

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP

UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

**Identificação e Análise de Genes Reguladores da Biossíntese de
Fenilpropanóides em *Myracrodruon urundeuva***

Patricia Garnica Roberto

RIBEIRÃO PRETO – SP

2020

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP

UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

**Identificação e Análise de Genes Reguladores da Biossíntese de
Fenilpropanóides em *Myracrodruon urundeuva***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Suzelei de Castro França

Doutoranda: Patricia Garnica Roberto

RIBEIRÃO PRETO – SP

2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

R642i Roberto, Patrícia Garnica, 1976-
Identificação e análise de genes reguladores da biossíntese de
fenilpropanóides em *Myracrodruon urundeuva* / Patrícia Garnica
Roberto. – Ribeirão Preto, 2020.
108 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzelei de Castro França.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. Fenilpropanóides. 2. Flavonoides. 3. Biossíntese.
4. *Myracrodruon urundeuva*. I. Título.

CDD 660

PATRICIA GARNICA ROBERTO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO COORDENADA DE GENES REGULADORES DA
BIOSSÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES EM *MYRACRODRUON URUNDEUVA*.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.


Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

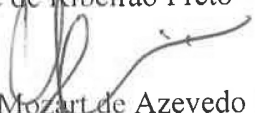
Data da defesa: 28 de setembro de 2020

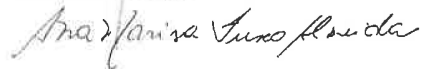
Resultado: Aprovada

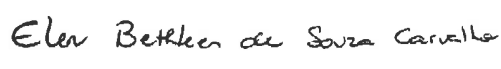
BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Suzelei de Castro França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
Universidade Estadual Paulista - UNESP


Profa. Dra. Elen Bethleen de Souza Carvalho
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

*Dedico este trabalho à minha família, minha filha Maria
Isabel e ao meu esposo Daniel que me deram
amor, carinho e forças para esta conquista*

Tudo vence um coração que não se deixa vencer.

(Padre Antônio Vieira, missionário português – 1608-1697)

AGRADECIMENTOS

- *A Profa. Dra. Suzelei de Castro França, pela orientação, apoio contínuo e amizade que tanto me incentivou não só no decorrer desta tese mas em toda a minha vida profissional, e pelo respeito e confiança em mim depositados*
- *A todos os meus familiares pelo incentivo para minha realização profissional e pessoal.*
- *Aos professores que fazem ou já fizeram parte da Unidade de Biotecnologia da UNAERP: Miriam V. Lourenço, Bianca W. Bertoni, Mozart Marins, Paulo Sergio Pereira, Ana Maria Soares Pereira, Sonia M. Zingaretti, Elen Rizzi Sanches, Adriana Aparecida Lopes, Rene de O. Belebony, Ana Lúcia F. Saltoratto, Silvia H. T. Contini.*
- *À Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) pelo apoio e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.*
- *Aos amigos do laboratório de Biotecnologia: Carla K. Antonietto, Juliana da Silva Coppede, Simone Torres, Sarazete I. V. Pereira, Letícia, Rosane.*
- *As minha amigas da Vigilância Sanitária de Pontal, Jêniffer A. F. de Castro, Érika C. R. Gallão e Laine Sicchieri.*

- *E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.*

Este trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), com apoio da mesma.

SUMÁRIO

RESUMO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	A planta	3
2.1.2	Composição química e propriedades farmacológicas	6
2.1.3	Produção de metabólitos secundários em plantas	12
2.1.4	Prospecção de genes e a expressão de genes de interesse biotecnológico	18
2.1.5	RACE (Amplificação Rápida de Extremidades de cDNA)	22
2.1.6	Biologia sintética	25
2.2	Justificativa	28
2.3	Hipótese do trabalho	29
3	OBJETIVOS	30
4	MÉTODOS	31
4.1	Seleção de fontes de genes alvos	32
4.2	Obtenção do RNA total e purificação de mRNAs	32
4.3	Construção da biblioteca de cDNA de folhas de <i>M. urundeuva</i>	32
4.4	Análise das colônias transformantes e sequenciamento randômico dos clones da biblioteca de cDNA de <i>M. urundeuva</i>	33
4.5	Análise e determinação da identidade dos transcritos sequenciados	34
4.6	Prospecção de genes chaves da via biossintética de flavonoides	34
4.7	Amplificação de genes utilizando a metodologia de SMARTer RACE	39
4.7.1	Síntese da primeira fita de cDNA do RACE	39

4.7.2	Construção do gene sintético de Flavonol Sintase	40
4.8	Expressão do gene de Flavonol Sintase em plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
4.8.1	Construção do cassete de expressão	43
4.8.2	Cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	47
4.8.3	Preparo de células eletrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	47
4.8.4	Transformação genética de <i>A. tumefaciens</i>	48
4.8.5	Preparo da suspensão da <i>A. tumefaciens</i>	48
4.8.6	Infecção das plântulas de <i>Nicotiana tabacum</i>	49
4.8.7	Análise Química das plantas infectadas	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Cosntrução de biblioteca de cDNA de <i>M. urundeuva</i> e rastreamento de cDNAs	51
5.2	Busca de genes com sondas específicas para as enzimas da via de biossíntese de flavonoides	53
5.3	Análise de similaridade com os genes depositados no GenBank	57
5.3.1	Chalcona isomerase	59
5.3.2	Flavanona 3'5' hidroxilase	60
5.3.3	Flavonol sintase	60
5.3.4	Flavonol 3'sulfotransferase	61
5.3.5	Laccase	62
5.3.6	Aquaporin	63
5.3.7	Thioredoxin	63
5.3.8	Lipooxigenase	64
5.3.9	Isopreno sintase	64
5.4	Obtenção de ESTs inteiros por meio da técnica de RACE	65
5.5	Expressão do gene de flavonol sintase em plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	72
6	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	81
7	REFERENCIAS	91
	ANEXO 01	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	4
Figura 2	Representação estrutural da fração enriquecida de chalcona	9
Figura 3	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	13
Figura 4	Núcleo fundamental dos flavonoides	15
Figura 5A	Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas	16
Figura 5B	Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas	17
Figura 6	Fluxograma do procedimento do SMARTer RACE 5'/3' kit	24
Figura 7	Representação esquemática da estratégia metodológica adotada no trabalho	31
Figura 8A	Representação esquemática da estratégia metodológica adotada na construção do gene sintético de Flavonol Sintase de <i>Myracrodruon urundeuva</i> .	41
Figura 8A	Representação esquemática da estratégia metodológica adotada na Expressão do gene de Flavonol Sintase em plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	42
Figura 9	Mapa do vetor pRT104 (TOPFER et al., 1987)	45
Figura 10	Mapa do vetor pCAMBIA2301 (SnapGene®)	46
Figura 11	Extração do RNA de folhas de <i>M. urundeuva</i> . Amostra 1, extração a partir de 50 mg de folhas e amostra 2 partindo de 100 mg de folha	51

Figura 12	Classificação dos ESTs obtidos da biblioteca de <i>M. urundeuva</i>	52
Figura 13	Representação da quantidade de ESTs relacionados ao metabolismo secundário de plantas	53
Figura 14A	Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas	55
Figura 14B	Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas	56
Figura 15	Amplificações da primeira fita do RACE com sondas específicas para Flavonol Sintase	66
Figura 16A	Sequencia fasta de nucleotídeos e aminoácidos de Flavonol Sintase de <i>M. urundeuva</i>	67
Figura 16B	Representação do alinhamento das sequencias parciais referentes ao gene parcial de Flavonol Sintase, homologia do contig de Flavonol Sintase com outras sequencias de Flavonol Sintase depositadas no banco de dados do NCBI, alinhamento do contig com a sequência de maior homologia no NCBI	68
Figura 17	Alinhamento múltiplo no programa ClustalX da sequência parcial de Flavonol Síntese de <i>M. urundeuva</i> (CONTIG 2) e da sequência completa de Flavonol Sintase de <i>Canarium. album</i> (KY213691.1)	70
Figura 18	Sequência completa sintética de nucleotídeos de Flavonol Sintase de folha de <i>Myracrodruon urundeuva</i> . (AROFLS-SINTETICA)	71
Figura 19	Sequência completa sintética de nucleotídeos de Flavonol Sintase de folha de <i>Myracrodruon urundeuva</i> com os sítios de restrição das enzimas SacI/Bam HI	72
Figura 20	Gel de agarose a 1,2%. A – Amplificação da banda de	73

	400 pb de flavonol sintase a partir dos plasmídeos (pUC57+FLS) obtidos	
Figura 21	Gel de agarose a 0,8 % da digestão dos plasmídeos pUC57+FLS com as enzimas de restrição Sac I e Bam HI.	74
Figura 22A	Gel de agarose a 0,8 % da extração dos plasmídeos pRT104+FLS	75
Figura 22B	Gel de agarose a 1,2 % dos produtos de PCR das colônias dos transformante de pRT104+FLS	75
Figura 23	Gel de agarose a 0,8 % da digestão do plasmídeo pRT104+FLS com enzimas de restrição SacI e BamHI e com a enzima de restrição HindIII	76
Figura 24	Sequência de DNA representativa do cassete de expressão pRT104+FLS	77
Figura 25	Gel de agarose a 1,2 % dos produtos de PCR das colônias dos transformante de pRT104+FLS.	78
Figura 26A	Gel de agarose a 0,8 % da extração de DNA dos plasmídeos pCAMBIA2301 + FLS	79
Figura 26B	Gel de agarose a 0,8 % da digestão do plasmídeo pCAMBIA2301 + FLS com as enzimas de restrição SacI e BamHI e com a enzima de restrição HindIII.	79
Figura 27A	Plantas de tabaco cultivadas <i>in vitro</i> : plantas controle	80
Figura 27B	Plantas de tabaco cultivadas <i>in vitro</i> : plantas infectadas com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes do metabolismo secundário presentes em plantas da família Anacardiaceae.	5
Tabela 2	Derivados flavônicos encontrados em <i>M. urundeuva</i>	11
Tabela 3	Sondas relacionadas a biossíntese de flavonoides utilizadas nas ampliações do cDNA de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	36
Tabela 4	Sequências de <i>M. urundeuva</i> depositadas no GenBank	58

RESUMO

Myracrodruon urundeuva Fr. All Alemão, conhecida popularmente como aroeira-do-sertão, é uma árvore da família Anacardiaceae representada por árvores e arbustos. Os extratos desta planta apresentam atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante no tratamento de ferimentos, gastrites, úlceras gástricas, cervicites, vaginites e hemorroidas. Tais atividades têm sido correlacionadas à presença de compostos bioativos de classes químicas específicas, biossintetizados nesta planta, tais como taninos, flavonóides e alcaloides. A produção destes compostos ocorre por meio de rotas metabólicas reguladas por várias enzimas que atuam de forma coordenada catalisando diferentes ramificações metabólicas e assim direcionando o fluxo biossintético para a produção de metabolitos distintos acumulados em órgãos específicos da planta. Existe pouco conhecimento a respeito do conjunto de mRNAs expressos em *M. urundeuva* relacionados ao metabolismo secundário e a rota de biossíntese de flavonóides. A elucidação dos genes que codificam enzimas chaves que regulam as rotas metabólicas e a manipulação genética destas vias de biossíntese é de extrema importância para estabelecer um processo biotecnológico de produção dos mesmos de uma maneira eficiente por meio da manipulação genética. A partir de uma biblioteca de cDNA de folhas de aroeira-do-sertão, um total de 1025 ESTs (marcador de sequência genética) foram clonados, sequenciados e analisados quanto à similaridade com sequências de genes depositadas na biblioteca não-redundante do National Center of Biotechnology Investigation– NCBI,

resultando na identificação de enzimas chaves relacionadas a rota de biossíntese de compostos bioativos. Baseado no fato de que as rotas de biossíntese de compostos em plantas são conhecidas e que *M. urundeuva* apresentou ativa a via metabólica para produção de flavonoides, foi realizada uma busca por genes relacionados a enzimas chaves para a biossíntese de flavonoides por meio de sondas específicas. Os experimentos demonstraram a expressão dos genes relacionados as enzimas chaves como a Flavonol 3' Sulfotransferase, Chalcona Isomerase, Flavonoide 3' 5' Hidroxilase e Flavonol Sintase. A funcionalidade de um dos genes encontrados, Flavonol Sintase, responsável por catalisar a reação de biossíntese do importante composto bioativo quercetina, foi confirmada pela clonagem em cassete de expressão, utilizando os vetores pRT104 e pCAMBIA 2301, e experimentos de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando tabaco como planta modelo.

Palavras-chave: fenilpropanoides, flavonoide, biossíntese, genes, *Myracrodruon urundeuva*.

ABSTRACT

Myracrodruon urundeuva Fr. Allemão, popularly known as Aroeira-do-Sertão, is a tree in the Anacardiaceae family represented by trees and shrubs. The extracts of this plant have antimicrobial, anti-inflammatory and healing activities in the treatment of wounds, gastritis, gastric ulcers, cervicitis, vaginitis and hemorrhoids. Such activities have been correlated to the presence of bioactive compounds of specific classes, biosynthesized in this plant, such as tannins, flavonoids and alkaloids. The production of these occurs through metabolic routes regulated by various enzymes that act in a coordinated pathway catalyzing different metabolic ramifications and thus directing the biosynthetic flow for the production of different metabolites accumulated in specific organs of the plant. There is little knowledge about the set of mRNAs expressed in *M. urundeuva* related to secondary metabolism and the flavonoid biosynthesis pathway. The elucidation of the genes that encode key enzymes that regulate metabolic pathways and a genetic manipulation of these biosynthesis pathways is extremely important to establish a biotechnological process for producing them in an efficient manner through genetic manipulation. From a library of cDNA from Aroeira-do-Sertão leaves, a total of 1025 ESTs (genetic sequence marker) were cloned, sequenced and identified for similarity with gene sequences deposited in the non-redundant library of the National Center for Biotechnology Information - NCBI, for the identification of key enzymes related to the bioactive compounds biosynthesis pathway. Based on the fact

that the biosynthesis routes of compounds in plants are marked and that *M. urundeuva* is shown to activate the metabolic pathway for the production of flavonoids, a search for genes related to key enzymes for the biosynthesis of flavonoids was performed using specific primers. The experiments demonstrated an expression of the related genes as key enzymes such as Flavonol 3-O-Sulfotransferase, Chalcone Isomerase, Flavonoid 3-O-Hydroxylase and Flavonol Synthase. The functionality of one of the found genes, Flavonol Synthase, responsible for catalyzing the biosynthesis reaction of the important bioactive compound quercetin, was confirmed by cloning into an expression cassette, using the vectors pRT104 and pCAMBIA 2301, and genetic transformation experiments via *Agrobacterium tumefaciens* tobacco as a model plant.

Keywords: phenylpropanoids, flavonoids, biosynthesis, genes, *Myracrodruon urundeuva*.

***Nunca é tarde para tentar o desconhecido,
nunca é tarde para ir mais além.***

(Gabriele D'Annunzio, poeta italiano – 1863-1938)

I. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais e alimentícias contendo componentes bioativos estão recebendo crescente interesse em razão de sua funcionalidade na prevenção e tratamento de doenças (BRUNING et al., 2012).

Uma via importante na biossíntese de substâncias com grande valor farmacológico é a via de fenilpropanoides cuja regulação se dá por meio de enzimas-chaves, como as chalconas sintases, que estão comprometidas na produção destes metabólitos. Convém ressaltar que a grande maioria dos genes de fenilpropanoides já caracterizados foram isolados de monocotiledôneas sendo necessários estudos com dicotiledôneas (VERVERIDES et al., 2007).

A *Myracrodruon urundeuva* Allemão conhecida popularmente como aroeira-do-sertão é uma planta da Família Anacardiaceae representada por árvores e arbustos distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. A entrecasca de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. é usada popularmente sob a forma de extrato aquoso ou alcoólico como anti-inflamatório para várias afecções como as ginecológicas, orais, entre outras (MATTOS, 1999)..

Existe pouco conhecimento acumulado a respeito do conjunto de mRNAs expressos em plantas relacionados as enzimas-chave do metabolismo secundário para a produção de compostos farmacologicamente ativos. As rotas metabólicas para a produção dos diferentes compostos ativos compreendem uma variedade de enzimas-chave que atuam de maneira coordenada para a síntese destes metabólitos. As principais vias metabólicas são a Via dos Fenilpropanoides e a Via do Acetato.

Baseado no fato que a aroeira do sertão possui importantes atividades farmacológicas e que estas atividades estão relacionadas a compostos biossintetizados pela via de síntese de fenilpropanoides é importante estabelecer um perfil de genes expressos de enzimas - chave do metabolismo secundário de *Myracrodruon urundeuva* a partir de um banco de ESTs (marcadores de sequencias expressas) visando uma possível elucidação da rota biossintética de produção dos compostos importantes como as chalconas diméricas, os flavonoides, dentre outros compostos bioativos encontrados nesta planta.

Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.

Eleanor Roosevelt

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A PLANTA

A *Myracrodruon urundeuva* Allemão, sinonímia *Astronium urundeuva* (Freire Allemão) Engler (Figura 01) é uma planta dicotiledônea, conhecida popularmente como aroeira-do-sertão. É uma árvore da Família Anacardiaceae. A família vegetal Anacardiaceae R. Br., constituída de cerca de 600 espécies, é representada por árvores e arbustos distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, de altura de seis a catorze metros no Cerrado e Caatinga, e até vinte a vinte e cinco metros em solos mais férteis da floresta latifoliada semidecídua, com tronco de cinquenta a oitenta centímetros de diâmetro. Diversas de suas espécies apresentam importantes usos terapêuticos. É encontrada no Brasil principalmente na vegetação da zona semi-árida do Nordeste, nas matas secas e subúmidas, e nas encostas de serra. Ocorre desde o Ceará até o estado do Paraná e Mato Grosso do Sul. É mais frequente no nordeste do país, oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. A madeira é muito pesada (densidade 1,19 g/cm³), de grande resistência mecânica e praticamente imputrescível. A madeira é excelente para obras externas, como postes, mourões, esteios, estacas, dormentes, vigas e armações de pontes, moendas de engenho, na construção civil, como caibros, vigas, tacos para assoalhos, ripas, para peças torneadas, etc. (MENEZES, 1986; MATOS, 1989; OLIVEIRA et al., 1989; VIANA et al., 1995). Esta árvore, pela beleza de sua copa aproximadamente piramidal e, por outras qualidades ornamentais, é indicada para arborização em geral.

Seu único inconveniente é a perda das folhas durante o inverno e o fato de provocar reações alérgicas a certas pessoas sensíveis que entrem em contato.

Figura 01 – Árvore de *Myracrodruon urundeuva* Allemão
(BANDEIRA, 2002).



A casca de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All apresenta-se em pedaços aproximadamente planos quando proveniente do tronco ou em pedaços recurvados quando provenientes de caules menos calibrosos. Sua superfície externa apresenta cor parda acinzentada escura com nuances amarronzada. Apresenta-se pouco rugosa sendo recoberta em alguns pontos por líquens foliáceos brancacentos ou ligeiramente esverdeados. A superfície interna é estriada longitudinalmente de coloração mais clara, amarelo amarronzada. Resina em forma de lágrimas pode ser observada tanto na superfície interna como na região floemática da secção transversal. (KATO & AKISUE, 2002).

Tem sido descritos genes de enzimas chaves relacionadas as vias de biossíntese do metabolismo secundário em plantas família Anacardiaceae (NCBI) (Tabela 01).

Tabela 01 - Genes do metabolismo secundário presentes em plantas da família Anacardiaceae

Plantas família Anacardiaceae	Genes identificados relacionados a enzimas chaves do metabolismo secundário de plantas
<i>Rhus chinensis</i>	Chalcona sintase Chalcona isomerase Fenilalanina Amônio Liase
<i>Mangifera indica</i>	Chalcona sintase Dihidroflavonol 4' Redutase Flavonona 3' Hidroxilase Fenilalanina Amônio Liase P Coumaroil Ester 3' Hidroxilase Cinnamato 4' Monooxygenase

2.1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

A composição química de *Myracrodruon urundeuva* apresenta constituintes voláteis e constituintes não voláteis. Em 1993, Bandeira realizou um estudo da constituição volátil das folhas e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, identificou dezesseis compostos sendo o principal constituinte o sesquiterpeno, trans-cariofileno (38,6%). Maia em 2002 analisando dos óleos essenciais das folhas de aroeira também identificou o monoterpeneo Δ^3 -careno como composto majoritário, com 78,1% e 56,3%, respectivamente (MAIA et al., 2002). Pouco se tem estudado sobre os constituintes não voláteis de aroeira-do-sertão. Bandeira em 2002, isolou e identificou chalconas diméricas: urundeuquina A (entrecasca e cerne da planta adulta; caule e órgão subterrâneos dos brotos), urundeuquina B (entrecasca e cerne da planta adulta; caule e órgão subterrâneos dos brotos), urundeuquina C (entrecasca da planta adulta). Nas folhas foram identificados flavonoides como quercetina, aromadendrinol e o biflavonoide agasthiflavona.

Estudos fitoquímicos recentes com extrato etanólico a 70 % das folhas e cascas de *M. urundeuva* demonstraram como principais constituintes químicos o ácido gálico, o galato de metila, o galato de etila, o ácido cromogênico e o ácido protocatecuico (SOUZA et al., 2012).

A análise fitoquímica do caule e da folha de *M. urundeuva* permitiu constatar que ambas possuem compostos semelhantes quanto à presença de flavonoides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides,

proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, além de açúcares. Derivados cinâmicos estiveram presentes apenas no caule (SILVA, et al., 2008). Pode-se acrescentar ainda a presença de óleos essenciais, saponinas e taninos (KATO & AKISUE, 2002).

A eficiência dos compostos fenólicos na atividade antioxidante depende da estrutura química dos compostos, varia de acordo com o número e posicionamento das hidroxilas ligadas ao anel aromático. A grande maioria dos trabalhos apresenta compostos fenólicos com atividades anti-inflamatória, antiproliferativa, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (JARDINI et al., 2010).

Em plantas geralmente são atribuídas atividades antioxidante e anti-inflamatória aos flavonoides (BRAVO, 1998; MIDDLETON et al., 2000).

No Brasil, na região Nordeste e principalmente no estado do Ceará, a entrecasca de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. é usada popularmente sob a forma de extrato aquoso ou alcoólico como anti-inflamatório para várias afecções como as ginecológicas, e também pode ser utilizada em hemorroidas, infecções respiratórias, urinárias e em distúrbios do sistema digestório (MATTOS, 1999).

Outro estudo que avaliou, *in vitro*, a atividade antioxidante dos extratos aquoso e metanólico, obtidos das cascas de três árvores nativas da Caatinga nordestina, constatou que dos extratos metanólicos testados, o da *M. urundeuva* apresentou significativa atividade antioxidante, sugerindo que este resultado possa corroborar a ação anti-inflamatória atribuída a esta espécie (DESMARCHELIER et al., 1999).

Frações contendo taninos isolados desta planta apresentaram propriedades anti-inflamatórias e antiúlceras em roedores devido ao efeito antioxidante (SOUZA, et al., 2007).

Em 2009, Sá et al. demonstraram atividade larvicida contra *Aedes aegypti* em *Myracrodruon urundeuva*. Também em 2008, foram isoladas desta planta frações enriquecidas em chalconas com ação neuroprotetora podendo ser um modelo terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas como Mal de Parkinson (NOBRE-JÚNIOR et al., 2009).

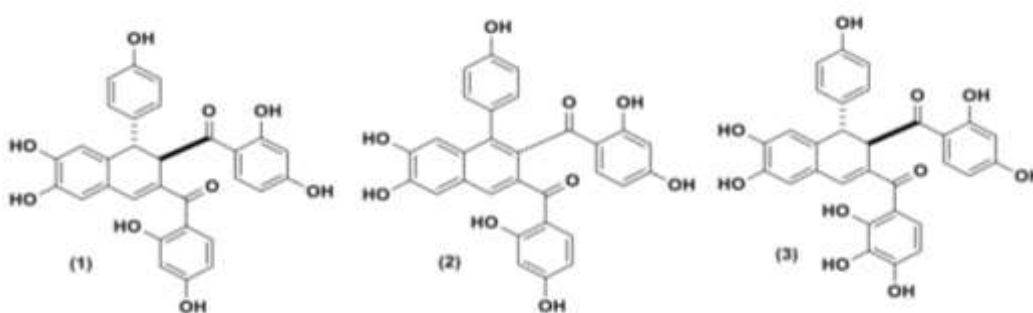
A partir do extrato acetato de etila obtido das cascas do tronco da *M. urundeuva*, foram isoladas três chalconas diméricas com efeitos analgésicos (central e periférico) e anti-inflamatórios (VIANA; BANDEIRA; MATOS, 2003). Na avaliação, *in vitro*, da ação imunomoduladora do extrato etanólico obtido da casca do tronco da *M. urundeuva*, constatou-se que a atividade anti-inflamatória estava associada à inibição da ciclooxigenase [COX] (DEHARO et al., 2004).

Dentre as várias chalconas diméricas isoladas de *M. urundeuva* podemos citar a 3,4 diclorochalcona com ação anti-inflamatória (CORREA et al., 2001), as chalconas derivadas de 2' hidróxi e 2' 5' dihidroxichalcona (HSIEH et al., 1998), dimetilamino chalcona e 3,4,5 trimetoxi-4'-fluorochalcona (ROJAS et al., 2002 e 2003) também com ações anti-inflamatórias.

Estudos relacionados ao fracionamento químico do extrato em acetato de etila de *M. urundeuva* demonstraram a presença de duas frações principais, uma fração enriquecida em compostos chalcônicos e outra com a

predominância de taninos catéquicos e pirogalícos (BANDEIRA et al., 1993). Na fração enriquecida de chalconas há o predomínio de três chalconas: urundevina A, urundevina B e urundevina C (Figura 02).

Figura 02 - Representação estrutural da fração enriquecida de chalcona: urundevina A (1), urundevina B (2), urundevina C (3). (BANDEIRA, 2002).



Características físicoquímicas das urundevinas.

Urundevina A: Fórmula molecular: $C_{30}H_{22}O_9$; PM:526 Da; Ponto de fusão: 183,7°-185,8°C; solubilidade: Acetato de etila, Acetona, Éter, Metanol.

Urundevina B: Fórmula molecular: $C_{30}H_{20}O_{10}$; PM:524 Da; Ponto de fusão: 185°-189°C; solubilidade: Acetato de etila, Acetona, Metanol.

Urundevina C: Fórmula molecular: $C_{30}H_{22}O_{10}$; PM:542 Da; Ponto de fusão: 220°-222°C; solubilidade: Acetato de etila, Acetona, Metanol.

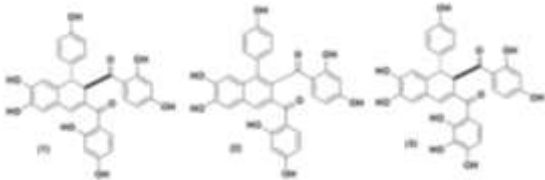
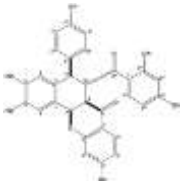
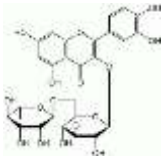
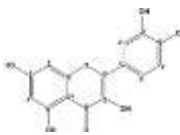
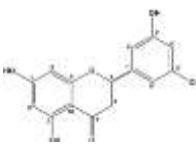
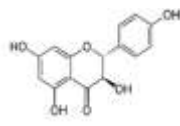
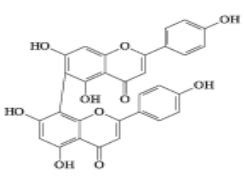
A presença de chalconas diméricas tem sido relatada em outras plantas que não pertencem a família *Anacardiaceae* como a *M urundeuva*. Em *Mallotus philippensis* a kamalachalcone que é uma chalcona dimérica apresenta ação antifúngica (KULKARNI et al., 2014). As chalconas diméricas de *Agapanthus africanus* são usadas para induzir o trabalho de parto (KAMARA; MANONG; BRANDT, 2005). Já em *Lophira alata* (ABDERAMANE et al., 2011) a chalcona dimérica bongosin, produzida por

esta planta, apresenta efeitos antissépticos. Em *Combretum yunnanensis* (DAWE et al., 2013) no extrato etanólico das folhas e do caule também foram isoladas chalconas diméricas com atividades anti-inflamatórias e antibacterianas e antifúngicas.

Em 2019, Aquino et al. descreveram o isolamento de 24 compostos de folhas de *M. urundeuva* que possuem um papel importante no efeito anti-inflamatório em humanos. Dentre os compostos isolados destacam-se flavonoides glicosilados, quercetina, galotaninos e alguns derivados fenólicos dos ácidos carboxílicos. Os compostos derivados flavônicos encontrados em *M. urundeuva* estão descritos na Tabela 02.

Tabela 02 - Derivados flavônicos encontrados em *M. urundeuva*

(AQUINO et al., 2019)

PARTES DA PLANTA	NOME DO FLAVONÓIDE
Casca/entrecasca	Chalconas diméricas – Urundeuvinas (A -N) 
Casca/entrecasca	Chalcona dimérica – Matosina 
Casca/entrecasca	Rutina 
Casca/entrecasca/folha	Quercetina 
Casca/entrecasca	5,7,3',5'-tetra-hidroxi-flavanona 
Folha	Aromadendrinol 
Folha	Biflavonóide Agasthiflavona 

2.1.3. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS

O metabolismo vegetal pode ser dividido em dois grupos: primário e secundário. O metabolismo primário corresponde às macromoléculas essenciais para as funções vitais como lipídeos e proteínas. Os produtos do metabolismo primário, através de diversas rotas biossintéticas originam o segundo grupo de compostos químicos que são os chamados metabólitos secundários. O metabolismo secundário é composto por micromoléculas com estrutura geralmente complexas, de baixo peso molecular, encontradas em baixas concentrações e com importantes atividades biológicas (MANN,1987; SIMÕES, 2000)

As rotas biossintéticas para a produção de metabólitos secundários são complexas e possuem elevado gasto de energia. Os metabólitos secundários estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao ambiente como defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, entre outros.

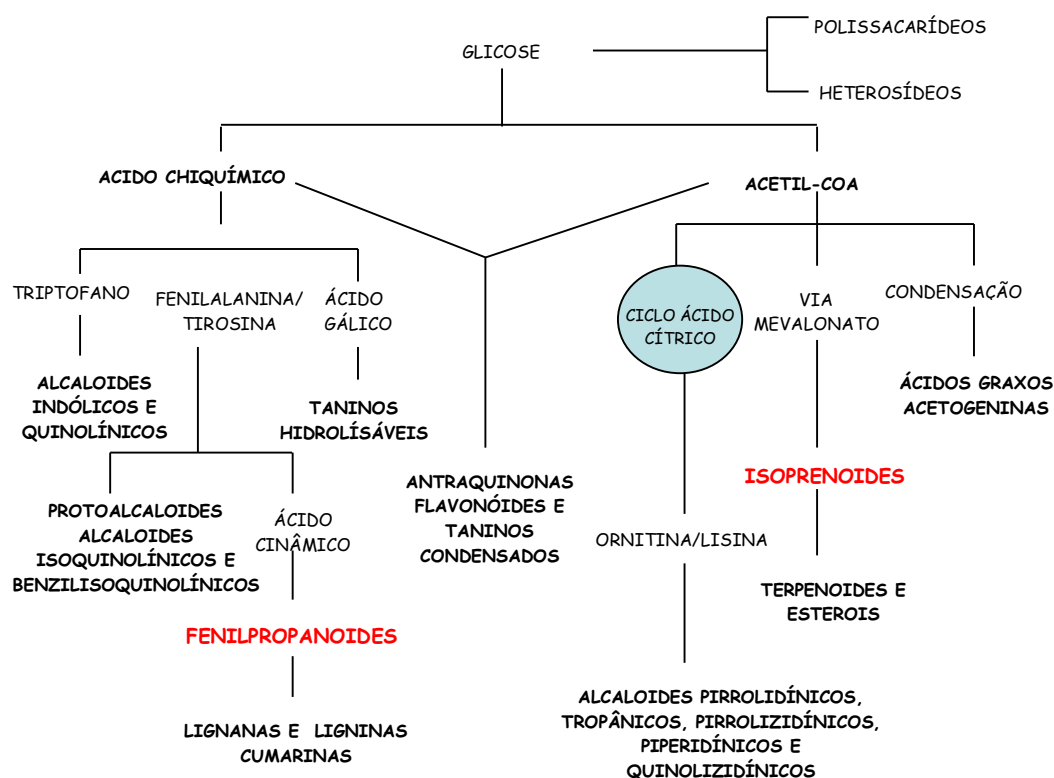
Em função da importância de vários metabólitos secundários principalmente na área farmacêutica, o estudo da sua biogênese e regulação torna-se um alvo de interesse relevante.

As rotas biossintéticas dos metabólitos secundários não são simples e talvez só sejam ativadas durante alguns estágios particulares do crescimento e desenvolvimento ou em períodos de interesse causados por limitações nutricionais ou ataques microbiológicos (MANN, 1987).

Existem diferentes classes de ativos produzidos pelas plantas com diversificadas atividades farmacológicas, como: resinas, lignanas, taninos, alcalóides, heterosídeos cardioativos, flavonóides, compostos fenólicos simples, entre outros.

A origem de todos os metabólitos secundários vem do metabolismo da glicose, via do ácido chiquímico e via do acetato conforme apresenta a Figura 3 (MANN, 1987). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursor da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Alguns metabólitos são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, dos flavonóides e dos taninos condensados.

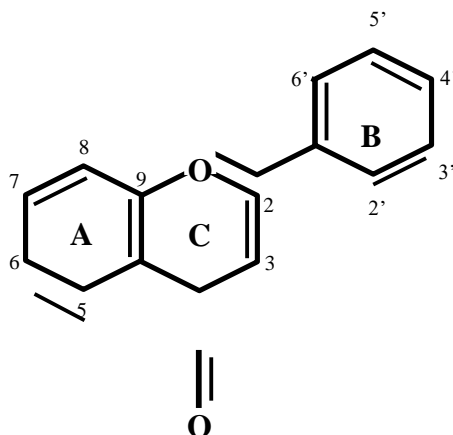
Figura 03 - Ciclo biosintético dos metabólitos secundários



Fonte: (Arquivo pessoal) adaptado (SIMÕES, 2000)

As rotas metabólicas para a produção dos diferentes compostos ativos compreendem uma variedade de enzimas-chave que atuam de maneira coordenada para a síntese destes metabólitos. As principais vias metabólicas são a Via dos Fenilpropanoides e a Via do Acetato. Nestas vias destacam-se as enzimas chalcona sintase (CHS; E.C. 2.3.1.74), chalcona isomerase (CHI; E.C. 5.5.1.6), flavonoide 3' 5' hidroxilase (F3'5'H; E.C. 1.14.13.88), flavona sintase (FS; E.C. 1.14.11.22), flavonol sintase (FLS; E.C. 1.14.11.23), isoflavona sintase (IFS; E.C. 1.14.14.87), isoflavona redutase (IFR; E.C. 1.3.1.45), dentre outras.

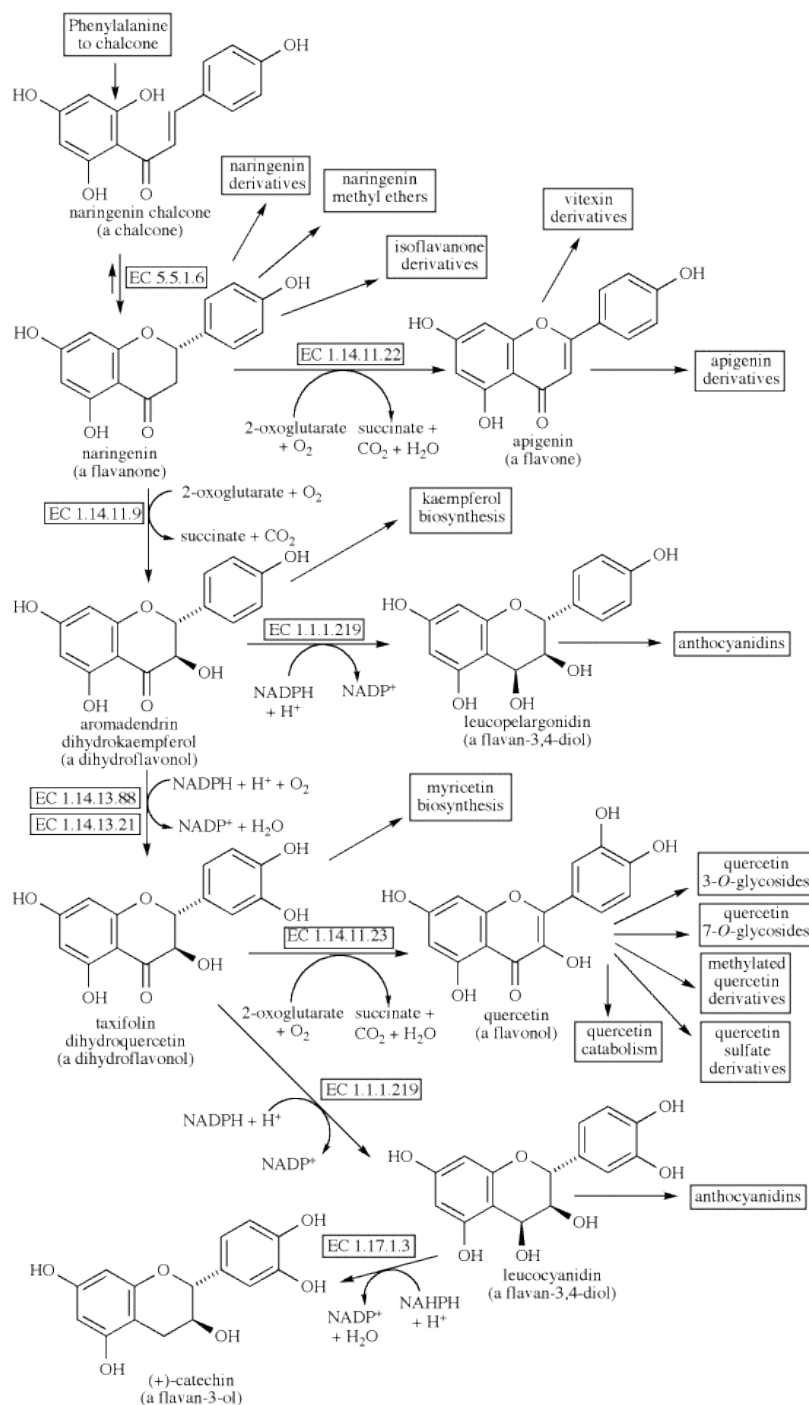
Os flavonoides são uma importante classe de polifenóis encontrado nas plantas em altas quantidades e são considerados um dos grupos mais importantes entre os produtos de origem natural. Podem-se encontrar flavonoides em diversas formas estruturais, mas a mais comum possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (SIMÕES et al., 2000) (Figura 04). Conforme mostra a Figura 05 A e B, os flavonoides são biossintetizados a partir do precursor fenilalanina seguindo a rota de fenilpropanoides. Esta rota é bastante complexa, tendo regulação coordenada no eixo principal e nas ramificações para a produção de várias classes de metabólitos.

Figura 04: Esqueleto fundamental dos flavonoides

Fonte: (Arquivo pessoal)

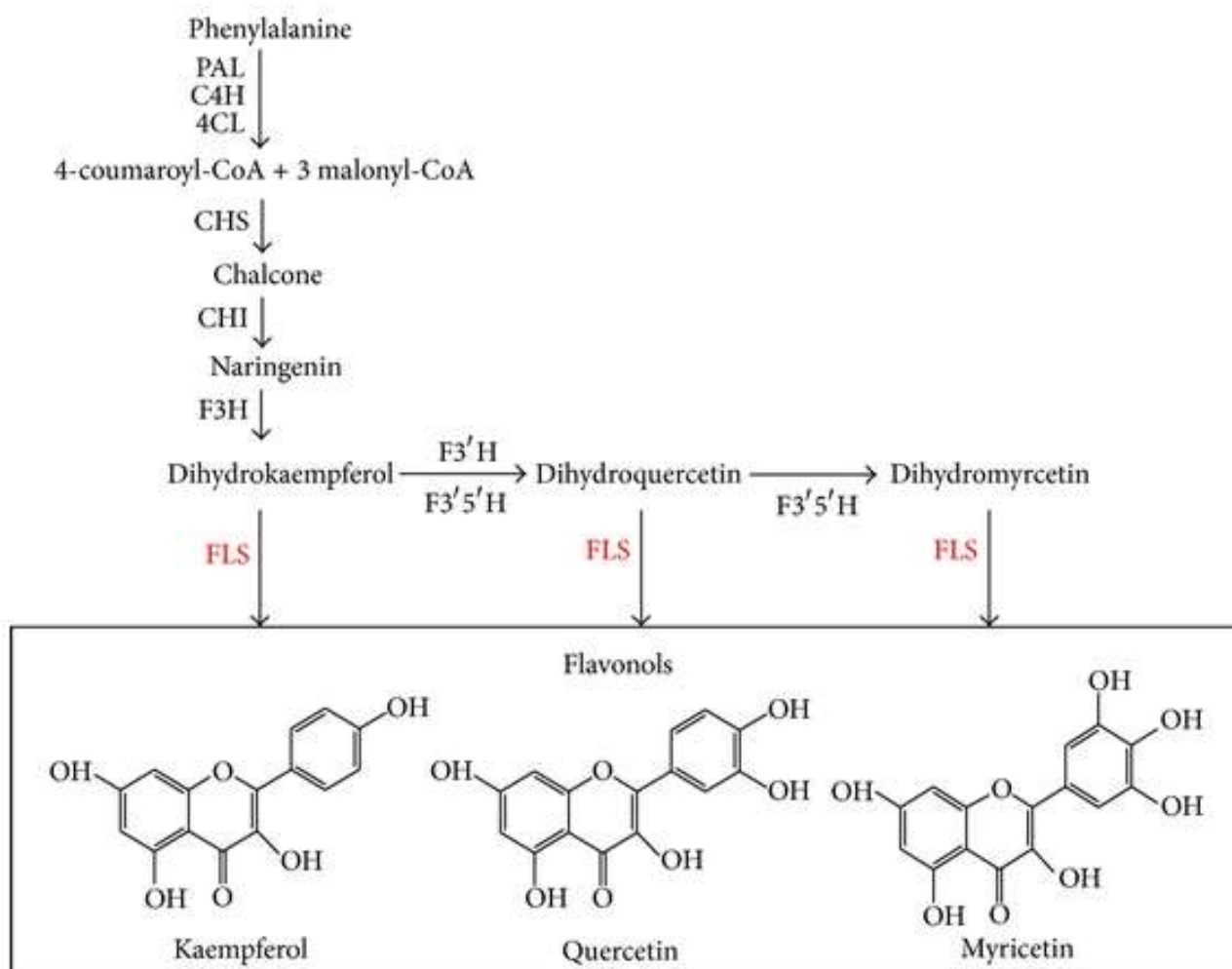
Entre os flavonoides, as chalconas têm sido apontadas como atraentes compostos com propriedades quimioprotetoras e antitumorais. O termo chalcona caracteriza uma família de compostos que possuem como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupo hidroxila.

Figura 05A -Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas. Chalcona Isomerase (CHI: EC 5.5.1.6), Flavona Sintase (FS: EC 1.14.11.22 = EC 1.14.20.5), Flavanone 3-Dioxigenase (F3D: EC 1.14.11.9), Dihidroflavanol 4-Reductase (DHR: EC 1.1.1.219), Flavonoide 3' 5 ' Hidroxilase (F3'5'H: EC 1.14.13.88), Flavonoide 3'- Monooxigenase (F3'MONO: EC 1.14.13.21 = EC 1.14.14.82, Flavonol Synthase (FLS: EC 1.14.11.23 = EC 1.14.20.6), Leucoanthocianidina Redutase (LR:EC 1.17.1.3).



Fonte: Adaptado de VERHOEYEN et al., 2002.

Figura 5B: Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas
(PAL: Fenilalanina Amonio Liase, C4H: Cinamato 4-Hidroxilase, 4CL: 4
Coumaroil CoA Ligase; CHS: Chalcona Sintase; CHI: Chalcona Isomerase;
F3H: Flavona 3 – Hidroxilase; F3'H: Flavonoide 3' Hidroxilase; F3'5'H:
Flavonoide 3' 5' Hidroxilase; FLS: Flavonol Sintase



Fonte: YEON BOK et al, 2014.

2.1.4. PROSPECÇÃO DE GENES E A EXPRESSÃO DE GENES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Com o advento e evolução da tecnologia do DNA recombinante, atualmente pode-se isolar genes, construir cDNAs, sequenciá-los, mutagenizá-los e expressá-los tanto em hospedeiras homólogas (próprias plantas) como heterólogas podendo expressar estes genes em bactérias e fungos. Consequentemente tornou-se muito mais rápido e mais barato o isolamento e a identificação de sequência codificadora de proteínas importantes.

A prospecção de genes de plantas está sendo amplamente estudada e explorada principalmente pelo potencial farmacológico que as plantas trazem para a saúde humana e animal. Envolve a combinação de análises *in silico* e de análises moleculares. A estratégia inicia-se com a construção de uma ou mais bibliotecas de cDNA. Posteriormente, é realizada uma busca de sequências por homologia, dos genes de interesse, nos bancos de dados públicos. Em seguida, são identificados domínios conservados através do alinhamento múltiplo. *Primers* degenerados podem ser desenhados para triagem das bibliotecas de cDNA buscando a localização de um ou mais genes de interesse, por meio de sondas marcadas ou estratégias de amplificação por PCR.

O estudo do transcriptoma de cana de açúcar originou um banco de dados de sequências expressas, SUCEST (“*sugarcane expressed sequence tag*”), obtidas a partir de tecidos sob diferentes condições fisiológicas,

incluindo transcritos relacionados a enzimas atuantes na regulação de vias metabólicas sob situações de estresse biológico e físico-químico (VETTORE et al, 2001). As análises “*in silico*” permitiram a identificação de sequências relacionadas a enzimas chaves da biossíntese de metabólitos secundários (FRANÇA et al., 2001). Estas análises demonstraram que as enzimas chaves da via de biossíntese de fenilpropanoides são altamente conservadas nas plantas.

A regulação dos genes das vias de biossíntese em plantas é coordenada durante o desenvolvimento dos tecidos e órgãos e também em resposta a condições ambientais. As expressões de genes regulatórios podem alterar a expressão de genes chave de uma determinada via de biossíntese. Com os recentes avanços da genômica, um grande número de genes pode ser analisado simultaneamente e os seus níveis de expressão comparados em diferentes estágios fisiológicos da planta por meio de biochips de DNA (VODKIN et al., 2004).

Bibliotecas de cDNAs de plantas têm sido construídas, como de cana-de-açúcar, soja, guaraná, entre outras, e muitos cDNAs importantes estão sendo descritos e expressos, em sua maioria, em sistemas procarióticos.

Transcritos com baixo número de cópias ou baixa frequência demandam uma produção em maior escala para que se possa estudar seus produtos quanto às características bioquímicas e atividades farmacológicas. A expressão em sistemas heterólogos em larga escala é uma alternativa cada vez mais viável para a produção de proteínas com potencial biotecnológico.

A descoberta de promotores e repressores específicos do genoma de *Escherichia coli* e de células eucarióticas permitiu a manipulação da expressão de proteínas e a clonagem de genes sob o controle de um promotor, onde a expressão possa ser regulável. O primeiro, e mais comumente sistema de expressão usado é procariótico em *E. coli* baseado no operon lac.

A tecnologia de organismos geneticamente modificados começou a ser desenvolvida na década de 1970 com a produção de novas variedades de plantas. Milhões de hectares de plantações transgênicas comerciais, tais como: soja, algodão, tabaco, batatas e milho têm sido plantados e colhidos anualmente em muitos países. Em 2017, mais de 17 milhões de agricultores, a maioria deles pequenos produtores, em 24 países, cultivaram 189,8 milhões de hectares de culturas transgênicas. O país que lidera a adoção de transgênicos no mundo continua sendo os Estados Unidos com 75 milhões de hectares plantados. O Brasil vem na sequência com 50 milhões de hectares plantados, seguido da Argentina (23,6 mi/ha), Canadá (13,1 mi/ha) e Índia (11,4 mi/ha) (ISAAA, 2018).

A Engenharia Genética tornou possível a remoção ou a inativação de genes indesejáveis, bem como a modificação de genes da própria planta, que atuam em rotas metabólicas específicas, para melhorar a qualidade do produto (ex. tomates geneticamente modificados que permanecem firmes por períodos mais longos). As primeiras plantas transgênicas foram desenvolvidas em 1983 quando um gene codificante para a resistência contra o antibiótico canamicina foi introduzido em plantas de fumo. Em

1992 um tomate transgênico obtido pela Calgene foi desregulamentado nos Estados Unidos e em 1994 estava sendo comercializado (BOREM, 2004).

Plantas transgênicas com características importantes, principalmente, com maior teor de princípios ativos farmacologicamente podem ser obtida através de técnicas de biologia molecular e transformação genética de plantas. Algumas plantas como *Atropa belladonna*, *Datura stramonim* e *Scopolia japonica*, tiveram suas rotas metabólica modificadas para aumentar a produção dos compostos bioativos (SILVA & AMARAL, 2003).

A transferência de genes de interesse para as plantas geralmente acontece via *Agrobacterium*. Dois tipos desta bactéria estão disponíveis para a transformação de plantas: a *Agrobacterium tumefaciens* e a *Agrobacterium rhizogenes*. Vetores plasmidiais podem ser manipulados com genes de enzimas-chaves de vias metabólicas de plantas, serem inseridos em *E. coli* e em seguida transferidos para a *Agrobacterium* com o intuito de produzir plantas transgênicas de interesse biotecnológico. A transferência de genes de *E.coli* para a *Agrobacterium* acontece geralmente por um método chamado conjugação triparental.

É um método simples, eficiente, não requer equipamentos específicos e dispensa a preparação de DNA plasmidial de *E. Coli*. Neste método duas linhagens de *E. coli* (*helper* e doadora) e uma linhagem de *Agrobacterium* (receptora) são co-cultivadas. A linhagem *helper* fornece as funções de mobilização (*mob*) e transferência (*tra*) de plasmídios entre bactérias compatíveis. Já a linhagem doadora contém o vetor binário ou intermediário

que deverá ser transferido. Durante a conjugação, o plasmídio *helper* é transferido para a linhagem doadora e, a seguir, promove sua mobilização e a do vetor para *Agrobacterium*. O plasmídio *helper* não se replica em *Agrobacterium*, portanto, é eliminado. Após a transferência, apenas as linhagens recombinantes de *Agrobacterium* são selecionadas, com os antibióticos apropriados. A principal desvantagem da conjugação triparental é a possibilidade de ocorrerem alterações no plasmídio introduzido, em virtude da recombinação com o plasmídio *helper*.

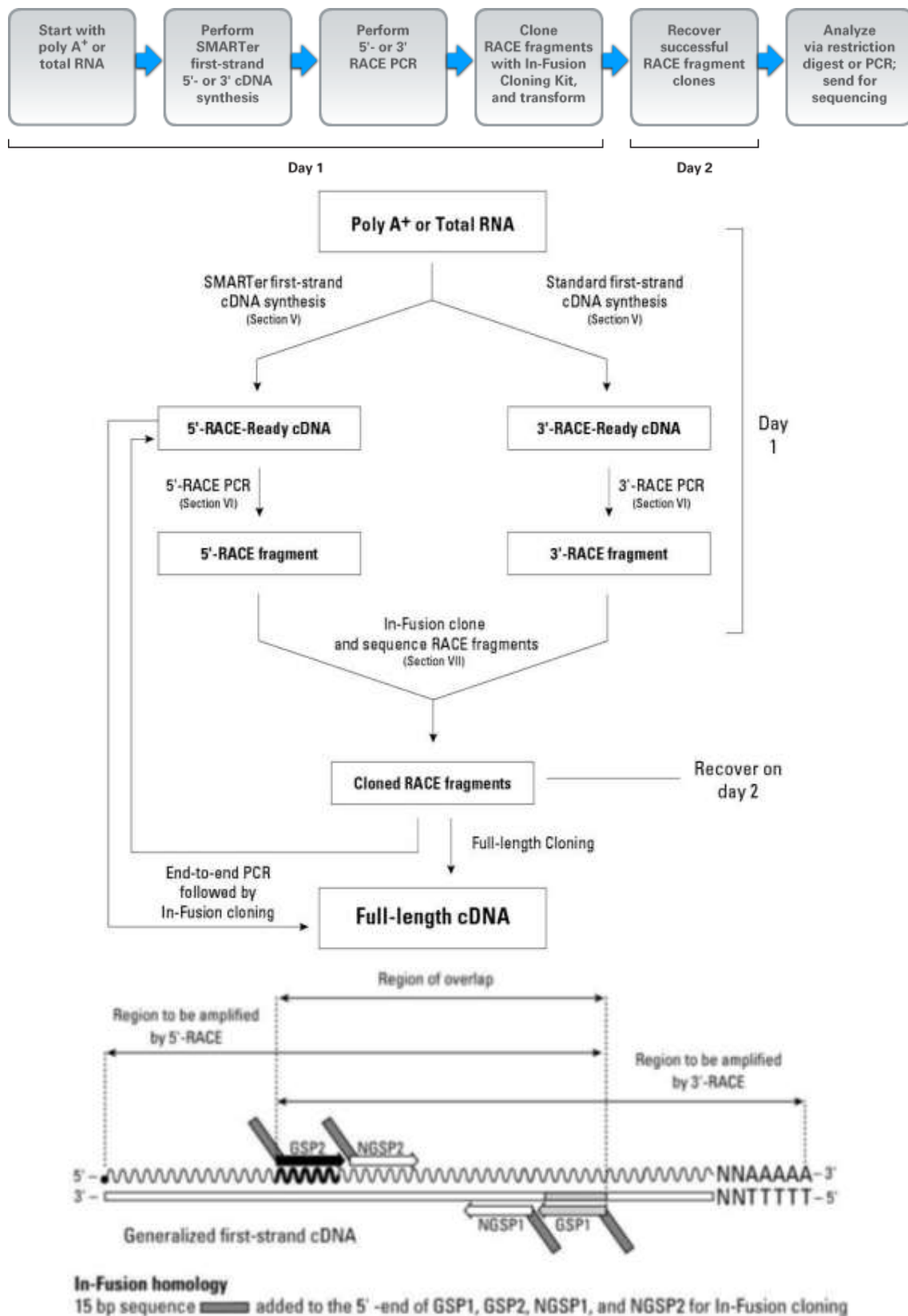
2.1.5. RACE (AMPLIFICAÇÃO RÁPIDA DE EXTREMIDADES DE cDNA)

O isolamento de transcritos gênicos completos é de extrema importância para análises de expressão gênica seja em plantas ou animais. Na maioria das vezes são isoladas tags de sequência expressa (ESTs) que são pedaços curtos de cDNA. A técnica de RACE, amplificação rápida de extremidades de cDNA (Rapid Amplification of cDNA Ends), tem sido amplamente utilizada para a obtenção de cDNAs completos quando apenas parte da sequência do transcrito é conhecida (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Este método permite a amplificação de regiões codificadas desconhecidas, requerendo somente o conhecimento de uma pequena sequência que esteja dentro do RNAm de interesse e é por isso utilizada para clonar as extremidades 5' ou 3' de um cDNA incompleto (FROHMAN; DUSH; MARTIN, 1988). A amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE) é uma ferramenta barata e poderosa para obter rapidamente cDNAs completos. Esta técnica se inicia com o isolamento do RNAm, a transcrição a

primeira fita de cDNA e posteriormente ampliações com sondas específicas desenhadas a partir de regiões conhecidas do gene (GSP- *gene specific primer*) que se quer obter por completo. O desenho das sondas precisa seguir alguns parâmetros pré-estabelecidos como: tamanho de 23-28 nucleotídeos, alto teor em GC (> 50 %), o que permite o emparelhamento dos iniciadores. Os iniciadores podem ser desenhados tanto no sentido 5' quanto no 3' da fita de DNA. Ao final da técnica a sequência do cDNA completo deve ser submetida a análises de sequenciamento e confirmação da identidade no NCBI. Diversos cDNAs completos tem sido descrito em plantas utilizando a técnica de RACE. Genes completos de plantas de resistência a patógenos, tolerância a seca e genes relacionados a produção de bioativos estão sendo isolados e clonados. Em 2010, Hui Xu e colaboradores descreveram a clonagem e a caracterização das enzimas fenilalanina amônia liase e cinnamato 4 hidroxilase que estão envolvidas na biossíntese de flavonóides utilizando RACE. Meiling et al.,2013, também identificarem por RACE uma sequência completa de um gene relacionado a produção de flavonoides em plantas, a flavanona 3-hidroxilase. Pela técnica de RACE foram estudados genes relacionados a biossíntese de artemisinina em *Artemisia annua L* (ZONG-XIA, et al., 2012). O SMARTer RACE 5'/3' kit utiliza uma técnica rápida, com alta sensibilidade e especificidade. A primeira fita de cDNA obtida pode ser usada diretamente nas reações de PCR, sem a necessidade do uso de adaptadores para as reações. Com o uso de *primers* específicos (GSP) fragmentos de cDNA inteiros são obtidos (Figura 06).

Figura 06 – Fluxograma do procedimento do SMARTer RACE 5'/3' kit

(TakaraBio)



2.1.6. BIOLOGIA SINTÉTICA

A partir de 2003, com o desenvolvimento de uma nova tecnologia denominada biologia sintética tornou-se possível à montagem aleatória de elementos genéticos. É uma tecnologia baseada em engenharia genética, microbiologia e bioinformática que passou a ser digital, transformando organismos naturais sintéticos de modo sistemático (RABINOW & BENNETT, 2009). Utilizando um conjunto de variadas técnicas de biologia molecular, os DNAs são projetados *in silico*, sintetizados e transferidos para organismos visando diferentes aplicações (SCHNEIDER, 2007).

O maior avanço da biologia sintética surgiu em 2010 com a criação do primeiro organismo vivo controlado por um genoma sintético, que e foi o desenvolvimento da bactéria *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn 1.0 (GIBSON et al., 2010). Depois disto esta tecnologia tem sido amplamente estudada com o objetivo maior de transformar microrganismos naturais (bactérias, leveduras, algas e vírus) em sintéticos (com genomas sintéticos) para realizarem funções pré-definidas e específicas.

A biologia sintética utiliza um conjunto de partes padronizadas de genes que são denominados como *biobricks* (biotijolos), analogia com o brinquedo de montar peças “Lego”, que foram inicialmente desenvolvidas por ex-professores do Massachusetts Institute of Technology (MIT), em 2003 (KHAN, 2014).

As sequências de nucleotídeos dos *biobricks* são projetadas para serem montadas na construção de novos circuitos e sistemas biológicos e aplicadas em, por exemplo: síntese de proteínas e produção de compostos. São constituídas por genes que atendem a critérios preestabelecidos para

garantir a compatibilidade entre as partes e manter o formato da montagem básica. Cada peça padrão é construída com extremidades para junções, prefixos e sufixos, e pontos de clivagem para enzimas de restrição (CONSTANTE; GRUNBERG; ISALAN, 2011).

Esta tecnologia pode ser aplicada nas indústrias de bioenergia para o desenvolvimento de combustível regenerativo. Em microrganismos eliminando a produção de determinadas substâncias indesejáveis, e em seres humanos para produzir proteínas úteis aos processos metabólicos. Também pode ser aplicada no desenvolvimento de novas drogas como, por exemplo, a utilização da bactéria *E. coli*, para a produção do ácido artemisínico, precursor da artemisinina (substância ativa da droga antimalárica), a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para as produções do composto antitumoral taxol, e na síntese do acetado de hidrocortizona (EASAC, 2011).

Pode ser aplicada para o desenvolvimento de antibióticos, vacinas e tratamento de câncer. Bem como para a modificação de plantas que possuem substâncias farmacologicamente ativas como o intuito de aumentar a produção destes ativos.

Em plantas, as técnicas de engenharia genética têm tido uma mudança progressiva desde a intervenção de um único gene até a transformação múltipla de genes (MGT) de modo a concretizar objetivos mais ambiciosos como a biossíntese de micromoléculas naturais complexas (HALPIN, 2005). Nesse sentido foram desenvolvidos métodos para a expressão coordenada de grupos de genes (CAPEL & CHRISTOU, 2004)

responsáveis pela produção de enzimas que atuam em pontos estratégicos das rotas de biossíntese, conseqüentemente aumentando a biodisponibilidade dos precursores e o fluxo da via de biossíntese de ativos específicos.

Uma estratégia muito interessante é a expressão simultânea de múltiplos genes da rota de biossíntese, representando preferencialmente todas as enzimas – chaves garantindo o direcionamento correto do fluxo metabólico. A transferência múltipla de genes para plantas pode ocorrer por duas maneiras, pela inserção de múltiplos genes em um único plasmídeo e pela inserção de diferentes genes em diferentes plasmídeos. Estes dois métodos utilizam o sistema de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando um vetor binário contendo múltiplos genes em uma região única do T-DNA (NAQVI et al., 2009). Uma maior eficiência é alcançada com esta técnica quando ocorre simultaneamente a transferência de múltiplos genes codificadores de enzimas para a planta receptora. Teoricamente não existe um número máximo de transgenes que podem ser introduzidos no T-DNA, mas um melhor resultado pode ser obtido com múltiplos genes carregados por um único vetor pois a integração pode ocorrer em um único locus o que facilita as estratégias baseadas na Biologia Sintética (ZORRILLA-LÓPEZ et al., 2013)

2.2. JUSTIFICATIVA

A Aroeira do Sertão possui metabólitos secundários, acumulados em suas folhas e na entrecasca, com importantes atividades farmacológicas como potente ações anti-inflamatórias, antibacterianas e antiúlceras. O conhecimento dos genes que codificam enzimas que regulam as rotas metabólicas da produção destes bioativos e a manipulação genética dessa rota de biossintética é de extrema importância para estabelecer um processo biotecnológico de obtenção dos mesmos de uma maneira eficiente por meio da manipulação genética.

2.3. HIPÓTESES DO TRABALHO

2.3.1. É possível a identificação de genes relacionados a biossíntese de metabólitos secundários em folhas de *Myracrodruon urundeuva*, por clonagem e sequenciamento randômico de uma biblioteca de cDNA de material vegetal supracitado;

2.3.2. O sequenciamento randômico dos transcritos possibilitará a identificação de enzimas chaves responsáveis pela biossíntese de fenilpropanóides em folhas de *Myracrodruon urundeuva*;

2.3.3 O rastreamento do conjunto de cDNAs de *Myracrodruon urundeuva* com sondas específicas permitirá a identificação de enzimas chaves na identificação de derivados flavônicos produzidos por *M. urundeuva*;

2.3.4 A partir da identificação de genes relacionados a biossíntese de flavonóides é possível induzir uma rota metabólica para a produção de metabólitos alvo, farmacologicamente ativos, por manipulação genética de múltiplos genes via *Agrobacterium tumefaciens*.

O sábio procura o que está nele próprio; o tolo, o que está fora dele.

(Confúcio, filósofo chinês – 551-478 a.C.)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificação de genes correlacionados com enzimas chaves no direcionamento do fluxo biossintético para a síntese de derivados bioativos de *Myracrodruon urundeuva*, com importantes atividades farmacológicas a exemplo de chalconas diméricas, quercetina e outros derivados flavônicos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estabelecer uma biblioteca de cDNA a partir de folhas de *M. urundeuva* e sequenciar randomicamente a biblioteca obtida;
- II. Identificar sequencias de ESTs relacionadas a importantes micromoléculas produzidas pela espécie;
- III. Identificar genes correlacionados com enzimas chaves da expressão da via de biossíntese de fenilpropanoides em *M. urundeuva*;
- IV. Identificar genes correlacionados as enzimas chaves responsáveis pela produção de flavonóides em *M. urundeuva*;
- V. Obter genes completos correlacionados as enzimas chaves responsáveis pela produção de flavonóides em *M. urundeuva*;
- VI. Obter um cassete de expressão para a realização de experimentos de manipulação genética da biossíntese de metabolitos de interesse;
- VII. Transformar plântulas cultivadas *in vitro*;
- VIII. Avaliar a funcionalidade do gene inserido em plântula hospedeira via *Agrobacterium tumefaciens*.

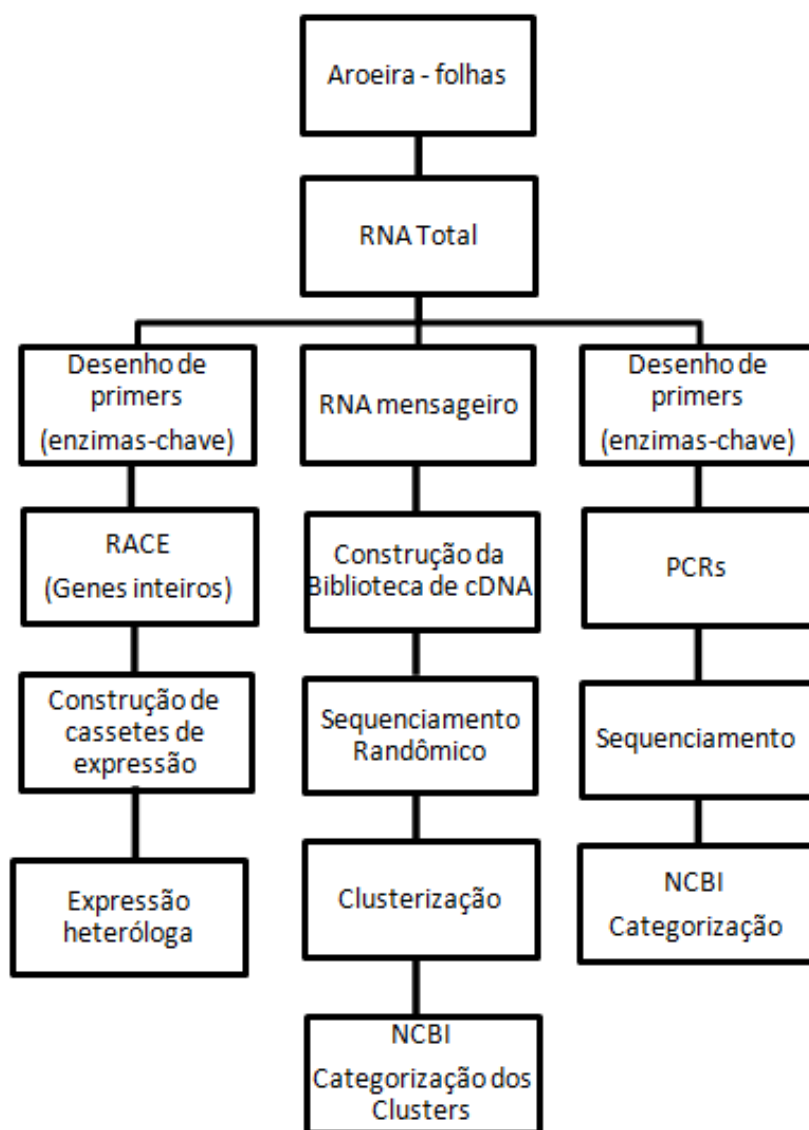
4. MÉTODOS

***Só o ignorante se zanga, o sábio
compreende.***

(Provérbio indiano)

A estratégia metodológica adotada neste trabalho pode ser melhor visualizada no organograma representado a seguir (Figura 07). A análise da expressão coordenada de genes de fenilpropanóides (biossíntese de flavonóides) em folhas de *M. urundeuva* foi realizada por três metodologias distintas.

Figura 07: Representação esquemática da estratégia metodológica adotada no trabalho.



4.1. Seleção de fontes de genes alvos

Folhas de indivíduos adultos de *Myracrodruon urundeuva* foram coletadas em novembro de 2011 na Universidade Federal de Sergipe (voucher 14999).

4.2. Obtenção do RNA total e Purificação do mRNAs

Para a obtenção do RNA total foram utilizadas 100 mg de folhas da planta. Após completa maceração em nitrogênio, realizou-se a extração do RNA utilizando o kit Spectrum™ Plant Total RNA da Sigma-Aldrich conforme orientações do fabricante. A fração poli-A⁺ foi purificada do RNA total do tecido alvo por meio do kit GenElute™ mRNA Miniprep de acordo com protocolo especificado pelo fabricante (Sigma Life Science).

4.3. Construção de Biblioteca de cDNA de folhas *Myracrodruon urundeuva*

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2 µg de mRNA. A biblioteca de cDNAs foi construída utilizando o *kit In-Fusion SMARTER cDNA Library Construction Kit, Clontech*.

Os cDNAs dupla fita obtidos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy Vectors (Promega, Madison, WI, USA). O sistema de ligação foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* (DH5α) pelo método do CaCl₂ (COHEN et al., 1972, SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Cerca de 5 µL do produto da ligação foram adicionados a 100 µL de

suspensão de células hospedeiras competentes e os tubos incubados em gelo por uma hora. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 2 minutos; incubadas em meio de cultura LB líquido a 37 °C por uma hora com agitação e em seguida, plaqueadas em meio de cultura LB sólido contendo o antibiótico apropriado à pressão seletiva (Ampicilina 100 ug/ml). Após incubação a 37 °C *overnight* as colônias transformantes foram analisadas.

4.4. Análise das colônias transformantes. Sequenciamento randômico dos clones da biblioteca de cDNA de *Myracrodruon urundeuva*.

Os clones recombinantes contendo cDNA foram analisados por meio de sequenciamento direto dos plasmídeos recombinantes utilizando-se os *primers* universais M13 *sense*, e reagentes do *kit* de sequenciamento *Dyynamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBace™)*, conforme orientações do fabricante. Os produtos amplificados foram sequenciados em sequenciador automático MegaBace 1000 DNA Sequencing System, GE Healthcare/Amersham Biosciences.

O protocolo de sequenciamento foi o recomendado pelo fabricante. Após a eliminação da região correspondente ao vetor os eletroferogramas foram analisados com auxílio da plataforma de análise desenvolvida por Fantinatto, 2015.

4.5. Análise e determinação da identidade dos transcritos sequenciados.

Após o sequenciamento randômico, as sequências foram analisadas usando programas e *scripts* na linguagem de programação Perl e CSharp, conforme descrito por Fantinato, 2015 e os dados analisados foram obtidos através da implementação de um pipeline com os seguintes programas: PHRED, PHD2FASTA, CROSSMATCH, Script for withdrawal vector, CAP3, ONLINE BLAST XLS REPORTER.

As sequencias analisadas foram então identificadas por comparação com sequencias depositadas no GenBank (NCBI), mediante alinhamentos locais (BLASTX), com sequencias depositadas.

Comparações múltiplas de similaridade das sequências obtidas foram realizadas pelo programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997).

4.6. Prospecção de genes de enzimas-chaves da Via Biossintética de Fenilpropanoides

A triagem de genes de interesse em cDNAs de *M. urundeuva* foi realizada com uso de sondas específicas, baseadas em regiões conservadas de enzimas-chaves relacionadas as vias de biossintese de flavonoides. Foi realizada uma busca de sequencias de enzimas-chaves de plantas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI. Com as sequencias selecionadas foram realizadas comparações múltiplas de similaridade utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997). A partir da identificação das

regiões de alta similaridade e das regiões dos domínios nas sequencias, as sondas foram construídas utilizando o programa Primer3Plus (UNTERGASSER, A. et al., 2007). As sondas foram desenhadas seguindo os parâmetros de tamanho (18-27 pb), temperatura (57-63 °C) e porcentagem de GC (20-80 %). Foram construídas sondas para Chalcona Sintase, Chalcona Isomerase, Flavona Sintase, Flavonona 3'-Dioxigenase, Dihidrocaempferol 4 – Redutase, Flavonóide 3' 5' Hidroxilase, Flavonoide 3' Monooxigenase, Flavonol Sintase e Leucoantocianidina Redutase (Tabela 03).

Tabela 03 - Sondas relacionadas a biossíntese de flavonoides utilizadas nas ampliações do cDNA de *Myracrodruon urundeuva*

SONDA	SENSE	ANTI-SENSE
CHALCONA SINTASE (CHS)	5' GAAGATCACCCACCTCGTGT 3'	5' TTGTTCTCGGCCAAGTCTTT 3'
CHALCONA ISOMERASE (CHI)	5' TTACTCGCCGGCAAATGGAA 3'	5' TCTTGCCGATCATCGACTCC 3'
DIHIDROKAEMPFEROL 4 – REDUTASE (DFR)	5' ATTTGCCAAACGCCAAGACG 3'	5' CTAGGCGGCATAGACGTTGT 3'
FLAVONOIDE 3' MONOOXIGENASE (F3'MONO)	5' GAGATGATCGGACGGCGATT 3'	5' TCATTTACCAGCGACGCCT 3'
FLAVONOIDE 3' 5' HIDROXILASE (F3'5'H)	5' TCGAGCCTTCCTCAAAACCC 3'	5' GGTCACAAAACTCGACGGC 3'
FLAVANONA 3' DIOXIGENASE (F3D)	5' AGCCTGTTGAAGGAGCGTTT 3'	5' GGGTTCTGGAACGTGGCTAT 3'
FLAVONOL SINTASE (FLS)	5' TCCAGGTTACAAACCACGGG 3'	5' TTGCACGTCTTTGCATCGG 3'
FLAVONA SINTASE (FS)	5' TTGCTTGATTGTGCCGAGGA 3'	5' CCGGTGGGTGTAGACGAAAT 3'
LEUCOANTOCIANIDINA REDUTASE (LR)	5' AGACGGTTCATTGAGGAGGC 3'	5' ACAGTGATGCCAGCTCGTTT 3'

A mistura reacional para 25 ul da PCR foi realizada utilizando-se 1 ul de cDNA obtido a partir do RNA total da folha de *M. urundeuva*, tampão 5X Green Reaction Buffer (Promega Corporation) acrescido de 1,5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada desoxirribonucleotídeo - dNTPs (Promega

Corporation), 10 pmoles de cada conjunto de *primers* (Tabela 3) e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega Corporation).

A reação foi conduzida durante 40 ciclos em ciclador térmico (MJ Research) e cada ciclo sob as seguintes condições: 95 °C durante 1 minuto; 60 °C durante 1 minuto e 72 °C durante 1 minuto. Ao término dos 40 ciclos, o produto de amplificação foi mantido durante 10 minutos a 72 °C. Após este intervalo as amostras foram mantidas a 4 °C.

Os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1 % com tampão TBE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 ug/mL) e revelado sob a luz ultravioleta. A purificação das bandas da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose *low melting* a 1 % em tampão TAE 1X pH 8,0 utilizando o “*kit Wizard PCR Preps – DNA Purification System*” (Promega Corporation), segundo as especificações de uso do fabricante.

Os fragmentos amplificados foram clonados utilizando o kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega Corporation) seguindo as especificações do fabricante.

O sistema de ligação foi incubado a 4 °C em geladeira *overnight*. Uma vez efetuada a ligação, realizou-se uma transformação, em células competentes previamente preparadas, de *E. coli* DH5 α .

As células competentes da linhagem hospedeira foram preparadas conforme o método do CaCl₂ descrito por *Cohen* et al. (1972) e a transformação foi induzida por choque térmico. Cerca de 5 μ L do produto da

ligação foram adicionados a 100 μ L de suspensão de células hospedeiras competentes e os tubos incubados em gelo por uma hora. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 2 minutos; incubadas em meio de cultura LB líquido a 37 °C por uma hora e em seguida, plaqueadas em meio de cultura LB sólido contendo os antibióticos apropriados à pressão seletiva (100 μ g/mL de ampicilina). Após incubação a 37 °C *overnight* as colônias transformantes foram analisadas.

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos utilizando o “*kit* PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega Corporation) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração dos plasmídeos, a qualidade do DNA plasmidial foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose à 1 % em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

O sequenciamento dos plasmídeos foi realizado em sequenciador automático Licor (Uniscience) utilizando os *primers* universais marcados (IRDye700 – M13 Forward e IRDye800 – M13 Reverse) e o kit Thermo Sequenase 78500.

As sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas utilizando o programa ChromasPro (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro>). A identificação da sequência foi realizada por comparação com sequências depositadas no GenBank (NCBI), mediante alinhamentos locais (BLASTX), com sequências depositadas.

4.7. Amplificação de genes completos utilizando a metodologia de SMARTer RACE

4.7.1. Síntese do cDNA completo do gene que codifica para a enzima Flavonol Sintase por RACE

Para obter a sequência inteira do gene de Flavonol Sintase (FLS) a partir do RNA total das folhas de *M. urundeuva* foi utilizada a metodologia de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) TakaraBio®.

Foram preparadas duas reações 5'-RACE e 3'-RACE utilizando 0,836 µg de RNA total para cada uma das reações. A síntese da primeira fita foi realizada conforme as orientações do fabricante. No passo final da síntese da primeira fita, esta foi diluída em 30 µL do tampão TRIS-EDTA.

A síntese do cDNA dupla fita 5' e 3', adicionando 41,5 µL de Mastermix (15,5 µL de água; 25 µL de 2X SeqAmp Buffer e 1,0 µL de Seq Amp DNA polymerase), 2,5 µL do cDNA primeira fita, 5 µL 10x UPM e 1 µL do primer específico para flavonol sintase, volume total 50 µL. O programa utilizado para as amplificações compreende 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 68 °C 30 segundos e 72 °C 3 minutos.

Para o controle de reação foi utilizado 1 µg de RNA total do coração de camundongo disponibilizado pelo fabricante. Após as amplificações, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,2 %.

Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados e as sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas utilizando o programa

ChromasPro (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro>). A identificação da sequência foi realizada por comparação com sequências depositadas no GenBank (NCBI).

4.7.2. Construção do gene sintético de Flavonol Sintase (ARO-FLS)

Com a identificação parcial do gene que codifica a enzima Flavonol Sintase (FLS) foram realizados vários alinhamentos utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) e sequências com alta similaridade a sequência parcial de ARO-FLS depositadas no GenBank (NCBI). Após a seleção de flavonol sintase de 3 espécies de plantas com alta similaridade a ARO-FLS (*Canarium album*, *Citrus unshiu* e *Juglans regia*), novamente foram realizadas múltiplas comparações utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997), para identificar a melhor sequência nucleotídica para completar as porções 5' e 3' do gene, a fim de obter um gene completo de ARO-FLS.

Além das comparações de similaridade de ARO-FLS com sequências nucleotídicas de FLS de outras plantas depositadas no GenBank (NCBI) também foram realizadas comparações múltiplas utilizando sequências de aminoácidos de FLS de outras plantas depositadas no GenBank (NCBI). Comparando as sequências de aminoácidos das 3 plantas que apresentaram maior homologia com a sequência de ARO-FLS foi identificado algumas trocas de resíduos de aminoácidos e com isso foi utilizado o programa Codon

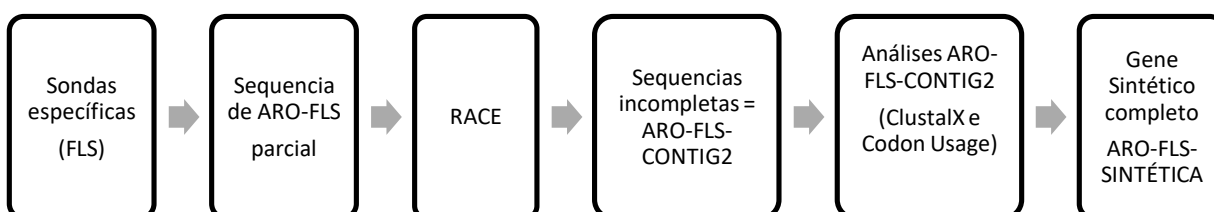
Usage (STOTHARD, 2000) para determinar qual espécie de planta usava códons parecidos com a espécie *Myracrodruon*.

Partindo-se das análises de similaridade das sequencias de nucleotídeos e dos códons usados em ARO-FLS com as 3 espécies de plantas selecionadas, as bases nucleotídicas ausentes nas porções 5' e 3' do gene de ARO-FLS foram adicionadas a sequencia parcial do gene de ARO-FLS obtendo um gene completo de Flavonol Sintase.

Após a obtenção *in silico* da sequência sintética do gene de flavonol sintase a síntese desta sequência foi realizada pela empresa GenScript® através da empresa FastBio Ltda. Na sequência sintética do gene de flavonol sintase durante a síntese foi introduzido na porção 5' sitio de restrição para a enzima SacI e na porção 3' sitio de restrição para a enzima BamHI e a clonagem do fragmento foi realizada no vetor pUC57.

A estratégia metodológica descrita anteriormente pode ser visualizada na Figura abaixo:

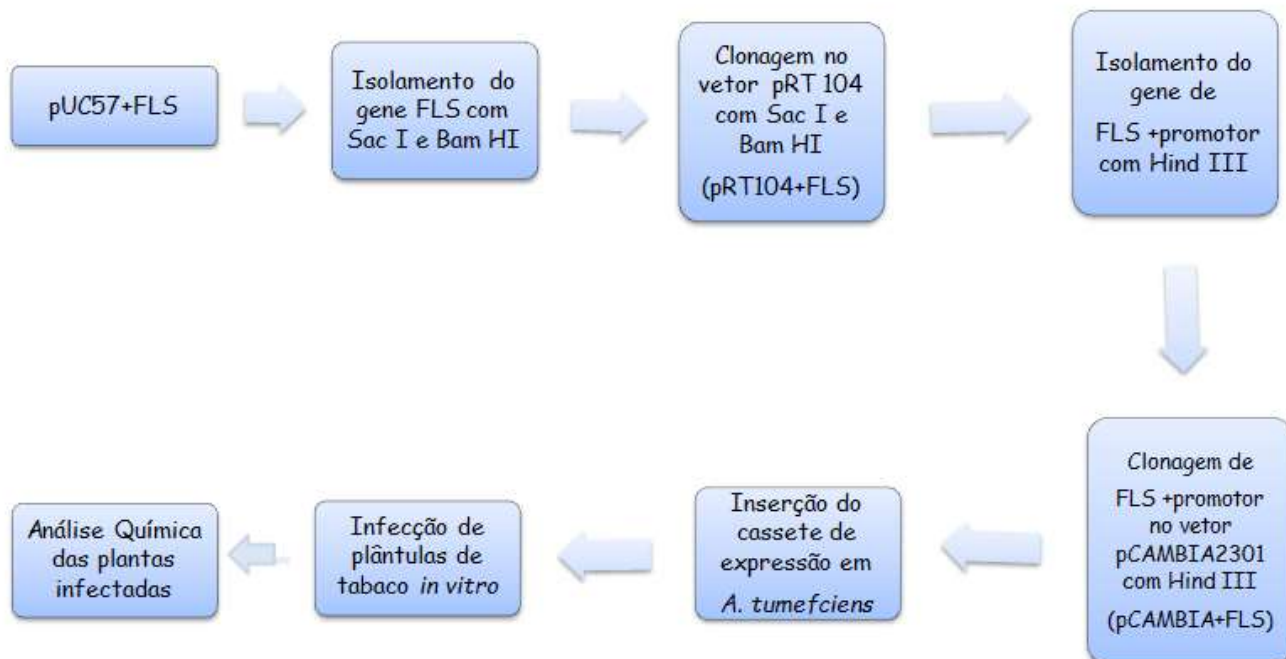
Figura 08A: Representação esquemática da estratégia metodológica adotada para a construção do gene sintético de Flavonol Sintase de *M. urundeuva*



4.8. Expressão do gene de Flavonol Sintase em plantas de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*

Esta metodologia foi desenvolvida conforme descrito abaixo e representado na Figura 08B.

Figura 08B: Representação esquemática da estratégia metodológica adotada na Expressão do gene de Flavonol Sintase em plantas de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*.



4.8.1. Construção do cassete de expressão

A partir do vetor pUC57 com a sequência de flavonol sintase (ARO-FLS) iniciou-se as etapas de clonagem nos vetores de expressão. Todas as enzimas utilizadas foram adquiridas do fabricante New England Biolabs, Inc.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega Corporation) seguindo instruções do fabricante e o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição SacI e BamHI conforme protocolo do fabricante. Utilizou-se 1 µg de DNA para a digestão e a digestão foi realizada a 37 °C por 1 hora e as enzimas foram inativadas a 65 °C por 15 minutos. O fragmento do gene de FLS com os sítios de restrição foi isolado em gel de agarose e purificado utilizando o “*kit Wizard PCR Preps – DNA Purification System*” (Promega Corporation), descrito pelo fabricante. Após a quantificação do fragmento foi realizada a clonagem no vetor de expressão.

Com o gene de ARO-FLS retirado do vetor pUC57 iniciou-se a construção do cassete de expressão que foi transferido para plântulas *in vitro* de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*.

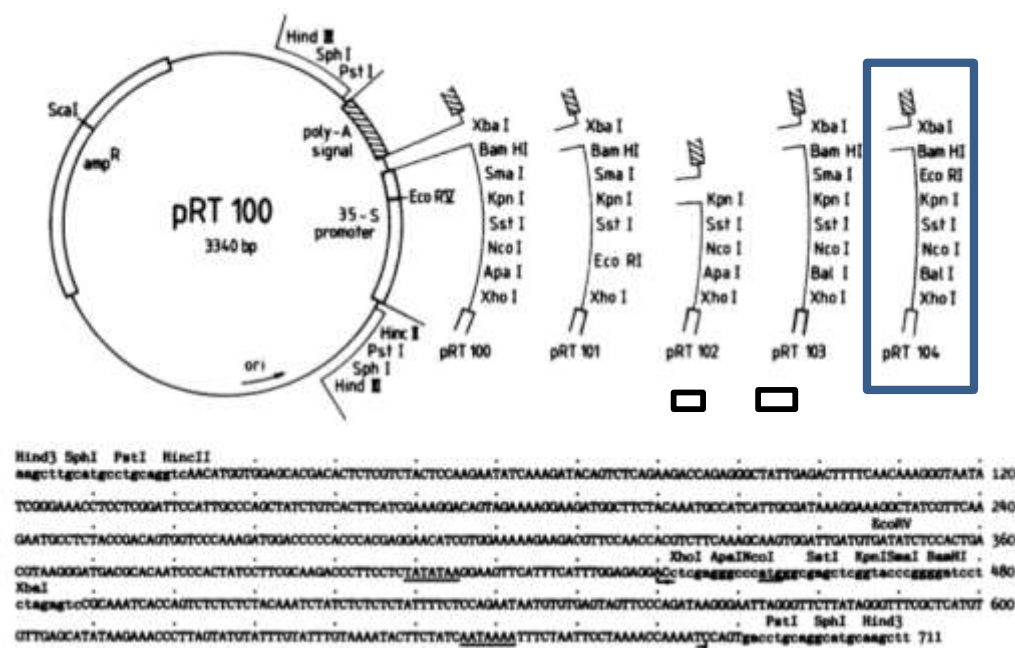
A construção do cassete de expressão foi realizada em 2 etapas. Foram utilizados 2 vetores para a clonagem do gene de ARO-FLS, o vetor pRT104 e o vetor pCAMBIA2301. Inicialmente o gene de ARO-FLS foi clonado utilizando o vetor pRT104 a fim de obter a sequência de ARO-FLS ligada a um promotor forte. O vetor pRT104 possui promotor e a digestão do

vetor com a enzima de restrição HindIII resultada em um fragmento de DNA com a sequência de interesse (ARO-FLS) ligada ao promotor. O segundo vetor de clonagem utilizado foi o vetor pCAMBIA2301, que é binário, o que permite sua propagação em células de bactérias e em plantas. Este vetor recebeu o gene de ARO-FLS ligado ao promotor e posteriormente foi transferido para células de *Agrobacterium tumefaciens*.

A primeira clonagem foi realizada no vetor pRT104 cedido pelo Prof. Dr. Ludger Hausmann do *Institut fur Rebenzuchtung Geilweilerhof (Institut for Grapevine Breeding Geilweilerhof)* da Alemanha. A partir de 1µg do vetor pRT104 (Figura 09) foi realizada a digestão a 37 °C por 1 hora com as enzimas de restrição SacI (SstI) e BamHI e as enzimas foram inativadas a 65 °C por 15 minutos. O vetor foi purificado por meio de eletroforese em gel de agarose *low melting* a 0,8 % em tampão TAE 1X pH 8,0 utilizando o “*kit Wizard PCR Preps – DNA Purification System*” (Promega Corporation), seguindo as especificações de uso do fabricante. Após a purificação o vetor foi quantificado e a clonagem foi realizada resultando em um cassete de expressão denominado pRT104 + FLS sob o controle do promotor 35S e com a região terminadora (NOS terminator). A transformação foi realizada por choque térmico a 42 °C / 45 segundos utilizando células competentes DH5α adquiridas da Invitrogen™. Após a transformação os transformantes foram inoculados em placas de petri contendo meio LB com o antibiótico de seleção ampicilina a 100 µg/ml e incubadas a 37 °C por 12 horas. A inserção do fragmento de flavonol sintase

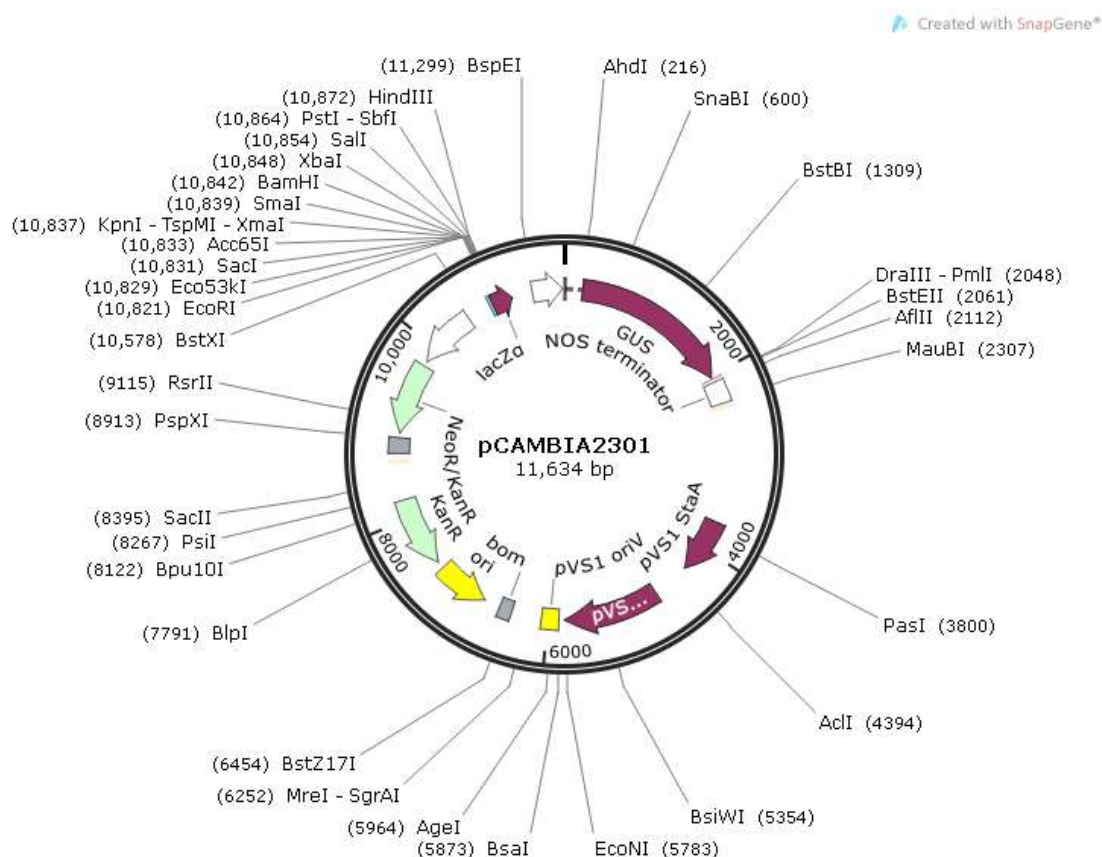
foi confirmada pela PCR e por digestão com as enzimas de restrição SacI (SstI) e BamHI.

Figura 09: Vetor pRT104 (TOPFER et al., 1987).



A segunda clonagem foi realizada no vetor binário pCAMBIA23.01 (Cambia, Austrália) representado na Figura 10.

Figura 10: Mapa do vetor pCAMBIA2301 (SnapGene®)



O cassete de expressão denominado pRT104 + FLS foi transferido para o vetor binário utilizando a enzima HindIII, resultando no vetor de expressão pCAMBIA2301+FLS que foi inserido em células de *E. coli* da linhagem DH5α. A transformação foi realizada por choque térmico a 42 °C / 45 segundos utilizando células competentes DH5α adquiridas da Invitrogen™. Após a transformação as colônias foram inoculadas em placas de petri contendo meio LB com o antibiótico de seleção canamicina a 50 µg/ml e incubadas a 37 °C por 12 horas e a presença do gene de ARO-FLS foi identificada por meio da reação da PCR utilizando sondas específicas para flavonol sintase. A partir das colônias selecionadas foram extraídos os plasmídeos e a inserção do fragmento de flavonol sintase acrescido da região

promotora do plasmídeo pRT104 foi confirmada por digestão com a enzima de restrição HindIII.

4.8.2. Cultivo de *A. tumefaciens*

O meio de cultura YMB, foi preparado como os reagentes (g.L⁻¹) K₂HPO₄ 0,50; MgSO₄ 0,20; NaCl 0,10; Manitol 10,0; Extrato de levedura 0,40 e Ágar 10,0 com o pH ajustado para 7,0 ± 0,1.

Para reativação da linhagem EHA 105, foi transferido do estoque em glicerol o *A. tumefaciens* para o meio de cultura YMB acrescido dos antibiótico rifampicina na concentração de 75 mg.L⁻¹.

4.8.3. Preparo de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*

À 25mL de YMB contendo rifampicina 75 mg.L⁻¹, adicionou-se uma colônia robusta da cultura de *Agrobacterium*. Esta suspensão celular foi mantida em shaker a 28 °C e 210 rpm por 24 horas. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 5000 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com glicerol 10 %. Esse procedimento foi realizado por 3 vezes. Na última centrifugação, após peletização, o pellet foi ressuspendido em 500 µL de glicerol 10 % gelado. O volume foi aliqotado em microtubos contendo 100 µL de células eletrocompetentes.

4.8.4. Transformação genética de *A. tumefaciens*

O plasmídeo pCAMBIA2301+FLS foi introduzido em *A. tumefaciens* via eletroporação. Adicionou-se 1 µg de DNA plasmidial em 100 µl de células eletrocompetentes. Esta solução foi transferida para uma cubeta de 2 mm e a eletroporação ocorreu a pulsos de 8-12 ms com 2,50 Kv, 25 uFD e 400 Ohms. Imediatamente adicionou-se 1 mL de meio de cultivo LB e a cultura foi mantida a 28 °C por 4 horas, sendo plaqueados 250 µL da solução. As placas de cultivo contendo os antibióticos de seleção rifampicina e canamicina foram armazenadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 48 horas. Decorrido o período de incubação as colônias foram avaliadas por PCR.

4.8.5. Preparo da suspensão da *A. tumefaciens*.

Foram adicionadas cerca de 10 “porções” (coletadas com alça de platina) da cultura bacteriana contendo o cassete de expressão em 20 mL de meio YMB líquido contendo os antibióticos específicos à linhagem (rifampicina e canamicina). Essa cultura foi mantida em agitação (110 rpm) por 72 horas à 28 °C até atingir a leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro a 550 nm de 0,4 e 0,6. A cultura foi centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante descartado e as células lavadas com meio de cultura YMB. Após lavagem, a cultura em solução foi

homogeneizada, e ao término do procedimento, as células foram ressuspensas em meio YMB (1 / 10 da concentração).

4.8.6. Infecção das plântulas de *Nicotiana tabacum*

Os procedimentos para a inoculação/transformação de plântulas de tabaco seguiram os protocolos descritos por Silva, 2017. As plântulas de *Nicotiana tabacum* foram obtidas a partir de sementes germinadas em condições axênicas em meio Murashige-Skoog (MS) com 30 g/L de sacarose e 2,5 g/L de phytigel mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 16 h de claro e 8 horas de escuro, umidade relativa de 70-80 % e temperatura de 22 ± 2 °C. Após 25 dias de germinação as plântulas foram utilizadas para o processo de transformação via *A. tumefaciens* utilizando método de microinjeção no xilema de segmentos nodais das plântulas.

Pequenas perfurações com agulha e seringa (1 mL) foram feitas nos segmentos para injetar 10 µL da cultura em suspensão de *A. tumefaciens* contendo o vetor de expressão com o gene de flavonol sintase. Os explantes foram transferidos para frascos de vidro contendo meio MS e acrescido de 250 µL de acetoseringona (0,02 g/L).

Os frascos contendo os explantes submetidos ao processo de transformação/infecção foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo, umidade e temperatura controlada. As plantas resistentes a canamicina foram transferidas para frascos contendo meio MS e antibiótico cefotaxima (500 mg/L) para eliminação da bactéria *A. tumefaciens*.

Aproximadamente de 3 em 3 dias as plantulas foram transferidas para metade da concentração de cefotaxima até as plântulas apresentarem condições axênicas na ausência de antibióticos.

4.8.7. Análise Química das plantas transformadas

As folhas das plantas transformadas com o cassete de expressão carregando o gene sintético de FLS foram submetidas a extração de flavonoides segundo Horbowincz (2002). O extrato foi preparado em etanol 60% por 4 horas sob agitação.

Em seguida os extratos foram filtrados em membranas de 20 μ M e evaporados usando rotaevaporador a uma temperatura de 40°C.

As amostras foram pesadas e 3mg de cada amostras foi utilizada para análises em HPLC/MS para verificar modificações no metaboloma da planta.

Quem me lisonjeia é meu inimigo; quem me critica é meu mestre.

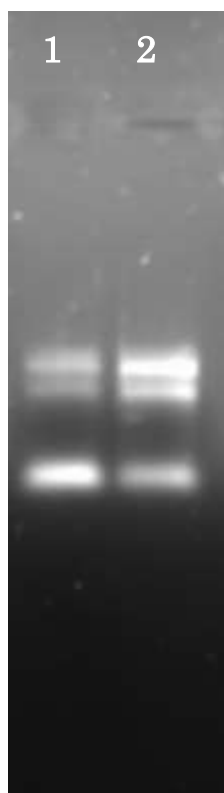
(Provérbio chinês)

5. RESULTADOS

5.1. Construção da biblioteca de cDNA de *Myracrodruon urundeuva* e rastreamento de cDNAs.

A partir de folhas de *Myracrodruon urundeuva* foi obtido RNA de qualidade para a construção da biblioteca de cDNA (Figura 11). Após a extração o RNA foi quantificado apresentando a concentração de 418 ng/ μ l e a qualidade foi analisada pela densidade óptica 260/280 nm resultando em 1,905.

Figura 11: Amostras de RNA de folhas de *M. urundeuva*. Amostra 1, extração a partir de 50 mg de folhas e amostra 2 partindo de 100 mg de folha.

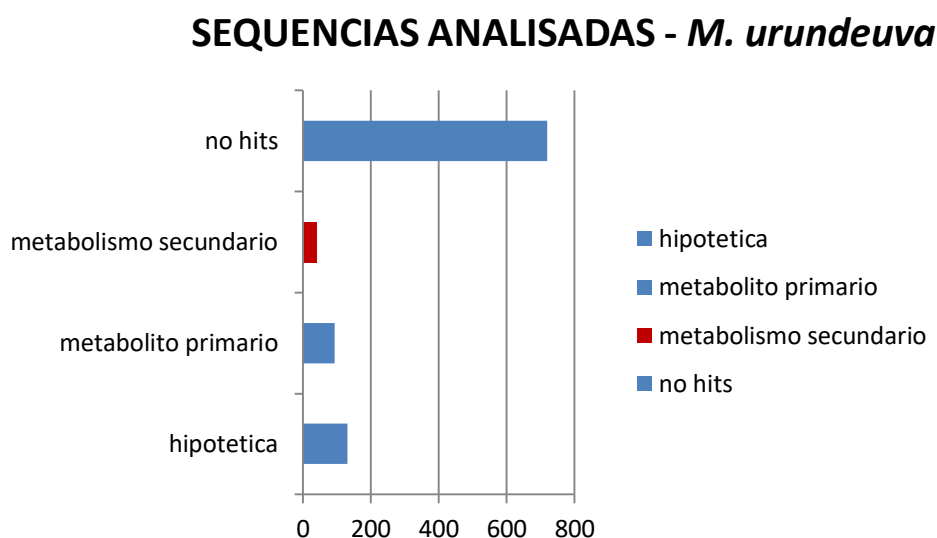


A clonagem dos cDNAs no vetor pGem T Easy resultou em uma biblioteca de cDNA contendo 1025 sequências válidas que após análises de

similaridade foram agrupados em 62 *contigs* (224 sequencias) e 801 *singletons*.

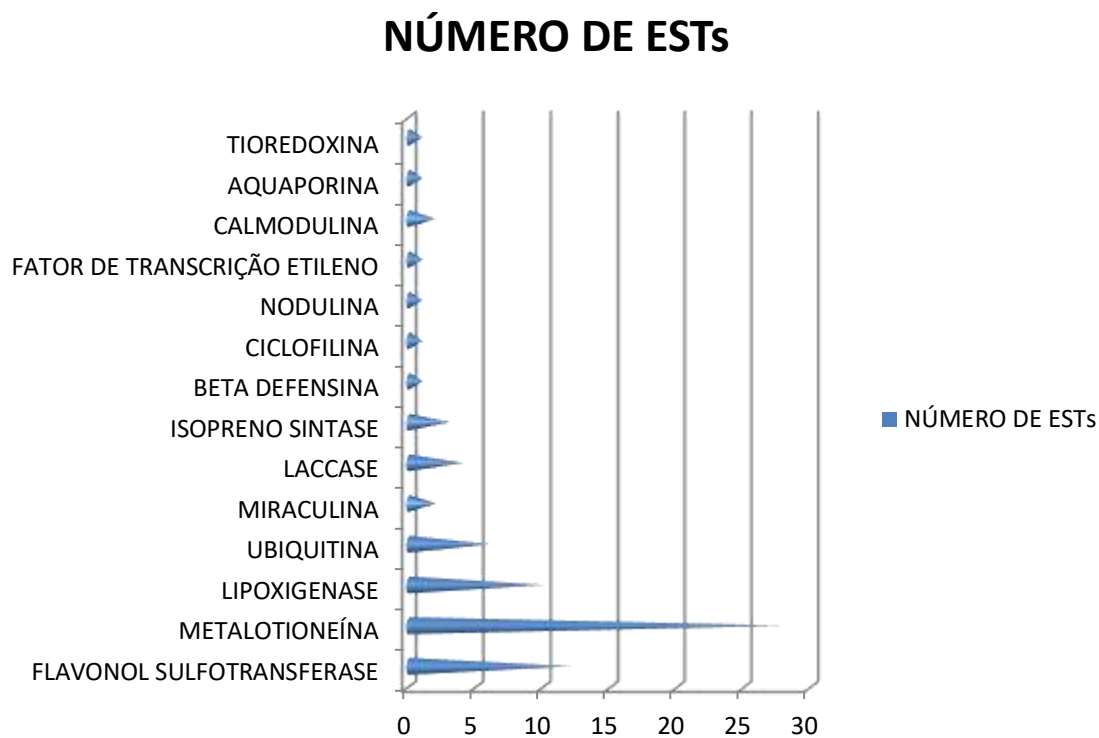
A homologia dos contigs e singletons obtidos foi analisada por comparação com sequencias depositadas no GenBank (BLASTX) (Anexo 1). A Figura 12 apresenta a classificação dos ESTs segundo GenBank, obtidos após análises de similaridade com as sequencias depositadas.

Figura 12 - Classificação dos ESTs obtidos da biblioteca de *M. urundeuva*



Dentre os cDNAs importantes identificados na biblioteca de cDNA, podemos destacar: miraculin, flavonol 3' sulfotransferase, nodulinas, laccases, lipoxygenases, aquaporinas, ciclofilinas, defensinas, tioredoxinas, ubiquitinas, calmodulinas, fator de transcrição do etileno e metalotioneínas (Figura 13).

Figura 13: Representação da quantidade de ESTs importantes relacionados ao metabolismo secundário de plantas



5.2. Busca de genes com sondas específicas para enzimas da via de biossíntese de flavonoides

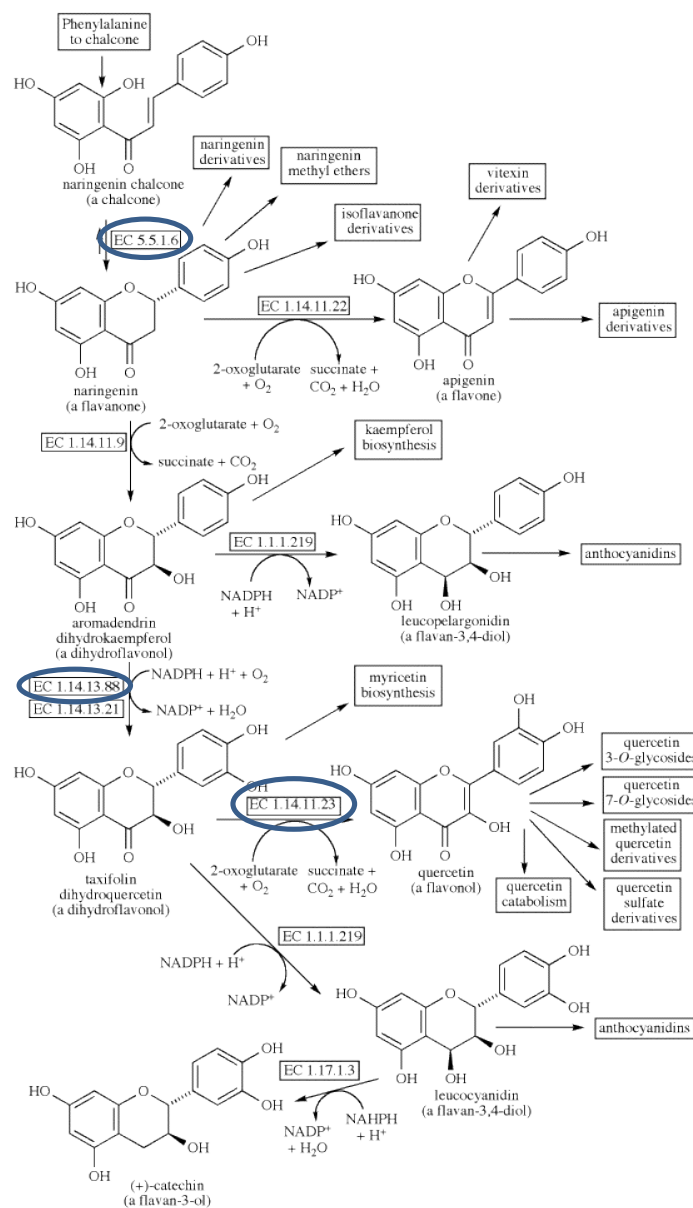
Foram construídas sondas específicas para amplificar genes das enzimas consideradas chaves para a biossíntese de flavonoides (Figura 04): chalcona isomerase (EC 5.5.1.6), flavona sintase (EC 1.14.11.22), flavonona 3'-dioxigenase (EC 1.14.11.9), dihidrocaempferol 4 – redutase (EC 1.1.1.219), flavonoide 3' 5' hidroxilase (EC 1.14.13.88), flavonoide 3' monooxigenase (EC

1.14.13.21), flavonol sintase (EC1.14.11.23) e leucoantocianidina redutase (EC 1.17.1.3).

Sequências de plantas depositadas no banco de dados do NCBI foram alinhadas e as regiões dos domínios das enzimas chaves foram identificadas. As sondas foram desenhadas a partir destes alinhamentos baseados na região do domínio e nas regiões onde as sequências eram altamente conservadas.

Após a várias reações de amplificação, as bandas obtidas foram clonadas, sequenciadas e identificou-se sequências relacionadas as enzimas chalcona isomerase, flavonoide 3' 5' hidroxilase e flavonol sintase. Baseada na rota biossintética de fenilpropanoídes podemos visualizar na figura seguinte (Figura 14 A e B) que aparentemente esta via de síntese está ativa e produzindo flavonoídes do tipo quercetina.

Figura 14A- Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas. Rota metabólica para a biossíntese de flavonoides em plantas. Chalcona isomerase (CHI: EC 5.5.1.6), Flavona sintase (FSI: EC 1.14.11.22 = EC 1.14.20.5), Flavonone 3-dioxigenase (F3D: EC 1.14.11.9), Dihidroflavanol 4-reductase (DHR: EC 1.1.1.219), Flavonoide 3' 5' hidroxilase (F3'5'H: EC 1.14.13.88), Flavonoide 3'-monooxigenase (F3'MONO: EC 1.14.13.21 = EC 1.14.14.82, Flavonol sintase (FLS: EC 1.14.11.23 = EC 1.14.20.6), Leucoanthocianidina reductase (LR: EC 1.17.1.3).



Fonte: Adaptado VERHOEYEN et al., 2002.

5.3. Análises de similaridade com genes depositados no GenBank.

As sequencias encontradas que estão relacionadas ao metabolismo secundário de plantas foram obtidas pelo sequenciamento randômico de biblioteca de cDNA ou por meio da busca com sondas específicas. Pela Tabela 04 podemos visualizar que algumas das sequencias identificadas foram depositadas no GenBank.

Tabela 04 - Sequencias de *M. urundeuva* (sinonímia *Astronium urundeuva* (Freire Allemão Engler) depositadas no GenBank, isoladas da biblioteca de cDNA ou com sondas específicas

	EST's	Acession number
1.	<i>Astronium urundeuva</i> voucher 14999 lipoxygenase-like mRNA, partial sequence - 270 bp	MF113377.1 GI:1245697556
2.	<i>Astronium urundeuva</i> voucher 14999 flavonol 3 sulfotransferase mRNA, partial cds - 309 bp	MF101973.1 GI:1245697554
3.	<i>Astronium urundeuva</i> voucher 14999 laccase-like protein mRNA, partial cds - 297 bp	MF078655.1 GI:1245697552
4.	<i>Astronium urundeuva</i> voucher 14999 chalcone-flavonone isomerase-like mRNA, partial sequence - 252 bp	MF078654.1 GI:1245697551
5.	<i>Astronium urundeuva</i> voucher 14999 isoprene sYnthase (ispS) mRNA, partial cds - 201 bp	MF278337.1 GI:1384050479
6.	<i>Astronium urundeuva</i> voucher 14999 flavonoid 3',5'-hidroxilase (F3'5'H) mRNA, partial cds - 240 bp	MF190187.1 GI:1238388649

A seguir estão descritas as análises de algumas das sequencias encontradas no sequenciamento randômico da biblioteca de cDNA e na busca de seqüências com sondas específicas.

ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS ENCONTRADAS COM SONDAS ESPECÍFICAS

5.3.1. CHALCONA ISOMERASE (ARO-CHI)

A seqüência de EST de chalcona isomerase foi identificada por meio da PCR com sonda específica. As análises de similaridade da chalcona isomerase encontrada em *M. urundeuva* com sequencias depositadas no banco de dados do NCBI mostram que o cDNA parcialmente obtido (255 pb) apresenta 91 % de homologia com chalcona isomerase de *Rhus chinensis* (gbAGH13331.1), mesma família Anacardiaceae da aroeira, e 86 % de homologia com chalcone—flavonone isomerase de *Gossypium arboreum* (gbKHG18033.1). A seqüência identificada de chalcona isomerase de *M urundeuva* apresenta o domínio característico da família das chalconas (em destaque)

```

gi|460479700|gb|AGH13331.1|      AIGVYVEDSAVSSLAGKWKGSAEELCESVPPFRDIVTGFPEKFIKRVMTI
ARO-CHI                          -----VAFLRDIVTGFPEKFIKRVMTI
gi|728838590|gb|KHG18033.1|      AIGVYLEDHAVNCLGVKWKGSVELTESVAFFRDVVTGDFEKFIKRVMTI
                                   *.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

```

```

gi|460479700|gb|AGH13331.1|      LPLTGQQYSQKVAENCVAIWKSLGLYTDAESKAIQFLAAFKDENFPPGA
ARO-CHI                          LPLTGQQYSEKVAENCVAIWKSLGLYTDAAEAKAIEQFVEAFKDENFPPGA
gi|728838590|gb|KHG18033.1|      LPLTGQQYSEKVAENCVAIWKSLGIYTDAAEAKAIEKFIKFIKDENFPPGS
*****:*.*:*****:*****:*****:*.*:*****:

```

```

gi|460479700|gb|AGH13331.1|      SILFTLSPLGSLTICFSKDESVEGSGKVVIDNKLLAESVLESIIKNGVSV
ARO-CHI                          SILFTLSP-----
gi|728838590|gb|KHG18033.1|      SILFTISGQGSILTIGFSKDSVPEGGKVVVIEKLLANSVLESIIKNGVSV
*****:*.

```

5.3.2. FLAVONOIDE 3' 5' HIDROXILASE (ARO-F3'5'H)

Esta EST foi identificada por meio da PCR com sonda específica com tamanho de 240 pb. Para a flavanoide 3' 5' hidroxilase as sequências identificadas apresentaram 95 % de identidade com as sequências do NCBI de flavanone 3-hidroxilase de *Pyrus communis* (gbADN03367.1) e flavanone 3'-hidroxilase de *Prunus armeniaca* (gbAGG18093.1). As sequências encontradas apresentaram domínio de 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily, de naringenin, 2-oxoglutarate 3-dioxygenase e oxidase reductase (em destaque).

```

ARO-F3'5'H
gb|ADN03367.1|
gb|AGG18093.1|
-----
-----PDLTLGLKRHTDPGTITLLQLDQVGGGLQATRDDGKWTW
QKVVVNFYPKCPQFDLTLGLKRHTDPGTITLLQLDQVGGGLQATRDDGKWTW

ARO-F3'5'H
gb|ADN03367.1|
gb|AGG18093.1|
----PVEGAFVVNLGDHG-ILSNGRFRKNADHQAVVNSNSRSLI-----
ITVQPVEGAFVVNLGDHGHFLSNGRFRKNADHQAVVNSNSRSLIATFQNP
ITVQPVEGAFVVNLGDHGHLLSNGRFRKNADHQAVVNSNSRSLIATFQNP
***** :*****

ARO-F3'5'H
gb|ADN03367.1|
gb|AGG18093.1|
-----
AQEATVYPLCVREGEKPILEAPITYTEMYKKKMSKDLELARLKLAKQQ
AQEAIVYPLSIREGEKPILEGPITYT-----

```

5.3.3. FLAVONOL SINTASE (ARO-FLS)

Esta sequência foi obtida por meio de PCR utilizando sondas específicas. Possui um tamanho de aproximadamente 400 pb, e o depósito no GenBank está em processo. Possui 86 % de homologia com flavonol sintase/flavanona 3- hidroxilase de *Citrus unshiu*. Possui o domínio de flavonol sintase (PLN02704) como mostrado no alinhamento a seguir:

ARO-FLS 1 YREANEYAKYMKEVVDKLFKFLSLGLGVEGHVLKEASGGEDIEYMLKINFYPPCPRDLALGVVPHDLSITILVPNE 80
 Cdd: PLN02704 155 YREVNEEYAKYLRGVADKLFKTLFSLGLGLEEHELKEAVGGDELEYLLKINIFYPPCPRDLALGVVAHTDMSAITILVPNE 234

ARO-FLS 81 VPGLQVFKDDRWFDAKYIPNALIVHIGDQIE 111
 Cdd: PLN02704 235 VQGLQVFRDDHWFVKYIPNALVIHIGDQIE 265

ANÁLISES DE SEQUENCIAS IDENTIFICADAS NO SEQUENCIAMENTO RANDÔMICO DA BIBLIOTECA DE cDNA.

5.3.4. FLAVONOL 3' SULFOTRANSFERASE (ARO-SULFO)

Esta EST foi identificada por meio do sequenciamento randômico da biblioteca de cDNA e apresenta tamanho de 309 pb. Após a busca de similaridade no banco de dados das sequências obtidas foi identificada a homologia com sequencias de flavonol 3' sulfotransferase de plantas. A sequência isolada demonstrou 67 % de identidade com a sequência putativa de flavonol 3-sulfotransferase de *Ricinus communis* (XP_002527846.1). A sequência de *M. urundeuva* de flavonol 3' sulfotransferase também apresenta o domínio da superfamília de sulfotransferase em destaque.

```

ARO-SULFO          -----LFLKYEEMKEDIKFNVKKMANF
R. comunis        TSLEKAFEMHYKGIHSFGPFCNHVLEYWKASQENPDKVLFLLKYEELKEDIIGCTKKLAEF
                   *****.****   .**.*:*

ARO-SULFO          LGCPFTEDEERQGVIEQISKFCSEFDNLKNLEVNKKGKHPTGFRNDAFFRKGEVGDWKNYL
R. comunis        LGFPFSKDEEEQGIVVEITRICALFENLNLDVNKNGKRPSGAPNDAFFRKGEVGDWSNHL
                   ** *::***.**::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*
                   *****.****

ARO-SULFO          TPSMSDRMEKILEEKFSGSLSF-----
R. comunis        TPSMAERMINLLQEKLKSGSLSFDLCKVQKKA
                   ****:*:** :*:**:*.******

```

5.3.5. LACCASE (ARO-LAC)

No sequenciamento randômico da biblioteca de cDNA de folhas de *M. urundeuva* foram encontradas 4 sequencias que se agruparam em um único contig com homologia encontrada nos bancos de dados do NCBI a laccase-14 de *Vitis vinifera* (XP_002264394.3) com 83 % de identidade e laccase-14-like de *Sesamum indicum* (XP_011074133.1) com 81 % de identidade.

```

ARO-LAC -----EY
Laccase V. vinifera LQAYYYNISGVYGDKFPSPPLVFDFTAE-YPPLKYETPRKGTEVVRVLEY
Laccase S. indicum LQAYYNRIRGVYGDDFPSNPPFTFNQTQOTMLPREWLTPQNGTEVVRVLEY
**

ARO-LAC
Laccase V. vinifera NTTVELVFQGPNLVAGADHPMHLHGHSFYVVGWGFNGFDKQKDPKYNLV
Laccase S. indicum NSTVEIVFQGTNLVAGTDHPMHLHGYSFYVVGWGFNGFDKNRDPLRYNLV
NSTVELVFQGTNLVSGIDHPMHLHGYSFYVVGSGFGNFDRDRDPLNYNLV
*:***.***.***:* *****:***** *****:***.***

ARO-LAC
Laccase V. vinifera DPPLQNTIAVPKNGWAAIRFKAANPGVWFMHCHLERHFTWGMEMAFIVKN
Laccase S. indicum DPPLQNTIAVPKNGWTAIRFKASNPGVWFMHCHLERHLSWGMDTAFIVKN
DPPLQNTIAVPVNGWTAIRFKANNPGVWLLHCHFERHVSWGMEMAFIVKN
***** *:****** *****:***:***.***:*****

ARO-LAC
Laccase V. vinifera GEGPKAKILPPPPDMPQC
Laccase S. indicum GKHPEAQLPPPSDMPPC
*:*.***:****.*

```

5.3.6. AQUAPORIN (ARO-PIP2)

Dentre os transcritos obtidos da biblioteca de *M. urundeuva* foi encontrada uma sequência de aquaporin que possui 100 % de homologia com aquaporin PIP2:2 (*Vitis heyneana* - gbAJZ72653.1) e aquaporin PIP2-7 (*Prunus mume* - XP008236033.1).

```

ARO-PIP2                -----RSFGAAVIYNNEKAWDDQWIFWVGPF
aquaporin V. heyneana   PIGFAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNNEKVVDDQWIFWVGPF
aquaporin P. mume       PIGFAVFIIVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIFNNKAWDDQWIFWVGPF
                        *****:**:*.*****

ARO-PIP2                VGALAAAAYHQYILRAAAIKALGSFRSNPTN
aquaporin V. heyneana   VGALAAAAYHQYILRAAAIKALGSFRSNPTN
aquaporin P. mume       VGALAAAAYHQYILRAAAIKALGSFRSNPTN
                        *****

```

5.3.7. THIOREDOXIN (ARO-THIO)

Análises da biblioteca de *M. urundeuva* identificaram somente uma sequência de thioredoxin com homologia de 77 % thioredoxin H-type-like de *Citrus sinensis* (refXP006473574.1) e 71 % thioredoxin H-type 5 de *Zea mays* (refNP001241730.1).

```

ARO-THIO                -----VEAMPTF
thioredoxin Z. mays     SASWCGPCRFIIEPAFKELASRFTDAIFIKVDVDELAEVARTWKVEAMPTF
thioredoxin C. sinensis TASWCPPCKLMSPIELSELAKKLPAVIFLKVDVDELKSVAEWAVEAMPTF
                        *****

ARO-THIO                VL--EGKLR---IGAKKDELLA-----
thioredoxin Z. mays     VLVKDGKEVGRVIGAKKDELERKIRMFVTSSSSS-----
thioredoxin C. sinensis VLTKEGKVLERIVGAKKDELQLAVEKHATTVENATTANA
                        **  :**      :*****

```

5.3.8. LIPOXIGENASE (ARO-LOX)

Análises da biblioteca de *M. urundeuva* identificaram 1 Contig com 7 sequencias totalizando 1007 pb, com homologia 70 % com linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic-like de *Populus euphratica* refXP_011037885.1 (LOC105134952). Apresenta também parte do domínio de Lipoxygenase PLN02305 (em destaque).

ARO-LOX	258	<u>PQEDNSEEGMEILTGEPEVLLRCFPSQTQAAMVMTVLDVLSNHSPDEEYLGQLAEP</u>	318
		P ED ++E +++ +PEV+LL FPSQ QA VM +LDVLSNHSPDEEYLGQ EP+W	
LOC105134952	774	PTEDPNDETLLKLFWEKPEVILLTTTFPSQIQATTVMAILDVLSNHSPDEEYLGQQIEPSWT	833
ARO-LOX	319	<u>EDPLVKSAFEKFNGLKEFEGLVDERNANREFKNRNGAGIMPYELLKPFSDSGVTGKGV</u>	498
		E+P + +AF KFNG+LKEFEG++DERNA+ + KNRNGAG+MPYELLKPFSD GVTGKGV	
LOC105134952	834	EEPAINAAFAKFNGLKEFEGIIDERNADIKLKNRNGAGVMPYELLKPFSDPGVTGKGV	893
ARO-LOX	499	YSISI 513	
		YSISI	
LOC105134952	894	YSISI 898	

5.3.9. ISOPRENO SINTASE (ARO-ispS)

Análises do sequenciamento randômico da biblioteca de folhas de *M. urundeuva* apresentaram uma sequência de isopreno sintase com tamanho de 201 pb. Esta sequência possui 60 % de homologia com isoprene sintase, chloroplastic de *Glycine max*. Também apresenta parte do domínio de isoprenoide e pertence a classes de terpenóides ciclases de plantas (cd00684).

```

                10      20      30      40      50
                .....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*
ARO-ispS      MNKG-LSDKHPFAEAFLETAISLARIAHCTYQNGDGHGAPDVS AKKRVRSAIIDP 54
Cdd:cd00684  488 LNEEF LKPSSDVPRPIKQRFLNLRVIDVFYKEGDGFTHPEGEIKDHITSLLFEP 542

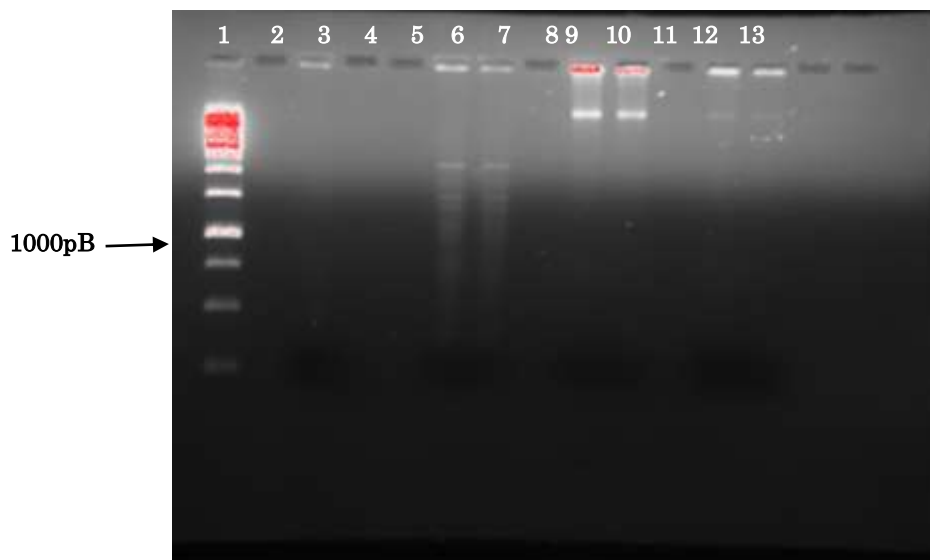
```

5.4. Obtenção de ESTs inteiros por meio da Técnica de RACE

Por meio de estudos das rotas metabólicas para a biossíntese de metabólitos secundários realizados pela Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes e pela Profa. Dra. Suzelei de Castro França foram identificadas algumas enzimas responsáveis pela produção de flavonoides em *M. urundeuva*. Dentre estas enzimas estão as chalcona isomerase, flavonol sintase, flavonol sulfotransferase e flavonoide 3' 5' hidroxilase.

Análises iniciais mostram uma eficiência de amplificação de sequencias utilizando esta técnica conforme podemos visualizar na figura 15. Algumas amplificações foram identificadas na PCR da primeira fita de cDNA do 3' RACE utilizando sondas específicas para flavonol sintase (FLS).

Figura 15 - Amplificações da primeira fita do RACE com sondas específicas para flavonol sintase. Amostras: 1- Marcador de 1 kilobase (Promega); 2- vazio; 3- amplificação 5' RACE; 4-5- vazio; 6-7 amplificação 3' RACE; 8- vazio; 9-10- controle RACE; 11- vazio; 12-13- controle RACE



Após inúmeras reações de PCR e experimentos utilizando a metodologia de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) TakaraBio® pela busca de genes relacionados as enzimas - chaves da rota biossintética de flavonoides em folhas de *M. urundeuva* pudemos identificar uma presença acentuada da expressão gênica da enzima flavonol sintase responsável pela produção de flavonoides do tipo quercetina. Várias propriedades terapêuticas dos flavonoides, principalmente da quercetina, têm sido estudados nas últimas décadas, destacando-se o potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático (BEHLING et al. ,2004).

Por meio da metodologia de RACE e com a disponibilidade de sondas para amplificar a sequência do gene que codifica a enzima flavonol sintase foram realizados vários experimentos para identificar e clonar a sequência inteira do gene que codifica tal enzima. A partir de várias ampliações pela PCR, clonagens e análises por sequenciamento de DNA e busca por homologia com sequências de flavonol sintase depositadas no banco de dados do Genbank, identificamos uma sequência genica relacionada a flavonol sintase quase completa, contendo o domínio conservado e alta homologia com outra flavona sintase (Figura 16).

Figura 16: A – Sequência fasta de nucleotídeos e aminoácidos de flavonol sintase (FLS) de *M. urundeuva*; B – Representação do alinhamento das sequências parciais referentes ao gene parcial de flavonol sintase; C – Representa a homologia do contig de flavonol sintase com outras sequências de flavonol sintase depositadas no banco de dados do NCBI; D – Representa o alinhamento do contig com a sequência de maior homologia no NCBI.

A

>ARO-FLS-CONTIG2 (aminoácido)

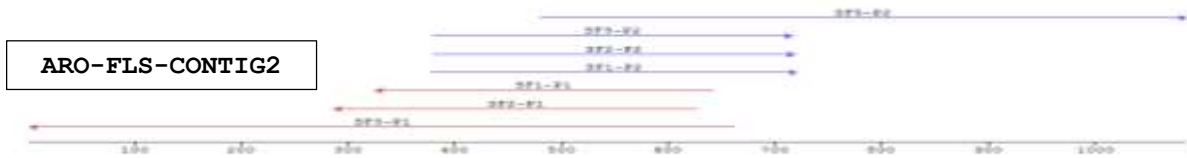
EKEQPAITTYVGPVPEIPTIDLNDPCEENLVRVLAEASREWGIFQVNVNHGIPGDVIRKQLQAAGKEFFELPVEEKE
 VYAKPPGDRSVEGYGSELQIEERGKKSVDHLFHKIWPPSSINYQVWPKNPPYYREATEEYAKYMKEVVDKLF
 TFLSLGLGVEGHVLKEASGGEDIEYMLKINFYPPCPRPDALGVVPHDLSTITILVPNEVPGLQVFKDDRWFDA
 KYIPNALIVHIGDQIEILSNGKYKAVLHRTTVSKEKTRMSWPGFLVPPGECVIGPLPQLVGEYFF

> ARO-FLS-CONTIG2 (nucleotídeo)

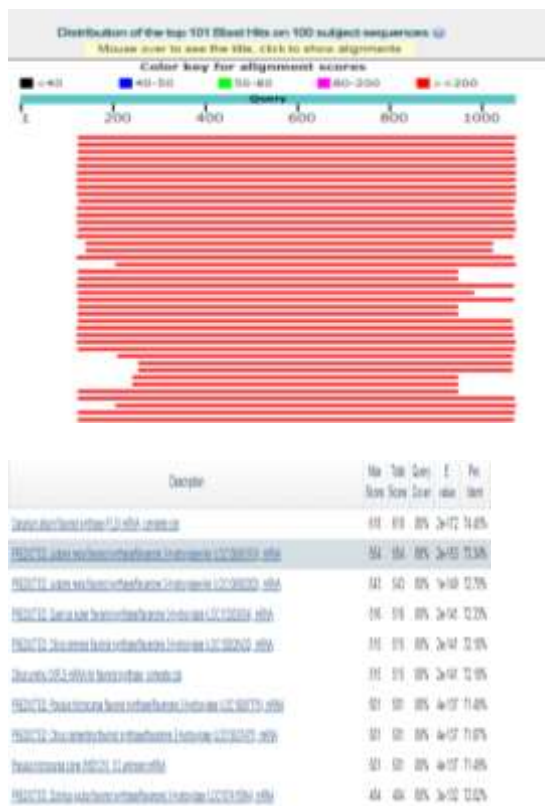
GAGAAAGAGCAGCCTGCAATCACTACATATGTTGGGCCAGTGCCTGAAATCCCCACCATTGATCTCAACGATC
 CTTGCGAAGAGAACCTCGTTCGTCTAGTAGCCGAAGCTAGCCGGGAATGGGGGATTTCCAGGTGGTGAACC
 ATGGAATTCCTGGTGATGTTATAAGGAAATTGCAGGCTGCAGGGAAAGAGTTCTTTGAGCTGCCAGTGGAAGA

AAAAGAAGTATATGCAAAGCCCCAGGAGATAGAAGTGTGTAAGGTTAAGGAAGCGAGCTTCAAATAGAAGA
 AAGAGGGAAAAAATCACGGGTGGATCATTGTTCCATAAGATTTGGCCCCCTTCTTCCATCAATTACCAAGTTT
 GACCTAAAAATCCTCCTTATTACAGGGAGGGCACCAGGAGTACGCAAATACATGAAAGAGGTGGTGGATAA
 GTTGTTTACATTTCTTTATTAGGGTTAGGTGTTGAAGGGCATGTTTTAAAAGAAGCATCTGGTGGTGAAGATA
 TTGAATATATGCTGAAAATAAATTTTTACCCACCATGTCCCTCGTCCAGATCTAGCCCTTGGTGTGTGCTCCAC
 ACTGATCTTTCTACTATCACCATTCTTGTTCCTAATGAAGTCCCTGGACTCCAGGTCTTTAAGGATGATCGTTG
 GTTTGACGCCAAATACATCCCAATGCTCTTATTGTTACATCGGTGATCAGATTGAGATTCTAAGCAATGGCA
 AGTACAAAGCTGTCTTACACAGAACAACGGTGAGCAAGGAGAAGACAAGGATGTCATGGCCAGGGTTTCTAGT
 TCCACCAGGGGAGTGTGTGATTGGTCCACTTCTCAACTTGTGGCGAATACTTTTTT

B



C



D

Canarium album flavonol synthase (FLS) mRNA, complete cds
 Sequence ID: gi|125423247|KY213681.1 Length: 1191 Number of Matches: 1

Range 1: 128 to 1472 GenBank Statistics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
618 bits(585)	2e-172	705/947(74%)	11/947(1%)	Plus/Minus
Query 125	TACTGGGGAATTTATTAAAGTGCATTAATGTATCTGAAAGTGTGTTGACCTTGAT	184		
Subject 1073	TACTGGGGAATTTATTAAAGTGCATTAATGTATCTGAAAGTGTGTTGACCTTGAT	184		
Query 105	TTAGTGAAGAAATATTCSCCAACAGTTSAGSBAATGAGCAATCACACACTCAATG	244		
Subject 1013	TTAGTGAAGAAATATTCSCCAACAGTTSAGSBAATGAGCAATCACACACTCAATG	244		
Query 245	TGGAACTAAGAAACCTGGCCATGACATCCTTGTCTCTCTGTTGTCGACCTGTTG	304		
Subject 054	TGGCCCTAAGAAACCTGGCCATGACATCCTTGTCTCTCTGTTGTCGACCTGTTG	304		
Query 305	NGNMTGNWATCTGCCTTTGTATTTGNCATTTGCTGAGGATCTCAATCTGATCG	364		
Subject 897	---GTGTAACTCAATCCTTGTATTTGNCATTTGCTGAGGATCTCAATCTGATCG	364		
Query 365	TGTGAACTAAGAAACCTGGCCATGACATCCTTGTCTCTCTGTTGTCGACCTGTTG	424		
Subject 844	TGTGAACTAAGAAACCTGGCCATGACATCCTTGTCTCTCTGTTGTCGACCTGTTG	424		
Query 425	CTGGAGTCCAGGACTTCATAGGAAACAGATGAGTGTATGTAAGAAAGTCACTGT	484		
Subject 784	CTGGAGTCCAGGACTTCATAGGAAACAGATGAGTGTATGTAAGAAAGTCACTGT	484		
Query 485	GGACACACCAAGAGGCTTASACTGGACAGGACATGAGTGGTAAATTTATTTTCA	544		
Subject 724	GGACACACCAAGAGGCTTASACTGGACAGGACATGAGTGGTAAATTTATTTTCA	544		
Query 545	TATATTCATATCTTCCAGCCAGATGCTCTTTAAAGATGCTCTTCAACACTTAAC	604		
Subject 604	TATATTCATATCTTCCAGCCAGATGCTCTTTAAAGATGCTCTTCAACACTTAAC	604		
Query 605	CTAATGAAAGAAATTTAAACACTTATCCACACTCTTTCATGATTTTGGTACTCT	664		
Subject 604	CTAATGAAAGAAATTTAAACACTTATCCACACTCTTTCATGATTTTGGTACTCT	664		
Query 665	CGTTACCTTCTCTGTAAGAAAGTGGATTTTGGCCAGAAATTTGTAATGATGAAAG	724		
Subject 544	CGTTACCTTCTCTGTAAGAAAGTGGATTTTGGCCAGAAATTTGTAATGATGAAAG	724		
Query 725	GGGCTTATCTTATGAAAGAAATGATCAGCCCACTTCTTCTCTGAGGCTCTTTT	784		
Subject 484	GGGCTTATCTTATGAAAGAAATGATCAGCCCACTTCTTCTCTGAGGCTCTTTT	784		
Query 785	GAAGCTGCTTCTTAACTTCAACACTTCTATCTCCGAGGCTTTCAGATGACTTCT	844		
Subject 424	GAAGCTGCTTCTTAACTTCAACACTTCTATCTCCGAGGCTTTCAGATGACTTCT	844		
Query 845	TTCTCTTCCAGTGGCTCAAGAACTCTTCCCTGCACTCTGCAATTTCTTATGAT	904		
Subject 304	TTCTCTTCCAGTGGCTCAAGAACTCTTCCCTGCACTCTGCAATTTCTTATGAT	904		
Query 905	CACCAAGAAATTCATGTTTCAACACTTCAAGAAATTTCCCTTCCAGGCTTTCAG	964		
Subject 384	CACCAAGAAATTCATGTTTCAACACTTCAAGAAATTTCCCTTCCAGGCTTTCAG	964		
Query 965	CTAAGCAATGATGTTTCAACACTTCAAGAAATTTCCCTTCCAGGCTTTCAG	1024		
Subject 244	CTAAGCAATGATGTTTCAACACTTCAAGAAATTTCCCTTCCAGGCTTTCAG	1024		
Query 1025	CTGGCCCAACATATGATGATGATGCAAGGCTCTTCTTCAAGTCTA	1084		
Subject 184	CTGGCCCAACATATGATGATGATGCAAGGCTCTTCTTCAAGTCTA	1084		

A sequência identificada possui 798 pb e após análises no programa ClustalX baseado no alinhamento com outras sequências de nucleotídeos e aminoácidos depositadas no NCBI observamos que a sequência completa deveria ter 1011 pb, portanto para completar a sequência faltam de 213 pb. Nas análises observamos a ausência de 81 pb na porção 5' e 132 pb na porção 3' do gene expresso quando comparado a sequência de maior homologia (flavonol sintase de *Canarium album* - KY213691.1). Como as enzimas – chaves das vias de biossíntese de flavonoides em plantas são altamente conservadas, identificamos as melhores regiões complementares a sequência parcial de flavonol sintase de folhas de *M. urundeuva* para obtermos o gene completo para expressão heteróloga e comprovação da funcionalidade do gene. Baseado na sequência de aminoácidos de flavonol sintase foram identificados os códons mais usados em cada espécie para escolher a porção de nucleotídeos ideal para completar a sequência parcial de flavonol sintase de *M. urundeuva* (Figura 17).

Figura 17: Alinhamento múltiplo no programa ClustalX da sequência parcial de flavonol síntese de *M. urundeuva* (ARO-FLS-CONTIG 2) e da sequência completa de flavonol sintase de *C. album* (KY213691.1). Em destaque a inserção sintética da sequência de nucleotídeos.

```

KY213691.1      ---ATGGAGGTAGAGACAAGGGTACAAGCAATTGCTTCGTTGTCATTTTTGAATGACACA
ARO-FLS-CONTIG2 -----

KY213691.1      ATTCCTTCTGAGTTCATTAGACCTGAGCAGGAACAGCCTGCACTCACTACCTATCACGGG
ARO-FLS-CONTIG2 -----GAGAAAGAGCAGCCTGCAATCACTACATATGTTGGG
                        *** * ** ***** ***** **
KY213691.1      TCGGTGCCTGATATTCCAATAATCGATTGAATGACCCCAAGAAGAACATCTCGTGCGT
ARO-FLS-CONTIG2 CCAGTGCCTGAAATCCCACCATTGATCTCAACGATCCTTGCGAAGAGAACCCTCGTTCGT
                        ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
KY213691.1      TCAGTTGCCAAAGCTAGCCAAGAGTGGGGGATATCCAGGTAATAAACCTGGAATACCT
ARO-FLS-CONTIG2 CTAGTAGCCGAAGCTAGCCGGGAATGGGGGATTTCCAGGTGGTGAACCATGGAATTCCT
                        *** ** ***** ** ***** ***** * ***** **
KY213691.1      AGCGATCTTATAGCTAAATTGCAGGCAGTTGGCAAAGAATTTTTGAGCTTCCTCAGGAA
ARO-FLS-CONTIG2 GGTGATGTTATAAGGAAATTCAGGCTGCAGGAAAGAGTTCTTTGAGCTGCCAGTGAA
                        * *** ***** ***** * ** ***** ** ***** **
KY213691.1      GAGAAAGAGGCTTATGCTAAGCCACCTGACGCACAAAGTGTGAAGGGTATGGTAGCAA
ARO-FLS-CONTIG2 GAAAAGAAGTATATGCAAAGCCCCAGGAGATAGAAGTGTGAAGGGTATGGAAGCGAG
                        ** ***** * ***** ***** ** * * ***** ***** **
KY213691.1      CTCCAAAAGGACCTTCAAGGAAAGAAAGTTGGGCTGATCATCTTTTCATAAGATTTGG
ARO-FLS-CONTIG2 CTTCAAATAGAAGAAAGAGGGAAAAAATCACGGGTGGATCATTTGTTCCATAAGATTTGG
                        ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **
KY213691.1      CCTCCTTCTTGATCAATTACAAATTCCTGGCCAAAAATCCACCTTCTTACAGAGAAGTT
ARO-FLS-CONTIG2 CCCCTTCTTCCATCAATTACCAAGTCTGGCCTAAAAATCCTCCTTATTACAGGGAGGCG
                        ** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** **
KY213691.1      AACGAAGAGTATGCAAATACTTGAGAGGAGTAGTAAACAAGTTGTTTACACTTCTTTCA
ARO-FLS-CONTIG2 ACCGAGGATACGCAAATACATGAAGAGGTGGTGGATAAGTTGTTTACATTTCTTTCA
                        * *** ***** ***** ** * ***** ** * ***** *****
KY213691.1      CTAGGGTTAGATCTTGAAGCAATGCGCTAAAAGAAGCAGCGGAGGTGAAGAGATGGAA
ARO-FLS-CONTIG2 TTAGGGTTAGGTGTTGAAGGCATGTTTAAAAGAAGCATCTGGTGGTGAAGATATTGAA
                        ***** * ***** * ** ***** ***** * ** ***** **
KY213691.1      TATGTCTTGAATAAATACTATCCACCGTGCCTCGGCCTGATCTCGCACTTGGAGTG
ARO-FLS-CONTIG2 TATATGCTGAAAATAAATTTTACCACCATGTCCTCGTCCAGATCTAGCCCTTGGTGT
                        *** * ***** ** ***** ** ***** ** ***** **
KY213691.1      GTGGCTCACACTGATCTGTCTTCCATTACCATTCTTGTACCTAATCAAGTCCAGGACTC
ARO-FLS-CONTIG2 GTCCTCACACTGATCTTTCTACTATCACCATCTTGTTCCTAATGAAGTCCCTGGACTC
                        ** ***** ** * ** ***** ***** ***** **
KY213691.1      CAAGTGCTCAAAGATGAACGTTGGATAGACGCTAAGTACATCCCCAACGCCCTTATTATC
ARO-FLS-CONTIG2 CAGGTCTTAAAGGATGATCGTTGGTTGACGCCAAATACATCCCCAATGCTCTTATTGTT
                        ** * * ***** ***** * ***** ***** ** ***** *
KY213691.1      CACATCGGTGATCAGATTGAGATTCTCAGCAATGGGAAATACAAGCTGTGTTACACAGA
ARO-FLS-CONTIG2 CACATCGGTGATCAGATTGAGATTCTAAGCAATGGCAAGTACAAGCTGTCTTACACAGA
                        ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
KY213691.1      ACAACTGTTGACAAGGAGAAGACGAGGATGCTTTGGCCAGTGTTTCTTAGGCCACCGAGA
ARO-FLS-CONTIG2 ACAACGGTGAGCAAGGAGAAGACAAAGGATGTCATGGCCAGG
                        ***** ** ***** ***** *****
KY213691.1      GAGTTGGTGGTGGCTCCACTTGTCAACTTGTTAGCGAAGATAATCCACCAAGTATAAA
ARO-FLS-CONTIG2 -----

KY213691.1      CCCAAGAAATTCAAGGATTACGCCATTGTAACTTAACAACTTCCCCAGTAA
ARO-FLS-CONTIG2 -----

```

Como resultado obtivemos uma sequência completa do gene relacionado a enzima flavonol sintase, com tamanho de 1011 pb, responsável pela produção de derivados de quercetina em aroeira do sertão. Esta sequência foi identificada com ARO-FLS-SINETICA (Figura 18) e a síntese bioquímica desta foi realizada pelo laboratório especializado da empresa GeneScript.

Figura 18: Sequência completa sintética de nucleotídeos de flavonol sintase de folha de *Myracrodruon urundeuva* (ARO-FLS-SINETICA)

```

ATGGAGGTAGAGACAAGGGTACAAGCAATTGCTTCGTTGTCATTTTTGAATGACACAATTCCTTC
TGAGTTCATTAGACCTGAGCAGGAGCAGCCTGCAATCACTACATATGTTGGGCCAGTGCCTGAAA
TCCCCACCATTGATCTCAACGATCCTTGCGAAGAGAACCCTCGTTCGTCTAGTAGCCGAAGCTAGC
CGGGAATGGGGGATTTTCCAGGTGGTGAACCATGGAATTCCTGGTGATGTTATAAGGAAATTGCA
GGCTGCAGGGAAAGAGTTCTTTGAGCTGCCAGTGAAGAAAAAGAAGTATATGCAAAGCCCCCA
GGAGATAGAAGTGTTGAAGGGTATGGAAGCGAGCTTCAAATAGAAGAAAGAGGGAAAAAATCAC
GGGTGGATCATTGTTCATAAGATTTGGCCCCCTTCTTCCATCAATTACCAAGTCTGGCCTAAAA
ATCCTCCTTATTACAGGGAGGCGACCGAGGAGTACGAAAATACATGAAAGAGGTGGTGGATAA
GTTGTTTACATTTCTTTCATTAGGGTTAGGTGTTGAAGGGCATGTTTTAAAAGAAGCATCTGGTG
GTGAAGATATTGAATATATGCTGAAAATAAATTTTTACCCACCATGTCCTCGTCCAGATCTAGCCC
TTGGTGTGTCCCTCACACTGATCTTTCTACTATCACCATTCTTGTTCCTAATGAAGTCCCTGGAC
TCCAGGTCTTTAAGGATGATCGTTGGTTTGACGCCAAATACATCCCCAATGCTCTTATTGTTTACA
TCGGTGATCAGATTGAGATTCTAAGCAATGGCAAGTACAAAGCTGTCTTACACAGAACAACGGTG
AGCAAGGAGAAGACAAGGATGTCATGGCCAGTGTCTTAGAGCCACCGAGAGAGTTGGTGGTGG
CTCCACTTGTTCAACTTGTTAGCGAAGATAATCCACCAAAGTATAAACCCAAGAAATTCAAGGATT
ACGCCTATTGTAACTTAACAACTTCCCCAGTAA

```

5.5. Expressão do gene de flavonol sintase em plantas de *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*.

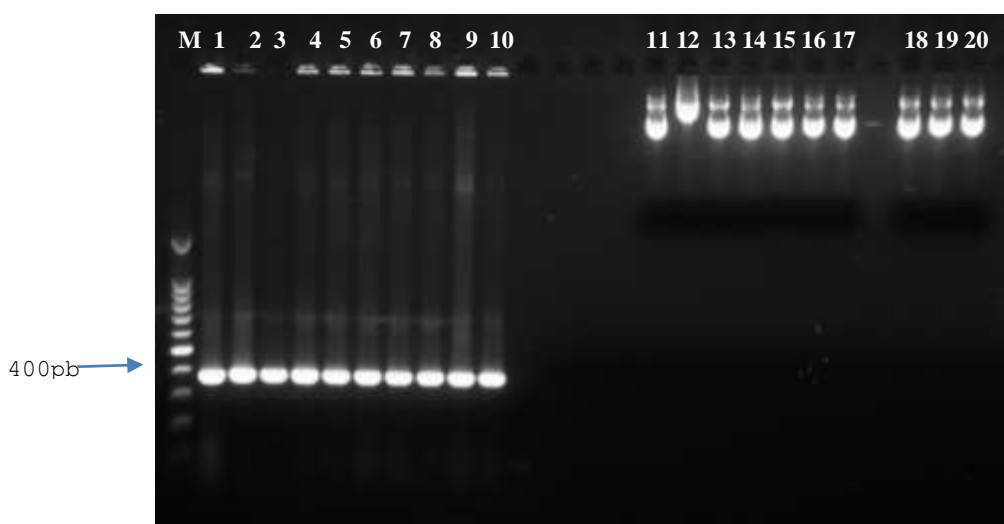
A sequência sintética de flavonol sintase (ARO-FLS-SINTETICA) foi construída incluindo nas extremidades 5' e 3' do gene sítios de restrição das enzimas SacI/Bam HI e a clonagem do gene foi realizada no vetor pUC57, conforme identificado na Figura 19. Portanto a sequência de nucleotídeos passou a ter um tamanho de 1023 pb. Esta construção passou a ser chamada de pUC57+FLS.

Figura 19: Sequência completa sintética de nucleotídeos de flavonol sintase de folha de *Myracrodruon urundeuva* com os sítios de restrição das enzimas SacI/Bam HI.

5' GAGCTCATGGAGGTAGAGACAAGGGTACAAGCAATTGCTTCGTTGTCATTTTTGAATGACAC
 AATTCCTTCTGAGTTCATTAGACCTGAGCAGGAGCAGCCTGCAATCACTACATATGTTGGGCCA
 GTGCCTGAAATCCCCACCATTGATCTCAACGATCCTTGCGAAGAGAACCCTCGTTCGCTCTAGTAG
 CCGAAGCTAGCCGGGAATGGGGGATTTCCAGGTGGTGAACCATGGAATTCCTGGTGATGTTAT
 AAGGAAATTGCAGGCTGCAGGGAAAGAGTCTTTGAGCTGCCAGTGGAAGAAAAGAAGTATAT
 GCAAAGCCCCCAGGAGATAGAAGTGTGGAAGGGTATGGAAGCGAGCTTCAAATAGAAGAAAGAG
 GGAAAAATCACGGGTGGATCATTGTTCCATAAGATTTGGCCCCCTTCTCCATCAATTACCA
 AGTCTGGCCTAAAAATCCTCCTTATTACAGGGAGGCGACCGAGGAGTACGAAAATACATGAAA
 GAGGTGGTGGATAAGTTGTTTACATTTCTTTCATTAGGGTTAGGTGTTGAAGGGCATGTTTTAA
 AAGAAGCATCTGGTGGTGAAGATATTGAATATATGCTGAAAATAAATTTTTACCCACCATGTCC
 TCGTCCAGATCTAGCCCTTGGTGTGTTGCCCTCACACTGATCTTTCTACTATCACCATTCTTGTT
 CCTAATGAAGTCCCTGGACTCCAGGTCTTTAAGGATGATCGTTGGTTTGACGCCAAATACATCC
 CCAATGCTCTTATTGTTTACATCGGTGATCAGATTGAGATTCTAAGCAATGGCAAGTACAAAGC
 TGTCTTACACAGAACAACGGTGAGCAAGGAGAAGACAAGGATGTCATGGCCAGTGTTCCTTAGAG
 CCACCGAGAGAGTTGGTGGTGGCTCCACTTGTCAACTTGTAGCGAAGATAATCCACCAAAGT
 ATAAACCCAAGAAATTCAAGGATTACGCCTATTGTAAACTTAACAAACTTCCCCAGTAAGGATC
 C3'

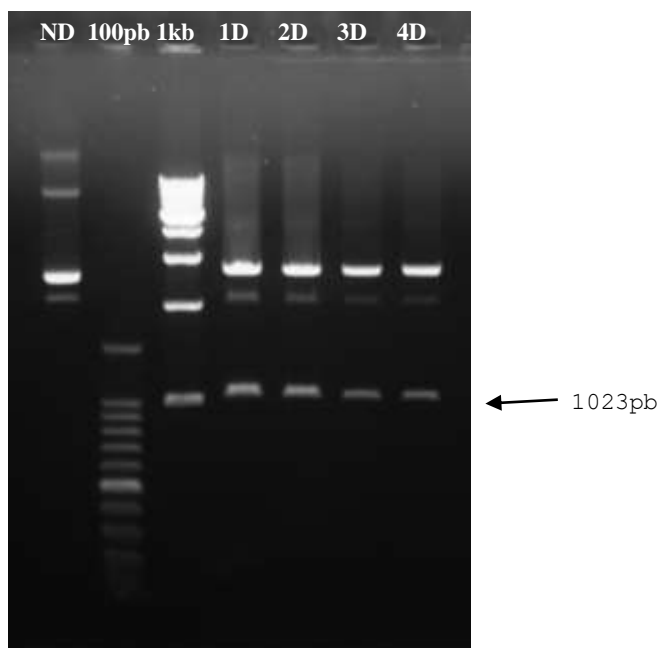
Após a transformação genética foi realizada a extração do DNA plasmidial e em seguida a presença do gene clonado no vetor pUC57 foi confirmada por meio de reações de PCR utilizando *primers* específicos para o gene que amplificam um fragmento de 400 pb conforme podemos observar na Figura 20.

Figura 20: Gel de agarose a 1,2 %. A – Amplificação da banda de 400 pb de flavonol sintase a partir dos plasmídeos (pUC57+FLS) obtidos. M = marcador de 100 pb e amostras de 1 a 10 plasmídeos amplificados. B – Amostras de DNA plasmidial de pUC57+FLS (11-20).



Os plasmídeos pUC57+FLS que apresentaram na PCR a banda de tamanho do esperado (400 pb) para flavonol sintase foram submetidos a uma reação de digestão com as enzimas de restrição SacI e BamHI para confirmar o tamanho esperado do fragmento clonado no pUC57. Como podemos visualizar na Figura 21 a digestão dos plasmídeos resultou na liberação do fragmento inserido de 1023 pb.

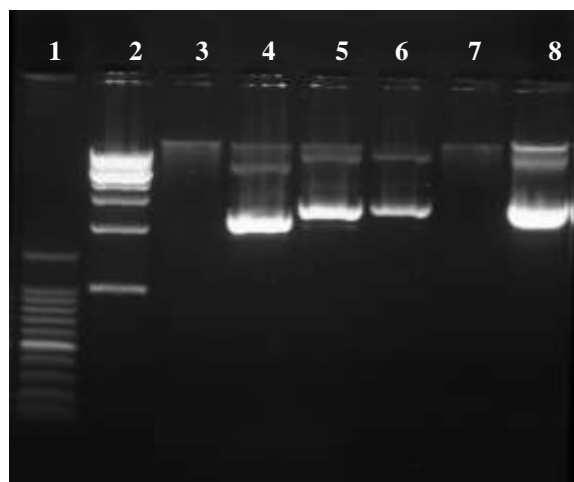
Figura 21: Gel de agarose a 0,8 % da digestão dos plasmídeos pUC57+FLS com as enzimas de restrição Sac I e Bam HI. ND = plasmídeo pUC57+FLS sem digerir, 100 pb = marcador, 1 kb = marcador, amostras 1D, 2D, 3D e 4D são plasmídeos pUC57+FLS digeridos com as enzimas SacI e BamHI



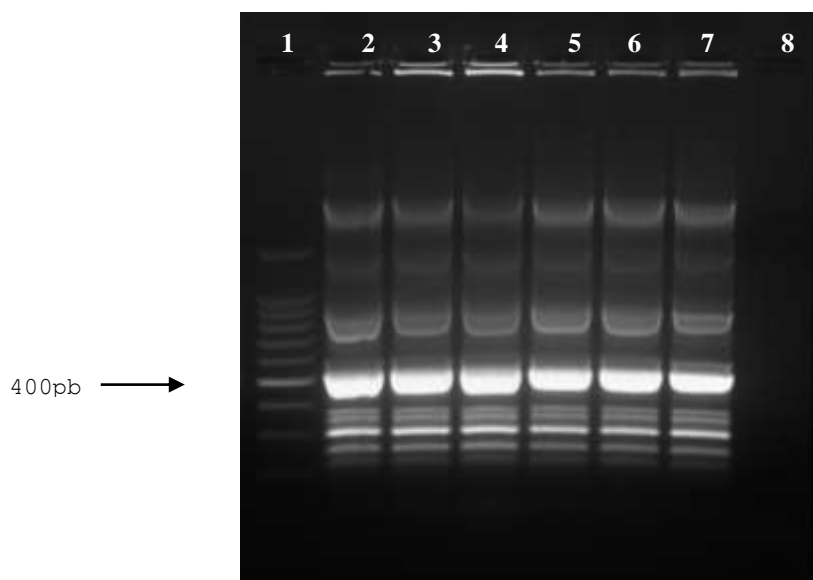
O fragmento resultante da digestão dos plasmídeos pUC57+FLS com as enzimas de restrição Sac I e Bam HI referente a flavonol sintase com 1023pb (ARO-FLS-SINTETICA) foi utilizado para a primeira clonagem usando o vetor pRT104 formando um cassete de expressão denominado pRT104+FLS. Após a transformação por choque térmico alguns transformante foram selecionados e os plasmídeos foram isolados (figura 22-A). As colônias transformadas foram analisadas pela técnica de PCR (figura 22 - B) e a análise dos plasmídeos pRT104+FLS foi realizada e por digestão com as enzimas de restrição SacI e BamHI (Figura 23).

Figura 22: **A** - Gel de agarose a 0,8 % da extração dos plasmídeos pRT104+FLS. Amostra 1 = marcador de 100 pb, amostra 2 = marcador de 1kb, amostras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 = plasmídeos pRT104+FLS; **B** - Gel de agarose a 1,2 % dos produtos de PCR das colônias dos transformante de pRT104+FLS. Amostra 1 = marcador de 100 pb, amostras 2 a 7 colônias amplificadas e amostra 8 = branco.

A



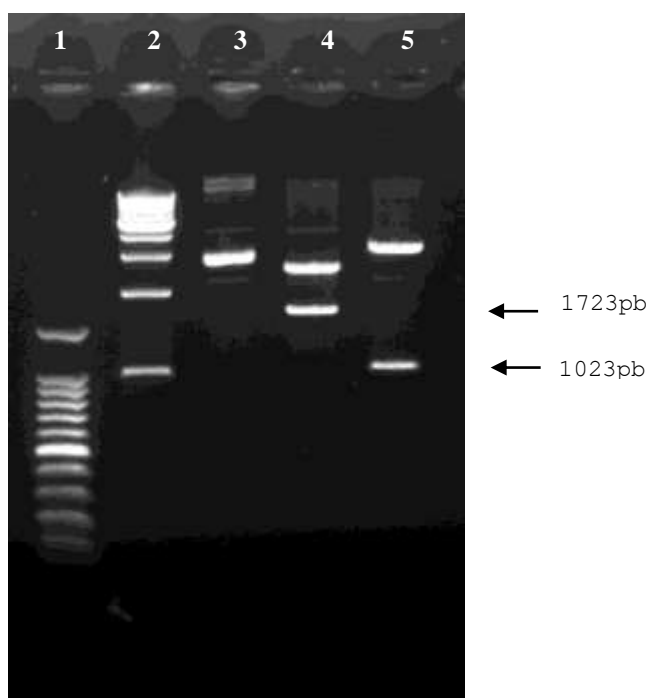
B



A digestão do plasmídeo pRT104+FLS com a enzima de restrição Hind III liberou um fragmento que é resultante da ligação do gene completo

de flavonol sintase 1023pb com 700pb da região promotora do vetor pRT104 (Figura 23).

Figura 23: Gel de agarose a 0,8 % da digestão do plasmídeo pRT104+FLS com enzimas de restrição SacI e BamHI e com a enzima de restrição HindIII. Amostra 1 = marcador de 100 pb; amostra 2 = marcador de 1 kb; amostra 3 = plasmídeo não digerido; amostra 4 = plasmídeo digerido com a enzima de restrição HindIII; amostra 5 = plasmídeo digerido com as enzimas de restrição SacI e BamHI.



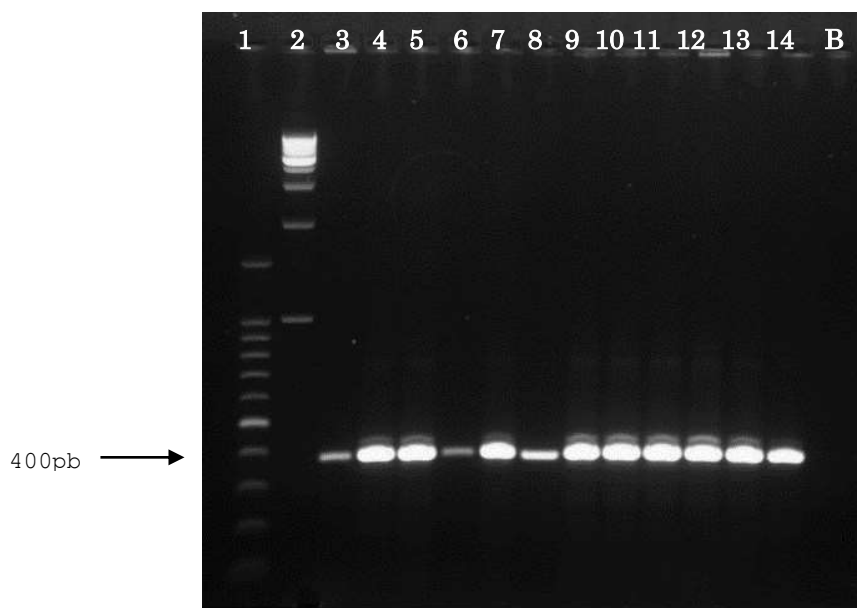
Confirmada a presença do cassete de expressão nos plasmídeos (Figura 24) o cassete de expressão foi isolado em gel de agarose e purificado e inserido no vetor de expressão binário pCAMBIA 2301 que foi linearizado com a enzima de restrição HindIII.

Figura 24: Seqüência de DNA representativa do cassete de expressão pRT104+FLS. Em destaque os sítios de restrição das enzimas HindIII, SacI, BamHI e HindIII, respectivamente. A seqüência do gene de flavonol sintase está sublinhada.

1... **AAGCTT**GCATGCCTGCAGGTCAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTAC
 TCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAGAGGGCTATTGAGACTTT
 TCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC
 GTCACCTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGATGGCTTCTACAAATGCCAT
 CATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGAATGCCTCTTACCGACAAGTGG
 TCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGGGAACATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCC
 AACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGTATCTCCACTGACGTAAGGGA
 TGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTC
 ATTTCAATTTGGAGAGGACCTCGAGGGCCCATGGGC **GAGCTC**ATGGAGGTAGA
GACAAGGGTACAAGCAATTGCTTCGTTGTCAATTTTGAATGACACAATTCCTTC
TGAGTTCATTAGACCTGAGCAGGAGCAGCCTGCAATCACTACATATGTTGGGC
CAGTGCCTGAAATCCCCACCATGATCTCAACGATCCTTGCGAAGAGAACCTC
GTTTCGTCTAGTAGCCGAAGCTAGCCGGGAATGGGGGATTTTCCAGGTGGTGA
ACCATGGAATTCCTGGTGATGTTATAAGGAAATTGCAGGCTGCAGGGAAAGAG
TTCTTTGAGCTGCCAGTGGAAGAAAAAGAAGTATATGCAAAGCCCCCAGGAGA
TAGAAGTGTGAAAGGGTATGGAAGCGAGCTTCAAATAGAAGAAAGAGGGAAA
AAATCACGGGTGGATCATTTGTTCCATAAGATTTGGCCCCCTTCTTCCATCAAT
TACCAAGTCTGGCCTAAAAATCCTCCTTATTACAGGGAGGCGACCGAGGAGTA
CGCAAATAACATGAAAGAGGGTGGTGGATAAGTTGTTTACATTTCTTTCATTAG
GGTTAGGTGTTGAAGGGCATGTTTTAAAAGAAGCATCTGGTGGTGAAGATATT
GAATATATGCTGAAAATAAATTTTTACCCACCATGTCCTCGTCCAGATCTAGCC
CTTGGTGTGTTGCCCTCACACTGATCTTTCTACTATCACCATTTCTTGTTCCTAAT
GAAGTCCCTGGACTCCAGGTCTTTAAGGATGATCGTTGGTTTGACGCCAAATA
CATCCCCAATGCTCTTATTGTTACATCGGTGATCAGATTGAGATTCTAAGCAA
TGGCAAGTACAAAGCTGTCTTACACAGAACAACGGTGAGCAAGGAGAAGACA
AGGATGTCATGGCCAGTGTCTTAGAGCCACCGAGAGAGTTGGTGGTGGCTCC
ACTTGTCAACTTGTTAGCGAAGATAATCCACCAAAGTATAAAACCAAAGAAATT
CAAGGATTACGCCTATTGTAAACTTAACAAACTTCCCCAGTAA **GGATCC** TCTA
 GAGTCCGCAAATCACAGTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTTCTCC
 AGAATAATGTGTGAGTAGTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTT
 TCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAA
 ATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTGACCTGCA
 GGCATGC **AAGCTT**.1713

A ligação pCAMBIA + FLS foi transformada em células de *E. coli* por choque térmico resultando em 12 transformantes que foram selecionados e os plasmídeos foram isolados e analisados por PCR (Figura 25).

Figura 25: Gel de agarose a 1,2 % dos produtos de PCR das colônias dos transformante de pRT104+FLS. Amostra 1 = marcador de 100 pb; amostra 2 = marcador de 1 kb; amostras 3 a 14 colônias amplificadas com primer específico; e amostra 15 = branco.

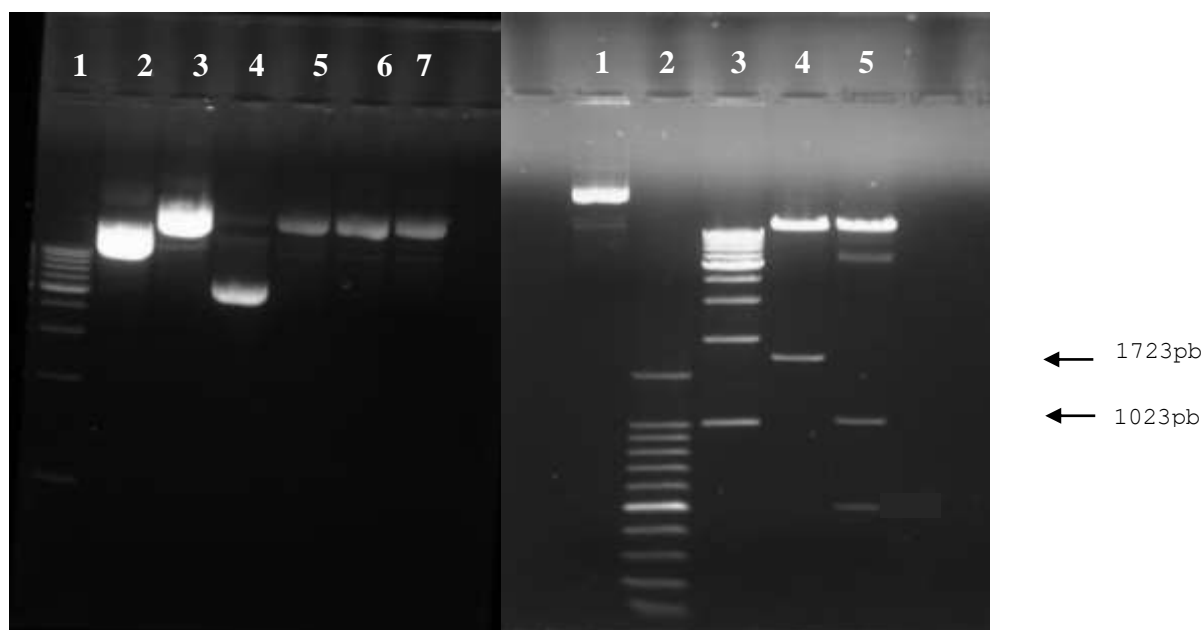


Algumas colônias foram escolhidas para a extração de DNA plasmidial e analisadas por digestão com a enzima de restrição HindIII (Figura 26 A e B) confirmando a inserção do cassete de expressão no vetor de expressão pCAMBIA2301.

FIGURA 26: A – Gel de agarose a 0,8 % da extração de DNA dos plasmídeos pCAMBIA2301 + FLS. Amostra 1 = marcador de 100 pb, amostras 2 a 7 = plasmídeos pCAMBIA2301 + FLS; B – Digestão do plasmídeo pCAMBIA2301 + FLS com as enzimas de restrição SacI e BamHI e com a enzima de restrição HindIII. Amostra 1 = plasmídeo não digerido, amostra 2 = marcador de 100 pb, amostra 3 = marcador de 1 kb, amostra 4 = plasmídeo digerido com a enzima de restrição HindIII; amostra 5 = plasmídeo digerido com as enzimas de restrição SacI e BamHI.

A

B



O plasmídeo pCAMBIA2301 + FLS com o cassete de expressão completo foi utilizado para a transformação de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*. Após a eletroporação as colônias obtidas foram analisadas quanto a presença do plasmídeo pCAMBIA+FLS por extração de DNA plasmidial e PCR com *primers* específicos para flavonol sintase. Após a

confirmação da transformação genética em *Agrobacterium tumefaciens* foi realizada a infecção de plântulas de tabaco que estão sendo cultivadas em meio MS basal suplementado com 20 g/L de sacarose pH 5,7 (Figura 27) para posterior análises fitoquímicas quanto a overexpressão de flavonoides em plântulas tabaco.

Figura 27: Plantas de tabaco cultivadas *in vitro*. A – Plantas controle; B – Plantas infectadas com *A. tumefaciens* contendo o cassete de expressão

A



Fonte: (Arquivo pessoal)

B



Fonte: (Arquivo pessoal)

O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra.

(Aristóteles, filósofo grego – 384-322 a.C.)

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A crescente demanda por produtos naturais farmacologicamente ativos, isolados de plantas medicinais com potencial biotecnológico, tem induzido os pesquisadores a procurarem vias alternativas para a produção contínua e monitorada destes ativos. A manipulação genética de culturas *in vitro* de células e órgãos de plantas surge como ferramenta tecnológica muito útil para a regulação de vias metabólicas de interesse direcionando assim como o fluxo metabólico para a biossíntese de moléculas bioativas em plantas.

Genes codificadores de enzimas chaves de diversas vias do metabolismo secundário de plantas têm sido identificados em diferentes plantas através de técnicas de biologia molecular com o uso de sondas (fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos sintéticos) específicas para cada tipo de enzima. Alguns trabalhos têm investigado genes que codificam proteínas regulatórias e estruturais da via biossintética de flavonoides (BOGS et al., 2006; SALAKKA; JOKELA; WAHALA, 2006; ALMEIDA JR et al., 2007). Em *Arabidopsis*, por exemplo, foram identificados genes correlacionados a sete classes de proteínas: chalcona sintase, chalcona isomerase, flavona 3-hidroxilase, flavanona 3-hidroxilase, flavonol sintase, dihidro flavonol redutase e leucocianina dioxigenase (SAITO, et al., 2013).

Técnicas de análise da expressão coordenada de genes codificadores das enzimas reguladoras do metabolismo secundário em plantas medicinais ainda são pouco exploradas, sendo que o mesmo apresenta uma complexa regulação com inúmeras ramificações nas vias principais da biossíntese das diferentes classes de metabólitos secundários (RALSTON et al., 2005). Uma

estratégia para a elucidação de genes é a construção de bibliotecas genômicas e de cDNAs para busca de sequências codificadoras de interesse, e a clonagem destes genes em sistemas procarióticos e eucarióticos para comprovação de seu papel funcional na rota de biossíntese.

A via de fenilpropanoides tanto em leguminosas como em espécies de outras famílias de plantas tem múltiplas ramificações pelas quais é realizada a biossíntese de numerosos compostos como ligninas, antocianinas, isoflavonoides e certas classes de fitoalexinas. Tais compostos desempenham papéis bioquímicos durante o desenvolvimento normal, assim como servem como protetores contra agentes causadores de estresse ambiental (DIXON & PAIVA, 1995). A expressão de genes codificadores de enzimas desta via é regulada conforme o estágio de desenvolvimento da espécie sendo ainda órgão específico. A expressão coordenada de grupos específicos de genes pode ser induzida em situações de estresse ambiental tais como deficiência nutricional, geadas, seca prolongada, ataque de patógenos e exposição à radiação UV (DIXON & PAIVA, 1995).

Diversos trabalhos (NAPOLEÃO et al., 2012 e 2013; FIGUEREDO et al., 2014; CECILIO et al., 2016; MOTA et al., 2015 e SILVA et al., 2011) reportaram análises fitoquímicas bem como diversas atividades farmacológicas em diferentes extratos de *Myracrodruon urundeuva*. As lectinas isoladas de folhas de *M. urundeuva* apresentaram atividade anti-helmíntica, larvicida e inseticida. O extrato de folhas de aroeira-do-setão apresentou atividade bacteriana contra *Staphylococcus*. Em 2014, Figueredo et al., analisaram o perfil químico de extratos das folhas de *M. urundeuva* e

demonstraram a presença de taninos hidrolisáveis, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, catequinas, leucoantocianidinas.

Estudos metabolômicos realizados por Silva et al., 2008, com a planta *Myracrodruon urundeuva*, mostraram a presença de importantes flavonoides, dentre eles a quercetina, que possui alta atividade anti-inflamatória. Em 2003, Viana et al., correlacionaram as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas exibidas por extratos de cascas do caule de *M. urundeuva* com algumas classes de metabólitos caracterizados como flavonoides, dentre eles chalconas diméricas específicas dessa espécie, denominadas urundeuvinas. Estudos relacionados ao fracionamento químico do extrato em acetato de etila de *M. urundeuva* demonstraram a presença de duas frações principais, uma fração enriquecida em compostos chalcônicos e outra com a predominância de taninos catéquicos e pirogalicos (BANDEIRA et al., 1993). Na fração enriquecida de chalconas há o predomínio de três chalconas: urundeuvina A, urundeuvina B e urundeuvina C. As chalconas diméricas encontradas em *M. urundeuva* são do tipo heterodiméricas. Este tipo de chalcona tem sido encontrado em outras plantas e podem se apresentar na forma heterodiméricas ou homodiméricas. A presença de chalconas diméricas tem sido relatada em outras plantas que não pertencem a família Anacardiaceae como a *M. urundeuva*. Em *Mallotus philippensis* a kamalachalcone que é uma chalcona dimérica apresenta ação antifúngica (KULKARNI et al., 2014). As chalconas diméricas de *Agapanthus africanus* são usadas para induzir o trabalho de parto (KAMARA et al., 2005). Já em

Lophira alata (ABDERAMANE et al., 2011) a chalcona dimérica bongosin, produzida por esta planta, apresenta efeitos antissépticos. No extrato etanólico das folhas e do caule de *Cobretum yunnanensis* (DAWE et al., 2013) também foram isoladas chalconas diméricas com atividades anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas.

Elucidar a regulação gênica da rota de biossíntese de chalconas diméricas em plantas de *M. urundeuva* é um grande desafio em razão da complexa regulação catalítica com precursores sendo utilizados como substrato por diversas enzimas nas ramificações da rota principal, cooperando para a biossíntese de várias classes de flavonoides bioativos.

A identificação de genes correlacionados com enzimas chaves no direcionamento do fluxo biossintético para a síntese de chalconas e outros derivados bioativos de *M. urundeuva*, com importantes atividades farmacológicas como é o caso do biflavonoide agathisflavone, quercitrina e quercetina, tornou-se então o objetivo primordial desse trabalho.

Como resultado do sequenciamento randômico de cDNAs de biblioteca de cDNA de *M. urundeuva*, foram identificadas sequências de ESTs relacionados a importantes micromoléculas produzidas pelas plantas, como metalotioneínas com papel importante na resistência ao estresse oxidativo e defensinas que são peptídeos antimicrobianos atuantes na defesa das plantas contra o ataque de microrganismos. Também foram identificadas sequências codificadoras de nodulinas, proteínas envolvidas com o processo de fixação de nitrogênio nas plantas; proteínas do tipo aquaporinas, relacionadas ao transporte de proteínas de membrana; calmodulinas (CaM),

proteína encontrada no interior das células eucariotas e que tem como função detectar e ligar-se aos íons de cálcio (Ca^{2+}) presentes no citoplasma e, em seguida, interagir e regular a função de diversas proteínas alvo da célula; ciclofilinas, enzimas do tipo isomerasas que estão envolvidas em diversos processos celulares como a apoptose celular; lipoxigenases, enzimas que catalisam a oxidação - redução de ácidos graxos poli-insaturados, produzindo hidroperóxidos através da incorporação de um oxigênio molecular; lacases, enzimas do tipo oxidase que usam cobre como co-fator, e são encontradas em muitas plantas, desempenhando um papel na formação de lignina, fungos e diversos microrganismos. As proteínas do tipo tioredoxina também foram identificadas na biblioteca de cDNA de *M. urundeuva* e são uma classe de pequenas proteínas redox conhecidas por estarem presentes em todos os organismos. Atuam em muitos processos biológicos importantes, incluindo a sinalização redox.

No conjunto de 1025 ESTs categorizadas, 5 % estavam relacionadas ao metabolismo secundário. O resultado do sequenciamento randômico de cDNAs da biblioteca de cDNA de *M. urundeuva*, propiciou a identificação de seqüências de DNAs homólogas a genes que codificam enzimas-chaves da via de biossíntese de flavonoides, como a flavonol 3' sulfotransferase (EC 2.8.2.25) que é uma enzima do tipo sulfotransferase que catalisa a reação química de 3'-fosfoadenilil sulfato + quercetina = adenosina 3',5'-bisfosfato + quercetina 3-sulfato, e está relacionada a biossíntese de flavonol e flavona.

Com base nos resultados obtidos por meio do sequenciamento randômico da biblioteca de cDNA de *M. urundeuva* pudemos observar que as rotas de biossíntese de fenilpropanóides e flavonoides estavam ativas, pois genes de algumas enzimas chaves relacionadas a estas rotas foram identificados. A aplicação dessa técnica de rastreamento de genes no pequeno conjunto de ESTs clonados foi de baixa eficiência para a detecção de genes relacionados à rota de síntese de flavonoides. No entanto os resultados obtidos com material genético de folhas de aroeira-do-sertão indicaram que a via de biossíntese de flavonoides está ativa para a produção destes metabólitos em *M. urundeuva*.

Portanto, a estratégia seguinte foi elaborada com foco na busca de genes, por sondas específicas desenhadas para rastrear enzimas chaves da via de produção de flavonoides e, particularmente, aquelas envolvidas na biossíntese de chalconas diméricas. Neste processo foram identificados alguns genes como, chalcona isomerase, flavonoide 3' 5' hidroxilase e flavonol sintase que estão presentes na rota metabólica em questão e que aparentemente estão sendo expressos de forma coordenada, produzindo diversas classes de flavonoides com importantes ações farmacológicas inclusive os flavonoides bioativos quercitrina e quercetina, que exibem forte atividade antioxidante e anti-inflamatória sendo utilizados em doenças cardiovasculares, pulmonares, e osteoporoses.

A busca de genes da via de biossíntese de flavonoides com o uso de sondas nucleotídicas específicas evidenciou um direcionamento no fluxo biossintético para a produção de flavonoides com expressão significativa de

genes que codificam enzimas que utilizam como substratos micromoléculas precursoras de flavononas, flavonas e flavonols, inclusive a flavonol sintase (FLS) essencial para a produção do flavonoide quercetina e seus derivados. Esse gene foi escolhido para os experimentos de manipulação genética da biossíntese de metabólitos de interesse via transformação genética com *Agrobacterium* utilizando tabaco como planta modelo.

A comparação de homologia de transcritos de flavonol sintase identificados no pool de cDNAs de folhas de *M. urundeuva* com sequências conservadas desse gene, depositadas em base de dados não redundante, permitiu o desenho de sondas específicas que uma vez sintetizadas foram utilizadas na técnica 3', 5' RACE para elucidação de gene completo de FLS de *M. urundeuva*. Após inúmeros experimentos a sequência completa do gene que corresponde à enzima flavonol sintase de aroeira-do-sertão não foi obtida, faltando pequenas unidades de nucleotídeos nas porções 5' e 3' do gene. Como as sequências destas enzimas em plantas são altamente conservadas optou-se por construir um gene sintético partindo da identificação de uma sequência parcial do gene da enzima flavonol sintase com base em alinhamentos com sequência de aminoácidos e nucleotídeos depositadas no Genbank. Após vários experimentos *in silico* com as sequências selecionadas foi desenhada uma sequência inteira para o gene relacionado a enzima FLS. A sequência sintética obtida foi clonada em um vetor de transferência (pRT104) e posteriormente utilizada na construção de cassetes de expressão para a transformação genética em plantas de tabaco cultivadas *in vitro*. As plantas de tabaco foram utilizadas como modelo para a expressão de FLS, uma vez que a via

de biossíntese de flavonoides também está ativa em tabaco, podendo, no entanto, causar alteração no perfil químico de flavonoides dessa planta hospedeira.

A expressão heteróloga de genes pode ser realizada em qualquer organismo, plantas e leveduras entre outros, sendo útil na medida em que permite seja confirmada a funcionalidade do gene inserido (SILVA & AMARAL, 2003). Plantas transgênicas podem ser utilizadas como modelo para o estudo de regulação genética das rotas de biossíntese de compostos ativos em organismos, visto que, a expressão simultânea de múltiplos genes da rota de biossíntese, representando preferencialmente todas as enzimas – chaves pode garantir o direcionamento correto do fluxo metabólico. Baseado no fato de que a transferência múltipla de genes para plantas pode ocorrer pela inserção de múltiplos genes em um único plasmídeo, pode-se realizar uma manipulação genética para aumentar ou diminuir a produção de algum ativo específico. O cassete de expressão construído com o gene que expressa a enzima flavonol sintase pode ser inserido em outras espécies de plantas com o intuito de aumentar a expressão de flavonoides nestas plantas ou permitir que plantas que não produzam flavonoides passem a produzir estes compostos.

A sequência identificada do gene de flavonol sintase pode ser utilizada como modelo para interferir na regulação genética da rota de biossíntese de flavonoides. Além de atuar como ferramenta para direcionar o fluxo biossintético no sentido de induzir a produção de derivados flavonoides a supressão de sua funcionalidade por edição gênica pode inibir a produção destes, favorecendo o acúmulo de outros metabólitos como chalconas diméricas, por exemplo.

CONCLUSÕES

- O sequenciamento randômico da biblioteca de cDNA de folhas de *Myracrodruon urundeuva* demonstrou que as rotas de biossíntese de fenilpropanoides e flavonoides estão ativas no material estudado, permitindo com isto um estudo direcionado para as enzimas chaves da produção de metabólitos ativos farmacologicamente encontrados nesta planta;
- Foi identificado um gene relacionado a flavonol sintase (FLS) e a partir deste foi desenhado um gene sintético de FLS completo, posteriormente este gene foi sintetizado e inserido em um cassete de expressão para a comprovação da funcionalidade;
- A construção sintética de cassetes de expressão de genes alvos é uma ferramenta eficiente para os estudos de regulação genética em plantas pois uma vez transferidos para organismos heterólogos podem ter sua funcionalidade manipulada.
- A expressão heteróloga do gene de FLS no hospedeiro *Nicotiana tabacum* foi comprovada permitindo estudos sobre interferências na via de biossíntese de flavonoides;
- A sequência identificada do gene de flavonol sintase pode ser utilizada como modelo para interferir na regulação genética da rota de biossíntese de flavonoides. Além de atuar como ferramenta para direcionar o fluxo de síntese no sentido de induzir a produção de derivados flavonoides, a supressão de sua funcionalidade por edição

gênica pode inibir a produção destes, favorecendo o acúmulo de outros metabólitos como chalconas diméricas, por exemplo.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A sabedoria não é outra coisa senão a ciência da felicidade

(Diderott, escritor francês – 1713-1784)

ABDERAMANE, B., et al. Isoflavonoid Derivatives from *Lophira alata* Stem. **Heartwood**, v. 66, p 87 – 92, 2011.

ALMEIDA, J.R., et al. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria xananassa*). **Arch Biochem Biophys.**, v. 465(1), p 61-71, 2007.

AQUINO, N.C. et al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Decoction from Leaves of a Cultivated Specimen of *Myracrodruon urundeuva*. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1616-1623, 2019.

BANDEIRA, M.A.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (= *Astronium urundeuva* engl.), aroeira-do-sertão.** 1993. 206p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1993.

BANDEIRA, M.A.M. ***Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão): Constituintes químicos ativos da planta em desenvolvimento e adulta.** 2002. 322f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BEHLING, E.B., et al. Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas, **Alim. Nutr**, v. 15(3), p 285-292, 2004.

BOGS, J., et al. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. **Plant Physiol**, v. 140(1), p 279-91, 2006.

BORÉM, A. **Biotecnologia Simplificada**. 2ª edição. Viçosa, p.302, 2004.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, **Nutrition Reviews**, v. 56, Issue 11, p 317–333, 1998.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro , v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012 .

CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Progress in plant metabolic engineering. **Curr. Opin Biotechnol**, v. 15, p 148-154, 2004.

CECÍLIO, A.B., et al. Antiviral activity of *Myracrodruon urundeuva* against rotavirus. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba , v. 26, n. 2, p. 197-202, 2016.

COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; HSU, L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *E. coli* by R-Factor DNA. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, Washington, v.69, n.8, p.2110-2114, 1972.

CONSTANTE, M.; GRÜNBERG, R.; ISALAN, M. A biobrick library for cloning custom eukaryotic plasmids. **PloS one**, 6(8), e23685, 2011.

CORREA R., et al. Antinociceptive properties of chalcones. Structure-activity relationships. **Arch Pharm**, v. 334, p 332–334, 2001.

DAWE, A., et al. Phytochemical Constituents of *Combretum* Loeffl. (Combretaceae). **Crops**, v. 4, p 38-59, 2013.

DEHARO, E., et al. In vitro immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. **Phytomedicine**, v. 11(6), p 516-22, 2004.

DESMARCHELIER, C., et al. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67(1), p 69-77, 1999.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p 1085-1097, 1995.

EASAC. **European academies science advisory council**. Synthetic Biology: An introduction. Academia Europaea, v. 1-16, 2011.

FANTINATTO, S.R.C. **Sistema de tratamento e caracterização da expressão de genes de fenilpropanoides em folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira-do-Sertão)**, 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, 2015.

FIGUEREDO, F.G., et al. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*, **Pharmaceutical Biology**, v. 52:5, p 560-565, 2014.

FRANÇA, S.C., et al. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24(1-4), p 243-250, 2001.

FROHMAN, M.A.; DUSH, M.K.; MARTIN, G.R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 1988.

GIBSON, D. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. **Science**, v. 329 (5087), p 52-56, 2010.

HALPIN, C. Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology. **Plant Biotechnol J.**, v. 3, p 141-155, 2005.

HORBOWICZ, M. Method of quercetin extraction from dry scales of onion. **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 57, p 119-124, 2002.

HSIEH, H.K., et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds. **Pharm Res**, v. 15, p 39–46, 1998.

HUI XU, et al. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis*. **Bioresource Technology**, v. 101, Issue 24, p 9715-9722, 2010.

ISAAA: Situação Global dos Cultivos Transgênicos em 2017. **International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)**. Resumo Executivo 2018.

JARDINI, F. A., et al. Compostos fenólicos da polpa e sementes de Romã (*Punica granatum*, L.): atividade antioxidante e protetora em células MDCK. **Alim Nutr**, v. 21 (4), p 509-517, 2010.

KAMARA, B.I.; MANONG, D.T.; BRANDT, E.V. Isolation and synthesis of a dimeric dihydrochalcone from *Agapanthus africanus*. **Phytochemistry**, v. 66(10), p 1126-32, 2005.

KATO, E.T.M.; AKISUE, G. Estudo farmacognóstico de cascas *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20 (1), p 69-76, 2002.

- KHAN, F.A. Biotechnology in Medical Sciences. In: **Slaughter MJ, editor. Synthetic biology and nanomedicine.** Florida: CRC Press p270-281, 2014.
- KULKARNI, R.R., et al. Antifungal dimeric chalcone derivative kamalachalcone E from *Mallotus philippinensis*. **Nat Prod Res.**, v. 28(4), p 245-50, 2014.
- MAIA, J. G. S., et al. Essential oils from *Astronium urundeuva* (Allemao) Engl. and *A. fraxinifolium* Schott ex Spreng. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 72-74, 2002.
- MANN, J. **Secondary metabolism.** 2ed. *Oxford: Clarendon*, 1987.
- MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia.** Fortaleza: UFC, 1989.
- MATTOS, F.J.A. **Plantas de medicina popular no Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas.** Fortaleza: Edição UFC, 80p. 1999.
- MEILING, L., et al. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria soongorica*. **Plant physiology and biochemistry**, v. 73, p 161-7, 2013.
- MENEZES, M. Ficoflórula da Chapada dos Guimarães e arredores, Mato Grosso, Brasil: Euglenaceae pigmentadas (Euglenophyceae). **Rickia**, v. 13, 87-95, 1986.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev.**, v. 52(4), p 673-751, 2000.

MOTA, A.R., et al. Efeito da substância húmica na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10(3), p 26-30, 2015.

NAPOLEÃO, T.H., et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes Aegypti* larvae. **Parasitol. Res.**, v. 110, p 609–616, 2012.

NAQVI, S. et al. When more is better: multigene engineering in plants. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 48-56, 2010.

NOBRE JÚNIOR, H.V., et al. Neuroprotective Effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced Cytotoxicity in Rat Mesencephalic Cells. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 1066-1075, 2009.

OLIVEIRA, V.P.V., et al. Plantas medicinais: considerações ecológicas e uso popular. **Salusvita**, v.8, p. 49-58, 1989.

RABINOW P.; BENNET, G. Synthetic biology: Ethical ramifications 2009. **Systems and Synthetic Biology**, v. 3(1-4), p 99-108, 2009.

RALSTON, L., et al. Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases. **Plant physiology**, v. 137(4), p 1375-1388, 2005.

RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant .Mol. Biol.**, v. 24, n.1, p1-20, 1994.

ROJAS, J., et al. Synthesis and inhibitory activity of dimethylamino-chalcone derivatives on the induction of nitric oxide synthase. **Eur. J. Med. Chem.**v. 37, p. 699-705, 2002.

ROJAS, J., et al. Therapeutic administration of 3, 4, 5-trimethoxy-4'-fluorochalcone, a selective inhibitor of iNOS expression, attenuates the development of adjuvant-induced arthritis in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** v. 368, p. 225-233, 2003.

SÁ, R. A., Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SAITO, K. et al. The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p 21-34, 2013.

SALAKKA, A.K.; JOKELA, T.H.; WÄHÄLÄ, K. Multiple hydride reduction pathways in isoflavonoids. **Beilstein J. Org. Chem**, v. 2, No. 16, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Rapid amplification of 5' cDNA ends," in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (eds. Sambrook, J. & Russell, D.W.) Chapter 8 Protocol 9, 8.54–8.60. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHNEIDER, M. **Biologia sintética**. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados 1-6, 2007.

SILVA, A.B.; AMARAL, C.L.F. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Edição 30, janeiro/junho, 2003.

SILVA, R.G. Análise *in silico* do gene “Lipid Transfer Protein” (LPT) da cana-de-açúcar e funcional em transformantes de *Nicotiana tabacum*, 2017,

67p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2017.

SILVA, V.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; NASCIMENTO, V.T. Técnicas para análise de dados etnobotânicos. In: Albuquerque, U.P., Lucena, R.F.P., Cunha, L.V.F.C. **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica**, 2ht Edicion. COMUNIGRAF, Recife, p. 127–143, 2008.

SILVA, V. C., et al. Characterization of Gallotannins from *Astronium* Species by Flow Injection Analysis-Electrospray Ionization-Ion Trap tandem Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Eur. J. Mass Spectrom**, v. 17 (4), p 365-375, 2011.

SIMÕES, C.M.A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento/organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões ... [et al.].** – 2.ed. ver. – Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS/Ed. Da UFRGS, 2000.

SOUZA, S.M., et al. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. **Phytother Res.**, v. 21(3), p 220-5, 2007.

SOUZA, T.M.; CUNHA, A.P.; FARIAS, D.F. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon*

urundeuva seeds. **Pest Management Science**, Fortaleza, v. 68, p 1380–1384, 2012.

STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **Biotechniques**, v. 28, p. 1102-1104, 2000.

TÖPFER, R. et al. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res*, v. 15,14, 1987.

THOMPSON, J.D., et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, **Nucl. Acids Res.**, v. 24, p 4876-4882, 1997.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.71-74, 2007.

VERHOEYEN, M. E. et al. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2099-2106, 2002.

VERVERIDIS, F.; TRANTAS, E.; DOUGLAS, C.; VOLLMER, G.; KRETZSCHMAR, G.; PANOPOULOS, N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. **Biotechnol J.**, v. 2, p.1214-34, 2007.

VETTORE, A.L., et al. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24,p 1-7, 2001.

VIANA, G.S.B, et al. Aroeira-do-Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão): Estudo Botânico, Farmacognóstico, Químico e Farmacológico, Fortaleza, Brasil, **EUFC**, 1995.

VIANA, G.S.; BANDEIRA, M.A.; MATOS, F.J. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* allemão. **Phytomedicine**, v. 10(2-3), p 189-95, 2003.

VILLALOBOS, A., et al. "Gene Designer: A synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments". **BMC Bioinformatics**, v. 7, 285, 2006.

VODKIN, L.O., et al. Microarrays for global expression constructed with a low redundancy set of 27,500 sequenced cDNAs representing an array of developmental stages and physiological conditions of the soybean plant. **BMC Genomics**, v. 5, 73, 2004.

YEON BOK, K., et al. Cloning and Characterization of a Flavonol Synthase Gene from *Scutellaria baicalensis* **Research Article**, v. 2014, p 1-7, 2014.

ZONG-XIA, Y., et al. The Jasmonate-Responsive AP2/ERF Transcription Factors AaERF1 and AaERF2 Positively Regulate Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Molecular Plant**, v. 5, 2012.

ZORRILLA-LÓPEZ, U., et al. Engineering metabolic pathways in plants by multigene transformation. **Int. J. Dev. Biol.**, vol. 57, fascículo 6, 7, 8, p. 565–576, 2013.

ANEXO 01: Categorização de ESTs importantes encontrados na biblioteca de cDNA de *M. urundeuva*.

IDENTIDADE DO GENE	IDENTIDADE - FUNÇÃO PUTATIVA	% SIMILARIDADE NO BLASTX
AROFOPLO4B07.ab1	gb ABQ41966.1 cytochrome c oxidase subunit [<i>Sonneratiacaseolaris</i>]	30/34(88%)
AROFOPLO1C01.scf	gb ADL16407.1 aquaporin [<i>Dianthus caryophyllus</i>]	36/37(97%)
AROFOPLO2C05.scf	ref XP_002528295.1 transcription factor, putative [<i>Ricinuscommunis</i>]	24/50(48%)
AROFOPLO2F07.scf	gb AAN72439.1 cyclophilin [<i>Kandeliacandel</i>]	26/32(81%)
AROFOPLO2H08.scf CONTIG16	ref XP_002529997.1 cystathionine gamma-synthase, putative [<i>Ricinuscommunis</i>]	60/78(77%)
AROFOPLO4A01.ab1	ref XP_002523809.1 Ferredoxin-3, chloroplast precursor, putative [<i>Ricinuscommunis</i>]	122/149(82%)

Continuação ANEXO 01: Categorização de ESTs importantes encontrados na biblioteca de cDNA de *M. urundeuva*.

IDENTIDADE DO GENE	IDENTIDADE - FUNÇÃO PUTATIVA	% SIMILARIDADE NO BLASTX
AROFOPPL04A05.ab1	ref NP_200968.1 ethylene-responsive transcription factor ERF104 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	22/29(76%)
AROFOPPL04A10.ab1	gb ABN72579.1 +A7531:G7531ubiquitin extension protein [<i>Heveabrasiliensis</i>]	141/146(97%)
AROFOPPL04B06.ab1	ref XP_002511206.1 PolcalcinJun o, putative [<i>Ricinuscommunis</i>]	51/67(76%)
AROFOPPL04H06.ab1	emb CAC33845.1 putative cytosolicCuZn-superoxidedismutase [<i>Populus tremula x Populustremuloides</i>]	49/53(92%)
AROFOPPL05A06.scf	ref XP_002511833.1 Remorin, putative [<i>Ricinuscommunis</i>]	32/50(64%)
AROFOPPL06G06R.scf	gb ACN85343.1 cystatin [<i>Camellia sinensis</i>]	25/32(78%)
AROFOPPL07F11.scf AROFOPPL09C07.scf	ref NP_181079.1 +A6617:F6617ubiquitin-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	66/90(73%)

Continuação ANEXO 01: Categorização de ESTs importantes encontrados na biblioteca de cDNA de *M. urundeuva*.

IDENTIDADE DO GENE	IDENTIDADE - FUNÇÃO PUTATIVA	% SIMILARIDADE NO BLASTX
AROFOPPL08D09R.scf	ref XP_003498038.1 PREDICTED: beta-defensin 43-like [<i>Cricetulusgriseus</i>]	15/37(41%)
AROFOPPL09A01.ab1	ref XP_003632228.1 PREDICTED: calmodulin-related protein isoform 2 [<i>Vitisvinifera</i>]	26/27(96%)
AROFOPPL09C12.ab1	gb ABL67652.1 putative thioredoxin H protein [<i>Citrus</i> hybrid cultivar]	23/29(79%)
AROFOPPL09D01.ab1	gb AFH57282.1 nodulin-like protein [<i>Gossypiumhirsutum</i>]	52/69(75%)
AROFOPPL09E08R1.scf	emb CBJ28730.1 similar to cyclin T2 isoform b isoform 9 [<i>Ectocarpussiliculosus</i>]	18/43(42%)
AROFOPPL09G04.scf AROFOPPL10E02.ab1 CONTIG55	ref XP_002527846.1 Flavonol 3-sulfotransferase, putative [<i>Ricinuscommunis</i>]	17/23(74%)
AROFOPPL10E01.ab1	ref XP_002513443.1 lipoxygenase, putative [<i>Ricinuscommunis</i>]	68/118(58%)
AROFOPPL09G06.ab1	gb AAY53809.1 putative lipoxygenase [<i>Populus deltoides</i>]	35/59(59%)

Continuação ANEXO 01: Categorização de ESTs importantes encontrados na biblioteca de cDNA de *M. urundeuva*.

IDENTIDADE DO GENE	IDENTIDADE - FUNÇÃO PUTATIVA	% SIMILARIDADE NO BLASTX
AROFOPLO9H01.ab1	gb AAA96951.1 polyubiquitin, partial [<i>Solanum tuberosum</i>]	71/73(97%)
AROFOPLO10_D11.ab1	ref XP_002510759.1 Calmodulin, putative [<i>Ricinus communis</i>]	99/164(60%)
AROFOPLO10C02.ab1	gb AAQ54303.1 +A626:G626zinc finger protein PIF1 [<i>Nicotiana glauca</i>]	59/93(63%)
CONTIG12 AROFOPLO9G07.ab1	ref XP_003537949.1 PREDICTED: linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic-like [<i>Glycine max</i>]	96/131(73%)
CONTIG19	emb CAL07979.1 putative ubiquitinprotein 2 [<i>Platanus x acerifolia</i>]	44/48(92%)
CONTIG20	gb AEK31196.1 miraculin-like protein 2 [<i>Citrus limonia</i>]	42/68(62%)
CONTIG26	ref XP_004237852.1 PREDICTED: laccase-14-like [<i>Solanum lycopersicum</i>]	84/102(82%)
CONTIG30	gb ADB02892.1 metallothionein-like MT-3 [<i>Jatropha curcas</i>]	51/64(80%)
CONTIG47	ref XP_003540856.1 PREDICTED: isoprene synthase, chloroplastic-like [<i>Glycine max</i>]	42/75(56%)

Continuação ANEXO 01: Categorização de ESTs importantes encontrados na biblioteca de cDNA de *M. urundeuva*.

IDENTIDADE DO GENE	IDENTIDADE - FUNÇÃO PUTATIVA	% SIMILARIDADE NO BLASTX
CONTIG7, 51, 57, 61 AROFOP10F12.ab1 AROFOP104A09.ab1 AROFOP109G10.ab1	gb ACD69680.1 metallothionein [<i>Mangifera indica</i>]	39/51(76%)