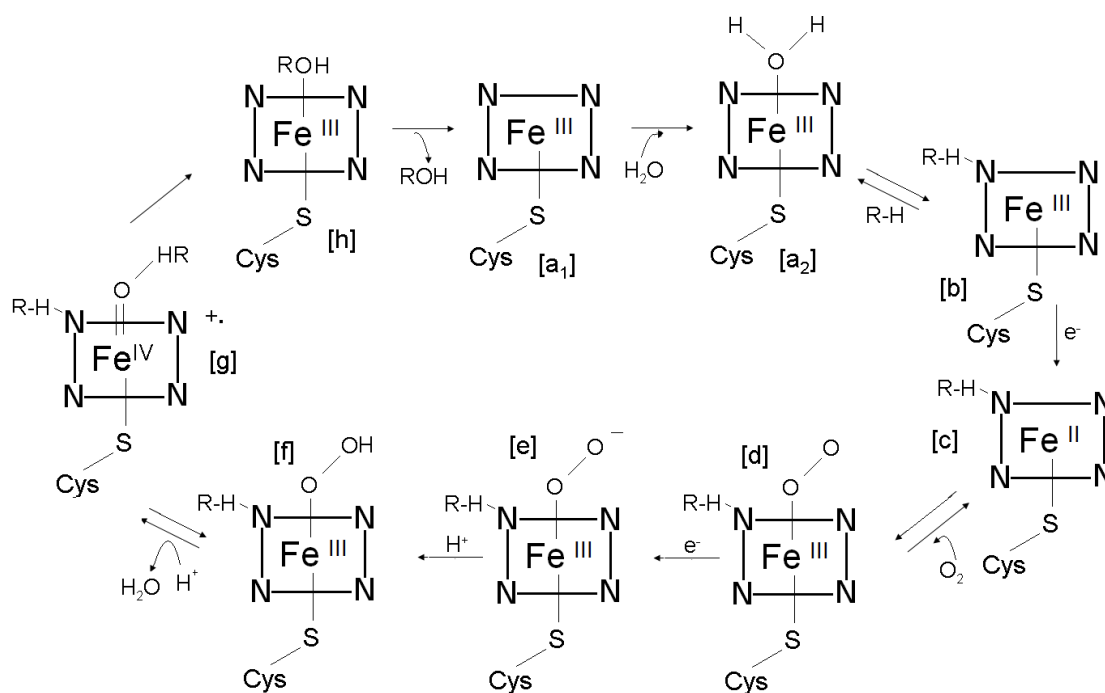
The mechanism of P450 is a complex cascade of individual steps involving the interaction of protein redox partners and consumption of reducing equivalents commonly in the form of NAD(P)H, therefore, they are divided into four classes depending on how electrons are delivered to the catalytic site: (i) proteins that require both an FAD-containing reductase and an iron sulfur redoxin; (ii) proteins that require only an FAD/FMN-containing P450 reductase for transfer of electrons; (iii) proteins that are self-sufficient and require no electron donor and (iv) proteins that receive electrons directly from NAD(P)H (DENISOV et al., 2005; WERCK-REICHHART and FEYEREISEN, 2000).

The P450 catalytic mechanism typically (figure 02) has the following steps: the cycle begins with P450 iron in the ferric state [a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>] the heme iron Fe<sup>3+</sup> is coordinated to water or hydroxide (can be in the low spin state (S=1/2) or in the high spin state (S=5/2)) (DENISOV and SLIGAR, 2012; GUENGERICH, 2001). The binding of the substrate to the enzyme [b]. The first reduction, which occurs with the introduction of the first electron from NAD(P)H via an electron transfer chain, of the heme iron to the ferrous state [c]. Binding of molecular oxygen to the ferrous heme to



form an oxy-ferrous [d]. One more reduction step [e] results in peroxy-ferric complex, which is sequentially protonated to arrive at hydroperoxy-ferric complex [f]. After the heterolytic cleavage of the O–O bond, happens the production of the water molecule to form a reactive oxo iron (IV) porphyrin cation radical, often called compound 1 [g] (BERNHARDT, 2006; DENISOV et al., 2005; DENISOV and SLIGAR, 2012; GUENGERICH, 2001; HARRIS and LOEW, 1998; MEUNIER et al., 2004; MONTELLANO, 2010; WERCK-REICHHART and FEYEREISEN, 2000). Besides oxygenation of the substrate, compound 1 then attacks the substrate, which dissociates to let the cycle start again. Most reactions driven by P450 enzymes are catalyzed by this species via oxidative transformation of the substrate, (hydroxylation, epoxidation, N-demethylation, etc.) (DENISOV and SLIGAR, 2012). Finally, the transfer of an oxygen atom to the bound substrate occurs to form to the oxygenated product [f] and the product dissociates, the cycle starts again.

**Figure 02 Summary of the cytochrome P450 catalytic cycle. The substrate hydrocarbon is represented as an R-H and R-OH resulting in hydroxylated product.**



Source: Author, 2012.

The natural substrates of plant P450 enzymes include precursors of membrane sterols and structural polymers such as lignin, cutin, suberin and

sporopollenin (BAK et al., 2011). Normally, the substrates for cytochrome P450 metabolism are hydrophobic and poorly soluble in water, although they are involved in the metabolism of alcohols, phenols, detergents, and other organic substances (DENISOV et al., 2005).

In animals and plants, P450 have functional roles such as detoxification of xenobiotics (compounds exogenous to the organism), where they play a protective role of degradation, biosynthesis of hormone, vitamins and some other metabolites. In plants, P450s are also frequently involved in the biosynthesis of a large number of secondary metabolites that often function as defense toxins against herbivores and pathogens or as flower pigments and fragrance for pollinators (GIERL, 2009).

The analysis of foliar carotenoid profiles in lines over-expressing the individual hydroxylases indicate a role for CYP97B3 in carotenoid biosynthesis, confirm and extend previous findings of hydroxylase activities based on knock-out mutants, and suggest functions of the multifunctional enzymes in carotenoid biosynthesis (KIM, et al., 2010).

Microarray data indicate that there are two P450 proteins involved in toluene oxidation, namely, CYP96A15 and CYP76C3 (GAO et al., 2012). Thus, these genes may be involved in toluene metabolism, and they can oxidize, reduce, transfer, or hydrolyze toluene molecules or its metabolic products.

*Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase CYP71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime (IAOx) to indole-3-acetonitrile (IAN) in camalexin (3-thiazol-2-yl-indole) synthesis and provide further support for the role of camalexin in resistance to necrotrophic fungal pathogens *Alternaria brassicicola* (NAFISI et al., 2007).

The analysis of CYP71A2 gene suggested that the role of this gene is pleiotropic in tomato development and its adaptability to the environment (LI et al., 2010). The expression of CYP71A2 was detected in all the tissues; however, the expression was utmost in immature green fruit.

Rohloff and Bones (2005) worked with *Arabidopsis thaliana* wild type and T-DNA knock-out mutants plants (Myrosinase 1, Myrosinase 2, CYP83A1 and CYP83B1) by evaluating the volatile profiling when are described defense related

compounds and 24 monoterpenes, 26 sesquiterpenes and 12 aromatic structures observed in inflorescences.

The co-expression of the CYP71AV8 monooxygenase, from chicory (*Cichorium intybus* L.), with a valencene synthase in yeast, led to formation of *trans*-nootkatol, *cis*-nootkatol, and (+)-nootkatone (sesquiterpenes) and the enzyme can catalyze a three step conversion of germacrene A to germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oic acid (CANKAR et al., 2011).

Hallahan and co-workers (1992) related that a cytochrome P450 in microsomes from ripe avocado (*Persea americana*) mesocarp (CYPT71A1) metabolize the monoterpenoids nerol and geraniol. Later, Hallahan et al. (1994), suggest that orthologous genes of CYP71 expressed in *Persea americana* and *Nepeta racemosa* (catmint) catalyze dissimilar reactions with monoterpene substrates.

The cytochromes P450 catalyze valuable reactions on a vast variety of substrates, which can open new potential applications of protein systems (See Table 01). These characteristics associated with the large number of P450s may explain the interest in the engineering of these enzymes for a variety of purposes, like fine chemical systems, herbicide tolerance, bioremediation, biosensors, plant improvement, prodrug therapy, biophysical analysis, analysis of catalytic specificity and other properties (BERNHARDT, 2006; GIELAM, 2008; MORANT et al., 2003). Thus, CYPs have a key function for generating the chemical diversity that is the hallmark of plants compared with animals (NELSON and WERCK-REICHHART, 2011).

**Table 1 Inventory of P450s involved in the biosynthesis of isoprenoids in plants (not comprehensive). (a) When two names and dates are indicated, the first refers to first characterization of the activity, and the second to the discovery of the coding sequence. (b) In taxol biosynthesis, coding sequences have been isolated, but not submitted to the nomenclature committee.**

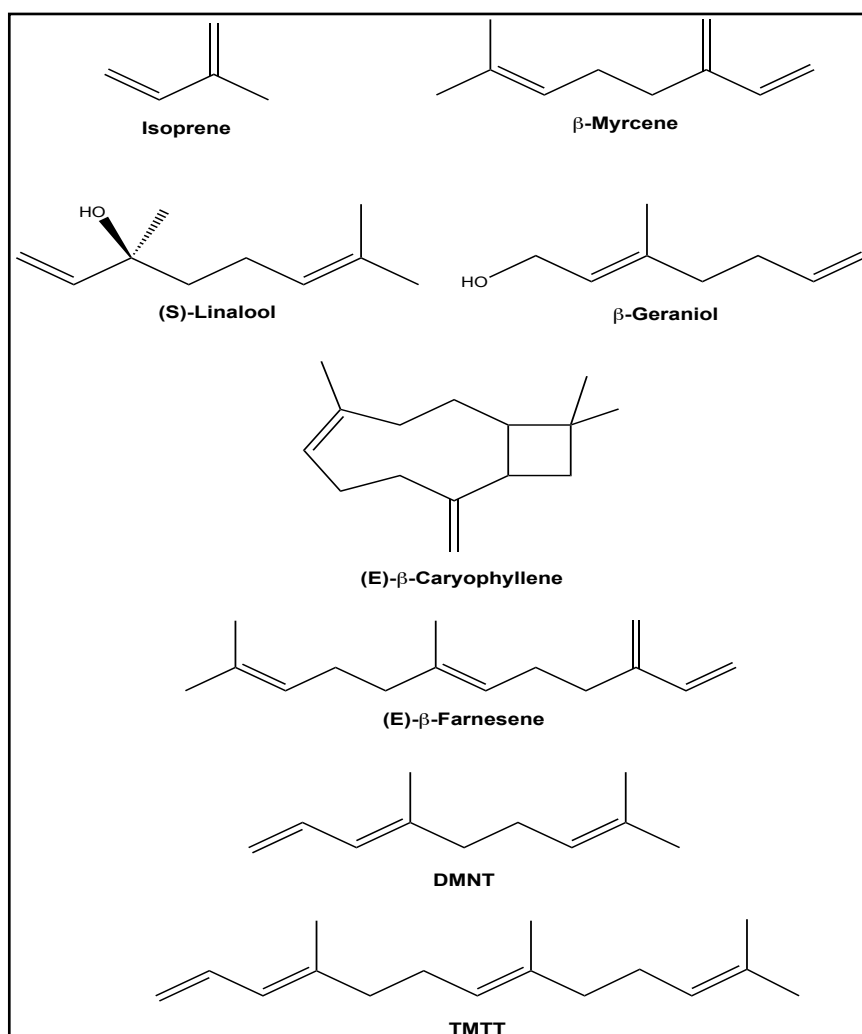
		(a)	(a)		
<b>Monoterpenoid biosynthesis</b>					
(-)-Limonene 3-hydroxylase	CYP71D15	Karp et al. / Lupien et al.	1990 / 1999	<i>Mentha x piperita</i>	Peppermint
(-)-Limonene 6-hydroxylase	CYP71D18	Karp et al. / Lupien et al.	1990 / 1999	<i>Mentha spicata</i>	Spearmint
(-)-Limonene 7-hydroxylase	CYP71D174	Karp et al. / Mau et al.	1990 / 2010	<i>Perilla frutescens</i>	Perilla
Geraniol, nerol 10-hydroxylase activity	CYP71A1	Hallahan et al. / ?	1992	<i>Persea americana</i>	Avocado
Geraniol, nerol 2,3- or 6,7-epoxidase activity	CYP71	Hallahan et al.	1994	<i>Nepeta racemosa</i>	Catmint
Camphor 6-exo-hydroxylase	n.d.	Funk et al.	1993	<i>Salvia officinalis</i>	Common Sage
(-)- $\alpha$ - and $\beta$ -Pinene 6-hydroxylase	n.d.	Karp and Croteau	1992	<i>Hyssopus officinalis</i>	Hyssop
$\alpha$ -Pinene 7-hydroxylase	CYP71	Aharoni et al.	2004	<i>Fragaria vesca</i>	Wild Strawberry
Geraniol 10-hydroxylase (G10H)	CYP76B6	Madyastha et al. / Collu et al.	1976 / 2001	<i>Catharantus roseus</i>	Madagascar Periwinkle
Secologanin synthase (SLS)	CYP72A1	Irmiler et al. / Vetter et al.	2000 / 1992	<i>Catharantus roseus</i>	Madagascar Periwinkle
Secologanin synthase (SLS)	n.d.	Yamamoto et al.	2000	<i>Lonicera japonica</i>	Japanese Honeysuckle
Tabersonine 16-hydroxylase (T16H)	CYP71D12	St-Pierre and De Luca / Schroder et al.	1995 / 1999	<i>Catharantus roseus</i>	Madagascar Periwinkle
Polyneuridine aldehyde synthase	n.d.	Schmidt and Stöckigt	1995	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Snakeroot
Vonirine 21-hydroxylase	n.d.	Falkenhagen and Stöckigt	1995	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Snakeroot
(+)-Sabinene 3-hydroxylase	n.d.	Karp et al.	1987	<i>Salvia officinalis</i>	Common Sage
(+)-Limonene 6-hydroxylase	n.d.	Bouwmeester et al.	1999	<i>Carum carvi</i>	Caraway
(+)-Pulegone 9-hydroxylase	(b)	Bertea et al.	2001	<i>Mentha x piperita</i>	Peppermint
<b>Sesquiterpenoid biosynthesis</b>					
Germacrene A oxidase (GAO)	n.d.	Nguyen et al.	2010	<i>Lactuca sativa</i>	Lettuce
Amorphadiene oxidase (AMO)	CYP71AV1	Ro et al.	2006	<i>Artemisia annua</i>	Sweet Wormwood
Premnaspirodiene oxidase (HPO)	CYP71D55	Takahashi et al.	2007	<i>Hyoscyamus muticus</i>	Henbane
5-epi-aristolochene 1 $\beta$ ,17-hydroxylase	CYP71D20	Ralston et al.	2001	<i>Nicotiana tabacum</i>	Common tobacco
Germacrene A 12-hydroxylase	n.d.	de Kraker et al.	2001	<i>Cichorium intybus</i>	Chicory
$\alpha$ -humulene 8-hydroxylase	CYP71BA1	Yu et al.	2010	<i>Zingiber zerumbet</i>	Shampoo Ginger
(+)- $\delta$ -cadinene hydroxylase	CYP706B1	Luo et al.	2001	<i>Gossypium arboreum</i>	Cotton
<b>Diterpenoid biosynthesis</b>					
Ent-kaurene, ent-kaurenol, ent-kaurenol oxidase (KO)	CYP701A3	Helliwell et al.	1999	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Kaurenol acid hydroxylase (KAH)	n.d.	Kim et al.	1996	<i>Stevia rebaudiana</i>	Stevia
Gibberellin 16 $\alpha$ ,17-epoxidase	CYP714D1	Ma et al.; Zhu et al.	2006	<i>Oryza sativa</i>	Rice
Abietadienol/abietadienol oxidase (PtAO)	CYP720B1	Ro et al.	2005	<i>Pinus taeda</i>	Loblolly pine
Cembratriene-ol hydroxylase	n.d.	Wang et al.	2001	<i>Nicotiana tabacum</i>	Common tobacco
ent-Cassadiene 11 $\alpha$ -hydroxylase	CYP76M7	Swaminathan et al.	2009	<i>Oryza sativa</i>	Rice
Abietadiene oxidase	CYP720B4	Hamberger and Bollman, unpublished	-	<i>Sitka spruce</i>	Spruce
Taxadiene 5-hydroxylase	(b)	Hefner et al. / Jennewein et al.	1996 / 2004	<i>Taxus cuspidata</i>	Yew
Taxoid 13-hydroxylase	(b)	Wheeler et al. / Jennewein et al.	2001 / 2001	<i>Taxus cuspidata</i>	Yew
Taxoid 10-hydroxylase	(b)	Wheeler et al. / Schoendorf	2001 / 2001	<i>Taxus cuspidata</i>	Yew
Taxoid 14-hydroxylase	(b)	Jennewein et al.	2003	<i>Taxus cuspidata</i>	Yew
Taxoid 9-hydroxylase	(b)	Floss and Mocek	1995	<i>Taxus cuspidata</i>	Yew
Taxoid 2-hydroxylase	(b)	Chau and Croteau	2004	<i>Taxus cuspidata</i>	Yew
Taxoid 7-hydroxylase	(b)	Chau et al.	2004	<i>Taxus cuspidata</i>	Yew
<b>Triterpenoid biosynthesis</b>					
$\beta$ -Amyrin and sophoradiol 24-hydroxylase	CYP93E1	Shibuya et al.	2006	<i>Glycine max</i>	Soybean
Steroid 22-hydroxylase	CYP90B1	Choe et al.	1998	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 22-hydroxylase	CYP724B2	Ohnishi et al.	2006c	<i>Solanum lycopersicum</i>	tomato
Steroid 22-hydroxylase	CYP90B3	Ohnishi et al.	2006c	<i>Solanum lycopersicum</i>	tomato
Steroid 22-hydroxylase	CYP724B1	Sakamoto et al.	2006	<i>Oryza sativa</i>	Rice
Steroid 22-hydroxylase	CYP90B2	Sakamoto et al.	2006	<i>Oryza sativa</i>	Rice
Steroid 23-hydroxylase	CYP90C1	Ohnishi et al.	2006b	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 23-hydroxylase	CYP90D1	Ohnishi et al.	2006b	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 3-hydroxylase	CYP90A1	Ohnishi et al., unpublished	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 23-hydroxylase	CYP90D2	Ohnishi et al., unpublished	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 23-hydroxylase	CYP90D3	Ohnishi et al., unpublished	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid Baeyer-Villiger oxidase	CYP85A2	Nomura et al.	2005	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Castasterone oxidase	CYP85A3	Nomura et al.	2005	<i>Solanum lycopersicum</i>	tomato
Steroid 6-oxidase	CYP85A1	Kim et al.	2005	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 26-hydroxylase	CYP734A1	Turk et al.	2003	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 26-hydroxylase	CYP72C1	Turk et al.	2005	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 26-hydroxylase	CYP734A7	Ohnishi et al.	2006a	<i>Solanum lycopersicum</i>	tomato
Steroid 22-desaturase	CYP710A1	Morikawa et al.	2006	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 22-desaturase	CYP710A2	Morikawa et al.	2006	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Steroid 22-desaturase	CYP710A11	Morikawa et al.	2006	<i>Solanum lycopersicum</i>	tomato
$\beta$ -Amyrin 11-oxidase	CYP88D6	Seki et al.	2008	<i>Glycyrrhiza</i>	Licorice
Thalianol hydroxylase (THAH)	CYP708A2	Field and Osbourn	2008	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Thalianol-diol desaturase (THAD)	CYP705A5	Field and Osbourn	2008	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
$\beta$ -Amyrin oxidase	CYP51H10	Qi et al.	2006	<i>Avena strigosa</i>	Oat
Sterol 14 $\alpha$ -demethylase	CYP51	Kahn et al.	1996	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum
Sterol 14 $\alpha$ -demethylase	CYP51	Cabello-Hurtado et al.	1997	<i>Triticum aestivum</i>	Wheat
<b>Tetraterpenoid biosynthesis</b>					
$\alpha$ -Carotene $\beta$ -hydroxylase	CYP97A3	Kim et DellaPenna	2006	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
Zeinoxanthin $\epsilon$ -hydroxylase	CYP97C1	Tian et al.	2004	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress

Source: Ginglinger, 2010. Reproduced with authorization from the thesis manuscript.

### 3 TERPENES

Terpenoids, also known as isoprenoids, constitute the largest and diverse class of natural products. They are classified according to the number of isoprene units in their structure: hemiterpenes  $C_5$  (1 isoprene unit), monoterpenes  $C_{10}$  (2 isoprene units), sesquiterpenes  $C_{15}$  (3 isoprene units), diterpenes  $C_{20}$  (4 isoprene units), triterpenes  $C_{30}$  (6 isoprene units), tetraterpenes  $C_{40}$  (8 isoprene units), polyterpenes  $C_n$  (long chains of many isoprenes more than  $> 40$  units). The meroterpenes consist of a terpene-derived unit attached to a non-terpene moiety, like chlorophyll, plastoquinone, certain indole alkaloids, and prenylated proteins (DAVIS and CROTEAU, 2000).

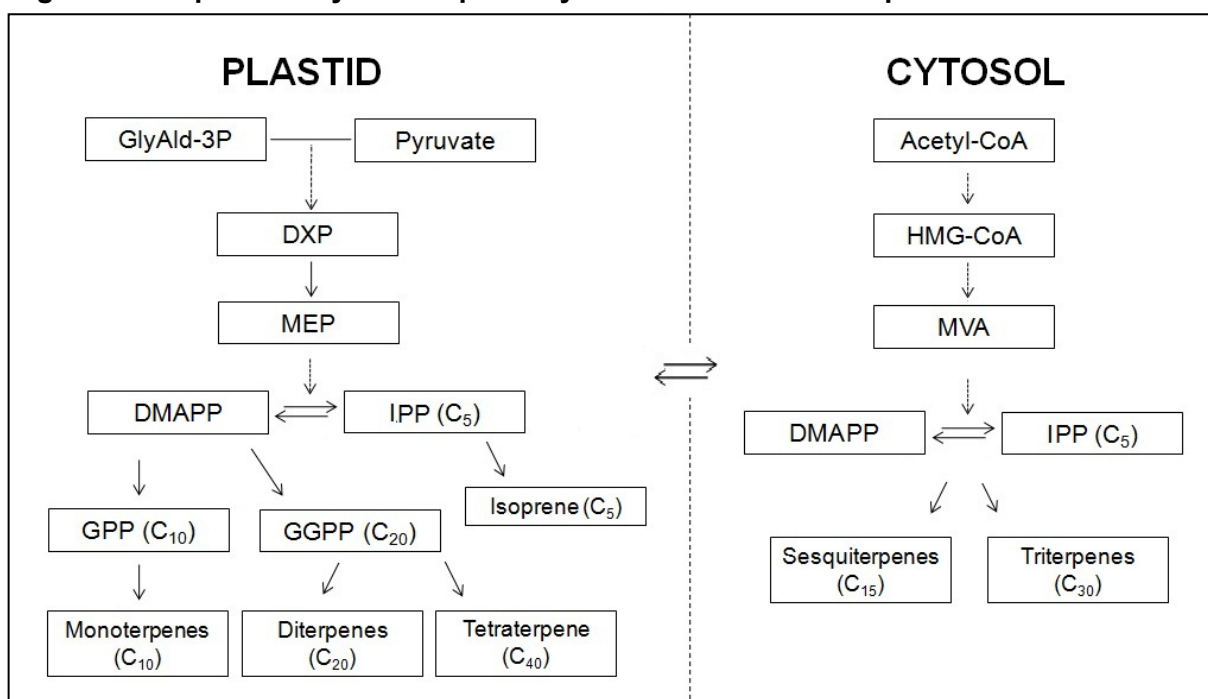
**Figure 03 Structures of some terpenes. Isoprene – Hemiterpene;  $\beta$ -Myrcene, Linalool and  $\beta$ -Geraniol – Monoterpenes; (*E*)- $\beta$ -Caryophyllene, (*E*)- $\beta$ -Farnesene - Sesquiterpenes; DMNT (4,8-Dimethylnona-1,3,7-Triene), TMTT ((*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene) – Homoterpenes.**



Source: Author, 2012.

The isoprenoid biosynthesis pathway generates both primary and secondary metabolites that are of great importance to plant growth and survival (AHARONI et al., 2005). All terpenoids are synthesized from the universal five carbon precursors, isopentenyl diphosphate (IPP, the active C<sub>5</sub> isoprene unit) and its allylic isomer, dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, terpenoids are derived from two alternative biosynthetic pathways localized in different subcellular compartments, the mevalonate (MVA) pathway operating in the cytosol and the methylerythritol phosphate (MEP) pathway in plastids, (LAULE et al., 2003; NAGEGOWDA, 2010; THOLL and LEE, 2011; OKADA, 2011) (Figure 04).

**Figure 04 Terpene biosynthesis pathways and subcellular compartments.**



Source: Author, 2012.

The classic route for the formation of the C<sub>5</sub> building blocks of terpenoid biosynthesis in plants is via the reactions of the MVA pathway, first demonstrated in yeast and mammals (THOLL, et al., 2004) and is currently known in animals, fungi, a few bacteria, and in the cytoplasm of the phototrophic organisms (ROHMER, 2010). This pathway involves condensation of three units of acetyl coenzyme A (AcCoA) to form the compound 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA). After the reduction of HMG-CoA to mevalonic acid, three sequential steps happen, two successive phosphorylations and a decarboxylation to yield the C<sub>5</sub> compound, IPP (AHARONI et al, 2006; ASHOUR et al. 2010; DUBEY et al., 2003; OKADA, 2011). The condensation of two IPP units with one DMAPP by the action of farnesyl

diphosphate synthase (*FPPS*) generates the precursor for sesquiterpenoids. This pathway produces sesquiterpenes and triterpenes such as phytosterols and oleanolic acid (AHARONI et al., 2003; AHARONI et al., 2006; ESTÉVEZ et al., 2001; GINGLINGER, 2010; KREUZWIESER et al., 1999; LAULE et al., 2003; OKADA, 2011).

The MEP pathway was first discovered in many bacteria and plastids of plants, and was later identified in most bacteria and in the plastids of phototrophic organisms and related phyla (ROHMER, 1999; ROHMER, 2010). This pathway starts with an aldol-type addition of hydroxyethyl-TPP (thiamine-pyrophosphate), which is formed by the decarboxylation of pyruvate, at the C1 position of glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) to yield 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) (AHARONI et al., 2006; ESTÉVEZ et al., 2001; KREUZWIESER et al., 1999; OKADA, 2011). The DXP is transformed to 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP). MEP is subsequently converted into 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) by the consecutive activities of three independent enzymes (ESTÉVEZ et al., 2001). The condensation of one IPP unit with one DMAPP by the action of geranyl diphosphate synthase (GPPS) generates the immediate precursor of monoterpenoids. This plastidic pathway produces isoprene, monoterpenes, diterpenes, carotenoids, plastiquinones, and phytol conjugates such as those of chlorophylls and tocopherols (AHARONI et al., 2006; ESTÉVEZ et al., 2001; KREUZWIESER et al., 1999; LAULE et al., 2003).

Although the subcellular compartmentalization of two pathways allows them to operate independently, metabolic cross-talks between the two pathways has been reported: the plastids produce terpenoid precursors primarily via MEP pathway, while in the cytosol/ER terpenoid precursors form largely via the MVA pathway (ASHOUR et al., 2010; HEMMERLIN et al. 2003; LAULE et al, 2003; OKADA, 2011; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN and BORONAT, 2002). When Tobacco Bright Yellow-2 Cells (TBY-2) were used to evaluate the cross-talks between the two pathways, Hemmerlin et al. (2003) found evidences that significant exchange of metabolites is possible across the plastid envelope. The interactions between the cytosolic and the plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* as probed by treatment with either an inhibitor of the MVA pathway (lovastatin) or the MEP pathway (fosmidomycin) (LAULE et al., 2003). Bouvier and colleagues (2005), with

available data of isoprene-emitting plants, indicated that the cross-talk between chloroplastic and extra-chloroplastic pathways of isoprenoid formation is marginal, thus when the plastid pathway is blocked, the amount IPP shuttled from the cytosol into the plastid could not compensate the deficiency.

Finally, the action of terpene synthases (*TPSs*) convert DMAPP, GPP, GGPP, and phytoene into hemiterpenes, monoterpenes, diterpenes, and tetraterpenes respectively in plastids; whereas other *TPSs* convert FPP and squalene to sesquiterpenes and triterpenes usually in the cytosol (BOHLMANN et al., 1998; LANGE et al., 2000).

The terpene synthases or cyclases are very similar in physical and chemical properties and catalyze the reactions in which the primary terpene skeletons are formed from the mentioned substrates (AHARONI et al., 2006; TRAPP and CROTEAU, 2001). One characteristic feature of many *TPSs* is the formation of multiple products from a single substrate (STEELE et al., 1998). The reaction mechanism involves a divalent-cation-dependent of the prenyl diphosphate substrate and the formation of reactive carbocation intermediates (THOLL et al., 2006). Although a *TPS* cyclization reaction may occasionally constitute the terminal step in a plant secondary metabolism, it is much common further modifications of the terpene olefin to take place (KIRBY and KEASLING, 2009). These modifications may at later points of the pathway be catalyzed by an array of different enzyme classes, such as the cytochrome P450 monooxygenases (see Table 01), dehydrogenases, methyl transferases, acyl transferases and UDP glycosyltransferases (DUDAREVA et al., 2004; GINGLINGER, 2010). For example, the serine carboxypeptidase-like (SCPL) acyltransferase enzyme is required for acylation of antimicrobial terpenes that are produced in the roots of *Avena* spp. and that provide protection against soil-borne pathogens (MUGFORD and OSBOURN, 2010). Further, the cytochrome P450 monoterpene oxygenases, in most cases, mediated allylic hydroxylation of parental monoterpene olefin leads to a series of redox transformations and conjugation reactions which yield a family of structurally related derivatives and isomers (MAU and CROTEAU, 2006). Thus, they are responsible for imparting structural and functional diversity to this family of natural products.

The terpene synthases of primary metabolism are linked to plant growth and development directly, thereby allowing, by mutation, an alteration in morphological



phenotype, while the genes of secondary metabolism, are not necessary for an organism to live, can tolerate functional mutations leading to product diversity. So, if a gene responsible for biosynthesis of an isoprenoid is already known, its overexpression or deletion in the plant can provide useful functional information (KIRBY and KEASLING, 2009).

### 3.1 Terpenoids volatiles

In plants, terpenoids play important roles such as hormones and in interactions with other organisms, including defense responses in neighboring plants, as an indirect defense by attracting natural enemies of herbivores, defense against pathogens and as attractants for pollinators and seed dispersers. Terpenes, such as isoprene and monoterpenes also appear to mitigate abiotic stresses, such as high temperature and oxidative stress (HOLOPAINEN and GERSHENZON, 2010; KREUZWIESER et al., 1999; LORETO and SCHNITZLER, 2010; SCHNITZLER et al., 2010). Besides their ecological benefits to plants, terpene specialized compounds are widely used by humans as flavors, fragrances, pharmaceuticals, or as potential precursors in the production of biofuels (BOHLMANN and KEELING, 2008).

Bohlmann et al. (2000) evaluated the functional expression in *E. coli* of an *Arabidopsis thaliana* terpene synthase gene, designated *AtTPS10*, converted geranyl diphosphate (GPP) into the acyclic monoterpenes  $\beta$ -myrcene and (*E*)- $\beta$ -ocimene and small amounts of cyclic monoterpenes. Van Poecke et al. (2001) showed that in *Arabidopsis* plants infested with *Pieris rapae* caterpillars, the expression of *TPS10* and the production of  $\beta$ -myrcene were induced. Fäldt et al. (2003) when worked with *AtTPS03* also of *A. thaliana*, they identified formation as major component of (*E*)- $\beta$ -ocimene from GPP. Normally, the (*E*)- $\beta$ -ocimene is a component of floral scents and protect plants by attracting natural enemies of herbivores or their parasitoids.

The formation of floral volatiles in *Arabidopsis* involved the expression of 32 *TPS* genes distributed in its five chromosomes (AUBOURG et al., 2002). Chen et al. (2003) showed that *Arabidopsis* flowers emit both monoterpenes and sesquiterpenes and the expression of 25 genes in flowers, roots, leaves, siliques and stems. These, especially six genes (*TPS02*, *TPS11*, *TPS14*, *TPS17*, *TPS21* and *TPS24*) showed complete or almost complete flower-specific expression. Chen et al. (2004)

characterized two root specific monoterpene synthases (*TPS23* and *TPS24*) from *A. thaliana* for the formation of the monoterpene 1,8-cineole as major enzymatic product.

Aharoni and colleagues (2003) led experiments in which transgenic *Arabidopsis* overexpressing two different TPS was generated. The leaves of transgenic plants constitutively expressing a dual linalool/nerolidol synthase in the plastids (*FaNES1*) produced linalool and its glycosylated and hydroxylated derivatives. They examined the volatiles emitted by wild type *Arabidopsis* plants that revealed that the flowers emit an array of monoterpenes (myrcene, limonene and (*E*)- $\beta$ -ocimene) and sesquiterpenes ((*E*)- $\beta$ -caryophyllene, thujopsene, and  $\alpha$ -humulene).

The analysis of induced volatile terpene emissions from rosette leaves of 27 *Arabidopsis* accessions show that several accessions such as Wassilewskija (*WS*) emitted the monoterpene (*E*)- $\beta$ -ocimene and the sesquiterpene (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, while others as Col-0 release (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, without any or only traces of (*E*)- $\beta$ -ocimene (Huang et al., 2010). They demonstrated that the difference is caused by allelic variations leading to differential expression and subcellular targeting of two closely related bifunctional (*E*)- $\beta$ -ocimene/(*E,E*)- $\alpha$ -farnesene synthases, *TPS02* and *TPS03*.

The linalool (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol) production was evaluated in different *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. Rico et al. (2010), showed enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) catalytic domain.

Genetic modifications can offer new opportunities to study the regulation of the biosynthesis of secondary metabolites in plants (LÜCKER et al, 2004). Thus, the goal of the project is to identify candidate P450s involved specifically in monoterpene modulation in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

## 4 MATERIAL AND METHODS

This work was completed in the Department of Metabolic Networks of the “Institut de Biologie Moléculaire des Plantes” (IBMP) of CNRS, Strasbourg – France with Dr. Jean-François Ginglinger under the supervision of Dr. Danièle Werck.

The initial part of the project, which is the cloning of the candidate genes and their promoters in the different vectors, their monitoring in *A. thaliana* using RT-qPCR and promoter-GUS fusion construct transformed plants, the selection of KO insertion mutant *Arabidopsis* lines, the construction and selection of over-expression *Arabidopsis* mutants was performed by Dr. Jean-François Ginglinger in his Ph.D thesis with the supervision of Dr. Danièle Werck.

### 4.1 Plant growth

Seeds of *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana* were sown in a standard soil compost mixture, and seedlings were grown individually in growth chambers under white fluorescent lamps. Photon fluency was 40–60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  at the rosette level and 70–90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  at the level of *Arabidopsis* inflorescence tips, i.e., ~20–30 cm above the rosettes. The temperature was 22 °C during the day (12 h) and 19°C during the night (12 h) for *Arabidopsis thaliana*. The temperature was 24°C during the day (16 h) and 20°C during the night (8 h) for *Nicotiana benthamiana*.

### 4.2 Monitoring of $\beta$ -glucuronidase activity

The promoter region (1.5kb) of candidate genes was isolated by PCR from *Arabidopsis* genomic DNA using appropriate primers with “user” extensions. The resulting PCR product was cloned into the vector pBI101U adapted with a “user”. The constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, which was used to transform *Arabidopsis* by floral vacuum. Transgenic lines transformed with the construct were selected on plate containing kanamycin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and cefotaxime 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and confirmed by PCR after gDNA extraction. Enzymatic assay with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc) were performed to

determine the localization of GUS activity. Tissue samples were incubated at 37°C in GUS staining buffer for 24 hours for the roots and 4 hours for the flowers and other organs. Samples were subsequently washed with PBS buffer 50 mM pH 7, ethanol 50% and ethanol 70%.

### 4.3 RT-qPCR of candidate genes

The transcript levels of target genes were quantified using RT-qPCR in 96 well plates using a Bio-Rad iCycler real time PCR instrument. One or two biological replicates were used for each treatment, and two or three technical replicates were analyzed for each biological replicate. Each technical replicate was associated to one or two reference genes for background correction: GAPDH (At1g13440) and TIP41-like (At4g34270) for *Arabidopsis*, PDA1 and ADH6 for *Saccharomyces cerevisiae*, and elongation factor 2 $\alpha$  (accession: AJ299248) for *N. benthamiana*.

Each reaction was performed in 20 $\mu$ L total volume: 10  $\mu$ L of 2\*SYBR Green I master mix with fluorescein, 5  $\mu$ L of 20 times diluted cDNAs and 5  $\mu$ L of 2  $\mu$ M primers appropriate. Thermal cycling conditions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 15s at 95°C and 1 min at 60°C before final dissociation for 1 min at 95°C. The calibration curve for each gene was obtained by performing RT-PCR with serial dilutions of the cloned cDNA fragment. The specificity of the individual PCR amplification was checked using a heat dissociation curve from 55 to 95°C following the final cycle of the PCR.

Jean François Ginglinger performed these molecular manipulations.

### 4.4 Subcellular protein localization

The candidate genes were isolated by PCR from a subclone, using appropriate primers with “user” extensions and modified to remove the stop codon. The open reading frame of the enhanced GFP (eGFP) was amplified from a plasmid using appropriate primers with “user” extensions. The resulting PCR products were cloned into the vector pCAMBIA2300U (*CaMV*-35S promoter) adapted with a “user” cassette. The GFP was inserted on the C-terminal side of the protein; the stop codon

of the candidate gene was replaced by a codon of the amino acid glycine (G) and a linker constituted by TGRH encoded by the sequence ACCGGTCCGAC was introduced between the proteins for flexibility. Jean François Ginglinger performed this manipulation.

The constructs were transformed into hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 (For more details, see 2.4.1. *Agrobacterium tumefaciens* transformation) and used for the infiltration of *Nicotiana benthamiana* leaves (See, 4.4. *Nicotiana benthamiana* leaf infiltration). Five days after infiltration, leaves were detached and used for observation of the fluorescent signal with a confocal microscope. Images were acquired with a LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss, software version AIM 4.2), using a 63x, 1.2 NA water immersion objective lens at 23°C. Fluorescence of free GFP or GFP fusion proteins was observed after excitation with a 488nm laser line, using a 505–550 band-pass emission filter.

## **4.5 Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae***

### **4.5.1 *In vitro* enzymatic assay**

The candidate genes were isolated of by PCR using appropriate primers with “user” extensions. The PCR products were cloned (user cloning) into the yeast expression vector pYeDP60U (expression cassette under the control of the GAL10-CYC1 glucose-repressed, galactose-inducible promoter) adapted with a “user” cassette. Jean François Ginglinger performed this manipulation.

Microsomal fractions containing the recombinant protein were then prepared as described in Pompon et al. (1996). 30 mL SGI selective medium was inoculated with a transformed WAT11 or HMT1 colony and incubated at 28°C overnight. 200 mL complete medium YPDE was inoculated with 2 mL of the preculture, and grown for 30 hours at 28°C. 20 mL of a 200 g/L galactose solution was added for induction of the promoter for 16 hours. Cells were centrifuged at 7 500g for 10min at 4°C, and the pellet was washed in 30 mL TEK solution. All following steps were performed while keeping samples on ice. Cells were centrifuged in the same conditions and the pellet was taken in 2 mL TES solution (0.5g BSA and 6µL β-mercapto-ethanol was added to 50mL TES before use). The cells were placed in a 50mL Falcon tube and 0.4-0.6

mm glass beads (Sartorius) were added until reaching 2 mm of the surface. Cells were broken by vigorously shaking the tubes for 5\*1 min. The solution was then filtered on Miracloth to remove the glass beads and was centrifuged in the same conditions as stated above to pellet cell debris. The supernatant was centrifuged at 100 000g for 45 min at 4°C, and the pellet (microsomal fraction) was taken in 1-2 mL TEG.

#### 4.5.1.1 P450 quantification

The reduced P450 binds CO with great affinity and forms a complex that absorbs light at 450nm. Measurement of the P450-CO complex was performed according to Omura and Sato (1964). A few milligrams of dithionite were added to 20 times dilute microsomes in TEG buffer. The solution was divided into 2 cuvettes and placed into a double beam spectrophotometer (Shimadzu SP2000). A base line was saved between 400 and 500 nm, and the test cuvette was saturated with CO. The difference spectrum peak at 450 nm allows calculation of the concentration of P450 ( $\epsilon_{450-490nm}=91mM^{-1}.cm^{-1}$ ).

#### 4.5.1.2 Enzymatic activities

Purified microsomal fractions were then used for incubation with substrates. Each reaction was performed in a final volume of 200  $\mu$ L in a glass tube. Substrates were solubilized in PBS 50 mM pH 7.4 to a final concentration of 100  $\mu$ M. 20  $\mu$ L microsomes were added and the reaction was initiated with the addition of NADPH at a final concentration of 1 mM. The tubes were placed at 27°C for 20min under gentle agitation, and were then extracted twice with 500 $\mu$ L ethyl acetate. The solvent fraction was concentrated under soft argon flow to ~200  $\mu$ L. 2  $\mu$ L were injected in GC-FID.

#### 4.5.2 Terpenoid analysis of reconstituted pathways

Jean François Ginglinger performed these molecular manipulations.

The *Saccharomyces cerevisiae* strain K197G was obtained from Pr. Francis Karst (INRA - Colmar), and used for replacement of the sole endogenous cytochrome P450 reductase by one of *Arabidopsis thaliana*: *ATR1* to produce a strain called HMT1. *ATR1* inserted in the yeast integrative vector pYeDP110 (*GAL10*-*CYC1* inducible promoter) was obtained from Pr. Philippe Urban (CNRS-CGM – Gif-sur-Yvette). After bacteria transformation, the constructs were checked by PCR to select colonies for which the fragment was inserted in the right direction. *ATR1*::pYeDP110 constructs were then introduced into *Saccharomyces cerevisiae* strain K197G.

The open reading frame of candidate genes were isolated by PCR using appropriate primers with NotI and PacI extensions for TPSs, and BamHI and XhoI extensions for P450s. The 5' 132bp and 285bp nucleotide sequence of *TPS10* and *TPS14* respectively, encoding a plastid targeting sequence, was not included in the amplification. The PCR products of the TPSs were cloned into the multiple cloning site 1 (MCS1; *GAL10* inducible promoter), and the P450 were cloned into the MCS2 (*GAL1* inducible promoter) of the double expression replicative vector pESC-Leu. All possible combinations of plasmids containing one or two genes were produced. The constructs were introduced into *Saccharomyces cerevisiae* strain HMT1 for expression.

For the determination of enantiomeric linalool produced by the conversion of *TPS10* and *TPS14* expressed in HMT1, was prepared constructs with and without the N-terminal sequence. The conversion products were extracted with 2\*1 mL ethyl acetate and eluted with 1 mL of the same solvent in SPE Cartridges (hydrophobic-lipophilic balance – HLB 60 mg/Waters) solvated with ethyl acetate. After, the solvent was concentrated ~ 200  $\mu$ L and injected in GC-MS.

#### 4.5.2.1 Metabolite extraction

10 mL of a 5 M NaCl solution containing 20 ng/mL of 3-octanol was added to 10 mL of supernatant to facilitate adsorption to SBSE stir bars (Gerstel, Mühlheim, Germany), which were added and let spin at 740 rpm for 2 hours and 30 min. Stir bars were quickly rinsed in water, dried, and placed in 100  $\mu$ L acetonitrile in a GC vial containing an insert. The vials were sonicated for 30 min to desorb the organic

compounds from the matrix, and stir bars were removed from the vials, from which 1  $\mu$ L was injected in the TD/GC-MS and GC-MS.

#### 4.6 Transient expression in the leaves of *Nicotiana benthamiana*

The open reading frame of candidate genes were isolated by PCR from a subclone, using appropriate primers with “user” extensions. For *TPS10* and *TPS14*, the sequence encoding the full-length protein including the N-terminal transit peptide was amplified. The PCR products were cloned into the vector *pCAMBIA3300U* (*CaMV*-35S promoter) adapted with a “user” cassette.

##### 4.6.1 *Agrobacterium tumefaciens* transformation

The constructs were expressed in the DNA constructions in vectors were expressed in plants via transformation in *Agrobacterium tumefaciens*. The *Agrobacterium* strain LBA4404 hypervirulent was used for transient expression in *N. benthamiana* leaves. Electrocompetent agrobacteria were thawed on ice. 0.5  $\mu$ L of 100 ng/ $\mu$ L plasmid was mixed with 50  $\mu$ L cells and placed in an electroporation cuvette (2 mm gap, Molecular Bioproducts). A BioRad electroporator (Gene Pulser II) was used to give an electric shock (voltage 2400 V, capacitance 25  $\mu$ F, resistance 200  $\Omega$ ). 150  $\mu$ L YEB medium was immediately added and cells were being spread on a YEB plate containing rifampicin 25  $\mu$ g/mL, gentamycin 25  $\mu$ g/mL, and kanamycin 50  $\mu$ g/mL, and incubated for 2 days at 28°C. 4 colonies were transferred on a similar YEB plate, and checked for the presence of the plasmid by colony PCR. 1 positive colony was used for plant transformation.

##### 4.6.2 *Nicotiana benthamiana* leaf infiltration

Transformed agrobacteria strain LBA4404 hypervirulent was used for infiltration of *N. benthamiana* leaves for transient expression. One transformed colony was grown for 30 hours at 28°C in 5 mL YEB medium containing rifampicin 25  $\mu$ g/mL, gentamycin 25  $\mu$ g/mL, and kanamycin 50  $\mu$ g/mL in a 12 mL culture tube. The



p19 (protein of tomato) expressing strain was grown in the same conditions, except that gentamycin was not added. The cells were then centrifuged at 5 500g for 8 min at 15°C, and the pellet was rinsed in 5 mL ddH<sub>2</sub>O. Cells were re-centrifuged in the same conditions and taken in 5 mL ddH<sub>2</sub>O. The OD<sub>600</sub> was measured, strains expressing different proteins were mixed if necessary, and the final OD<sub>600</sub> was brought to 0.5. The culture was mixed to the p19-expressing strain in a 4:1 ratio (v/v, mixture of candidate gene(s):p19).

The mixture of agrobacteria was used for the infiltration of two leaves 4-6 weeks old *Nicotiana benthamiana* plants per replicate.

#### 4.6.3 Terpenoid analysis of reconstituted pathway

##### 4.6.3.1 Incubation with substrates

5 days after infiltration and confirmation of the subcellular protein localization (See 4.4. Subcellular protein localization), leaves were detached and discs of 11 mm diameter were cut with a metal circular lid. Five discs per leaf were placed for incubation for 4 hours in a small glass dish floating at the surface of 2 mL PBS buffer 20 mM, pH 7.4 and the potential monoterpene substrates (linalool, geraniol,  $\beta$ -ocimene, nerol and  $\beta$ -myrcene) at 200  $\mu$ M. Buffer and discs were then used for analysis of terpenoids by liquid-liquid extraction and tissue extraction, respectively.

##### 4.6.3.2 Buffer liquid-liquid extraction

The buffer used for incubation of discs of transformed *N. benthamiana* leaves was extracted for analysis of terpenoids. 10mL buffer was extracted with 10 mL pentane/ethyl acetate (4:1). The supernatant was spiked with 1  $\mu$ M 3-octanol and concentrated under argon flow to ~100  $\mu$ L. 2  $\mu$ L were injected in GC-FID and TD/GC-MS.

##### 4.6.3.3 Tissue extraction

The 10 discs of *N. benthamiana* was extracted with 2 mL of methanol spiked with 10  $\mu$ M 3-octanol (internal standard) in a mortar and a pestle, 1 mL methanol more was added to rinse the pestle, and 2 more to rinse the borders of the mortar.

The extract was let incubated for 1 hour. The mixture was centrifuged at 2 000g for 2 min and the supernatant was then concentrated to approximately 500 µL under argon flow, stored at -30°C overnight to precipitate proteins, and centrifuged again at 2 000g for 2 min. The supernatant was transferred to a LC vial and analyzed in UPLC-MS/MS.

#### 4.6.3.4 Volatile collection of *N. benthamiana* leaves

Two transformed *N. benthamiana* leaves (5 days after infiltration) per replicate were placed in a pot with water. Volatile compounds were sampled according to the procedure described by Aharoni et al. (2003). Samples were placed in 1 L glass jars fitted with a Teflon-lined lid equipped with an inlet and an outlet. A vacuum pump was used to draw air through the glass jar at ~100 mL/min. The incoming air was purified through a metal cartridge (140\*4 mm) containing 200mg Tenax TA (20/35; Grace scientific). The volatiles emitted by the flowers were trapped at the outlet on a similar Tenax cartridge. Volatiles were sampled 24 hours. Volatiles were recovered from the cartridges and analyzed by thermo-desorption using TD/GC-MS.

## 4.7 Mutant lines analysis

Mutants of *Arabidopsis thaliana* were generated and analyzed with the aim to replace the enzymes in the relevant metabolic pathway(s), and to point to their physiological role *in vivo*.

Metabolic profiles were obtained *i)* from the volatile fraction using the volatile collection system and *ii)* from the flowers by optimizing extraction procedures.

### 4.7.1 KO insertion mutant *Arabidopsis* lines selection

This part was designed and performed by Dr. Jean-François Ginglinger.

*Arabidopsis* Salk insertion lines were obtained from the NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center). Seeds were spread and 10 plants per line were grown on soil. Selection for mutants was performed by genotyping because the plant resistance marker is no longer working in Salk lines. When the rosette was formed,

one young leaf was detached and used for genomic DNA (gDNA) extraction. Rounds of PCR with appropriate primers were performed to genotype the plants.

#### 4.7.2 Construction of over-expression *Arabidopsis* mutants

This part was designed was performed by Dr. Jean-François Ginglinger.

The open reading frame of the candidate genes was isolated by PCR from a subclone, using appropriate primers with “user” extensions. The resulting PCR products were cloned into the vector pCAMBIA3300U (*CaMV*-35S promoter) adapted with a “user” cassette. The constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, which was used to transform *Arabidopsis* by floral dip. Transgenic lines transformed with the construct were selected on soil using Basta and confirmed by RT-qPCR.

#### 4.7.3 Volatile collection of *A. thaliana*

Mutant and wild type plants were cultivated in growth room until fully flowering. Three plants per replicate were used for the collection of volatiles emitted from flowers. Approximately 60 inflorescences for each genotype were placed in a small glass pot with water. When fully flowering, the inflorescences of 5 mutant and wild type plants per replicate were used for the collection.

The *Arabidopsis thaliana* inflorescences were gathered in bouquets, placed in small pots with water and enclosed in 1 L glass jars closed with a Teflon-lined lid equipped with inlet and outlet Aharoni et al. (2003). A vacuum pump is used to draw air through the glass jar at ~100 mL/min. The incoming air is purified through a metal cartridge (140x4 mm) containing 200 mg Tenax TA (20/35; Grace scientific). At the outlet, the volatiles emitted were trapped on a similar Tenax cartridge. Volatiles were sampled during 23 hours. Cartridges were thermally desorbed in TD/GC-MS.

#### 4.7.4 Tissue extraction

##### 4.7.4.1 Tissue extraction (frozen)

*A. thaliana* flowers (~ 120 mg) were frozen in liquid nitrogen, and grinded in 2mL Eppendorf tubes with a metal bead and using a grinder (TissueLyser II, Qiagen). 100 mg of frozen grinded tissue was precisely weighed and placed in 2mL Eppendorf tubes and extracted with 1mL methanol spiked with 10  $\mu$ M citronellol (internal standard). Tubes were vortexed, stored at -30°C overnight, and centrifuged at 21 000g for 20 min. Approximately 500  $\mu$ L of the supernatant was transferred to a LC vial and analyzed in UPLC-MS/MS.

##### 4.7.4.2 Tissue extraction (fresh)

*A. thaliana* flowers (~ 120 mg) (KO and Wild-Type) were collected and extracted them fresh in 3.5 mL MeOH. The samples were concentrated to 500  $\mu$ L, and analyzed in UPLC-MS/MS operated in multiple reaction monitoring (MRM) looking for the signature of 7 compounds: linalool, 8-hydroxy linalool, 8-oxo-linalool, linalool-8-carboxylic acid, 1,2 epoxy-linalool, lilac alcohol and lilac alcohol epoxyde.

#### 4.8 Analytical methods based on GC and UPLC

Compounds were identified by comparing retention times and mass spectra with those of standards compounds (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or provided from Matthias Wüst (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn) and Adam Matich (The New Zealand Institute for Plant & Food Research). The solvents utilized were HPLC grade from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

##### 4.8.1 GC-FID

Samples from incubation assays were analyzed on a Varian 3900 gas chromatograph coupled to a flame ionization detector. Separation was performed on

a DB-5 column (Agilent) of 30 m \* 0.25 mm i.d. \* 0.25  $\mu$ m thickness. Helium was the carrier gas (flow rate of 1.2 mL/min), a splitless injection (injection volume of 2  $\mu$ L) was used, and a temperature gradient of 10°C/min from 50°C (0.5 min hold) to 320°C (5 min hold) was applied.

#### 4.8.2 TD/GC-MS

##### 4.8.2.1 Perkin Elmer thermodesorption

Tenax cartridges were analyzed on a Perkin Elmer clarus 680 equipped with a Clarus 600T quadrupole mass spectrometer. Volatiles were released from Tenax traps using a thermal desorption cold trap setup by heating at 250°C for 5 min, with a Helium flow of 30 mL/min. Desorbed volatiles were then transferred to an electronically-cooled focusing trap at -30°C within the TDS. Volatiles were injected in splitless mode into the analytical column (HP5-MS, 30 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu$ m thickness) by heating the cold trap to 280°C. The GC was held at the initial temperature of 50°C for 3.5 min followed by a linear thermal gradient of 10°C/min to 140°C, then another gradient of 5°C/min to 220°C, another gradient of 20°C/min to 300°C and held for 5 min with a constant column pressure of 26 psi. The column was coupled directly to the ion source of the DSQ quadrupole mass spectrometer, which was operated in the 70eV EI ionization mode and scanned from mass 50 to 600 amu. TurboMass software (version 5.4.2) was used for instrument control and data processing.

##### 4.8.2.2 Perkin Elmer liquid injection

Liquid samples were analyzed on the same machine, but using a liquid injector. Helium was the carrier gas (flow rate of 1.2mL/min), the injector was set to 280°C in splitless mode. 2  $\mu$ L were injected and the GC oven temperature was programmed at 50°C for 30 sec and then a rate of 10°C min<sup>-1</sup> to 320°C and the temperature was held for 10 min. The Mass spectrometer was operated as described above.

#### 4.8.3 GC-MS (a)

Tenax cartridges were sent to the laboratory of Plant Physiology at the University of Wageningen in the Netherlands. All analyses were entirely performed by Dr. Francel Verstapen. Tenax cartridges were analyzed on a Trace GC Ultra™ (Thermo Electron Corporation) equipped with a Trace DSQ quadrupole mass spectrometer (Thermo Electron Corporation). Tenax cartridges were first dry-purged with helium at 100 mL/min for 10 min at ambient temperature to remove any water. Volatiles were released from Tenax traps using a thermal desorption cold trap setup by heating at 250°C for 3 min, with a He flow of 30 mL/min. Desorbed volatiles were then transferred to an electronically-cooled focusing trap at -10°C within the TDS. Volatiles were injected in splitless mode into the analytical column (Restek, RTX 5MS, 30 m × 0.25 mm i.d. × 1.0 µm thickness) by heating the cold trap to 300°C. The GC was held at the initial temperature of 40°C for 3.5 min followed by a linear thermal gradient of 10°C/min to 280°C, and held for 2.5 min with a He flow of approximately 1 mL/min. The column was coupled directly to the ion source of the DSQ quadrupole mass spectrometer, which was operated in the 70eV EI ionization mode and scanned from mass 45 to 400 amu. An auto sampler was used for the automatic desorption of the Tenax traps (Ultra™, Markes international Ltd, UK). The TC-20 Multi-tube conditioning unit (Markes International Ltd, UK) was used to clean the cartridges in between measurements by heating them at 310°C for 40 min under a He flow.

#### 4.8.4 GC-MS (b)

Sampling and analysis were performed in the Max Plank Institute for Chemical Ecology of Jena (Germany). The analytical part was performed by Dr. Tobias Köllner. Samples were analyzed on an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with an Agilent 7683 automatic liquid sampler coupled to an Agilent 5975B inert MSD (Agilent Technologies). Separation was performed on a heptakis (2,3,-di-o-methyl-6-o-f-butyldimethyl-silyl)-β-cyclodextrin diluted with OV1701 capillary column of 20 m × 0.25 mm i.d. × 0.15 µm film thickness. Helium was the carrier gas (flow rate of 0.6 mL/min), the injector was set to 200°C in splitless mode. 1µL was injected and the

GC oven temperature was programmed at 50°C for 2min and then a rate of 4°C min<sup>-1</sup> to 200°C. The Mass spectrometer was operated in electron impact ionization mode (EI, 70eV) and the masses were scanned over a m/z range of 50 – 600 amu. Agilent MSD ChemStation software (G1701DA, Rev D.03.00) was used for instrument control and data processing.

#### 4.8.5 UPLC-MS/MS

Analyses were performed using a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA USA) equipped with an electrospray ionisation source (ESI) and coupled to an Acquity UPLC system (Waters USA). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 x 2.1 mm, 1.7 µm; Waters) and pre-column. The mobile phase consisted of (A) water and (B) methanol, both containing 0.1% formic acid. The run started by 2 min of 95% A, then a linear gradient was applied to reach 100% B at 12 min, followed by isocratic run using B during 2 min. Return to initial conditions was achieved in 3 min, with a total run time of 17 min. The column was operated at 35°C with a flow-rate of 0.35 mL/min, injecting 3 µl samples. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The nebulizer gas flow was set to approximately 50 L/h, and the desolvation gas flow to 900 L/h. The interface temperature was set to 400°C and the source temperature at 135°C. The capillary voltage was set to 3.4 kV and the cone voltage to 25 V, the ionization was in positive or negative mode. Low mass and high mass resolution were 15 for the both mass analyzers, ion energies 1 and 2 were 0.5 V, entrance and exit potential were 50 V and detector (multiplier) gain was 650 V. Data acquisition and analysis were performed with the MassLynx software (version 4.0). Full-scan and Selected Ion Recording (dwell time 0.1 s) mode was used for qualitative analyses. The multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to quantitative analyses.

## 5 RESULTS AND DISCUSSION

The plants produce phytochemicals that can be necessary for a cell to live and proliferation (primary metabolism) or that may have specialized roles with its environment (secondary metabolism). Most of the secondary metabolite structural diversity is generated by modifying common backbone structures, with the derived compounds having potentially divergent biological activities (KLIEBENSTEIN, 2004). For example, the enzymes P450s that catalyze a large proportion of the most complex substrates regio- and stereo-specific steps in plant metabolism. They have been shown to be involved in the biosynthesis of steroids, phenylpropanoid, monoterpenoid, and alkaloid defense compounds as well as signal compounds such as gibberellins and jasmonates (LORETO and SCHNITZLER, 2010; MAUGHAN et al., 1997; SCHNITZLER et al., 2010).

### 5.1 Candidate genes expression and localization

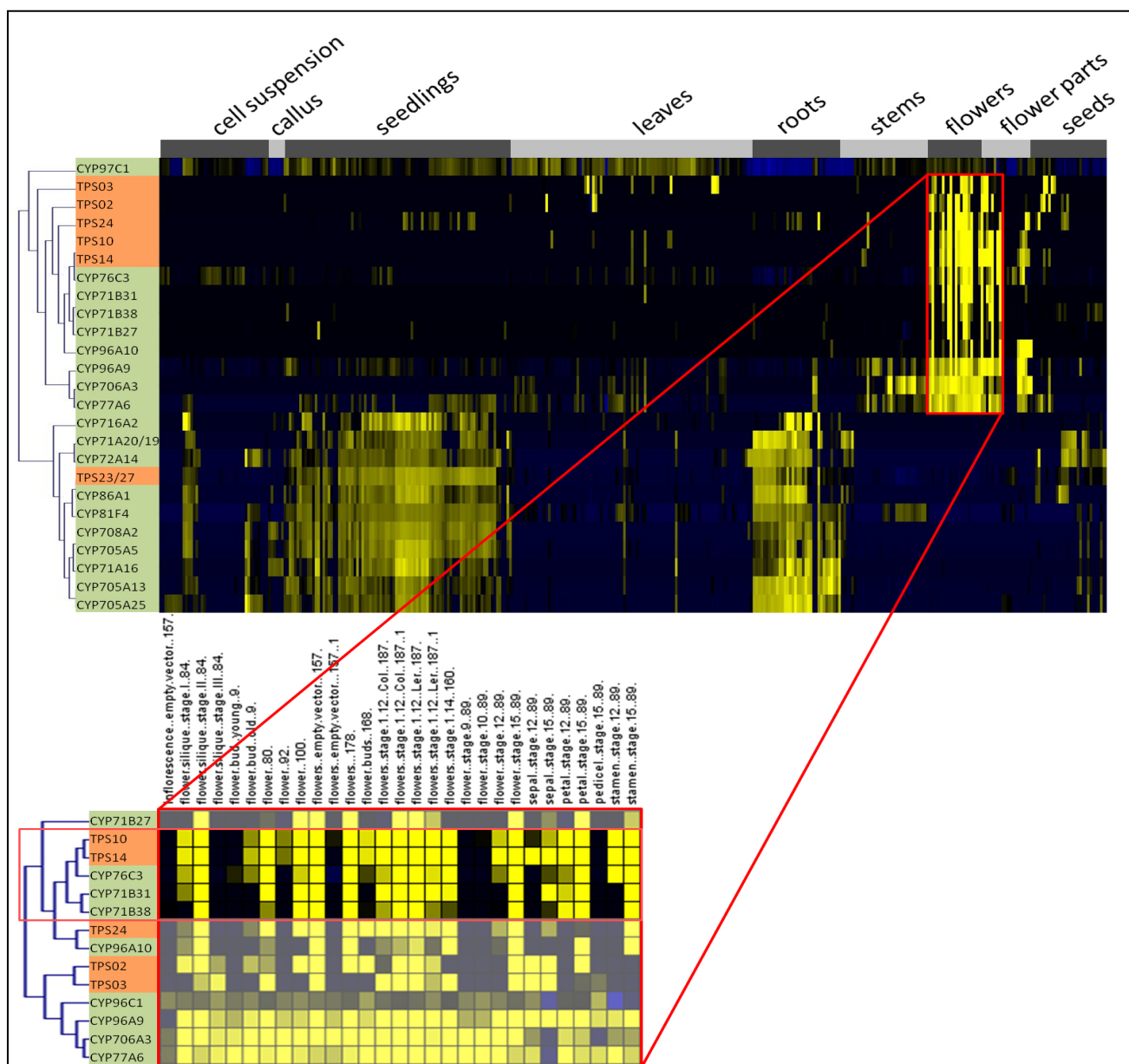
*Arabidopsis thaliana* is a member of the Brassicaceae, a well established model plant with a complete genomic map of all 5 chromosomes. There are 246 P450s genes (the most are of unknown biochemical function) and 32 TPS genes annotated. Thus, with its extensive genetic and genomic resources, *A. thaliana* provides an ideal model system to study the fundamental roles of terpene floral volatiles (THOLL et al., 2005).

In the Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) of CNRS, Strasbourg – France was created software called CYPedia - Cytochrome P450 Expression Database using *Arabidopsis* (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/>) which combines large scale P450 (co-) expression data with functional annotation. The CYPedia calculates co-expression between *Arabidopsis* genes based on Affymetrix ATH1 microarray. The public microarray data of diverse databases were analyzed on the Affymetrix ATH1 microarray using the Genevestigator, in which were generated gene expression matrices for all P450s gene with the expression of more than 4,000 genes of the plant metabolism, with the objective to identify known and putative metabolic genes co-expressed with each CYP across thousands of biological samples (EHLTING et al., 2008). The Pearson correlation coefficients (*r-value*) were calculated where each P450 with each of the selected genes of plant



metabolism similarly ( $r > 0.5$ ) were kept for the identification of co-expressed pathways. In evaluating the correlation coefficients, it was found that the floral genes *TPS10*, *TPS14*, *CYP76C3* and *CYP71B31* have high correlation coefficients equal to or greater than 0.84, suggesting that they participate in the same biosynthetic pathway. Thus, *CYP76C3* and *CYP71B31* were selected as candidate genes for the floral oxygenation of monoterpenoids produced by *TPS10* and *TPS14*.

**Figure 05 Hierarchical cluster analysis of mono-TPS genes (orange) and selected P450 (green). In detail the flower cluster. The selection (red) indicates the formation of an hierarchical cluster of mono-TPS in flowers with stronger correlation.**



Source: Author, 2012.

The *Arabidopsis thaliana* plants containing the promoter-GUS fusion constructs for the 4 candidate genes were evaluated in root, leaves, stem, inflorescence, flower, stamen, and nectary.

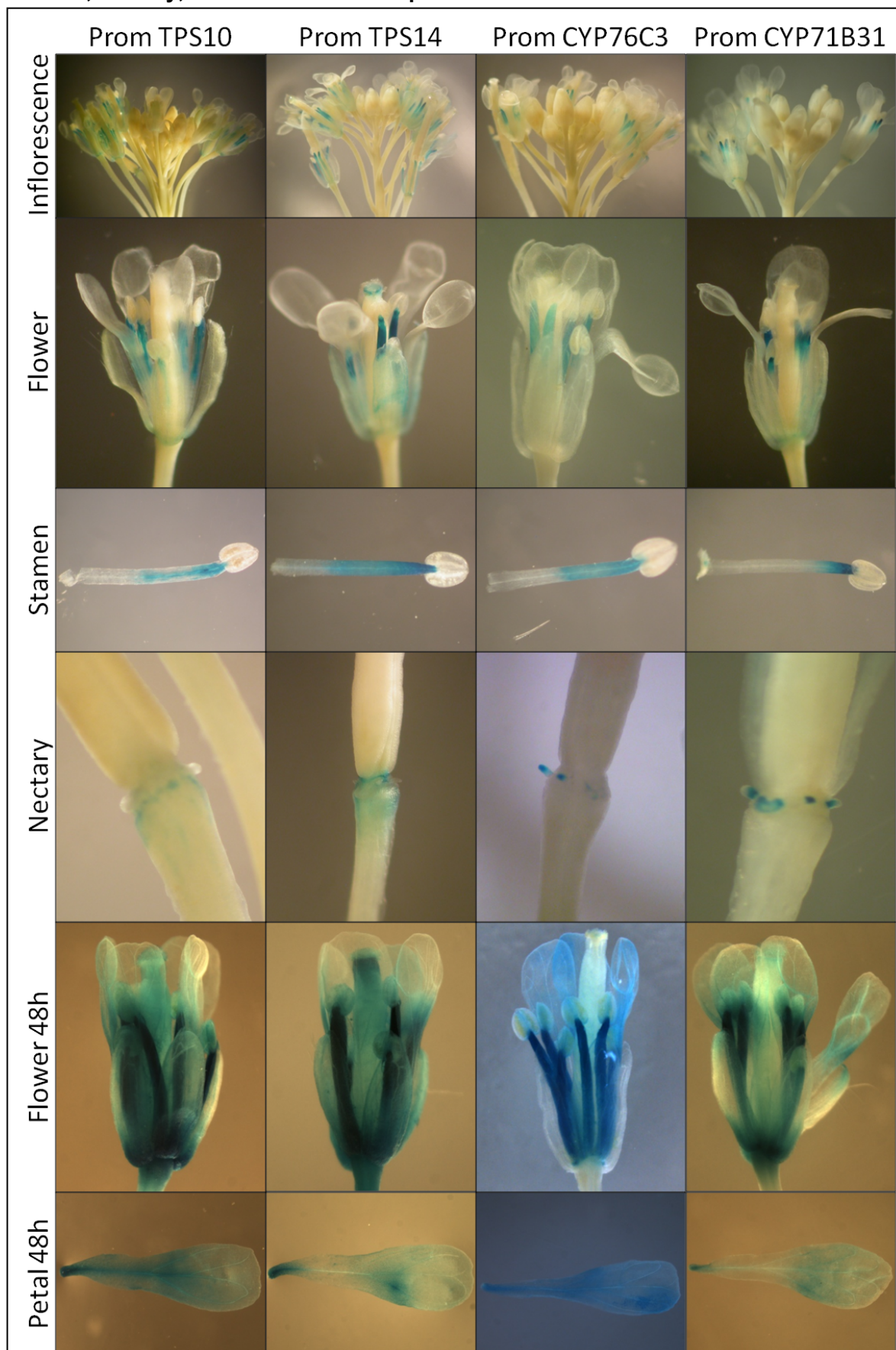
According to the figure 06, it can be seen that the candidate genes are expressed in the stamens, and more specifically in filaments, especially the upper part. At the stage of silique development, GUS activity was also present in nectaries, however, in low intensity. Control lines carrying the promoterless GUS insertion cassette did not show any GUS control (data not shown).

The occurrence of GUS staining in the sepals, filaments, and receptacles suggests a function involving the entire flower, such as pollinator attraction (CHEN et al., 2003). Floral scents play important roles in pollinator attraction; in a natural population of *A. thaliana* the most frequent flower visitors are solitary bees, diptera and thrips (HOFFMANN et al., 2003). The floral volatiles of *Arabidopsis* also could play a variety of the roles instead of or in addition to pollinator attraction (CHEN et al., 2003).

The very similar expression of the 4 candidate genes indicates a possible joint biochemical action and corroborates their co-expression calculated from microarray data in the organ and tissue. Thus, the monitoring of the  $\beta$ -glucuronidase activity confirms their co-expression in the flowers.

Ginglinger (2010) evaluated the expression of the 4 candidate genes (*TPS10*, *TPS14*, *CYP73C3* and *CYP71B31*) in different organs, at different flower stages, and in the different part of the flower. The strongest expression was found first in the flowers, after in siliques, leaves, stems and roots. The level of expression of the candidate genes follows the same trend, with the maximum at stage when the flowers are fully open, except for *TPS10*, which reaches its highest point in the stage when the flowers are just open.

**Figure 06 GUS activity in PromTPS10, PromTPS14, PromCYP76C3 and PromCYP71B31 plants. Histochemical GUS staining of an inflorescence, flower, stamen, nectary, flower 48 hours and petal 48 hours.**

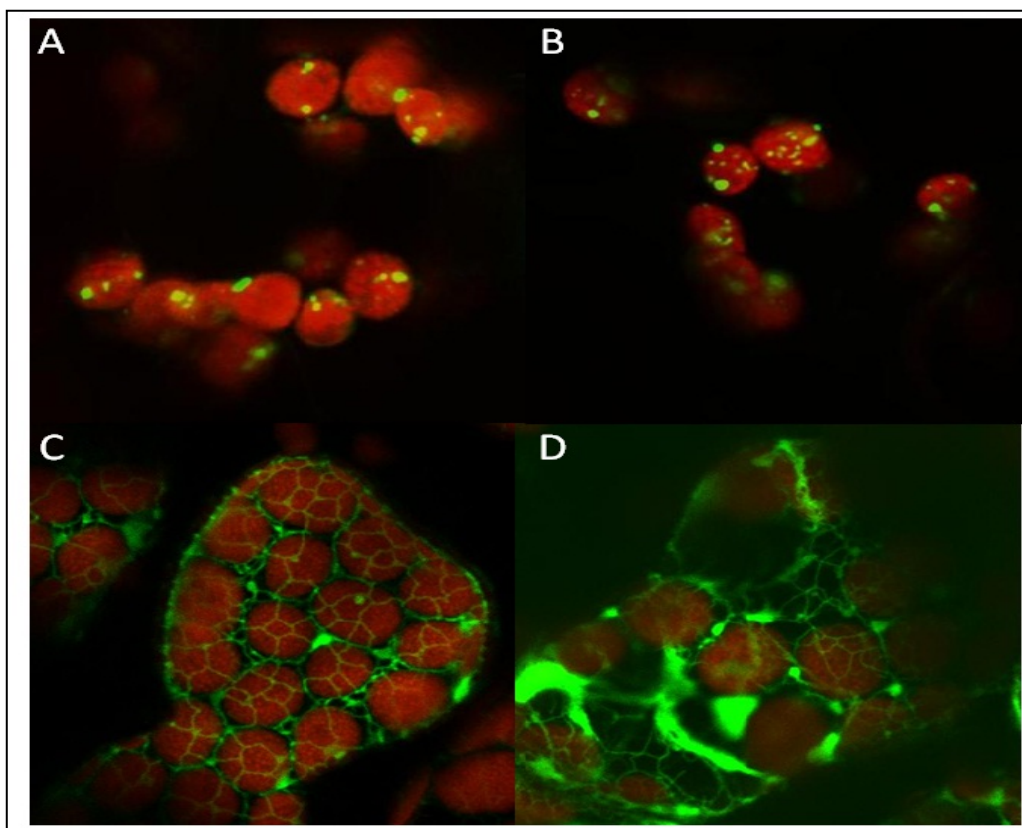


Source: Author, 2012.

To experimentally determine the subcellular localization of the 4 proteins, a 1,5 kb cDNA fragment beginning with the start codon of the candidate gene was inserted into the vector pCambia2300U with a C-terminal fusion to green fluorescent protein (eGFP). A linker constituted by five amino acid was introduced between the candidate and fluorescent proteins for flexibility. Use of C-terminal fusions is mandatory since it is the N-terminal ends of P450s and TPSs that drive respectively their anchoring into the endoplasmic reticulum membrane, or their import into the plastids (GINGLINGER, 2010). All the plant MEP pathway enzymes carry N-terminal transit peptides for import into plastids (THOLL and LEE, 2011).

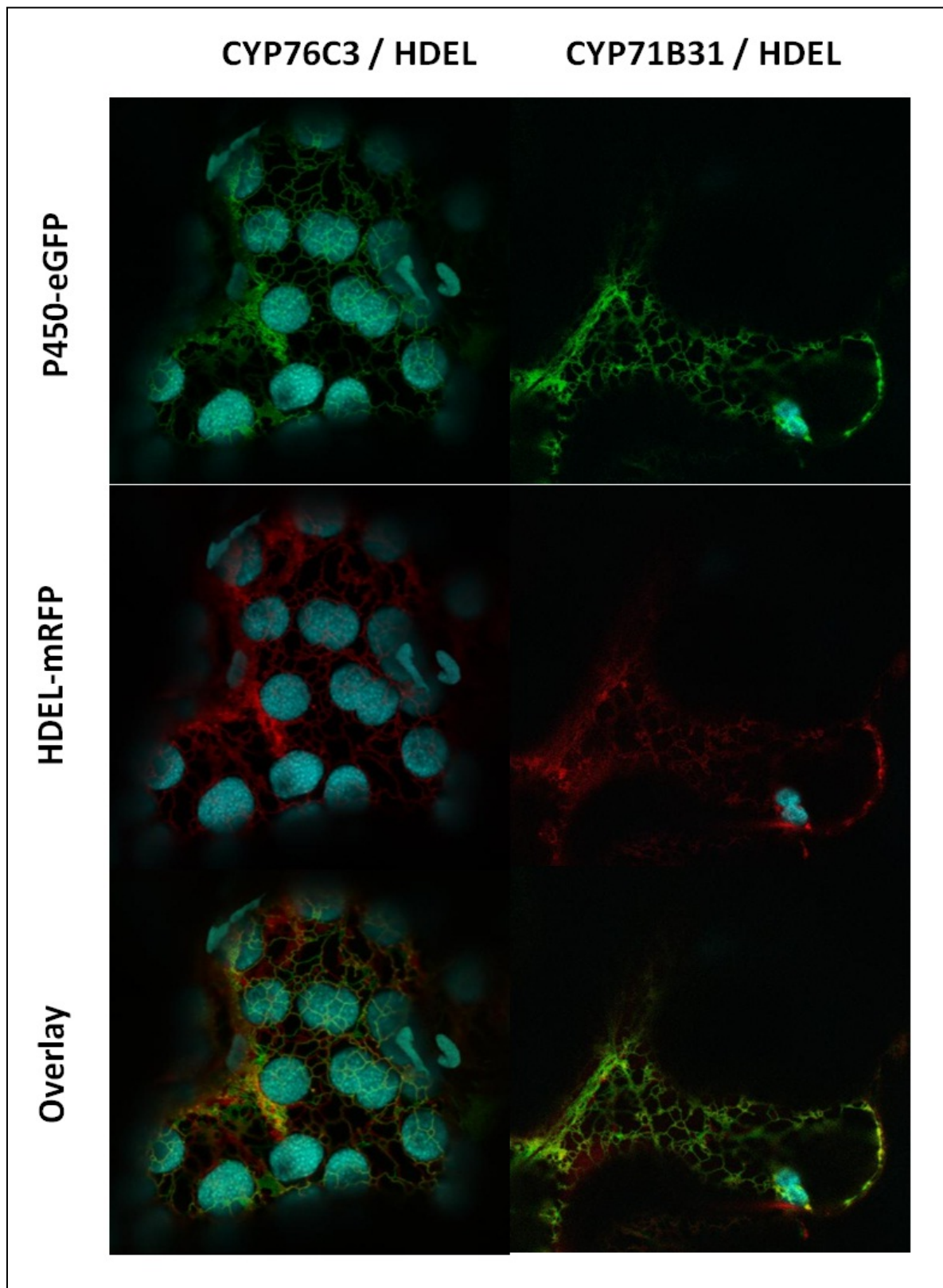
The GFP analysis of leaf discs of *Nicotiana benthamiana* transformed with the *TPS10*-eGFP or *TPS14*-eGFP constructs showed green fluorescence located in spots on the surface of chloroplasts. In plants transformed with the *CYP76C3*-eGFP or *CYP71B31*-eGFP constructs, GFP fluorescence was observed at the endoplasmic reticulum (Figure 07 and 08).

**Figure 07 Confocal laser scanning microscopy of expressed *TPS10* (A), *TPS14* (B), *CYP76C3* (C) and *CYP71B31* (D) peptide-GFP fusion proteins. Microscopic images were taken from the leaf discs of *Nicotiana benthamiana*. A and B – The images shows proteins localized on the surface of the chloroplasts. C and D – The ER localization of the fluorescence.**



Source: Author, 2012.

Figure 08 Confocal laser scanning microscopy. Localization of CYP76C3-eGFP and CYP 71B31-eGFP, with RFP-HDEL as a marker of the ER. RFP - Red Fluorescent Protein and GFP - green fluorescent protein.



## 5.2 Heterologous expression

The terpenes synthesized by TPS10 and TPS14 are candidate substrates for the oxygenation by CYP76C3 and CYP71B31. The candidate genes were expressed in heterologous systems and the formed biochemical products were analyzed.

### 5.2.1 *In vitro* assays with yeast microsomes

The *in vitro* assays with yeast microsomes consists of incubating substrates with microsomal membranes isolated from the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing P450s and a cytochrome P450 reductase (CPR). The P450s are usually membrane-bound enzymes, thus these require the presence of a co-localized CPR partner to supply reducing equivalents. The *S. cerevisiae* does contain native P450s and therefore, as *E. coli* and most other bacteria do not have any native P450s, are the preferred hosts for P450 expression (KIRBY and KEASLING, 2009).

In principle, the *CYP76C3* and *CYP71B31* coding sequences was insert into the vector pYeDP60U and each construct to be studied was transformed into *S. cerevisiae* WAT11 host cell. The strain WAT11 contains the *A. thaliana* cytochrome P450 reductase (ATR1) under the control of GAL10-CYC1 hybrid promoter in place of the endogenous P450 reductase (CPR1) (URBAN, et al., 1997), and is auxotrophic for adenine. The vector contains the ADE2 gene to alleviate the auxotrophy.

The peak at 450 nm was not detected by use of reduced CO differential absorption spectroscopy. Therefore, the membranes were probably devoid of functional P450. The catalytic activity of the proteins was verified by enzyme assays using monoterpenes (linalool, nerol, geraniol, myrcene, phelladrene, cymene, carene, camphene, and limonene) and sesquiterpenes (humulene, caryophyllene, fanesene, isolongifolene, valencene, and cedrene) as substrates. The conversion of these substrates were not detected in GC-FID, that which could be associated with the instability of these P450s on the yeast membranes and/or damaged during the preparation of microsomal fractions.

### 5.2.2 Monoterpenoids analyses in reconstituted pathways in yeast

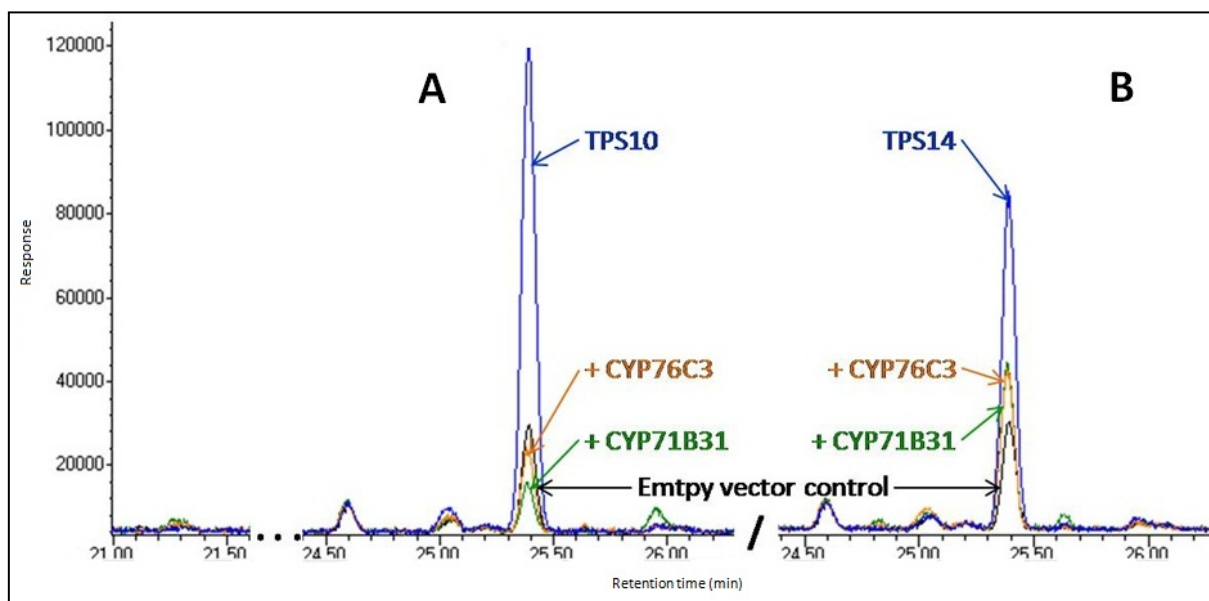
The *Saccharomyces cerevisiae* strain K197G generated by Pr. Francis Karst contains the *A. thaliana* cytochrome P450 reductase (ATR1) under the control of GAL10-CYC1 hybrid promoter in place of the endogenous P450 reductase (CPR) (URBAN, et al., 1997), and is auxotrophic to uracil, histidine and leucine. ATR1 was cloned in the integrative vector pYeDP110 (with an uracil selection marker) bearing flanking regions of the CPR.

The K197G strain had been engineered for the accumulation of the common monoterpene precursor GPP by disruption of the endogenous FPP synthase. After transformation, ATR1 was integrated together with the galactose-inducible promoter into the yeast genome at the CPR locus. The strains growing on selective medium without uracil were named HMT1 (with ATR1). Each gene taken separately and all possible combinations of TPS-P450 co-expressing in pESC-Leu vectors were transformed into the HMT1. The truncated versions of TPSs lacking the putative plastid peptide were used for cloning into pESC-Leu. Control assays were performed with the same strain carrying the same expression vector without any gene inserted. The transformants were grown and the expression of the genes was induced by changing the carbon source to galactose. The culture was then centrifuged and the growth medium was extracted using Stir Bar Supportive Extraction method (SBSE; Gerstel). The organic compounds were then eluted from the stir bars using acetonitrile and analyzed on GC-MS (a).

Linalool was produced when TPS10 or TPS 14 were expressed alone. In other hand, when the TPSs were co-expressed with a P450 the level of linalool produced was very similar to that found in wild-type (Figure 08). This result is in part in agreement with the literature. Chen et al. (2003) analyzed *in vitro* incubations of extracts of *E.coli* expressing *TPS14* with GPP. Enantiomerically pure (+)-3S-linalool was the only product. However, for TPS10, this result is in contradiction with what was suggested by Bohlmann et al. (2000). The functional expression of *TPS10* in *E. coli* was shown to produce a series of olefin terpenes (*i.e.*, 2-carene, limonene, myrcene, tricyclene and  $\beta$ -ocimene). Besides van Poecke et al. (2001) showed that the expression of TPS10 is induced in *Arabidopsis* plants infested with *Pieris rapae* caterpillars and can most likely be associated to quantities of  $\beta$ -myrcene is produced.

The results indicate that the linalool produced when the TPSs are expressed was higher than when they are co-expressed with the P450s. This latter level is very close to the level produced by the empty vector control (except for the co-expression with CYP71B31 in **A**- figure 09).

**Figure 09** Linalool produced in yeast by TPS10 (**A**) and TPS14 (**B**) alone or with CYP76C3 and 71B31 (co)-expressed. Empty vector control (black), *TPS10* and *TPS14*(blue), CYP76C3 (orange) and CYP71B31 (green).



Source: Author, 2012.

Thus, the present data leads to believe that the cellular environment influences the function of the enzyme and that CYP76C3 and CYP71B31 accept reductase ATR1 as an electron donor. The linalool is further converted by P450s however; the oxidation products were not detected.

The monoterpene synthases are encoded by nuclear genes that possess an N-terminal transit peptide that directs their import into the plastid followed by cleavage of the transit peptide, e.g., the *AtTPS10* cDNA is truncated at the 5' terminus. The truncation represents 36 amino acid residues of a presumptive transit peptide region at the N-terminus of the deduced protein (BOHLMANN et al., 2000; CHEN, et al., 2003). The truncated protein (cleaved/mature), missing the N-terminal transit peptide responsible for the plastid localization, often has higher specific activity when expressed than the full-length preprotein.

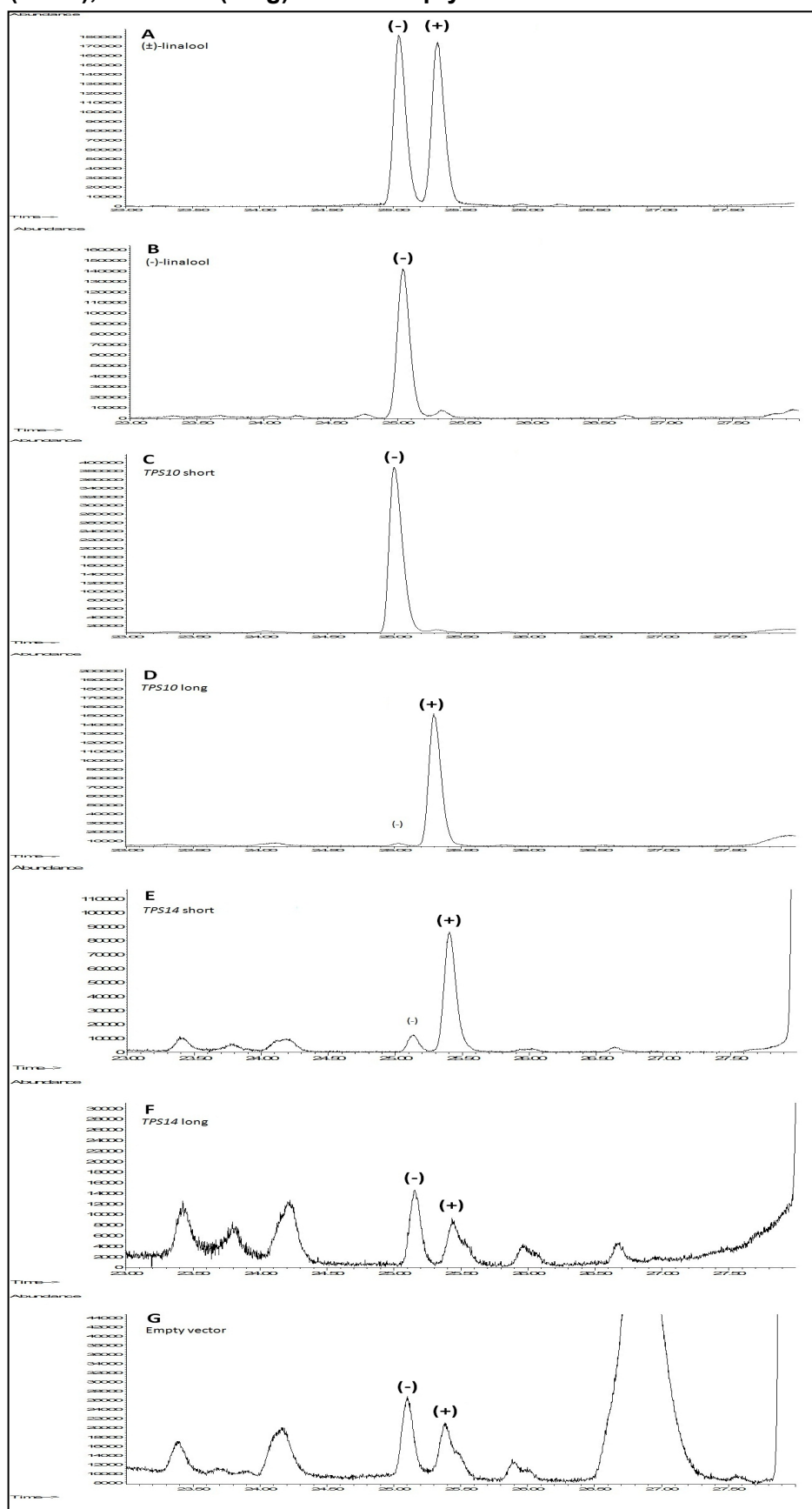


For the determination of enantiomeric linalool produced by the conversion of *TPS10* and *TPS14* expressed in yeast, constructs with or without the N-terminal sequence were prepared. Control assays were performed with the same strain carrying the same expression vector without any *TPS* gene inserted. These experiments were conducted as described above, however the conversion products were extracted with SPE cartridges and eluted with ethyl acetate. The solvent was then concentrated and injected in GC-MS (b).

The complete protein encoded by *TPS10* (long) and its mature version without the putative transit peptidase (short) do not lead to the same products. The *TPS10* long version, catalyzed the conversion of GPP to two products, R-(-)-linalool and S-(+)-linalool (Figure 10 – **C** and **D**). Because of the chiral properties of its hydroxylated third carbon, linalool occurs in two enantiomeric forms: R-(-)-linalool and S-(+)-linalool (RAGUSO and PICHERSKY, 1999). This result different to *TPS10* long and short may be related with the protein problem folding. Its product was done, but without the same characteristics.

For the *TPS14* the conversion was differently, have been found where the two enantiomers of linalool, though in different concentrations whichever formation of S-(+)-linalool by *TPS14* short (See Figure 10 - **E**). *TPS14* long catalyzed conversion of GPP was considered inactive because its products have concentrations similar to the control empty (expression vector without any *TPS* gene inserted) (See Figure 10 - **F** and **G**). These data are not in accordance with Chen et al. (2003), that found to both the versions the conversion single product S-(+)-linalool.

**Figure 10 Chirality of linalool produced by *TPS10* or *TPS14* expressed in HMT1 yeast. A. S/R-(+/-)-linalool (standard), B. R-(-)-linalool, (standard) C. *TPS10* (short), D. *TPS10* (long), E. *TPS14* (short), F. *TPS14* (long) and G. Empty vector.**



Source: Author, 2012.

The product was separated on a  $\beta$ -cyclodextrin column. \* Short – without the N-terminal transit peptide sequence. Long – With the N-terminal transit peptide sequence.

### 5.2.3 Monoterpenoid analysis in reconstituted pathways in leaves of *Nicotiana benthamiana*

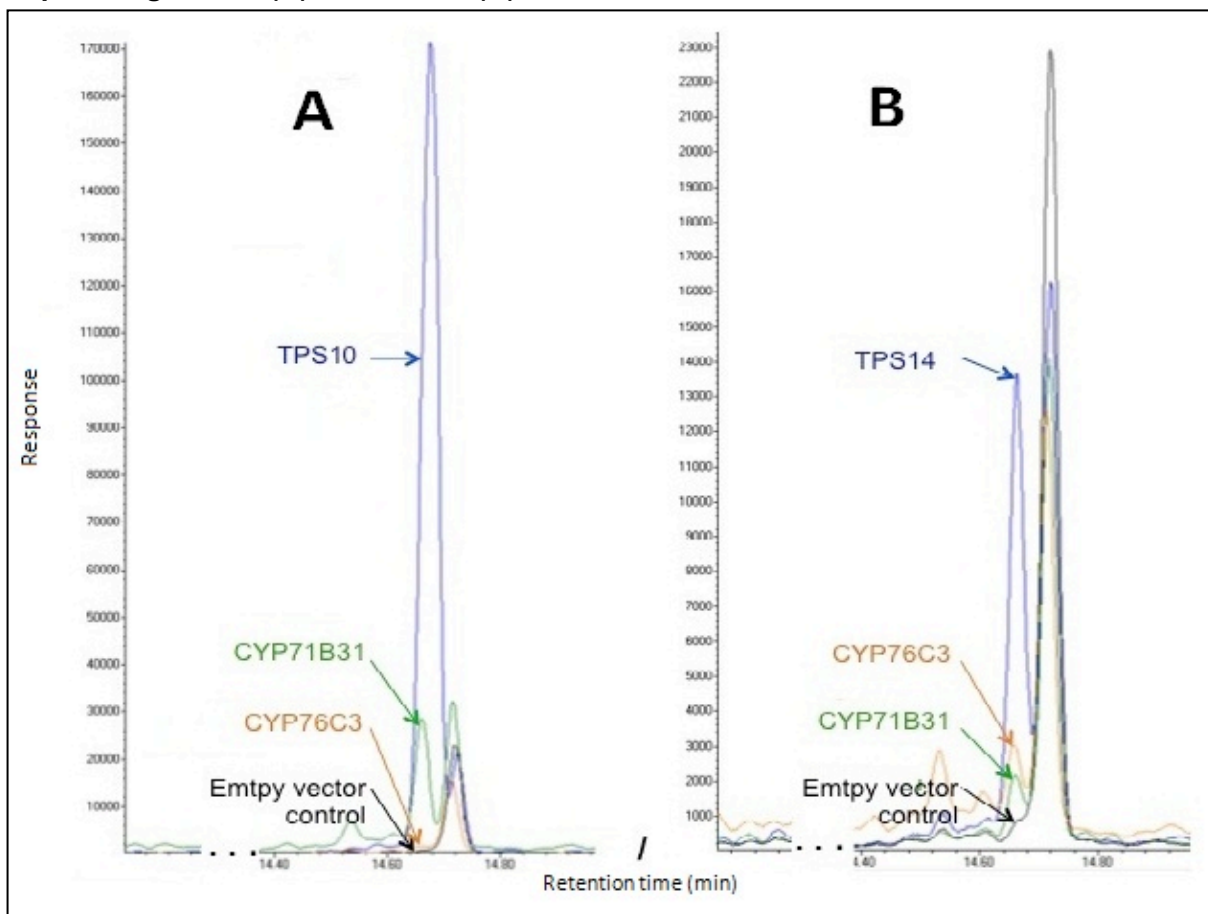
The postulated monoterpenoid pathways were transiently reconstituted in leaves of *N. benthamiana* by co-expressing the candidate *TPSs* and *P450s*. For the *TPSs*, the sequences encoding the full-length protein including the N-terminal transit peptide were expressed in the plant. The candidate genes were cloned separately into the pCAMBIA3300U vector under the control of the *CaMV* (*Cauliflower mosaic virus*) 35S promoter, transformed into *Agrobacterium tumefaciens*. The different *Agrobacteria* cultures were then mixed to obtain the desired combination of *TPS* and *P450* ( $OD_{600}=0.5$ ) and then mixed with a culture of equal density expressing the p19 protein of the tomato bushy stunt virus (TBSV) in a ratio of 4:1 (v/v, candidate gene(s):p19). The p19 protein prevents the onset of post-transcriptional gene silencing in the infiltrated tissues and allows high level of transient expression (VOINNET et al., 2003).

The *Agrobacteria* cultures containing all 4 possible combinations of one *TPS* and one *P450*, as well as each gene taken separately were used for infiltration of leaves of *N. benthamiana*, which were then analyzed 5 days later.

To assess the emitted volatiles, detached leaves of these plants were analyzed by headspace and the volatiles were adsorbed on the metal cartridges containing a solid sorbent (Tenax). Two methods are known to desorb the compounds from the cartridges: *i*) elute with a solvent that is concentrated and analyzed, or *ii*) heat-desorb from the cartridge and directly inject into the GC column using desorption module apparatus. The genes were expressed in all possible combinations and the volatile compounds were collected for 4 hours using the volatile trapping system. The cartridges containing the adsorbed terpenoids were analyzed on a thermo-desorption-equipped GC-MS (a).

The results were very similar with those found in yeast. The protein encoded by *TPS10* produce linalool and when co-expressed with CYP76C3 or CYP71B31, the linalool emission dropped, indicating further conversion of the products by *P450* (Figure 11 - **A**). The *TPS14* produced linalool, and when co-expressed with CYP76C3 or CYP71B31, a similar drop of linalool in emitted volatile was observed. However, no oxygenated terpenoid was found in the co-expressed samples.

**Figure 11** Linalool emitted\* by *Nicotiana benthamiana* detached leaves transiently expressing TPS10 (A) and TPS14 (B) alone or with CYP76C3 and CYP71B31.



Source: Author, 2012.

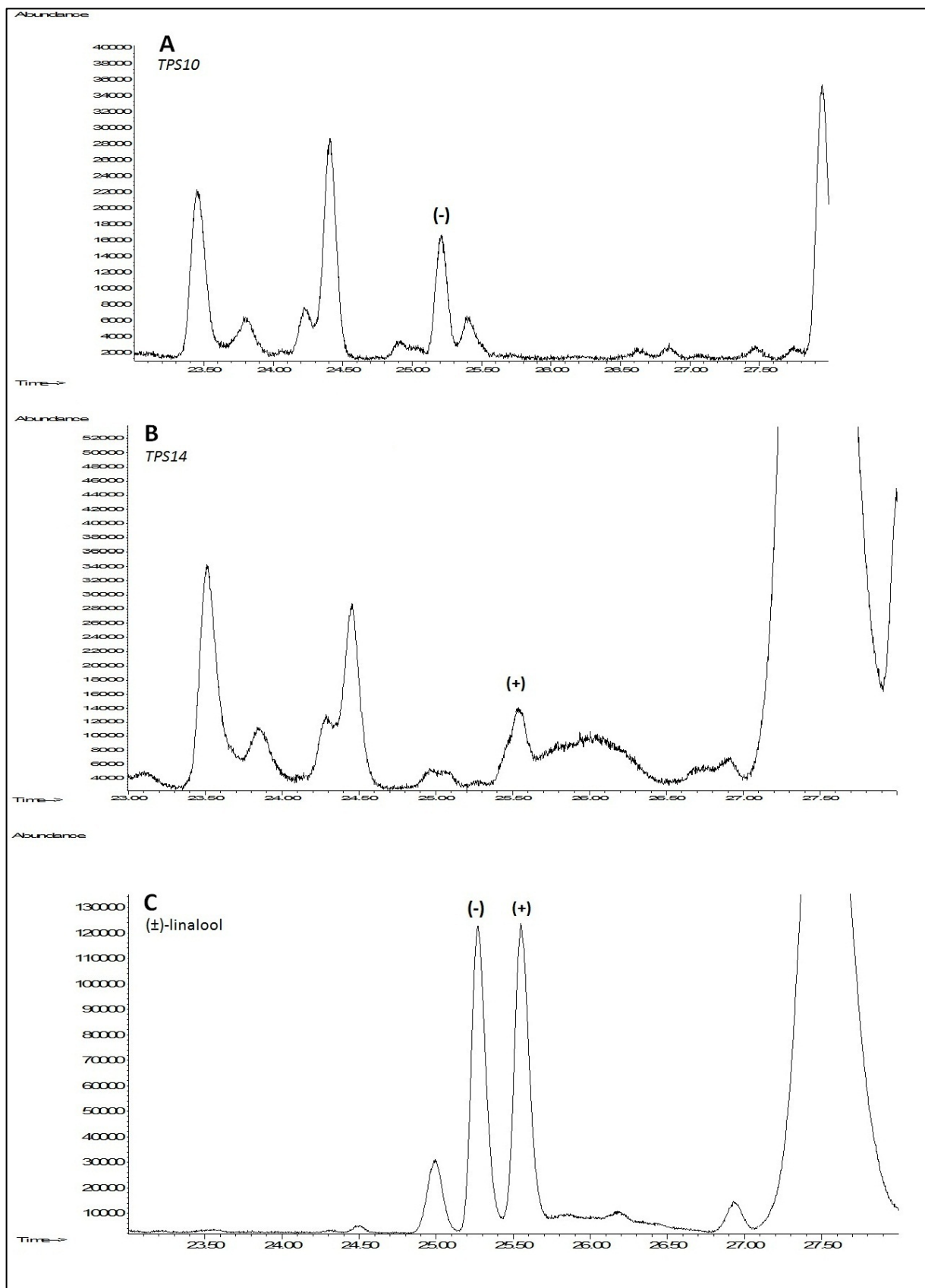
Empty vector control (black), *TPS10* or *TPS14* (blue), *CYP76C3* (orange) and *CYP71B31* (green).

\* The volatile emission was collected in 4 hours in volatile trapping system.

For the determination of the enantiomeric linalool produced by the TPSs, *TPS10* and *TPS14* were expressed in *N. benthamiana* as described above. However, the trapped products were extracted with pentane:ether (4:1), concentrated and injected in GC-MS (b).

The results are consistent with those found in yeast (Figure 09). The protein encoded by *TPS10* and *TPS14* produced the isomer R-(-)-linalool and S-(+)-linalool respectively (Figure 11). Tholl et al. (2007) also indicated that the enzyme *TPS14* catalyze the formation of monoterpene S-(+)-linalool (Figure 12).

Figure 12 Chirality of linalool produced by *Nicotiana benthamiana* detached leaves transiently expressing *TPS10* and *TPS14*. A. *TPS10*, B. *TPS14*, D. S/R-(+/-)-linalool (standard).



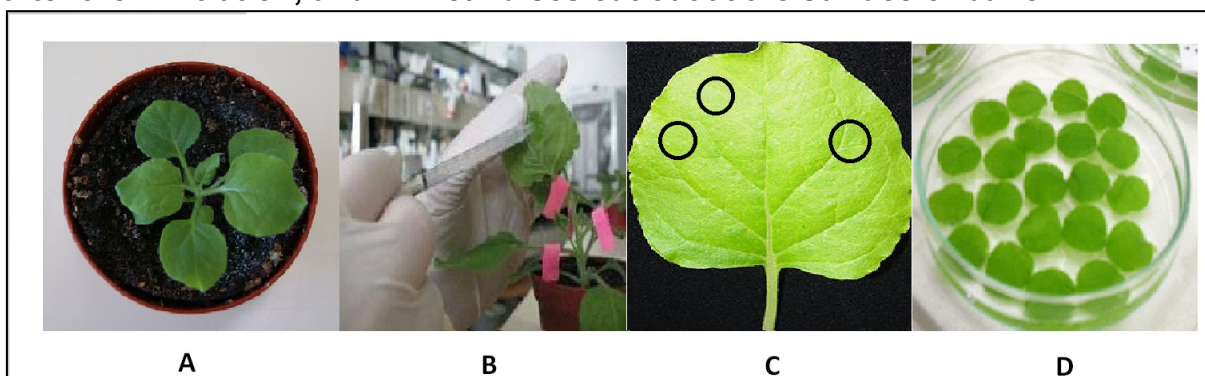
Source: Author, 2012.

The product was separated on a  $\beta$ -cyclodextrin column.

#### 5.2.4 Incubation with *Nicotiana benthamiana* leaf discs

*CYP73C3* and *CYP71B31* were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves as described above, and 5 days after infiltration leaf discs were cut out and placed at the surface of a buffer containing 200  $\mu$ M linalool (Figure 13). Assays were carried out to test the substrate specificity of the enzymes with S/R-(+/-)-linalool, geraniol, nerol, myrcene and ocimene as substrate.

**Figure 13 A - *Nicotiana Benthamiana* young, B – leaf infiltration, C – leaf 5 days after the infiltration, and D – leaf discs cut out at the surface of buffer.**

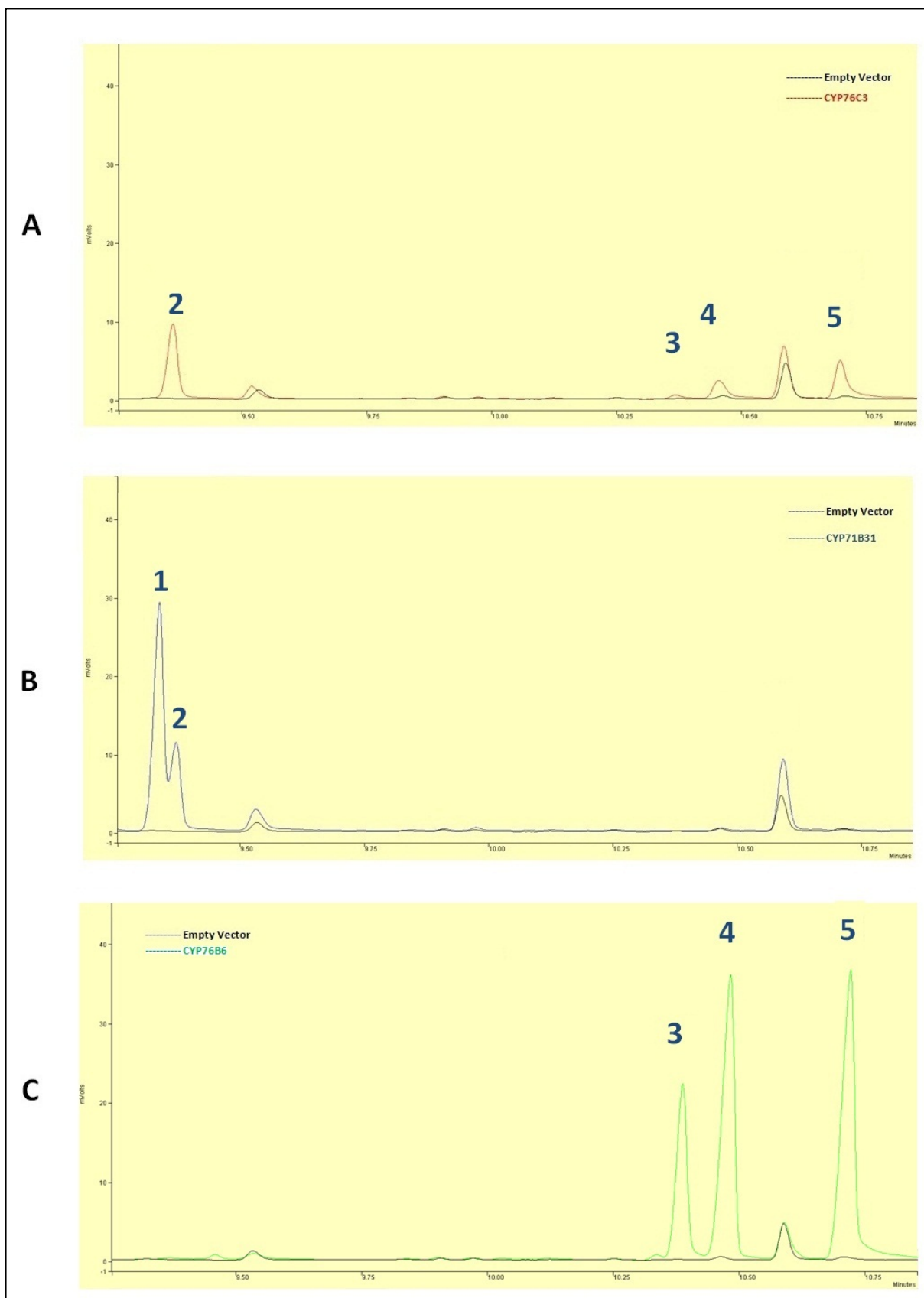


Source: Author, 2012.

After 4 hours of incubation, the buffer was extracted with an apolar solvent mixture (pentane and ethyl acetate, 85:15, v/v) and injected in GC-FID/GC-MS. The discs were ground and extracted with methanol and injected in UPLC-MS/MS.

The analysis of the buffer extract in GC-FID/GC-MS showed a significant decrease of the linalool that was either converted or absorbed into the leaf discs. No conversion was observed with geraniol, nerol, myrcene or ocimene as substrates. The chromatograms revealed the presence of neo-formed compounds in the assays performed with linalool. To *CYP76C3* using the linalool as substrate were found the molecules: compound 2 and 3 (no identification), *E*-8-oxo-linalool (4) and *E*-8-hydroxy linalool (5). *CYP71B31*, also using linalool, were found 1,2 epoxy-linalool (1) (in larger amount) and compound 2 (no identification). The results were compared with *CYP76B6* of *Catharanthus roseus* as positive control and empty vector as negative control (Figure 14). The *CYP76B6* was used by having good performance in producing volatiles, to be accepted and used in literature as positive control.

Figure 14 Identification of the products formed by CYP76C3, CYP71B31 and CYP76B6.



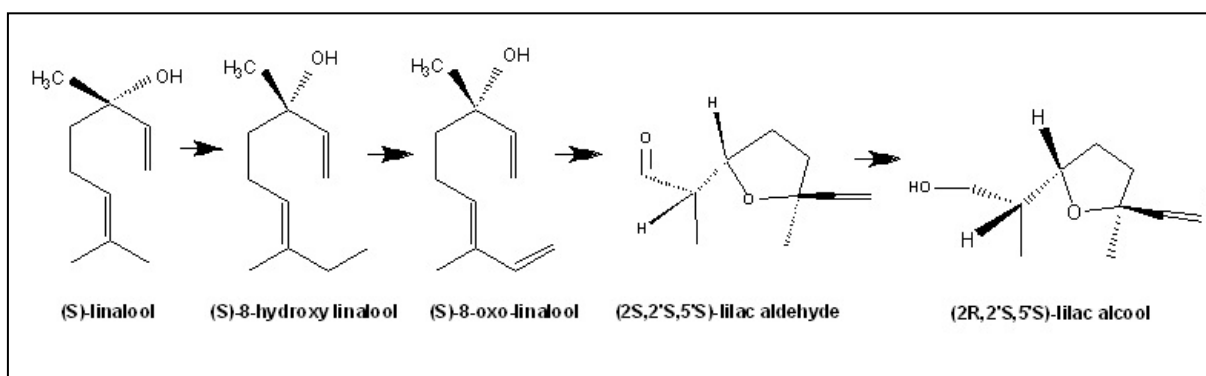
Source: Author, 2012.

Gas chromatographic separation of the monoterpenes extracted from the incubation buffer of discs of *N. benthamiana* leaves transiently expressing 76C3 (A - in red), 71B31 (B - in blue) and CYP76B6 (C - in green). The compounds 1 is 1,2 epoxy-linalool, 2 and 3 were not identified, 4 is 8-(*E*)-oxo-linalool and 5 is 8-(*E*)-hydroxy-linalool.

In transgenic *Arabidopsis* plants the overexpression of the strawberry FaNES1 gene (*Fragaria Ananassa Nerolidol Synthase I*) encoding a dual S-(+)-linalool and nerolidol synthase resulted in the production of substantial levels of free, hydroxylated, and glycosylated linalool derivatives (*i.e.*, linalool, nerolidol, *E*-8-hydroxy linalool and *E*-8-hydroxy-6,7-dihydrolinalool) because of endogenous P450 hydroxylase and glycosyl transferase activities (AHARONI et al., 2003).

Lücker et al. (2001) in studies of transgenic plants expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene *Lis* demonstrated that the linalool formed is metabolized further to either glycosylated or hydroxylated forms. Studies of biogenesis have shown that lilac aldehydes are formed from linalool by direct hydroxylation of linalool at C8 to (*E*)-8-hydroxylinalool and further to (*E*)-8-oxolinalool, that is converted to lilac alcohols that undergo oxidation to lilac aldehydes (BURKHARDT and MOSANDL, 2003; KRECK et al., 2003; WÜST and MOSANDL, 1999). Enantioselective GC–MS analysis of lilac aldehydes, alcohols and alcohol epoxides, from *Actinidia arguta* petals incubated with *rac*-linalool revealed that the endogenous lilac aldehydes and alcohols were derived exclusively from S-(+)-linalool, whilst the lilac alcohol epoxide was 28% derived from (R)-linalool (MATICH et al., 2011).

**Figure 15 (S)-linalool and its derivatives.**



Source: Author, 2012.

The UPLC-MS/MS analysis of the methanol extracts of *N. benthamiana* leaf discs incubated in S-(+)-linalool showed that the P450s convert linalool to lilac alcohol (data not shown).



### 5.3 Mutant lines analysis

Mutants of *Arabidopsis thaliana* were simultaneously generated and analyzed with the aim to replace the enzymes in the relevant metabolic pathway(s), and to point to their physiological roles *in vivo*.

For each gene, two independent insertion mutant lines were screened to obtain homozygous knock-out lines, except for *TPS14* for which only one line was obtained. Over-expression lines were also generated by stable agrotransformation with constructs of the 4 candidate coding sequences under the control of the CaMV-35S promoter.

For the *KO* lines, the insertion mutant lines were from the Salk collection. The seeds obtained from the NASC are usually of second generation after plant transformation. The seeds of these plants were grown and ten individuals were genotyped again to confirm that the line was homozygous.

The mutant lines were separated in *KO* mutant lines (*KO TPS10*, *KO CYP76C3* and *KO CYP71B31*) and over-expression (*OX*) lines (*OX TPS10*, *OX TPS14*, *OX CYP76C3* and *OX CYP71B31*). Information on the gene function in the plant can be inferred by the disappearance or decrease of the product(s) of the enzyme and an increase in its precursors in *KO* lines, and opposite behaviour in the over-expression lines.

#### 5.3.1 The volatile emission of plants and flowers

The volatiles were collected on Tenax cartridges using the volatile collection system for ~24 hours. The cartridges were then analysed in thermo-desorption equipped TD/GC-MS.

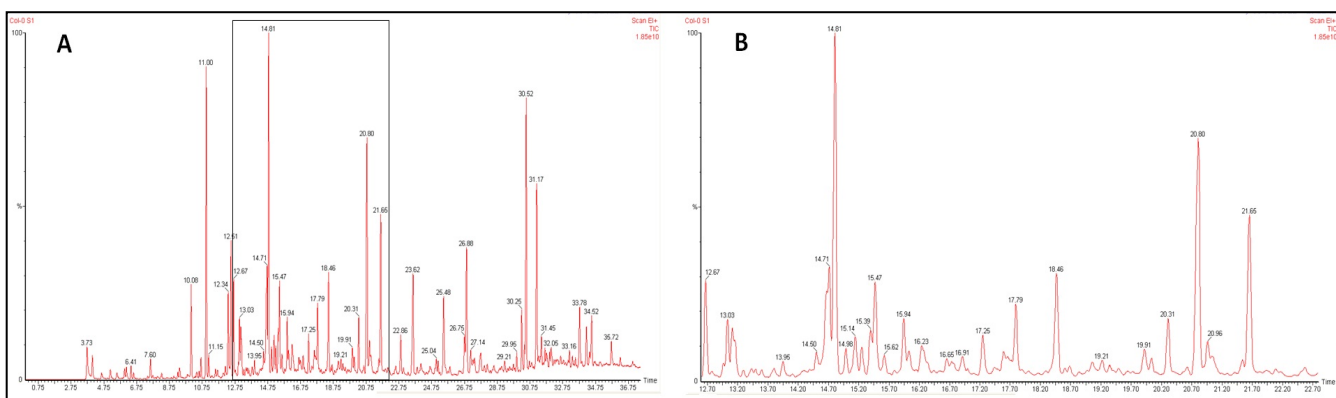
As the 35S promoter offers an ubiquitous expression in the plant, the *TPS*s over-expression lines were tested for linalool emission from the leaves. Three young plants of each construct were placed in the volatile collection system, the emitted volatiles were collected for 24 hours on Tenax cartridges and thermo-desorbed on the GC module. However, no linalool was detected. It is possible that most of the produced linalool was conjugated in the leaves as it has already been previously described. Analysis of petunia (*Petunia hybrida*) plants transformed with a linalool

synthase revealed that all of the synthesized S-(-)-linalool was converted into its corresponding non-volatile glycosylated conjugate (LÜCKER et al., 2001).

Analysis of the volatile emission as well as the flower content of the mutant lines showed little differences with the wild type. First, linalool was not absent from the TPSs KO lines, most likely because of the redundant function of the two enzymes. A double mutant line, created by artificial cross polination, will be available soon and should allow addressing this question. Second, linalool was only very slightly accumulated in the P450 KO lines. This can also be explained by potential redundant function among P450s of the CYP71B and CYP76C3 subfamilies. Several of them being as well expressed in the flowers. Finally and more surprisingly, no neo-formed linalool derivative was detected in the volatile emission and flower content of the over-expression lines.

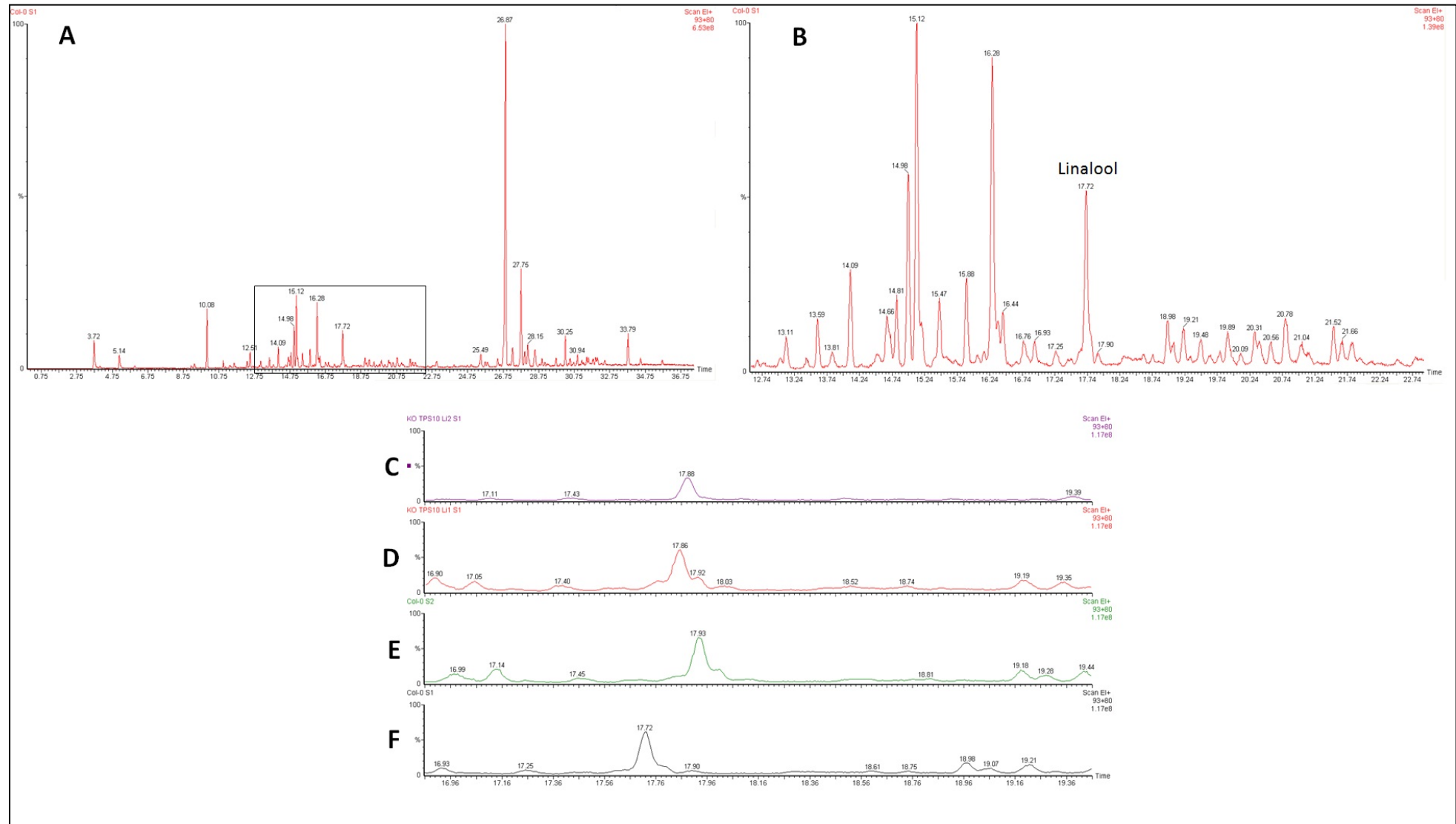
Certain species, including members of the Pinaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Lamiaceae, and Asteraceae, possess specialized anatomical structures for terpenoids biosynthesis and accumulation (e.g., resin ducts, glandular trichomes and secretory cavities), however most plants species, including *Arabidopsis*, do not develop compartments for the terpenoid formation and storage (BOHLMANN et al., 2000). Thus, produced terpenoid secondary metabolites accumulate in only small quantities.

**Figure 16 Chromatogram of the emitted volatiles of wild-type (A ). Extension for viewing the region where can be found linalool (B).**



Source: Author, 2012.

Figure 17. GC-M chromatogram of emitted volatile. The volatile emission of the same developmental stages of *Arabidopsis* flowers wild-type control plant (A, B, C and D) and *KOTPS10* mutant line (E and D).



Source: Author, 2012.

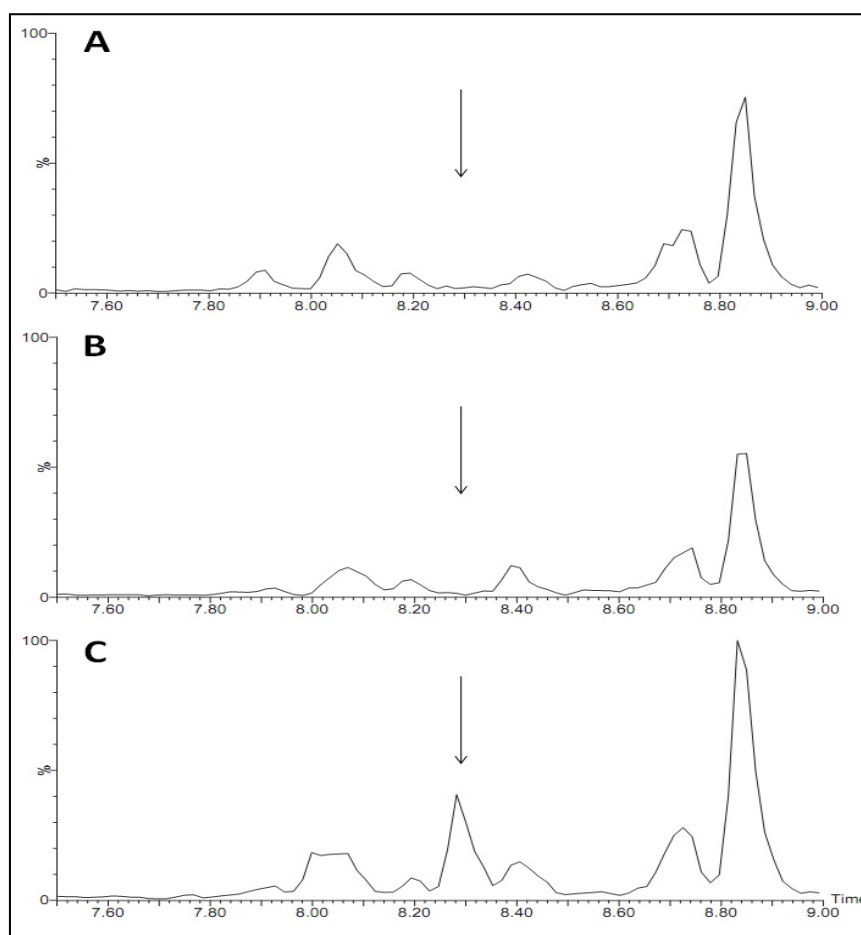
Monoterpene linalool peaks identified by its mass spectrum and retention time (RT=17,72).

*Arabidopsis* flowers (KO lines and Wild-Type) were extracted fresh and analyzed in UPLC-MS/MS operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode looking for the signature of 7 compounds: linalool, 8-hydroxy linalool, 8-oxolinalool, linalool-8-carboxylic acid, 1,2 epoxy-linalool, lilac alcohol and lilac alcohol epoxyde.

The small differences were found in results of these analyses, when the same compound was missing in KO CYP76C3 (both lines - **A**) and KO TPS10 (both lines - **B**) and was found in the Wild-Type (**C**) samples (Figure 18). It has the same MRM signature as linalool, but at a different retention time. This compound was not identified. So, may be that this compound is a bound form of linalool.

This analyze mode have strong specificity, and therefore high levels of sensitivity. Liquid Chromatography coupled with tandem quadruple mass spectrometry (LC/MS/MS) and operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode is often the analytical method of choice for the determination and quantification of drugs metabolites, pesticides and hormones with great precision (WEI et al., 2010).

**Figure 18 UPLC-MS/MS chromatogram operated in multiple reaction monitoring (MRM). A. CYP76C3, B. KOTPS10 and C. Wild-Type.**



Source: Author, 2012.

## 6 CONCLUSIONS

- All four candidate genes have a very similar expression pattern in the stamens and more specifically in the upper part of the filaments.
- TPS10 and TPS14 are localized in 5-20 spots on the surface of the chloroplasts, and CYP76C3 and CYP71B31 have a classical P450 localization at the surface of the endoplasmic reticulum.
- Heterologous expression of the two candidate P450s in yeast microsomes turned out to be unsuccessful. This may be associated with their instability during the preparation of microsomal fractions.
- Maybe the protein (TPS10 long/short) has problem of folding, and the product of heterologous expression in yeast was different to TPS10 (long) and TPS (short).
- TPS10 and TPS14 produced the R-(-)-linalool and S-(+)-linalool enantiomer, respectively, when transiently expressed in *N. benthamiana* leaves.
- CYP76C3 converts linalool into *E*-8-hydroxy-linalool and *E*-8-oxo-linalool and another unknown molecule.
- CYP71B31 converts linalool into 1,2-epoxy-linalool, and the same unknown molecule as CYP76C3.
- The analysis of methanol extracts of *N. benthamiana* leaf discs incubated in S-(+)-linalool showed the use of this substrate by P450s converting to lilac alcohol.
- Only minor differences were detected in the emitted volatile and flower content profiles of the mutant lines, compared to wild type. In the second analyze with MRM mode was found a compound with the same signature that linalool, but different retention time. This compound may be a linalool bound form.

## REFERENCES

- AHARONI, A., et al. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* Plants. **The Plant Cell Online**, v. 15, n. 12, p. 2866-2884, 2003.
- AHARONI, A., et al. Volatile science? metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends Plant Sci**, v. 10, n. 12, p. 594-602, 2005.
- AHARONI, A., et al. Metabolic Engineering of Terpenoid Biosynthesis in Plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 1, p. 49-58, 2006.
- AHARONI, A., et al. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. **Plant Cell**, n. 16, p. 3110-3131, 2004.
- ASHOUR, M., et al. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. M. Wink. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. v. 40, p. 258-303, 2010.
- AUBOURG, S., et al. Structure, organization and putative function of the genes identified within a 23.9-kb fragment from *Arabidopsis thaliana* chromosome IV. **Gene**, v. 199, n. 1-2, 241-253, 1997.
- AUBOURG, S. A., et al. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, n. 6, p. 730-745, 2002.
- BAK, S., et al. Cytochromes P450. **The Arabidopsis Book**, v. 9, 2011.
- BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **J Biotechnol**, v. 124, n. 1, p. 128-145, 2006.
- BERTEA, C. M., et al. Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: Cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. **Arch Biochem Biophys**, n. 390, p. 279-286, 2001.
- BEVAN, M., et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 391, n. 6666, p. 485-488, 1998.
- BOHLMANN, J., KEELING C. I. Terpenoid biomaterials. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 656-669, 2008.
- BOHLMANN, J., et al. Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/(E)- $\beta$ -ocimene synthase. **Arch Biochem Biophys**, v. 375, n. 2, p. 261-269, 2000.
- BOHLMANN, J., et al. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 8, p. 4126-4133, 1998.

BOUVIER, F., et al. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 44, n. 6, p. 357-429, 2005.

BOUWMEESTER, H. J., et al. Cytochrome P450 dependent (+)-limonene-6-hydroxylation in fruits of caraway (*Carum carvi*). **Phytochemistry**, v. 50, p. 243-248, 1999.

BURKHARDT, D., MOSANDL, A. Biogenetic studies in *Syringa vulgaris* L.: Bioconversion of <sup>18</sup>O(2H)-Labeled Precursors into lilac aldehydes and lilac alcohols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7391-7395, (2003).

CABELLO-HURTADO, F., et al. Cloning and functional expression in yeast of a cDNA coding for an obtusifolios 14  $\alpha$ -demethylase (CYP51) in wheat. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 230, p. 381-385, 1997.

CHAU, M., CROTEAU, R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 $\alpha$ -hydroxylase involved in taxol biosynthesis. **Arch Biochem Biophys** v. 427, p. 48-57, 2004.

CHAU, M., et al. Taxol biosynthesis: molecular cloning and of a cytochrome p450 characterization taxoid 7 $\beta$ -hydroxylase. **Chem Biol** v. 11, p. 663-672, 2004.

CHEN, F., et al. Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. **Plant Physiol**, v. 135, n. 4, p. 1956-1966, 2004.

CHEN, F., et al. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from Arabidopsis flowers. **Plant Cell**, v. 15, n. 2, p. 481-494, 2003.

CHOE, S., et al. The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22  $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Cell**, v.10, p. 231-243, 1998.

COLLU, G., et al. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. **FEBS Lett**, v. 508, p. 215-220, 2001.

DAVIS, E. M., CROTEAU, R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. **Top Curr Chem**, v. 209, p. 53-95, 2000.

DE KRAKER, J. W., et al. Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene A hydroxylase and NADP(+)-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. **Plant Physiol**, n. 125, p. 1930-1940, 2001.

DENISOV, I. G., SLIGAR, S. G. A novel type of allosteric regulation: functional cooperativity in monomeric proteins. **Arch Biochem Biophys**, v. 519, n. 2, p. 91-102, 2012.

- DUBEY, V. S., et al. An esterase is involved in geraniol production during palmarosa inflorescence development. **Phytochemistry**, v. 63, n. 3, 257-264, 2003.
- DUDAREVA, N., et al. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers." **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 3, p. 933-938, 2005.
- EHLTING, J., et al. An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biol**, n. 8, p. 47, 2008.
- EL TAMER, M. K., et al. The influence of monoterpene synthase transformation on the odour of tobacco. **J Biotechnol**, v. 106, n. 1, p. 15-21, 2003.
- ESTEVEZ, J. M., et al. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 25, p. 22901-22909, 2001.
- FALKENHAGEN, H., STÖCKIGT, J. Enzymatic biosynthesis of vomilenine, a key intermediate of the ajmaline pathway, catalyzed by a novel cytochrome-P450-dependent enzyme from plant-cell cultures of *Rauwolfia-serpentina*. **Z Naturforsch (C)** v. 50, p. 45-53, 1995.
- FIELD, B., OSBOURN, A. E. Metabolic diversification – Independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. **Science**, v. 320, p. 543-547, 2008.
- FLOSS, H. G., MOCEK, U. Biosynthesis of taxol. *In*: Suffness M (ed) **Taxol – Science and applications**, USA: CRC Press, Boca Raton, p. 191-208, 1995.
- FUNK, C., CROTEAU, R. Induction and characterization of a cytochrome-P-450-dependent camphor hydroxylase in tissue-cultures of common Sage (*Salvia-officinalis*). **Plant Physiol**, v. 101, p. 1231-1237, 1993.
- GAO, J. J., et al. Phytoremediation and phytosensing of chemical contaminant, toluene: identification of the required target genes. **Molecular Biology Reports**, 2012.
- GIERL, A. The cytochrome P450 superfamily of monooxygenases **Mayze Handbook: Genetics and genomics**. J. L. a. H. Bennetzen, Sara. New York: Springer Science + Business Media LLC. v.2, 781 p., 2009.
- GINGLINGER, J. F. **Functional analysis of cytochromes P450 involved in the biosynthesis of monoterpenoids in Arabidopsis thaliana**. 2010. Thesis. (Ph.D in Molecular Biology) - Université de Strasbourg, Strasbourg, 2010.
- GROVES, J. Models and mechanisms of cytochrome P450 action. *In*: Ortiz de Montellano, P. R. **Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry**. New York: Kluwer Academic - Plenum Publishers, p. 1-43, 2005.



GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001.

HALLAHAN, D., et al. Cytochrome P450 catalysed monoterpenoid oxidation in catmint (*Nepeta racemosa*) and avocado (*Persea americana*); evidence for related enzymes with different activities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1201, n. 1, p. 94-100, 1994.

HALLAHAN, L. D. N., et al. Interactions of Avocado (*Persea americana*) Cytochrome P450 with monoterpenoids. **Plant physiology**, v. 98, p. 1290-1297, 1992.

HARRIS, D. L., LOEW G. H. Theoretical investigation of the proton assisted pathway to formation of cytochrome P450 compound I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 35, p. 8941-8948, 1998.

HEFNER, J., et al. Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-diene to taxa-4(20),11(12)-dien-5  $\alpha$ -ol: The first oxygenation step in taxol biosynthesis. **Chem Biol**, v.3, p. 479-489, 1996.

HELDT, H. W., PIECHULLA, F. **Plant Biochemistry**, London, UK: Academic Press-Elsevier, 2011.

HELLIWELL, C. A., et al. *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. **Plant Physiol**, v. 119, p. 507-510, 1999.

HEMMERLIN, A., et al. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells." **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, 26666-26676, 2003.

HERDE, M., et al. Identification and regulation of *TPS04/GES*, an *Arabidopsis* geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C16-homoterpene TMTT. **Plant Cell**, v. 20, n. 4, p. 1152-1168, 2008.

HOFFMANN, M. H., et al. Flower visitors in a natural population of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, v. 5, n. 5, p. 491-494, 2003.

HOLOPAINEN, J. K., GERSHENZON, J. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs." **Trends Plant Sci**, v. 15, n. 3, 176-184, 2010.

HUANG, M., et al. Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, *TPS02* and *TPS03*. **Plant Physiol**. v. 153, n. 3, p. 1293-1310, 2010.

JENNEWEIN, S., et al. Cytochrome P450 taxadiene 5 $\alpha$ -hydroxylase, a mechanistically unusual mono-oxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis". **Chem Biol**, v. 11, p. 379-387, 2004.

JENNEWEIN, S., et al. Taxoid metabolism: Taxoid 14  $\beta$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. **Arch Biochem Biophys**, v. 413, p. 462-470, 2003.

JENNEWEIN, S., et al. Taxol biosynthesis: taxane 13  $\alpha$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 13595-13600, 2001.

KARP, F., CROTEAU, R. Hydroxylation of (-)- $\beta$ -pinene and (-)- $\alpha$ -pinene by a cytochrome P450 system from hyssop (*Hyssopus officinalis*). In: Petroski RJ, McCormick, SP (Eds). **Secondary metabolite biosynthesis and metabolism**, New York: Plenum Press, p 253-260, 1992.

KAHN, R. A., et al. Isolation and reconstitution of the heme-thiolate protein obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase from *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **J Biol Chem**, v. 271, p. 32944-32950, 1996.

KARP, F., et al. Monoterpene biosynthesis – specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha-piperita*), spearmint (*Mentha-spicata*) and perilla (*Perilla-frutescens*) leaves. **Arch Biochem Biophys**, v. 276, p. 219-226, 1990.

KARP, F., et al. Metabolism of monoterpenes – demonstration of the hydroxylation of (+)-sabinene to (+)-*cis*-sabinol by an enzyme preparation from Sage (*Salvia officinalis*) leaves. **Arch Biochem Biophys**, v. 256, p. 179-193, 1987.

KIM, J. E., et al. Over-expression of Arabidopsis thaliana carotenoid hydroxylases individually and in combination with a  $\beta$ -carotene ketolase provides insight into in vivo functions. **Phytochemistry**, v. 71, n. 2-3, p. 168-178, 2010.

KIM, J., DELLAPENNA, D. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: The role of *Arabidopsis* carotenoid  $\beta$ -ring hydroxylase CYP97A3. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, p. 3474-3479, 2006.

KIM, K. K., et al. Hydroxylation of *ent*-kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni – Purification and partial characterization of the enzyme. **Arch Biochem Biophys**, v. 332, p. 223-230, 1996.

KIM, T. W., et al. *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis“. **Plant Cell**, v. 17, p. 2397-2412, 2005.

KIRBY, J., KEASLING, J. D. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: perspectives for microbial engineering. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 335-355, 2009.

KLIEBENSTEIN, D. J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinged glasses. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, p. 675-684, 2004.

- KRECK, M., et al. Biogenetic Studies in *Syringa vulgaris* L.: synthesis and bioconversion of deuterium-labeled precursors into lilac aldehydes and lilac alcohols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 463-469, 2003.
- KREUZWIESER, J., et al. Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. **Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 149-159, 1999.
- LANGE, B. M., et al. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 24, p. 13172-13177, 2000.
- LAULE, O., et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 11, p. 6866-6871, 2003.
- LI, Z., et al. Molecular cloning and expression analysis of a cytochrome P450 gene in tomato. **Plant Growth Regulation**, v. 61, n. 3, p. 297-304, 2010.
- LORETO, F., SCHNITZLER, J. P. Abiotic stresses and induced BVOCs. **Trends Plant Sci**, v. 15, n. 3, 154-166, 2010.
- LÜCKER, J., et al. Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. **The Plant Journal**, v. 27, n. 4, p. 315-324, 2001.
- LÜCKER, J., et al. Increased and Altered Fragrance of Tobacco Plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from Lemon. **Plant Physiol**, v. 134, n. 1, p. 510-519, 2004.
- LUO, P., et al. Molecular cloning and functional identification of (+)- $\delta$ -cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. **Plant J**, v. 28, p. 95-104, 2001.
- LUPIEN, S., et al. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase. **Arch Biochem Biophys**, v. 368, p. 181-192, 1999.
- MA, H. K., et al. Fine mapping and in silico isolation of the EUI1 gene controlling upper internode elongation in rice. **Plant Mol Biol**, v. 60, p. 87-94, 2006.
- MADYASTHA, K. M., et al. Characterization of a cytochrome-P-450-dependent monoterpene hydroxylase from higher plant *Vinca-Rosea*. **Biochemistry**, v. 15, p. 1097-1102, 1976.
- MAKRIS, T. M., et al. Activation of Molecular Oxygen by Cytochrome P450. *In*: Ortiz de Montellano, P. R. **Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry**. New York: Kluwer Academic - Plenum Publishers: v. 572, 2005.

- MATICH, A. J., et al. Biosynthesis and enantioselectivity in the production of the lilac compounds in *Actinidia arguta* flowers. **Phytochemistry**, v. 72, n. 7, 579-586, 2011.
- MAU, C. J. D., CROTEAU, R. Cytochrome P450 oxygenases of monoterpene metabolism. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 373-383, 2006.
- MAUGHAN, J. A., et al. Expression of CYP71B7, a cytochrome P450 expressed sequence tag from *Arabidopsis thaliana*. **Arch Biochem Biophys**, v. 341, n. 1, p. 104-111, 1997.
- MEUNIER, B., et al. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. **Chem Rev**, v. 104, n. 9, p. 3947-3980, 2004.
- MORIKAWA, T., et al. Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in *Arabidopsis* and tomato. **Plant Cell**, v. 18, p. 1008-1022, 2006.
- MUGFORD, S. T., et al. A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in rats." **The Plant Cell Online**, v. 21, n. 8, p. 2473-2484, 2009.
- NAFISI, M., S. et al. *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase CYP71A13 catalyzes the conversion of Indole-3-Acetaldoxime in camalexin synthesis." **The Plant Cell Online**, v. 19, n. 6, p. 2039-2052, 2007.
- NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Lett**, v. 584, n. 14, p. 2965-2973, 2010.
- NGUYEN, D. T., et al. Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in Asteraceae. **J Biol Chem**, v. 285, p. 16588-16598, 2010.
- NELSON, D., WERCK-REICHHART, D. A P450-centric view of plant evolution. **Plant J**, v. 66, n. 1, p. 194-211, 2011.
- NELSON, D. R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450." **Biochim Biophys Acta**, v. 1814, n. 1, p. 14-18, 2011.
- NUGROHO, L. H. V., R. Secondary metabolism in tobacco. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 68, p. 105-125, 2002.
- NOMURA, T., et al. The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. **J Biol Chem**, v. 280, p. 17873-17879, 2005.
- OHNISHI, T., et al. Tomato cytochrome P450 CYP734A7 functions in brassinosteroid catabolism. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1895-1906, 2006a.
- OHNISHI, T., et al. C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Cell**, v.18, p.3275–3288, 2006b.

OHNISHI, T., et al. CYP724B2 and CYP90B3 function in the early C-22 hydroxylation steps of brassinosteroid biosynthetic pathway in tomato. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 70, p. 2071-2080, 2006c.

OKADA, K. The biosynthesis of isoprenoids and the mechanisms regulating it in plants." **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 75, n.7, p. 1219-1225, 2011.

OKSMAN-CALDENTEY, K. M., et al. **Transgenic plants for animal health: edible vaccine against Piglet ETEC Diarrhoea**, Plant-Based Vaccines & Antibodies Plant Expression Systems for Recombinant Pharmacologics, 2007.

OMURA, T., SATO, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. **J Biol Chem**, v. 239, p. 2370-2378, 1964.

ORTIZ de MONTELLANO, P. R. Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 2, p. 932-948, 2010.

PAQUETTE, S. M., et al. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. **DNA Cell Biol**, v. 19, n. 5, p. 307-317, 2000.

POMPON, D., et al. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. **Methods in Enzymology**, v. 272, p. 51-64, 1996.

QI, X., et al. A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, p. 18848-18853, 2006.

RAGUSO, R. A., PICHERSKY, E. New perspectives in pollination biology: floral fragrances. A day in the life of a linalool molecule: chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. **Plant Species Biology**, v. 14, n. 2, p. 95-120.

RALSTON, L., et al. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-*epi*-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Arch Biochem Biophys**, v. 393, p. 222-235, 2001.

RICO, J., et al. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme A reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n. 19, p. 6449-6454, 2010.

RO, D. K., et al. Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase PtAO (CYP720B1) is a multifunctional, multi substrate cytochrome P450 monooxygenase. **Proc Natl Acad Sci**, v.102, p. 8060-8065, 2005.

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

- RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M., BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiol**, v. 130, n. 3, p. 1079-1089, 2002.
- ROHLOFF, J., BONES, A. M. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* - putative olfactory compounds in plant communication. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1941-1955, 2005.
- ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Nat Prod Rep**, v. 16, n.5, p. 565-574, 1999.
- ROHMER, M. Methylerythritol phosphate pathway. **Comprehensive Natural Products II - Chemistry and Biology**, v.1, p. 517-555, 2010.
- SAKAMOTO, T., et al. Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. **Nat Biotechnol**, v. 24, p. 105-109, 2006.
- SCHMIDT, D., STÖCKIGT, J. Enzymatic formation of the sarpagan-bridge – a key step in the biosynthesis of sarpagine-type and ajmaline-type alkaloids. **Planta Med**, v. 61, p. 254-258, 1995.
- SCHNITZLER, J. P., et al. Poplar volatiles - biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. **Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 302-316, 2010.
- SCHOENDORF, A., et al. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 $\beta$ -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 1501-1506, 2001.
- SCHRODER, G., et al. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. **FEBS Lett**, v. 458, p. 97-102, 1999.
- SEKI, H., et al. Licorice  $\beta$ -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener gly-cyrrhizin. **Proc Natl Acad Sci**, v.105, p. 14204-14209, 2008.
- STEELE, C. L., et al. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) - Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2078-2089, 1998.
- ST-PIERRE, B., DE LUCA, V. A cytochrome-P450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharantus roseus*. **Plant Physiol**, v. 109, p. 131-139, 1995.

SWAMINATHAN, S., et al. CYP76M7 Is an *ent*-cassadiene C11  $\alpha$ -hydroxylase defining a second multifunctional diterpenoid biosynthetic gene cluster in rice. **Plant Cell**, v. 21, p. 3315-3325, 2009.

TAKAHASHI, S., et al. Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. **J Biol Chem**, v. 282, p. 31744-31754, 2007.

THOLL, D., et al. Chapter one *Arabidopsis thaliana*, a model system for investigating volatile terpene biosynthesis, regulation, and function. **Recent Advances in Phytochemistry**, T. R. John, Elsevier, v. 38, p. 1-18, 2004.

THOLL, D., et al. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. **The Plant Journal**, v. 42, n. 5, p. 757-771, 2005.

THOLL, D., LEE, S. Elucidating the metabolism of plant terpene volatiles: alternative tools for engineering plant defenses? **The Biological Activity of Phytochemicals**. New York: D. R. Gang, Springer, v. 41, p.159-178, 2011.

THOLL, D., LEE, S. Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Arabidopsis Book**, v. 9, n. 0143, 2011.

THOLL, D. C., et. al. Identifying substrates and products of enzymes of plant volatile biosynthesis with the help of metabolic profiling. **Concepts in Plant Metabolomics**, B. J. W. Nikolau, E. S., Springer: v. 157, 2007.

TIAN, L., et al. The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid  $\epsilon$ -ring hydroxylation activity. **Proc Natl Acad Sci**, v.101, p. 402-407, 2004.

TRAPP, S. C., CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001.

TURK, E. M., et al. CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: An intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. **Plant Physiol**, v. 133, p. 1643-1653, 2003.

TURK, E. M., et al. BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. **Plant J**, v. 42, p. 23-34, 2005.

URBAN, P. M., C.; et. al. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 31, p. 19176-19186, 1997.

- VAN POECKE, R. M. P., et al. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene expression analysis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 10, p. 1911-1928, 2001.
- VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 253-262, 2000.
- VETTER, H. P., et al. Molecular analysis and heterologous expression of an inducible cytochrome-P450 protein from Peri-winkle (*Catharantus roseus* L.). **Plant Physiol**, v. 100, p. 998-1007, 1992.
- VOINNET, O., et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **The Plant Journal**, v. 33, n. 5, p. 949-956, 2003.
- WANG, E. M., et al. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. **Nat Biotechnol**, v. 19, p. 371-374, 2001.
- WEI, R., et al. High-throughput and multiplexed LC/MS/MRM method for targeted metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 13, p. 5527-5533, 2010.
- WERCK-REICHHART, D., FEYEREISEN, R. Cytochromes P450: a success story. **Genome Biol**, REVIEWS 3003, v. 1, n. 6, 2000.
- WHEELER, A. L., et al. Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5  $\alpha$ -ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 390, p. 265-278, 2001.
- WÜST, M. M., A. Important chiral monoterpenoid ethers in flavours and essential oils - enantioselective analysis and biogenesis. **European Food Research and Technology**, v. 209, n. 1, p. 3-11, 1999.
- YU, F., et al. *Zingiber zerumbet* CYP71BA1 catalyzes the conversion of  $\alpha$ -humulene to 8-hydroxy- $\alpha$ -humulene in zerumbone biosynthesis. **Cell Mol Life Sci online**, 2010.
- ZHU, Y. Y., et al. Elongated upper most inter node encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. **Plant Cell**, v. 18, p. 442-456, 2006.



## APPENDIX

### A Buffers and media composition

#### A1 Buffers

a) PBS (Phosphate buffer), pH 6-8, 50-500mM

A 0.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  solution was poured into a 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solution until desired pH was obtained. The 0.5 M PBS buffer was diluted to obtain desired strength.

b) Phosphate-citrate buffer, pH 7, 500mM

A 0.5M citric acid solution was poured into a 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solution until pH 7 was obtained.

c) TrisHCl buffer, pH 7-8.5-1M

A 12N HCl solution was poured into a 1 M tris solution until desired pH was obtained. The 1 M TrisHCl buffer was diluted to obtain desired strength.

d) NE buffer

Tris HCl buffer 5 mM pH 8.5

#### A2 Media

For solid medium, 13 g/L agar was added.

##### A2.1 *Bacteria and agrobacteria*

a) LB medium (for 1 L):

Tryptone 10 g

Yeast extract 5 g

NaCl 10 g

Water qsp 1L

b) SOC medium (for 1 L):

Yeast extract 5 g

Tryptone 20 g

NaCl 5.8 g

Dextrose 3.6 g

KCl 1.9 g

MgSO<sub>4</sub> 2.5 g

MgCl<sub>2</sub> 2 g

Water qsp 1L

c) YEB medium (for 1 L):

Beef extract 5 g

Yeast extract 1 g

Peptone 5 g

Sucrose 5 g

MgSO<sub>4</sub> 1 M 2 mL

Water qsp 1 L

pH adjusted to 7.2

### **A3 Yeast**

a) SD minimum medium (for 1L):

Yeast nitrogen base

without amino acids 6.7 g

Dextrose 20 g

Water qsp 1 L

b) SGI selective medium (for 1L):

Casamino acids 1 g

Yeast nitrogen base 7 g

Tryptophane 20 mg

Dextrose 20 g

Water qsp 1 L

c) YPD complete buffered medium (for 1 L):

Yeast extract 10 g  
Peptone 20 g  
Dextrose 20 g  
Phosphate citrate buffer 100 mL  
Water qsp 1 L

d) YPI complete buffered medium (for 1 L):

Yeast extract 10 g  
Peptone 20 g  
Galactose 20 g  
Phosphate citrate buffer 100 mL  
Water qsp 1 L

e) YPDE complete medium (for 1 L):

Yeast extract 10 g  
Peptone 10 g  
Dextrose 5 g  
Ethanol 50 mL  
Water qsp 1 L

## B List of employed primers.

<b>A. subcloning</b>		Forward	Reverse
<i>Topo or</i>	TPS10	GAGCTAGAATGGCCACTCTCTGCAA	GTAAGTCAATCTAAAGGAATCGGATTG
<i>pGEMT</i>	TPS14	GAGACTAGTATGGCCTAATAGCTACCAAATAAG	ATACTCGAGTTACATTAGAGACTTGAGATATTCG
	CYP76C3	GATGGATCCATGGACCTCTCACTAATTCAAGG	GTAAGTCAATCTAAAGGAATCGGATTG
	CYP71B31	GATGGATCCATGTCTATGTTCTAGGTTTGCTC	GTAAGTCAATCTAAAGGAATCGGATTG
	Prom. TPS10	GATAAGCTTGTCTCGTGTGATTTGATGATAC	GATAAGCTTATTGAATAAATGATTATTATGCTATACGTAAC
	Prom. TPS14	GATGGATCCACCATTTCGATTAATTTAAG	GATGGATCCGATGATGAACCTAAGTTTTGTTTTG
	Prom. CYP76C3	-	-
	Prom. CYP71B31	GATAAGCTTCAATGATATGGACGATGACAG	GATGGATCCAATTATTGTTTTTTTTTTGTTGCTAAC
<b>B. Classical cloning</b>			
<b>Yeast expr.</b>			
<i>pESC-LEU</i>	TPS10	ATAGCGGCCGCATGCAGCGTCTGTTCTGCG	GTATTAATTAATCAATCTAAAGGAATCGGATTG
	TPS14	ATAGCGGCCGCATGATCGATGTCATTCAAAGT	ATATTAATTAATTACATTAGAGACTTGAGATATTCG
	CYP76C3	GATGGATCCATGGACCTCTCACTAATTCAAGG	GTAAGTCAATCTAAAGGAATCGGATTG
	CYP71B31	GATGGATCCATGTCTATGTTCTAGGTTTGCTC	GTAAGTCAATCTAAAGGAATCGGATTG
<b>C. USER cloning</b>			
<b>1. Cloning 1 fragment</b>			
<b>Yeast expr.</b>			
<i>pYePD60 U</i>	TPS10	GGCTTAAUATGCAGCGTCTGTTCTGCG	GGTTTAAUTCAATCTAAAGGAATCGGATTG
	TPS14	GGCTTAAUATGATCGATGTCATTCAAAGT	GGTTTAAUTTACATTAGAGACTTGAGATATTCG
	CYP76C3	GGCTTAAUATGGACCTCTCACTAATTCAAGG	GGTTTAAUTTAATAAGGAAGCGATATTGTAGGTTTC
	CYP71B31	GGCTTAAUATGTCTATGTTCTAGGTTTGCTC	GGTTTAAUTTATGGAAGAGTTGGTACGAGC
	<i>N. bentha. expr.</i>		
<i>pCAMBIA3300 U</i>	TPS10	GGCTTAAUATGGCCACTCTCTGCAA	GGTTTAAUTCAATCTAAAGGAATCGGATTG
	TPS14	GGCTTAAUATGGCCTAATAGCTACC	GGTTTAAUTTACATTAGAGACTTGAGATATTCG
	CYP76C3	GGCTTAAUATGGACCTCTCACTAATTCAAGG	GGTTTAAUTTAATAAGGAAGCGATATTGTAGGTTTC
	CYP71B31	GGCTTAAUATGTCTATGTTCTAGGTTTGCTC	GGTTTAAUTTATGGAAGAGTTGGTACGAGC
	<b>Prom-GUS fusion</b>		
<i>pBI101 U</i>	Prom. TPS10	GGCTTAAUGTCTCGTGTGATTTGATGATAC	GGTTTAAUATTGAATAAATGATTATTATGCTATACGTAAC
	Prom. TPS14	GGCTTAAUCACCATTTCGATTAATTTAAG	GGTTTAAUGATGATGAACCTAAGTTTTGTTTTG
	Prom. CYP76C3	-	-
	Prom. CYP71B31	GGCTTAAUCAATGATATGGACGATGACAG	GGTTTAAUGCAAACCTAGGAATATAGATATAATTATTG
<b>2. Cloning 2 fragments</b>			
<b>Prot.-GFP fusion</b>			
<i>pCAMBIA2300 U</i>	TPS10	GGCTTAAUATGGCCACTCTCTGCAA	ATGTGGCGACCGGUACCCTAAAGGAATCGGATTG
	TPS14	GGCTTAAUATGGCCTAATAGCTACC	ATGTGGCGACCGGUACCCTAAAGGAATCGGATTG
	CYP76C3	GGCTTAAUATGGACCTCTCACTAATTCAAGG	ATGTGGCGACCGGUACCCTAAAGGAATCGGATTG
	CYP71B31	GGCTTAAUATGTCTATGTTCTAGGTTTGCTC	ATGTGGCGACCGGUACCCTAAAGGAATCGGATTG
	eGFP	ACCGGTCGCCACAUGGTGAGCAAGGGCGAGG	GGTTTAAUTTAGGCCATGATATAGACGTTGTGG
<b>D. RT-qPCR primers</b>			
<b>couples 1</b>			
	TPS10	TGTTACATGAGTAAACTGGAGCAT	CATCCACAAGTCATTGATCATCT
	TPS14	GCCTCCAATTCACGGTGAT	GTGACCCCTTGTCTCAGCAATC
	CYP76C3	CGATGTTCAAGATTATGGGTTTCC	CGTCTATCGCCCATACGTT
	CYP71B31	TCCAAGAACGCCCATGTA	CAGGGTTAGTCCAACGTTTAGGA
<b>couples 2</b>			
	TPS10	ATCGTACAAGCTATTCATCAAGAGGAACT	ACCTAAACCTGTCTCCATCCACC
	TPS14	GTCATTGACTCAAGGAGAAATGTCTCAAAC	GCTTCTTGCCCTTCCACATCTTT
	CYP76C3	CCCTTGCTCGTTGGAGGT	ATTGAATAGCATTAAGTTTTGCGGTGA
	CYP71B31	CTTACGATCATCTCATAGCAATGATGTCGG	ATTGTTACTGTTCCAGCGTTACTCCC

