



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

MARIANA CROTTI FRANCO GRANDI

**ESTUDO DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE PILOCARPINA EM JABORANDI POR  
MEIO DE ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

CAMPINAS

2021

MARIANA CROTTI FRANCO GRANDI

**ESTUDO DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE PILOCARPINA EM JABORANDI POR  
MEIO DE ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a  
obtenção do título de Doutora em Genética  
e Biologia Molecular na área de Genética  
Vegetal e Melhoramento.*

Orientador: DR. PAULO MAZZAFERA

ESTE ARQUIVO DIGITAL  
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA  
MARIANA CROTTI FRANCO GRANDI,  
E ORIENTADA PELO PROF. DR.  
PAULO MAZZAFERA.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G764e Grandi, Mariana Crotti Franco, 1988-  
Estudo da rota de biossíntese de pilocarpina em jaborandi por meio de  
análise bioquímica e molecular / Mariana Crotti Franco Grandi. – Campinas, SP  
: [s.n.], 2021.

Orientador: Paulo Mazzafera.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. Pilocarpina. 2. Alcaloides. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of pilocarpine biosynthetic pathway in jaborandi through  
biochemical and molecular analysis

**Palavras-chave em inglês:**

Pilocarpine

Alkaloids

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Paulo Mazzafera [Orientador]

José Francisco de Carvalho Gonçalves

Ricardo Alfredo Kluge

Sara Adrian Lopez de Andrade

Pedro Araújo

**Data de defesa:** 17-12-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8116-5410>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3170266603492201>

Campinas, 17/12/2021.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Prof.(a). Dr.(a) Sara Adrian Lopez de Andrade

Prof. Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves

Prof. Dr. Pedro Araújo

Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular da Unidade do Instituto de Biologia.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, irmã,  
marido e avós que direta ou indiretamente me  
incentivaram para a finalização do projeto.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e força para enfrentar todos os desafios ao longo dessa jornada;

À CAPES pela bolsa cedida para a execução do projeto (processo nº 1445207);

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

À FAPESP pela bolsa cedida para a execução do projeto;

Processo nº 2014/16488-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);

À UNICAMP, Instituto de Biologia e laboratório LAFIMP pela oportunidade da obtenção do título;

À minha família por todo o apoio, amor e incentivo que recebo a minha vida toda e por serem a minha fonte de segurança;

Ao meu marido Henrique Grandi por toda a ajuda, segurança, companheirismo e incentivo que recebo todos os dias e pela compreensão pelos muitos finais de semana e feriados que estive ausente;

Ao professor Dr. Paulo Mazzafera por ter me aceito como aluna, pelas orientações, aprendizado e por permitir a finalização deste trabalho;

À Alexandra Bottcher Marchesini pela amizade, aprendizado, incentivo e por todas as conversas sempre muito sinceras e cheias de carinho e conselhos;

Ao Pedro Araújo e Eduardo Kiyota por toda a ajuda no laboratório, nas trocas de ideias, suporte nas análises de dados, e por serem a minha conexão com a UNICAMP em todo o período que eu estive distante;

À Daniela Feltrim pela prontidão de resposta em todos os momentos que eu necessitava de ajuda;

Ao Felipe Tolentino e Flávia Schimpl pela amizade e aprendizado;

A todos do laboratório LAFIMP pela amizade e companheirismo na minha passagem pela UNICAMP.

## RESUMO

Diversas espécies do gênero *Pilocarpus Vahl* são nativas do território brasileiro. Popularmente conhecidas como jaborandi, elas apresentam, dentre outros metabólitos secundários, o alcaloide pilocarpina. A pilocarpina, de ação farmacológica, possui alto valor econômico, sendo extraída e comercializada no Brasil a partir de áreas cultivadas ou programas de colheita sustentável. Não há até o presente momento a definição dos genes atuantes na rota de biossíntese de pilocarpina, o que traria ganhos em trabalhos futuros para o aumento da quantidade deste alcaloide em jaborandi. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo elencar genes que possam atuar na rota de biossíntese de pilocarpina. Para isso, foram realizados estudos com o intuito de alterar a concentração dos alcaloides em jaborandi, além de estudos no âmbito da proteômica e transcrito, em que folhas de duas espécies de jaborandi (*P. spicatus* e *P. microphyllus*) foram utilizadas ao longo do trabalho por apresentarem concentrações discrepantes do alcaloide. O foco das buscas foi para enzimas que pudessem atuar na desaminação dos aminoácidos L-histidina e L-treonina (possíveis precursores) e iniciar a via de biossíntese de pilocarpina, ou para enzimas que pudessem atuar dentro da via, tendo como principais alvos as enzimas CYP450 que são conhecidas por estarem envolvidas em diversas vias de metabólitos secundários. Os dados de proteômica do presente trabalho retornaram o total de 4.168 proteínas que foram analisadas e classificadas em seus respectivos processos biológicos. A partir dos dados de transcrito foi realizada a montagem *de novo* das *reads* sequenciadas e realizadas as análises para a obtenção dos genes diferencialmente expressos entre as duas espécies estudadas, que somaram o total de 13.497 sequências. Destas, 7.777 foram mapeadas e verificadas com o intuito de encontrar genes participantes da via de biossíntese de pilocarpina. Enzimas como treonina amônia-liase e fenilalanina amônia-liase foram encontradas nos dados sequenciados, podendo atuar no catabolismo dos aminoácidos precursores da via de alcaloides em jaborandi. Outros 45 transcritos foram alvos do presente estudo por terem sido mapeados como enzimas CYP450. Diversas CYP450 vistas nos dados de RNAseq de jaborandi já foram descritas em outros trabalhos atuando em vias de biossíntese de diferentes alcaloides. O presente trabalho traz, portanto, um banco de dados de genes e proteínas de duas espécies de jaborandi com indicações para as enzimas que poderiam atuar na via de biossíntese de pilocarpina e dos demais alcaloides em jaborandi e que servirão de base para trabalhos futuros.

## ABSTRACT

Several *Pilocarpus Vahl* species are native to Brazilian territory. Popularly known as jaborandi, they have among other secondary metabolites, the alkaloid pilocarpine. Pilocarpine has pharmacological interest and is extract and commercialized in Brazil from cultivated areas and/or sustainable harvest programs. Until now there is no definition of the genes that are involved in natural pilocarpine production, being important to uncover the biosynthetic pathway to optimize pilocarpine concentrations in jaborandi leaves. The present study aims to score genes that may be present at pilocarpine biosynthetic pathway through assays of modulation of alkaloids concentration in leaves and through proteomics and transcriptomics data. Two jaborandi species (*P. spicatus* and *P. microphyllus*) were chosen to this study by their contrasting pilocarpine concentrations. All generated data were used to search enzymes from amino acids catabolism, in special from L-threonine and L-histidine that could be involved as jaborandi alkaloids precursors or CYP450 enzymes that can be present along the pathway. Proteomics data provided a total of 4,168 proteins that were analyzed and classified at their respective biological process. From transcriptomic data, the sequenced reads were *de novo* assembled and analyzed to obtain a list of different expressed genes between the two studied species. From 13,497 different expressed genes, 7,777 were mapped and used to search genes presented in pilocarpine biosynthetic pathway. Threonine ammonia-lyase and phenylalanine ammonia-lyase were found at the sequenced data. Those enzymes can act in the amino acids catabolism in jaborandi alkaloids pathway. CYP450s were mapped through 45 genes with different expression levels between the two jaborandi studied species. Most of the CYP450 genes found in this work were described in other species to be involved in alkaloids biosynthetic pathways. Therefore, the present work brings a database of genes and proteins from two jaborandi species with indication for enzymes that could be acting in the pilocarpine biosynthetic pathway and that can be used in future works.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição do número de espécies do gênero <i>Pilocarpus</i> entre os domínios fitogeográficos do Brasil (A) e entre as regiões brasileiras (B). Fonte: Pirani e Groppo (2020). .....	15
Figura 2. Distribuição geográfica em território brasileiro das espécies de jaborandi: <i>P. spicatus</i> (A) e <i>P. microphyllus</i> (B). Fonte: Pirani e Groppo (2020).....	16
Figura 3. Estrutura química do aminoácido histidina e do alcaloide pilocarpina com suas respectivas massas/carga ( <i>m/z</i> ). .....	22
Figura 4. Rota de biossíntese de pilocarpina e demais alcaloides em jaborandi proposta por Sawaya <i>et al.</i> (2015). .....	24
Figura 5. Alcaloides imidazólicos encontrados em jaborandi. A. pilocarpina, B. isopilocarpine, C. pilosina, D. isopilosine, E. epi-isopilosine, F. epi-pilosine, G. piloturine, H. epi-isopiloturine, I. pilosinine, J. dehydropilosinine, K. pilocarpidina, L. isopilocarpidine, M. 13-nor-7(11) dehydropilocarpine, N. anhydropilosine, O. 4,6-dehydro-1,2,4,5-tetrahydro-2,5-dioxopilocarpine, P. 3-(3-methyl-3H-imidazol-4-ylmethyl)-1-phenyl-but-3-en-1-one, Q. 3-Hidroximetil-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)-1-phenyl-butan-1-one, R. 3-Benzoyl-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-ylmethyl)-dihydro-furan-2-one (Sawaya <i>et al.</i> 2011).....	25
Figura 6. Detalhe do material coletado para o ensaio de caracterização de alcaloides de <i>P. spicatus</i> . A. Folhas jovens, B. Folhas adultas, e C. Raiz. Barra = 1 cm. ....	32
Figura 7. Cromatograma do extrato de alcaloides da pasta remanescente da extração de pilocarpina de folhas de jaborandi, onde pode-se observar os compostos: pilosinina ( <i>m/z</i> 181, tempo de retenção de 1,41), pilosina ( <i>m/z</i> 287, tempo de retenção de 4,87), traquilofilina ( <i>m/z</i> 259, tempo de retenção de 9,68) e anidropilosina ( <i>m/z</i> 269, tempo de retenção de 10,80).....	39
Figura 8. Cromatograma em HPLC preparativa do extrato de alcaloides utilizado para a coleta e isolamento dos compostos. Detalhe para os picos dos íons coletados, sendo 1: pilosinina ( <i>m/z</i> 181), 2: pilosina ( <i>m/z</i> 287), 3: traquilofilina ( <i>m/z</i> 259) e 4: anidropilosina ( <i>m/z</i> 269).....	39
Figura 9. Cromatograma do extrato de alcaloides de <i>P. spicatus</i> do ensaio de caracterização. Amostra de folhas adultas (A). Amostra de folhas jovens (B). Amostra de raiz (C). Destaque em tracejado para o composto com <i>m/z</i> 391 presente apenas nas amostras de raízes. ....	40

Figura 10. Dados de concentração ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) dos alcaloides e demais compostos encontrados no ensaio de caracterização do perfil de *P. spicatus* para os tratamentos e indivíduos estudados. A. Composto com  $m/z$  381. B. Alcaloide com  $m/z$  193. C. Composto com  $m/z$  215. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ . Barras = erro padrão. ....42

Figura 11. Dados de concentração ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) dos compostos encontrados no ensaio de caracterização do perfil de alcaloides de *P. spicatus* para os tratamentos e indivíduos estudados. A. Alcaloide com  $m/z$  179, onde letras maiúsculas mostram diferença entre os indivíduos e minúscula diferença entre os tratamentos. B. Composto com  $m/z$  391. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ . Barras = erro padrão. ....43

Figura 12. Dados de concentração ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) do composto com  $m/z$  341 encontrado nos diferentes tratamentos e indivíduos estudados de *P. spicatus*. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ , sendo as comparações realizadas entre os tratamentos, dentro de cada indivíduo testado. Barras = erro padrão. ....43

Figura 13. Porcentagem de variância dos seis componentes principais obtidos na análise dos dados (PCA) do ensaio de caracterização do perfil de alcaloides de *P. spicatus*, sendo a soma dos três primeiros totalizando 81,9% de toda a variação dos dados obtidos. ....44

Figura 14. Resultado da análise de componentes principais. Agrupamento dos dados da PC1 (48% da variação) versus PC2 (17,8% da variação) nos diferentes tratamentos estudados. ....45

Figura 15. Resultado da análise de componentes principais. Agrupamento dos dados da PC1 (48% da variação) versus PC3 (16,2% da variação) nos diferentes tratamentos estudados. ....45

Figura 16. Resultado da análise de componentes principais. Gráfico Biplot com a sobreposição dos escores de cada amostra e das variáveis analisadas no ensaio de caracterização do perfil do extrato de alcaloides de *P. spicatus* para a PC1 (48% da variação) versus PC2 (17,8% da variação), em vermelho pode-se observar os compostos identificados. ....46

Figura 17. Total de alcaloides obtidos na espécie *P. microphyllus* (em  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) após 6 dias das folhas imersas nas diferentes soluções de elicitores e alcaloides. Barras = desvio padrão. Letras distintas diferem estatisticamente pelo método Games-Howell com  $p \leq 0,05$ . ....47

Figura 18. Cromatograma dos alcaloides extraídos da espécie *P. microphyllus*, com detalhe para o tempo de retenção (rt) da pilocarpina (rt = 1,92 min). ....47

Figura 19. Cromatograma dos alcaloides extraídos a partir de amostras foliares da espécie <i>P. spicatus</i> .....	50
Figura 20. Dados do ensaio de indução de alcaloides da espécie <i>P. spicatus</i> . Perfil de alcaloides apresentado em $\mu\text{g}/\text{mg}$ para os diferentes tratamentos. Barras = erro padrão....	50
Figura 21. Análise dos aminoácidos histidina e treonina da espécie <i>P. microphyllus</i> para todos os tratamentos testados no ensaio de indução de alcaloides (A). Comparação da concentração dos aminoácidos histidina e treonina entre as espécies <i>P. microphyllus</i> e <i>P. spicatus</i> independente do tratamento testado (B). Letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de médias Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras = desvio padrão. ....	51
Figura 22. Gel de poliacrilamida com as amostras da extração total de proteínas de jaborandi. Coluna 1: Marcador Bio-Rad 250 kD, Coluna 2: Amostra de <i>P. microphyllus</i> (1 $\mu\text{g}$ ) e Coluna 3: Amostra de <i>P. spicatus</i> (1 $\mu\text{g}$ ). ....	53
Figura 23. A. Número de peptídeos de cada uma das proteínas encontradas na análise de Proteômica de duas espécies de jaborandi. B. Porcentagem de cobertura das sequências de proteínas na análise de proteômica de duas espécies de jaborandi. ....	54
Figura 24. Diagrama de Venn com o número total de proteínas expressas em cada espécie estudada de jaborandi. Dados provenientes da análise de proteômica. ....	54
Figura 25. $\text{Log}_2$ da razão entre as áreas dos picos cromatográficos (LFQ <i>intensity</i> ) de <i>P. microphyllus</i> sobre <i>P. spicatus</i> . Dados provenientes da análise de proteômica de jaborandi. ....	55
Figura 26. Distribuição de espécies dos blast hits das sequências de proteínas encontradas nas duas espécies de jaborandi estudadas.....	55
Figura 27. Classificação das sequências de proteínas dos dados de jaborandi em processos biológicos (A), componentes celulares (B) e funções moleculares (C).....	57
Figura 28. Pontuação de qualidade por base com detalhe ao <i>threshold</i> de qualidade exigido ( $Q \geq 20$ ) para as <i>reads</i> sequenciadas.....	58
Figura 29. Pontuação de qualidade das <i>reads forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) sequenciadas após a ferramenta TRIMMOMATIC. A. Sequências de <i>P. spicatus</i> (Psp) e B. Sequências de <i>P. microphyllus</i> (Pmc). ....	59
Figura 30. Distribuição do conteúdo GC (%) nas <i>reads forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) sequenciadas de jaborandi. A. Sequências de <i>P. spicatus</i> (Psp) e B. Sequências de <i>P. microphyllus</i> (Pmc). ....	60
Figura 31. Tamanho das sequências analisadas pelo Blast2GO provenientes dos dados dos genes diferencialmente expressos de <i>Pilocarpus</i> . ....	60

Figura 32. Total de sequências de <i>Pilocarpus</i> que passaram por blast, mapeamento e anotação após análise no software Blast2GO.....	61
Figura 33. Distribuição das sequências em suas respectivas classes do Gene Ontology, estando divididas entre: processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares (CC).....	62
Figura 34. Classificação das sequências dos genes diferencialmente expressos de <i>Pilocarpus</i> nas respectivas classes de enzimas, com o total de sequências para cada classe...	63
Figura 35. Dados de expressão representados pelo valor de $\log_2$ da razão entre <i>P. microphyllus</i> e <i>P. spicatus</i> para os transcritos relacionados à via do aminoácido treonina. Dados provenientes da análise dos genes diferencialmente expressos entre as duas espécies estudadas de <i>Pilocarpus</i> . ....	65
Figura 36. Dados de expressão representados pelo valor de $\log_2$ da razão entre <i>P. microphyllus</i> e <i>P. spicatus</i> para os transcritos relacionados à via do aminoácido histidina e para a enzima PAL. Dados provenientes da análise dos genes diferencialmente expressos entre as duas espécies estudadas de <i>Pilocarpus</i> . ....	66
Figura 37. Distribuição das sequências de CYP450 dos genes diferencialmente expressos entre <i>P. microphyllus</i> e <i>P. spicatus</i> em seus respectivos termos do <i>Gene Ontology</i> para funções moleculares.....	68
Figura 38. Dados de expressão representados pelo valor de $\log_2$ da razão entre <i>P. microphyllus</i> e <i>P. spicatus</i> para os transcritos presentes em ambas as espécies e mapeados em enzimas do citocromo P450. Árvore filogenética inferida a partir de 1000 repetições do teste de bootstrap, os valores representam a porcentagem do número de repetições em que os grupos taxonômicos se agruparam juntos (n=1000).....	70

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Pilocarpina e sua biossíntese .....	19
2.2 Proteínas CYP450 .....	25
2.3 Sequenciamento de RNA.....	28
3 Objetivo Geral .....	30
3.1 Objetivos Específicos .....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Extração e purificação de alcaloides .....	30
4.2 Caracterização do perfil de alcaloides em <i>P. spicatus</i> .....	31
4.3 Alteração no padrão de alcaloides de folhas de jaborandi.....	32
4.3.1 Ensaio de Indução 1.....	32
4.3.2 Ensaio de Indução 2.....	33
4.4 Extração de alcaloides e análises no espectrômetro de massas .....	34
4.5 Extração e análise de aminoácidos .....	35
4.6 Extração de proteínas e análise de proteômica.....	35
4.7 Extração de RNA e sequenciamento .....	36
4.7.1 Montagem de novo e análise do banco de dados .....	36
4.7.2 Alinhamento das CYP450 e montagem da árvore filogenética.....	37
4.8 Análise estatística .....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1 Purificação de alcaloides .....	38
5.2 Caracterização de alcaloides em <i>P. spicatus</i> .....	40
5.3 Ensaio Indução de alcaloides.....	46
5.3.1 Ensaio de Indução 1.....	46
5.3.2 Análise de aminoácidos nos tratamentos de indução 1 .....	50
5.3.3 Ensaio de Indução 2.....	51
5.4 Extração de proteínas e análise proteômica.....	52
5.5 Extração de RNA e sequenciamento .....	57
5.5.1 Montagem <i>de novo</i> e análise do banco de dados.....	60
5.5.2 Seleção de genes de interesse .....	63
6 CONCLUSÃO.....	71

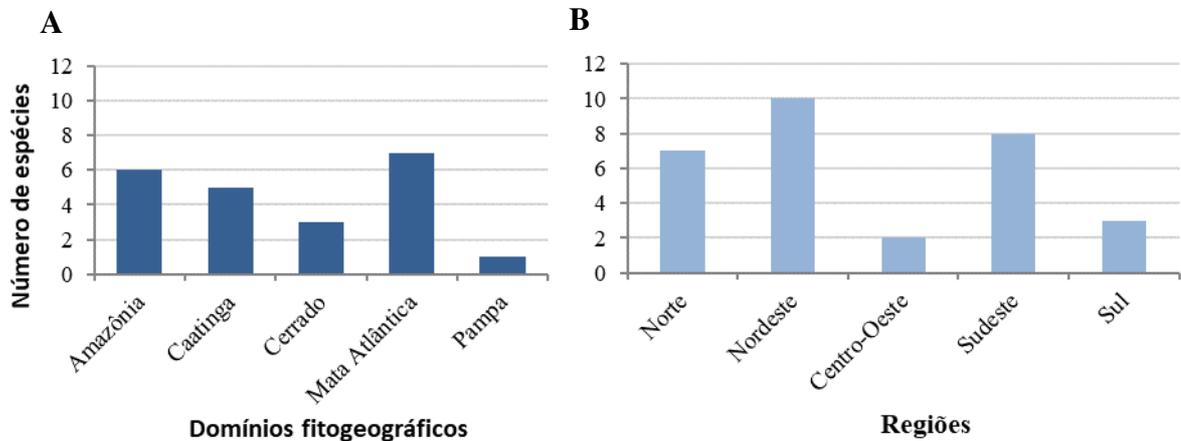
REFERÊNCIAS .....	75
ANEXOS .....	86
I - Documento referente à bioética e/ou biossegurança.....	86
II – Declaração de direitos autorais .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Jaborandi é o nome popularmente dado às espécies do gênero *Pilocarpus* Vahl, pertencente à família das Rutáceas. De porte arbustivo, as plantas deste gênero podem atingir de 3 a 7,5 metros de altura. O gênero *Pilocarpus* possui 17 espécies, ocorrendo do México à Argentina, com ampla distribuição no território brasileiro, sendo encontradas tanto em áreas abertas e de vegetação baixa quanto em áreas com vegetação densa, como a floresta amazônica e mata atlântica (figura 1A) (Oliveira 2007; Pinheiro 1997; Pirani e Groppo 2020). Das 17 espécies apenas *P. demerarae* Sandwith e *P. racemosus* Vahl não ocorrem no Brasil (Pirani e Groppo 2020).

No território brasileiro, a ocorrência se dá desde o norte do Pará até o Rio Grande do Sul, com maior concentração na região nordeste do país (figura 1B) (Pinheiro 1997; Pirani e Groppo 2020). O estado do Maranhão foi caracterizado como o grande centro de produção de folhas de jaborandi, compondo 95% de toda a produção nacional até 1992 (Pinheiro 1997).

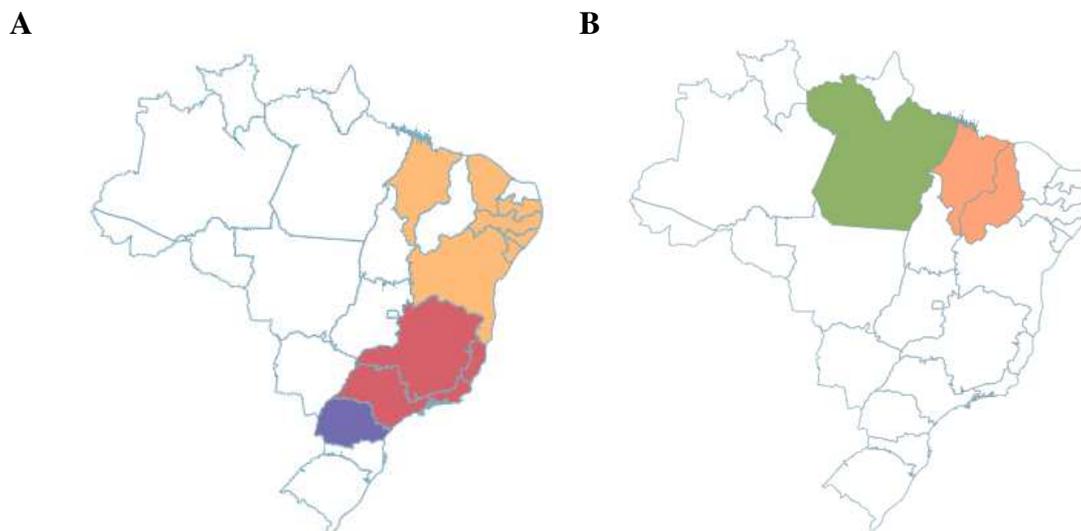
Segundo dados do IBGE, em 2014, 2015 e 2016 foram extraídos 252, 238 e 229 toneladas (t) de folhas de jaborandi no Brasil, respectivamente (IBGE 2014; IBGE 2016).



**Figura 1.** Distribuição do número de espécies do gênero *Pilocarpus* entre os domínios fitogeográficos do Brasil (A) e entre as regiões brasileiras (B). Fonte: Pirani e Groppo (2020).

Na figura 2 é possível observar a distribuição geográfica no território brasileiro das duas espécies de jaborandi que serão alvo do presente estudo: *P. spicatus* (figura 2A), espécie nativa, endêmica do Brasil, podendo ser chamada de arengueiro, catinga-de-porco, jaborandi-da-restinga e pimentinha; e *P. microphyllus* (figura 2B), espécie nativa, não

endêmica, considerada como “em perigo” de extinção pelo Ministério do Meio Ambiente, podendo ser chamada de arruda e arruda-brava (Pirani e Groppo 2020).



**Figura 2.** Distribuição geográfica em território brasileiro das espécies de jaborandi: *P. spicatus* (A) e *P. microphyllum* (B). Fonte: Pirani e Groppo (2020).

Entre os vários metabólitos secundários encontrados nas folhas das espécies do gênero *Pilocarpus*, o alcaloide pilocarpina é o de maior interesse econômico (Santos e Moreno 2004). O jaborandi é a única fonte natural de pilocarpina, um alcaloide imidazólico ativador do sistema nervoso autônomo parassimpático, utilizado pela indústria farmacêutica no tratamento de doenças como glaucoma e xerostomia. Um dos seus efeitos é a estimulação das glândulas lacrimais, de suor e salivares (Valdez *et al.* 1993).

Naturalmente são encontradas variações na concentração deste alcaloide (2 a 70% do total de alcaloides presentes nas plantas) entre as espécies de jaborandi, sendo que *P. jaborandi*, *P. racemosus*, *P. trachyllophus* e *P. microphyllum* apresentam as maiores concentrações e *P. spicatus* apresenta apenas traços do alcaloide (Sawaya *et al.* 2011). Esta informação justifica a escolha das espécies *P. microphyllum* e *P. spicatus* para este estudo, já que apresentam concentrações discrepantes do alcaloide pilocarpina.

Os fatores que controlam a concentração do alcaloide nas folhas de jaborandi são desconhecidos. De forma geral, a concentração de alcaloides em plantas pode responder a diversos tratamentos bióticos e abióticos, como variações de temperatura, estresse osmótico, nutricional e presença de indutores, como metiljasmonato e ácido abscísico (Avancini *et al.* 2003; Idrees *et al.* 2013; Namdeo 2007).

O alto valor econômico associado à pilocarpina incentivou por muito tempo a atividade extrativista de suas folhas, levando ao risco de extinção (Pinheiro 1997; Pinheiro 2002). O sistema de exploração extrativista do jaborandi tinha como problema central a coleta excessiva e frequente de folhas de uma mesma planta ou grupo de plantas, o que não permitia o tempo necessário para o completo desenvolvimento foliar. Como consequência ocorria alta taxa de mortalidade, além da redução de altura e vigor das plantas e redução do tamanho de novas folhas, levando à inclusão de espécies do gênero *Pilocarpus* em listas de plantas ameaçadas de extinção (Centroflora 2020; Pinheiro 2002). Dentre as espécies ameaçadas estão: *P. jaborandi* Holm., *P. microphyllus* tapf ex Wardl. e *P. trachylophus* Holmes (Pirani e Groppo 2020).

Apesar da ameaça às espécies, apenas entre os anos de 1989/90 um programa foi iniciado para a domesticação do jaborandi. Este processo foi feito pela empresa Merck, principal companhia na época atuando com a exploração do jaborandi e a extração de pilocarpina (Pinheiro 1997; Pinheiro 2002). A Merck é detentora da patente US5059531A de 1991, que tem como principal reivindicação o isolamento de pilocarpina a partir do cultivo *in vitro* de células vegetais de *Pilocarpus* (Reuther 1991).

Atualmente o grupo Centroflora e a empresa Sourceteck atuam na extração e comercialização de pilocarpina no Brasil. Em conjunto com comunidades de três estados do nordeste brasileiro, o grupo Centroflora criou em 2008 um programa de valorização do jaborandi, com o incentivo da colheita sustentável das folhas. Por esta ação, em 2015 a empresa recebeu o Prêmio Nacional da Biodiversidade (Centroflora 2020). Já a empresa Sourceteck cultiva jaborandi no município Barra do Corda no Maranhão, em uma fazenda de 465 hectares, com atividade de colheita mecanizada (Sourceteck 2020).

O valor medicinal de espécies nativas brasileiras em associação à ação predatória do homem tem motivado o estudo destas plantas visando sua preservação e mostrando que é essencial ter acesso a métodos que permitem o rápido isolamento e identificação dos produtos bioativos naturais (Hostettmann *et al.* 1997; Souza *et al.* 2003).

O estudo de compostos como a pilocarpina tem requerido cada vez mais conhecimento do aparato gênico envolvido nas vias de biossíntese. Dentre as técnicas amplamente usadas, destaca-se o RNAseq, uma técnica de sequenciamento de alta geração que se mostra vantajosa para a análise global de expressão gênica (transcritoma) (Guo *et al.* 2014; Wang *et al.* 2009). Através do RNAseq é possível identificar e quantificar os transcritos em um determinado momento do genoma, analisando entre outros pontos, os genes diferencialmente expressos de tratamentos de interesse (Maroli *et al.* 2018).

Apesar de alguns estudos apontarem para o aminoácido L-histidina como um possível precursor para a produção de pilocarpina pela similaridade entre a estrutura do aminoácido e o anel imidazólico do alcaloide (Sawaya *et al.* 2011), pouco se sabe ainda sobre a rota de biossíntese da pilocarpina e dos demais alcaloides imidazólicos de jaborandi.

Dados de transcrito associadas a estudos de metabolômica podem auxiliar na descoberta dos genes envolvidos em vias metabólicas (Lau e Sattely 2015; Marques *et al.* 2013). Esta técnica se mostra bastante vantajosa para o estudo de grandes famílias gênicas, como é o caso de enzimas do citocromo P450 (CYP450), que formam uma superfamília de proteínas com aproximadamente 245 genes e 28 pseudogenes presentes em *Arabidopsis thaliana*. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo secundário de plantas, como na biossíntese de cumarinas, flavonoides, ésteres fenólicos e alcaloides (Ehlting *et al.* 2006; Werck-Reichhart *et al.* 2002). O estudo da expressão diferencial de enzimas como as CYP450 entre as espécies de jaborandi pode trazer respostas quanto à via de biossíntese de pilocarpina, já que as reações catalisadas por elas se mostram presentes no pouco que se conhece sobre a biossíntese desse alcaloide.

A interação de diversas ômicas vem sendo amplamente utilizada para diferentes estudos em plantas, como: estresses abióticos, variações fenotípicas, interação planta-patógeno, entre outros (Su *et al.* 2018; Wang *et al.* 2020; Xiaoxia *et al.* 2020; Zhuang *et al.* 2014).

O presente trabalho tem como propósito analisar os dados de proteômica e transcritômica de duas espécies de jaborandi, *P. microphyllus* e *P. spicatus*, que se diferenciam pela quantidade de pilocarpina produzida, além dos dados de extração de alcaloides de ambas as espécies. A hipótese a ser testada é que através dos resultados gerados será possível trazer uma compreensão maior da rota de biossíntese de pilocarpina, nomeando os precursores e as enzimas participantes da via de alcaloides em jaborandi.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Pilocarpina e sua biossíntese

Os alcaloides são metabólitos secundários sintetizados a partir de aminoácidos, compostos por um ou mais átomos de nitrogênio. Os alcaloides geralmente tem natureza básica, sendo armazenados na forma protonada frequentemente no vacúolo das células (Heldt e Heldt 2005). São classificados pelo seu anel heterocíclico, sendo a pilocarpina, um dos alcaloides presentes em espécies de jaborandi, pertencente ao grupo dos alcaloides imidazólicos, por ter um anel imidazólico. O gênero *Pilocarpus* é o único gênero de plantas com a presença de alcaloides com este tipo de anel heterocíclico (Allevato *et al.* 2019a).

As folhas de jaborandi vêm sendo utilizadas há muito tempo por índios sul-americanos. Entretanto, não se tem relatos de uma finalidade específica para o seu uso na época. Há sugestões de que eram utilizadas para o tratamento de diversas doenças, existindo registros do conhecimento sobre o seu efeito na salivação e no aumento do suor. A introdução de folhas de jaborandi na Europa se deu através do médico Symphronio Olympio Cezar Coutinho, por volta de 1873, sendo a descoberta da pilocarpina dada independentemente por Hardy e Gerrard em 1875 (Holmstedt *et al.* 1979).

A pilocarpina ativa o sistema nervoso autônomo parassimpático, que é responsável pela homeostase das funções do corpo (Segal *et al.* 1996). Ela é amplamente utilizada no tratamento de certos tipos de glaucoma, atuando na redução da pressão intraocular, em procedimentos cirúrgicos (na contração de pupila), e no tratamento da xerostomia, principalmente em pacientes que passam por radioterapia, pois promove aumento da salivação (Holmstedt *et al.* 1979; Valdez *et al.* 1993). Mais recentemente um estudo *in silico* mostrou que alguns alcaloides imidazólicos de jaborandi (epiisopiloturina, epiisopilosina, isopilosina e pilosina) poderiam ser potenciais inibidores contra a protease M<sup>pro</sup> do vírus SARS-CoV-2 causador da COVID-19 (de Sá *et al.* 2021).

Seguindo um padrão geral para alcaloides, a maior concentração de pilocarpina é encontrada em tecidos jovens (Abreu *et al.* 2011), porém, pouco se sabe sobre o controle metabólico desse alcaloide nas folhas de jaborandi. Abreu *et al.* (2007b) compararam amostras de *P. microphyllus* coletadas em diferentes épocas do ano, e mostraram variações na concentração de pilocarpina ( $m/z$  209), sendo que a maior concentração nas folhas ocorreu no verão em comparação com o outono e inverno. O inverso foi visto com o alcaloide pilosina ( $m/z$  287), que estava mais presente nas amostras do outono e inverno. Com relação às estações chuvosas, Lima *et al.* (2017) verificaram menor concentração de pilocarpina na

época das águas e maior concentração nas estações secas, sendo este estudo conduzido no nordeste brasileiro.

Algumas espécies de jaborandi apresentam grandes variações não só no conteúdo, mas também nos tipos de alcaloides imidazólicos presentes. Sawaya *et al.* (2011) compararam sete espécies de jaborandi e observaram uma variação entre 0,88% e 1,08% de alcaloides totais extraídos a partir de folhas secas, sendo que a proporção de pilocarpina em relação ao total de alcaloides variou de 2,6% em *P. carajaensis* a 70,8% em *P. jaborandi*. As espécies *P. jaborandi*, *P. racemosus* e *P. trachyllophus* foram as que apresentaram as maiores concentrações de pilocarpina, já na espécie *P. microphyllus* a porcentagem de pilocarpina no extrato de alcaloides é representada por 23,6% a 34,5%. Apesar de ter sido encontrado em *P. spicatus* 0,88% de alcaloides totais nas folhas, não foi encontrada pilocarpina no extrato. A tabela 1 mostra dados qualitativos sobre a presença ou não dos alcaloides imidazólicos identificados até o momento nas espécies de jaborandi.

Resultados semelhantes foram obtidos por Allevato *et al.* (2019b), em que foi observado maiores concentrações de pilocarpina em *P. sulcatus*, *P. trachyllophus* e *P. grandiflorus*, e ausência do alcaloide em *P. spicatus* e *P. giganteus*.

Estudos filogenéticos mostram a divisão das espécies *P. microphyllus* e *P. spicatus* em diferentes clados, sendo estes associados às regiões geográficas de ocorrência das espécies, ou seja, diferentes condições ambientais. Estes clados apresentam diferenças na diversidade de alguns metabólitos secundários, sendo o clado no qual *P. microphyllus* foi incluída o de espécies que apresentam maior diversidade de alcaloides e menor diversidade de cumarinas. O clado que agrupa *P. spicatus* tem a maior diversidade de cumarinas e menor de alcaloides (Allevato *et al.* 2019b).

O trabalho com genótipos selvagens de *P. pennatifolius* de seis localidades realizado por Allevato *et al.* (2019a) mostrou a associação de alterações no perfil metabólico (alcaloides e compostos fenólicos) das plantas em detrimento a adaptação a diferentes condições ambientais de cada região. As variáveis mais importantes que contribuíram para a variação no padrão de alcaloides das plantas foram: temperatura média do quartil mais úmido, concentração de fósforo e magnésio no solo e saturação de bases do solo (V%). As condições ambientais que favoreceram a maior abundância de pilocarpina nas plantas, foram as mesmas para os alcaloides pilocarpidine (*m/z* 195) e 4-(3Himidazol-4-ylmethyl)-3-methyl-5H-furan-2-one (*m/z* 179).

O método cromatográfico proposto por Sawaya *et al.* (2008) permitiu separar e quantificar 13 alcaloides de amostras de jaborandi incluindo seus isômeros. Com este método

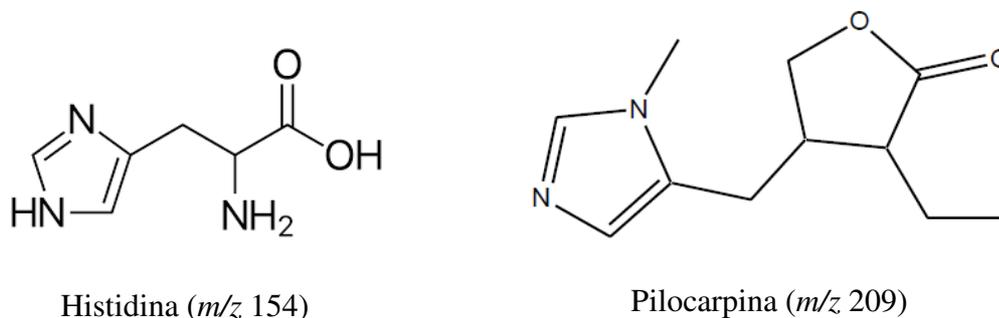
foi possível analisar sete espécies de jaborandi, e observar variações no perfil e conteúdo dos alcaloides, informações importantes para os estudos da rota biossintética de pilocarpina (Sawaya *et al.* 2011).

**Tabela 1.** Alcaloides encontrados em amostras de folhas de jaborandi, caracterizadas pela alta resolução de massa da molécula protonada ( $m/z$ ) e tempo de retenção (Rt) em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massa. P = presença, *P. microphyllus* (PmM e PmS), *P. carajaensis* (Pc), *P. spicatus* (Ps), *P. trachyllophus* (Pt), *P. pennatifolius* (Pp), *P. jaborandi* (Pj), *P. racemosus* (Pr) (Sawaya et al., 2011).

	No.	High resolution [M + H] <sup>+</sup> m/z	Rt min.	Samples								
				PmM	PmS	Pc	Ps	Pt	Pp	Pj	Pr	
	1	179.08150	4.3			p	p	p	p	p	p	
	2	193.09712	4.3	p			p	p	p			p
	3	195.11281	8.1									p
<i>Pilocarpine</i>	4	209.12836	8.4	p	p	p		p	p	p	p	
	5	273.12348	9.1						p			
	6	287.13882	10.0	p	p							
	7	287.13882	10.3	p	p							
	8	273.12348	12.5		p							
<i>Pilosine and isomers</i>	9	287.13882	12.8	p	p	p						
	10	287.13882	13.4	p		p						
	11	273.12348	13.5		p							
	12	287.13882	14.1	p	p	p						
	13	259.14442	17.7	p	p	p	p	p				
	14	259.14442	18.0	p	p	p						p
	15	285.12352	18.5	p	p							
	16	255.11291	19.3	p	p				p			
	17	269.12834	19.5	p	p	p	p					
	18	257.12854	20.0						p			
	19	257.12854	21.0						p			
	20	255.11291	21.7		p				p			
	21	269.12834	22.4	p		p						
	22	269.12834	22.9			p						

Apesar de existirem informações sobre o teor de pilocarpina nas diversas partes das plantas de jaborandi (Abreu *et al.* 2011), e de existirem trabalhos com cultivo *in vitro* de células de *P. microphyllus* (Andreazza *et al.* 2009), a sua biossíntese ainda é pouco conhecida. Por tempos, tem-se sugerido que a pilocarpina e outros alcaloides análogos em plantas são derivados do aminoácido L-histidina, porém ainda não existem trabalhos que comprovem esta relação. Esta teoria se baseia no fato de haver similaridade entre a estrutura do aminoácido e o

anel aromático do alcaloide (Brochmann–Hanssen *et al.* 1975). As estruturas do aminoácido histidina e do alcaloide pilocarpina são mostradas na figura 3.



**Figura 3.** Estrutura química do aminoácido histidina e do alcaloide pilocarpina com suas respectivas massas/carga ( $m/z$ ).

A fim de encontrar um modelo de estudo da rota biossintética de pilocarpina em jaborandi, diferentes técnicas já foram testadas, dentre elas, a de aumentar o nível do alcaloide em suspensões celulares (Abreu *et al.* 2007a; Andrezza *et al.* 2009), em calos (Abreu *et al.* 2005) e em plântulas (Avancini *et al.* 2003).

Conforme dito anteriormente, sugere-se que o início da via de biossíntese dos alcaloides imidazólicos em *Pilocarpus* ocorra através da retirada do grupo amina dos aminoácidos L-histidina e L-treonina. O primeiro passo para o catabolismo dos aminoácidos é a retirada do nitrogênio em forma de amônia, esta reação pode ser realizada por enzimas denominadas amônia-liases (desaminases), como é o caso, por exemplo, do aminoácido L-treonina, em que a enzima treonina desaminase atua formando ácido  $\alpha$ -cetobutírico +  $\text{NH}_4$  e o aminoácido L-histidina em que a enzima histidina amônia-liase (em animais) forma ácido urocânico +  $\text{NH}_4$  (Givot *et al.* 1969; Hildebrandt *et al.* 2015; Jander e Joshi 2009).

Para alguns aminoácidos, entretanto, a reação que ocorre neste primeiro passo é através das enzimas aminotransferases (Hildebrandt *et al.* 2015). As aminotransferases transferem o grupamento amina de um composto doador para um composto receptor. Um exemplo de aminotransferase caracterizada em *Arabidopsis* é a *histidinol-phosphate aminotransferase* (EC 2.6.1.9) presente na via de biossíntese de histidina (Liepman e Olsen 2004).

Brochmann–Hanssen *et al.* (1975) em seu estudo com aminoácidos marcados com  $^{14}\text{C}$  em ramos de *P. pennatifolius* observou a incorporação de [S-metil- $^{14}\text{C}$ ] L-metionina pelas folhas, mas não de [S-metil- $^{14}\text{C}$ ] L-histidina e [S-metil- $^{14}\text{C}$ ] L-treonina (possíveis precursores

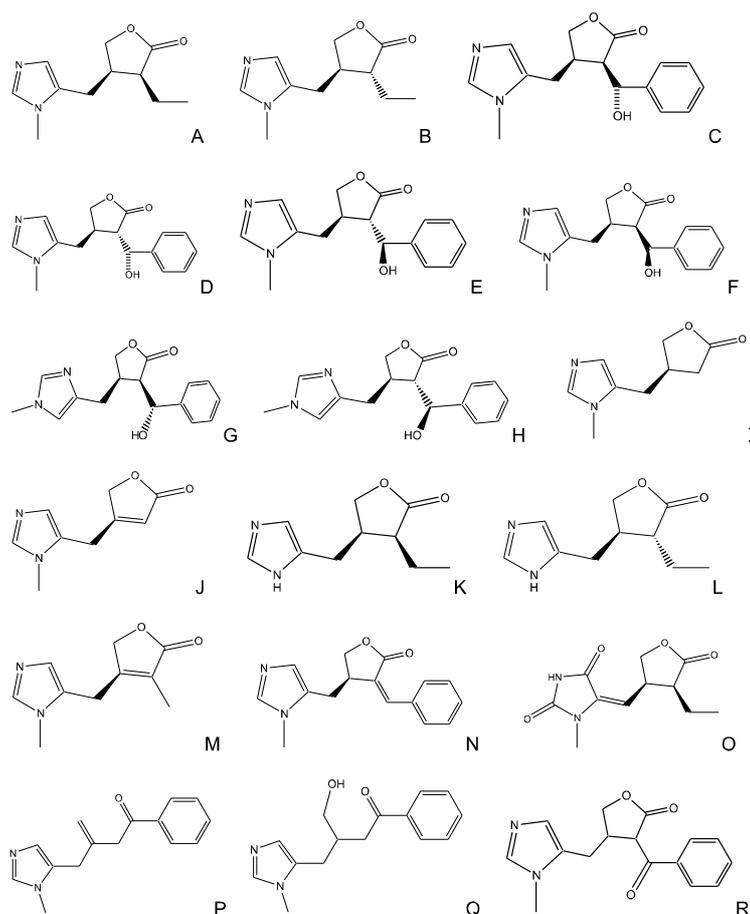
de pilocarpina), o que levantou a hipótese de que o início da via de biossíntese de pilocarpina pudesse ocorrer em outra parte da planta que não as folhas, como por exemplo, nas raízes. Sabe-se que o nível de pilocarpina nas raízes é menor do que em folhas (jovens e adultas) e caule (Abreu *et al.* 2011). Brochmann–Hanssen *et al.* (1975) sugeriram ainda o transporte do alcaloide pilocarpidina das raízes para as folhas, onde ocorreria a finalização da biossíntese de pilocarpina.

Conceição (2004) utilizou extratos protéicos de folhas e raízes de *P. pennatifolius* para verificar a possível ação das enzimas histidina aminotransferase (HAT - EC 2.6.1.38) e histina amônia-liase (HAL – EC 4.3.1.3), sob a hipótese de que a L-histidina fosse o precursor primário de pilocarpina. Ao final do estudo observou apenas a ação de HAT nas amostras de raízes, já que foi verificada a formação do composto ácido imidazol-pirúvico e nenhuma formação do ácido trans-urocânico sob a presença do aminoácido histidina, supondo que os precursores da pilocarpina possam ser formados nas raízes e translocados para as folhas e que a L-histidina possa ser o fornecedor do núcleo imidazólico da pilocarpina. Entretanto, até o momento a presença da enzima HAL ainda não foi confirmada em plantas (Barros e Dixon 2019).

Andreazza *et al.* (2015) estudaram o transporte pela membrana celular e acúmulo de pilocarpina em suspensões celulares de *P. microphyllus*, mostrando que proteínas ABC, principalmente, e ATPases controlam a entrada de pilocarpina para dentro e fora das células. A maior absorção de pilocarpina do meio de cultura pelas células se deu com pH entre 5,8 e 6,8. Foi verificado ainda que no interior das células a pilocarpina que não é metabolizada fica estocada nos vacúolos.

Sawaya *et al.* (2015) descreveram uma possível rota de biossíntese de pilocarpina (figura 4). As estruturas encontradas até o momento e que auxiliaram a definição desta rota são mostradas na figura 5. Nela, uma enzima no início da via catalisaria o primeiro passo para a degradação do aminoácido L-histidina, retirando o grupo amina para a formação do ácido urocânico (Givot *et al.* 1969; Katona *et al.* 2006). Sendo a treonina outro precursor potencial, a remoção do grupo amina seria feita pela treonina amônia-liase (TAL, EC 4.3.1.19), com a formação do ácido  $\alpha$ -cetobutírico, sendo este um dos primeiros passos para a biossíntese da isoleucina (Umbarger 1978).





**Figura 5.** Alcaloides imidazólicos encontrados em jaborandi. A. pilocarpina, B. isopilocarpine, C. pilosina, D. isopilosine, E. epi-isopilosine, F. epi-pilosine, G. piloturine, H. epi-isopiloturine, I. pilosinine, J. dehydropilosinine, K. pilocarpidina, L. isopilocarpidine, M. 13-nor-7(11) dehydropilocarpine, N. anhydropilosine, O. 4,6-dehydro-1,2,4,5-tetrahydro-2,5-dioxopilocarpine, P. 3-(3-methyl-3H-imidazol-4-ylmethyl)-1-phenyl-but-3-en-1-one, Q. 3-Hidroximetil-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)-1-phenyl-butan-1-one, R. 3-Benzoyl-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)-dihydro-furan-2-one (Sawaya *et al.* 2011).

## 2.2 Proteínas CYP450

CYP é uma superfamília de proteínas que apresentam forte absorção de luz em 450 nm, característica de onde vem o nome CYP450 (*Pigment absorbing at 450 nm* – P450) (Jun *et al.* 2015). Os genes CYPs representam por volta de 1% do total de genes codificadores em plantas (aproximadamente 245 genes e 28 pseudogenes presentes em *A. thaliana*), constituindo, portanto, a maior família de enzimas do metabolismo vegetal, seguida das glicosiltransferases 1 (aproximadamente 123 genes em *A. thaliana*), e a terceira maior família

de genes vegetais, regulando diversos processos celulares importantes que afetam o desenvolvimento e crescimento das plantas. Sendo assim, as CYPs são uma excelente imagem da evolução e do papel do metabolismo vegetal no desenvolvimento e adaptação das plantas (Nelson e Werck-Reichhart 2011).

Nelson *et al.* (2008) realizaram um estudo comparativo de seis genomas vegetais previamente sequenciados, sendo eles *Vitis vinífera* (uva), *Carica papaya* (mamão), *Populus trichocarpa* (populus), *Oryza sativa* (arroz), *Arabidopsis thaliana* e *Physcomitrella patens* (musgo), mostrando que a superfamília de P450 foi fundamental para a adaptação das plantas no ambiente terrestre e na evolução de estruturas mais complexas de órgãos e tecidos.

Alguns genes de CYP450s estão envolvidos na biossíntese de compostos em várias vias metabólicas. Diversos grupos de metabólitos secundários como terpenoides, flavonoides, esteroides, alcaloides e fenilpropanoides são catalizados por CYPs (Jun *et al.* 2015). CYP450s também contribuem para a homeostase de hormônios vegetais, na sinalização de moléculas pelo controle de sua biossíntese (ex: giberelinas, auxinas, brassinosteroides, citocininas, jasmonato, estrigolactonas) e catabolismo (ex: giberelinas, brassinosteroides e ácido abscísico) (Bak *et al.* 2011), além de mediar diversos aspectos da fisiologia vegetal, incluindo a formação de estruturas lignificadas, coloração de flores e frutos, odores e compostos de defesa (Nelson *et al.* 2008).

As CYP450s estão distribuídas em 11 diferentes clados em plantas, seis destes clados são compostos por uma única família, que são CYP51, CYP74, CYP97, CYP710, CYP711, CYP727 e CYP746, e quatro deles são multifamílias, sendo nomeados com o código do membro da família de menor número, sendo eles, CYP71, CYP72, CYP85 e CYP86. O clado CYP727 está presente apenas em monocotiledôneas e o CYP746 está presente apenas em musgos e algas verdes, não estando presente em plantas vasculares (Nelson e Werck-Reichhart 2011). A classificação filogenética dos genes do citocromo P450 em plantas foi primeiramente reportada em 1995 (Nelson *et al.* 2004). Uma família de CYP é composta por membros com pelo menos 39% de identidade na sequência de aminoácidos, ou por 37 – 38% para grandes famílias. A família é representada por um número enquanto que a subfamília é representada por uma letra, sendo as sequências com pelo menos 55% de identidade classificadas em uma mesma subfamília (Bak *et al.* 2011; Nelson e Werck-Reichhart 2011).

Através de análises filogenéticas as CYP450s foram divididas em dois grupos, sendo eles: grupo tipo-A e não-tipo A P450. As famílias pertencentes ao grupo A são as CYP71, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83 e 89, grupo específico de plantas, sendo todas

pertencentes ao clado CYP71, as enzimas deste grupo, de acordo com algumas funções já conhecidas, são relacionadas ao desenvolvimento, metabolismo e defesa das plantas. As famílias pertencentes ao grupo não-tipo A são CYP72, 74, 86 e 87, ficando agrupadas na análise filogenética mais próximas a outros organismos do que às próprias sequências de plantas (Durst e Nelson 1995).

O clado CYP71 representa mais de 50% de todas as CYPs em plantas, conseqüentemente apresenta uma enorme diversidade de funções, como o metabolismo de derivados de aminoácidos aromáticos e alifáticos (fenilpropanoides, derivados indólicos, glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos), pequenos isoprenoides (mono e sesquiterpenoides) e alguns derivados de triterpenoides, alcaloides, ácidos graxos e precursores de hormônios (Nelson e Werck-Reichhart 2011).

A maioria das CYP450 de *Arabidopsis* estão localizadas acopladas na membrana do retículo endoplasmático com parte da estrutura no lado citoplasmático da membrana, e um menor número localizada nos cloroplastos (Schuler *et al.* 2006), estas enzimas apresentam um centro catalítico comum, formado por um grupamento heme e ferro sendo, portanto, denominadas hemoproteínas (Werck-Reichhart *et al.* 2002). O fato da molécula de ferro das P450 existir sob grande diversidade de estados de oxidação e ser acessível a diversos substratos faz com que as enzimas P450 apresentem uma grande diversidade de reações, sendo entre outras, reações de oxidações ou reduções envolvendo quebras de ligação C-C ou C=N, desidratação, desidrogenação e isomerização (Mansuy 1998).

Sabe-se que determinadas famílias de CYP450 dos clados CYP71 e CYP72 atuam em alguns grupos taxonômicos das angiospermas na biossíntese de diterpenos, contribuindo para a diversidade metabólica destes compostos (Bathe e Tissier 2019).

Com relação às vias de biossíntese de alcaloides em plantas, está bem estabelecido o papel predominante das enzimas CYP450 em realizar reações de oxidação e hidroxilação (Pauli e Kutchan 1998). Na biossíntese de alcaloides isoquinolínicos já foram reportadas reações de hidroxilação, formação de pontes metilenodioxí e acoplamento de fenol mediados por P450s (Ikezawa *et al.* 2008).

A família CYP80 foi mencionada em diversos trabalhos por estar associada à biossíntese de diversos alcaloides, como por exemplo: CYP80B1 na biossíntese de alcaloide de benzofenantridina na papoula-da-califórnia (*Eschscholzia californica*) (Apuya *et al.* 2008), CYP80F1 envolvido no rearranjo de littorine para hiosciamina em meimendo negro (*Hyoscyamus niger*) na via de biossíntese de alcaloides tropânicos (Li *et al.* 2006), CYP80G2 que pode estar envolvido na biossíntese de magnoflorina em *Coptis japonica* (Ikezawa *et al.*

2008), entre outros. Um exemplo da família CYP82 é a atuação da enzima CYP82E na conversão dos alcaloides nicotina para nornicotina em espécies do gênero *Nicotiana* (tabaco) (Gavilano e Siminszky 2007).

As enzimas CYP719 fazem parte das mesmas vias de biossíntese de alcaloides das CYP80s para a formação de pontes metilenodioxí, estas pontes são um passo chave para a biossíntese de vários tipos diferentes de produtos naturais vegetais (Dang e Facchini 2014; Ikezawa *et al.* 2008; Nelson e Werck-Reichhart 2011). Em um estudo utilizando o silenciamento gênico da enzima CYP719A21, Dang e Facchini (2014) obtiveram como resultado a redução dos níveis de noscapina em papoula (*Papaver somniferum*), mostrando a relação entre a enzima e a produção do alcaloide.

Levando em conta a grande participação de enzimas do citocromo P450 em diversas vias de biossíntese de alcaloides em plantas, estas serão alvo de estudo no presente trabalho com a busca de enzimas diferencialmente expressas entre plantas das espécies *P. microphyllum* e *P. spicatus* nos dados de RNAseq.

### 2.3 Sequenciamento de RNA

A compreensão do transcrito (conjunto completo dos transcritos de um material em uma determinada condição fisiológica e estágio de desenvolvimento) é essencial, entre outros motivos, para a interpretação dos elementos funcionais do genoma, tendo como um dos objetivos a quantificação das mudanças no nível de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento e sob diferentes condições de um organismo (Wang *et al.* 2009).

O RNAseq é um método de sequenciamento de DNA de alto rendimento, que com o seu desenvolvimento forneceu a possibilidade da descoberta de novos genes, mapeamento de transcritomas e identificação e quantificação dos níveis de expressão global de transcritos, sendo os dados gerados altamente quantitativos (Marguerat e Bähler 2010; Trapnell *et al.* 2012; Wang *et al.* 2009).

Para o sequenciamento, uma população de RNA é convertida em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores em uma ou nas duas terminações. Cada molécula é sequenciada para obter pequenas sequências (*reads*) com aproximadamente 30-400 pares de bases, dependendo da tecnologia de sequenciamento de DNA utilizada. As *reads* são então alinhadas em um genoma ou transcritos de referência ou montadas *de novo* sem o uso do genoma (Wang *et al.* 2009). Com relação à análise dos dados gerados pelo RNAseq, normalmente são utilizadas ferramentas de bioinformática que realizam o alinhamento das

*reads* sequenciadas, montagem dos transcritos, anotação do genoma e quantificação dos genes e transcritos (Trapnell *et al.* 2012).

Algumas ferramentas de análise necessitam um genoma de referência para o alinhamento e montagem das *reads*, como é o caso do TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) e Cufflinks (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) e para trabalhos onde não existe um genoma de referência uma das ferramentas utilizadas para a montagem *de novo* é o Trinity (Grabherr *et al.* 2011; Trapnell *et al.* 2012).

A ferramenta Trinity é um método de reconstrução *de novo* de transcriptomas aplicado para processar grandes volumes de *reads* provenientes de RNAseq. A metodologia é composta por três softwares, *Inchworm* (que realiza a montagem dos transcritos), *Chrysalis* (reúne os contigs que são relacionados entre si e constrói um grafo de *Bruijn* para cada conjunto de contigs) e *Butterfly* (analisa o caminho tomado pelas *reads* e pelo pareamento das *reads* no contexto dos grafos de *Bruijn*, e reporta todas as sequências plausíveis de transcritos) (Grabherr *et al.* 2011).

Para a análise e visualização dos dados existe a plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org>) que tem como objetivo a análise de dados de forma acessível, com reprodutibilidade e comunicação transparente entre análises, contando com comunidades distintas atuando em melhorias, produção de tutoriais, etc (Afgan *et al.* 2018).

A tecnologia de RNAseq necessita apenas uma pequena quantidade inicial de amostras de RNA para gerar os dados, sendo altamente precisa para a quantificação dos níveis de expressão dos transcritos e mostrando altos níveis de reprodutibilidade, tanto para replicatas técnicas quanto biológicas (Wang *et al.* 2009).

Diversos trabalhos utilizaram dados de RNAseq para encontrar genes candidatos que pudessem estar envolvidos na rota de biossíntese de metabólitos secundários, tais como a seleção de sete CYP450s e cinco UDP-glucosiltransferase como potenciais candidatos para a biossíntese de um triterpeno em *Siraitia grosvenorii* (Tang *et al.* 2011), seleção de genes relacionados à via de síntese de alcaloides em *Dendrobium* (Shen *et al.* 2017), síntese do monoterpenoide secoiridoide em *Gentiana macrophylla* (Hua *et al.* 2014) e seleção de potenciais genes envolvidos na síntese de ginsenosídeos em *Panax japonicus* (Rai *et al.* 2016), entre outros.

O presente trabalho trará o mesmo foco, onde dados de RNAseq serão utilizados na tentativa de encontrar genes candidatos que possam atuar na via de biossíntese de pilocarpina.

### 3 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo identificar, por meio de dados de transcriptoma e proteômica, possíveis precursores da via de biossíntese de pilocarpina, bem como selecionar os genes que possam atuar na rota de biossíntese, seja na desaminação dos aminoácidos L-histidina e/ou L-treonina ou na conversão de um alcaloide em outro até a produção de pilocarpina.

#### 3.1 Objetivos Específicos

O presente trabalho visa: (1) realizar um estudo mais detalhado da espécie *P. spicatus* em relação à presença e indução de alcaloides, já que a grande maioria dos trabalhos publicados até o momento tem como foco principal as espécies com maior produção de pilocarpina, (2) análise de expressão diferencial dos transcritos sequenciados a partir de folhas de *P. spicatus* e *P. microphyllus*, bem como a seleção de genes candidatos na participação da via de biossíntese de pilocarpina e seleção dos possíveis precursores com base nos dados do transcriptoma e (3) indução da alteração dos níveis de alcaloides em plantas das espécies *P. microphyllus* e *P. spicatus* para melhor compreensão da rota de biossíntese.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Extração e purificação de alcaloides

O produto remanescente do processo de extração comercial de pilocarpina de folhas de jaborandi (denominado “pasta”) foi cedido pelo grupo Centroflora (Botucatu, SP, Brasil - <http://www.centroflora.com.br>) e utilizado para a extração em larga escala de alcaloides com o objetivo de obter os compostos isolados para uso nos demais ensaios. Os alcaloides totais foram extraídos desta pasta pelo método de água ácida descrito no item 4.4. Após a extração, a solução de alcaloides foi neutralizada com hidróxido de amônio (10%) até o pH atingir 9,0. Os alcaloides foram filtrados em papel Whatman (1,2 µm), congelados e liofilizados.

A quantidade de 1 grama (g) de alcaloide seco foi solubilizada em 20 mililitros (ml) de tampão (10 mM de acetato de amônio pH 3), acidificado com ácido fórmico e utilizada em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando coluna preparativa. Para a HPLC preparativa utilizou-se uma coluna C18 (250 x 21,2 mm de diâmetro x 5 µm de tamanho de partícula), com injeção de 2 ml de amostra e vazão de solvente de 17 ml/minuto (min). Como solventes foram usados: fase A (10 mM de acetato de amônio pH 3,0) e fase B

(acetonitrila), conforme descrito por Sawaya *et al.* (2011). O gradiente utilizado começou com 5% de fase B, indo para 10% até 8 min e para 25% até 20 min, se mantendo estável por 2 min e descendo para 5% de fase B até o tempo de 25 min, mantendo-se estável até o final da corrida com 30 min. O comprimento de onda utilizado no detector de UV foi de 212 nm (Sawaya *et al.* 2008). Foi realizada uma corrida inicial em LC/MS para a determinação de quais alcaloides estavam presentes na pasta e quais os tempos de retenção. Foram encontrados o total de 4 alcaloides (pilosinina, pilosina, traquilofilina e anidropilosina), que foram coletados via HPLC preparativa. Para cada pico (alcaloide) foram utilizados de três a seis tubos de coleta, sendo as frações coletadas no intervalo de 6 segundos por tubo. A corrida em HPLC preparativa foi repetida até que se obtivesse o mínimo de 20 ml para cada fração. Corridas em LC/MS foram realizadas para cada uma das frações com o intuito de confirmar a presença de um único pico e do tempo de retenção do composto isolado, as frações foram então neutralizadas com gotas de hidróxido de amônio 89,5% até que o pH fosse de aproximadamente 4,0 para 9,0. Após a neutralização, as frações foram extraídas com clorofórmio para facilitar a etapa posterior de secagem. A extração foi realizada com a adição de 10 ml de clorofórmio para cada 20 ml de solução. A mistura passou por agitação e a fase inferior foi recuperada. O produto da extração foi seco em capela de exaustão.

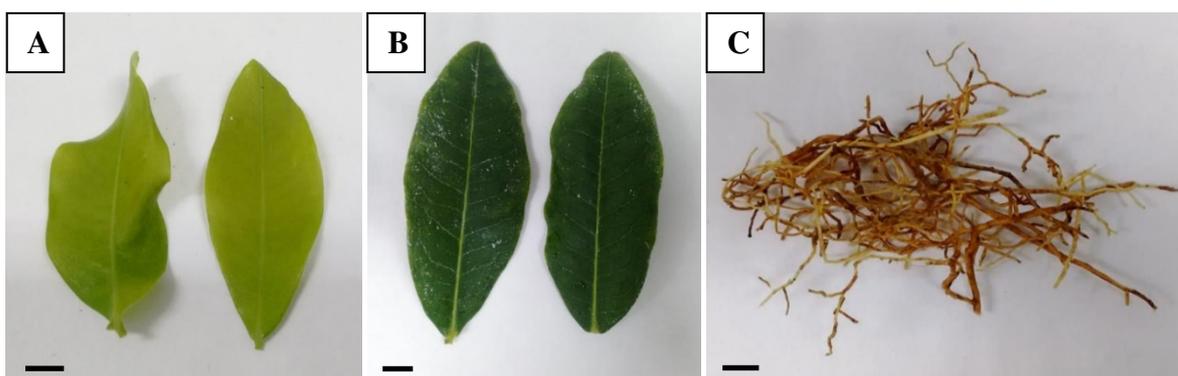
Dos alcaloides isolados neste ensaio, a pilosina ( $m/z$  287) foi utilizada nos ensaios a seguir de indução de alcaloides, os demais não apresentaram concentração suficiente.

#### **4.2 Caracterização do perfil de alcaloides em *P. spicatus***

O objetivo deste ensaio foi analisar o perfil de alcaloides em diferentes partes da planta da espécie de jaborandi *P. spicatus*. Conforme dito anteriormente, esta espécie será utilizada durante todo o trabalho como forma de comparação contra a espécie *P. microphyllus* por apresentar apenas traços ou ausência da produção de pilocarpina, já a espécie *P. microphyllus* já foi amplamente estudada e caracterizada por trabalhos anteriores (Abreu *et al.* 2011; Abreu *et al.* 2007b).

Materiais de três indivíduos de *P. spicatus* foram coletados, sendo a coleta realizada no período do outono (abril – maio /19). As plantas que forneceram material para este ensaio apresentavam no momento da coleta aproximadamente 1 metro de altura, sendo cultivadas em vasos plásticos de 21,5 litros com substrato à base de turfa e casca de pinus, mantidas na casa-de-vegetação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP.

Os tratamentos foram compostos por folhas adultas (segundo e terceiro par de folhas), folhas jovens (primeiro par de folhas), e raiz (figura 6). Foram coletadas cinco amostras de cada tratamento para cada indivíduo. As amostras foram coletadas, lavadas em água corrente, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o processamento. Antes da extração, o material foi macerado em nitrogênio líquido, liofilizado e mantido em dessecador com sílica sob vácuo.



**Figura 6.** Detalhe do material coletado para o ensaio de caracterização de alcaloides de *P. spicatus*. A. Folhas jovens, B. Folhas adultas, e C. Raiz. Barra = 1 cm.

A extração foi realizada pelo método de água ácida descrito no item 4.4, partindo de 30 mg de material seco. Após a extração, a solução de alcaloides foi injetada no espectrômetro de massas (item 4.4) para a análise do perfil de alcaloides.

### 4.3 Alteração no padrão de alcaloides de folhas de jaborandi

Os ensaios a seguir tiveram como objetivo induzir a alteração (aumento ou redução) do padrão de alcaloides produzidos pelas espécies *P. microphyllus* e *P. spicatus*. Para isso, folhas jovens de ambas as espécies foram coletadas, tiveram um pedaço do pecíolo cortado debaixo d'água (água destilada) e colocadas imersas imediatamente nos tratamentos (soluções), a fim de favorecer a absorção das soluções testadas evitando a formação de bolhas, conforme realizado também no trabalho descrito por Sawaya *et al.* (2015). Foram conduzidos dois diferentes ensaios de indução que serão descritos a seguir.

#### 4.3.1 Ensaio de Indução 1

O primeiro ensaio foi composto por cinco tratamentos, onde as folhas coletadas tiveram seu pecíolo imerso nas seguintes soluções:

- Controle: tampão 25 mM fosfato pH 6,0

- Pilocarpina (0,5 mM) em tampão 25 mM fosfato pH 6,0
- Pilocarpina (0,5 mM) em tampão 25 mM fosfato pH 6,0
- Ácido Salicílico (0,5 mM e 2,0 mM) em tampão 25 mM fosfato pH 6,0.

O ácido salicílico foi diluído primeiramente em algumas gotas de etanol 96% antes de ser adicionado ao tampão fosfato e o volume de solução ajustado até atingir a concentração final desejada. Já para os tratamentos contendo alcaloides, os mesmos foram diluídos com o auxílio de algumas gotas de ácido fórmico 85% na solução de tampão fosfato. O pH foi verificado e se manteve próximo de 6.

O ensaio foi composto por 4 replicatas biológicas (4 folhas) por tratamento. Cada replicata biológica foi colocada individualmente em frascos contendo 10 ml e 15 ml da solução, para *P. microphyllus* e *P. spicatus*, respectivamente. Os frascos foram mantidos em câmara BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz. Foram realizadas duas coletas, uma com três e outra com seis dias após o início do ensaio. Em cada uma das coletas as folhas foram retiradas das soluções testadas, lavadas em água destilada, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o processamento. O material foi então liofilizado e utilizado para a extração de alcaloides pelo método de água ácida (item 4.4) e para a extração de aminoácidos por metanol 80% (item 4.5).

#### 4.3.2 Ensaio de Indução 2

O segundo ensaio de indução foi composto por seis tratamentos, nos quais foram testados possíveis aminoácidos precursores da via de biossíntese de pilocarpina em *P. microphyllus*:

- Sem aminoácidos: meio base composto por sais de MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 30 g/L de glicose, sem adição de aminoácidos;
- Histidina: meio base + 5 mM de histidina;
- Treonina: meio base + 5 mM de treonina;
- Fenilalanina: meio base + 5 mM de fenilalanina;
- Mix de aminoácidos: meio base + 5 mM de histidina + 5 mM de treonina + 5 mM de fenilalanina;

Ao final do preparo das soluções o pH foi ajustado para 5,75 com o auxílio de KOH e HCL 1M. O ensaio foi composto por 8 replicatas biológicas (folhas) para cada tratamento.

Cada replicata biológica foi colocada individualmente nos tratamentos em tubos falcon contendo 5 ml de solução. Os tubos foram fechados com papel alumínio e levados para câmara BOD a 26 °C e fotoperíodo de 16 h de luz.

Ao final de oito dias as folhas foram coletadas, lavadas em água corrente, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o processamento. O material foi então liofilizado e utilizado para a extração de alcaloides pelo método de água ácida.

#### **4.4 Extração de alcaloides e análises no espectrômetro de massas**

Para a extração pelo método de água ácida (método desenvolvido pela Prof<sup>a</sup> Alexandra Sawaya – Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos – UNICAMP), 50 mg de material liofilizado e moído foi extraído com 1 ml de água MilliQ contendo 0,1 % de ácido fórmico em banho de ultrassom por 20 min. O sobrenadante foi retirado e guardado, o material foi re-extraído mais duas vezes e os extratos aquosos agregados. Os extratos foram filtrados em filtro Millipore de 0,45 µm para posterior injeção no cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS). O equipamento utilizado foi o Acquity UPLC da Waters acoplado ao espectrômetro de massas Acquity Q-trap detector, com coluna Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 com tamanho de partícula de 1,7 µm e injeção de 1 µl de amostra (5 µl para o ensaio de caracterização de *P. spicatus*). Os solventes utilizados como fase móvel foram: fase A (0,1% de ácido fórmico diluído em água) e fase B (acetonitrila). O gradiente dos solventes utilizado foi de 5% de fase B no início da corrida se mantendo estável por 1 min, passando para 25% até 9 min, se mantendo estável por 1 min e descendo novamente para 5% até 11 min, se mantendo estável até o final da corrida com 12 min. O comprimento de onda utilizado no detector foi de 212 nm. Foram obtidos dados de massa entre  $m/z$  150 e 500. Os parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de massas foram: capilaridade de 3500V, temperatura de 150 °C, cone de 30V e extrator de 1V, com ionização por eletro spray em modo positivo.

Para a determinação da pilocarpina nas amostras, representada pela área dos picos encontrados nos cromatogramas, foram injetadas quantidades conhecidas de uma diluição seriada do padrão pilocarpina (SIGMA). Foram feitas duas curvas, sendo uma para concentrações menores, com as diluições de 0,625 µg/ml a 50 µg/ml (contendo sete pontos na

curva) e outra de 5 µg/ml a 200 µg/ml (contendo 6 pontos na curva) para concentrações maiores. O padrão de pilocarpina foi utilizado como referência para a quantificação de todos os compostos encontrados nas corridas de HPLC/MS das extrações de alcaloides.

#### 4.5 Extração e análise de aminoácidos

Para a extração de aminoácidos 20 mg de material vegetal liofilizado foi extraído com 1 ml de metanol 80% em banho de ultrassom por 15 min. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 8000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi recuperado e filtrado em filtro Millipore de 0,45 µm para posterior injeção no LC-MS (Mokochinski *et al.* 2013). O equipamento utilizado foi o Acquity UPLC da Waters acoplado ao espectrômetro de massas Acquity Q-trap detector, com coluna Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 com tamanho de partícula de 1,7 µm.

#### 4.6 Extração de proteínas e análise de proteômica

Folhas jovens de duas espécies de jaborandi (*P. microphyllus* e *P. spicatus*) foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas. Cerca de 3 g de material macerado foi utilizado para extração de proteínas pelo método de fenol (Hurkman e Tanaka 1986). Ao final do processo de extração, foram separadas duas amostras de cada espécie, sendo que em uma o pellet foi seco em capela de exaustão para análise proteômica e em outra o pellet foi solubilizado em 400 µl de tampão de amostra (2X Laemmli Buffer – 125 mM Tris pH 6,8, 20% glicerol, 1% SDS, 1% DTT) para verificar a qualidade da extração em eletroforese desnaturante e análise de concentração de proteínas (Bradford 1976). Para a eletroforese desnaturante foi utilizado gel pronto para uso - ECL Gel - da Amersham-GE e tampão de corrida 1X (Tris/glicina/SDS) na cuba de corrida. Adicionou-se 25 µl de tampão de corrida 3X (Tris/HCl pH 6,8 100mM; SDS 4,0%; azul de bromofenol 0,2%; glicerol 20,0% e β-mercaptoetanol) em 50 µl de amostra, que foram colocadas em banho seco por 5 min a 95 °C para posterior aplicação em gel. A corrida foi realizada a 160 V por 1 h, e aplicados no gel o peso molecular da BioRad de 250 kD e amostra de 1 µg de cada espécie. O gel foi corado em solução de Coomassie blue por 2,5 h e depois lavado com água destilada e mantido em solução descorante (metanol/ácido acético glacial/água Milli-Q) overnight sob constante agitação.

As amostras secas foram encaminhadas para o centro Charles W. Gehrke Proteomics em Missouri, EUA para identificação proteica pela técnica de espectrometria de massas (LC-MS/MS). Os dados obtidos foram comparados contra o banco de dados do Swiss-

Prot e a estratégia de quantificação relativa de proteínas utilizada foi a *Label-Free Quantification* (LFQ) *intensity*. Na abordagem *Label-Free* a quantificação é mensurada baseada na intensidade do sinal de espectrometria de massas de um íon precursor de peptídeo e este valor de intensidade pode ser comparado com os seus respectivos sinais entre diferentes amostras/experimentos (Bantscheff *et al.* 2007; Latosinska *et al.* 2015; Tyanova *et al.* 2016).

#### 4.7 Extração de RNA e sequenciamento

As espécies *Pilocarpus spicatus* e *P. microphyllus* foram selecionadas para a análise de transcrito. A extração de RNA foi realizada a partir de folhas jovens de ambas as espécies e o método utilizado foi o de perclorato de sódio (Rezaian e Krake 1987). Foi enviado para sequenciamento o total de três amostras de cada espécie. As amostras de *P. spicatus* apresentaram dados de qualidade do RNA (*RNA Integrity Number* - RIN, (Schroeder *et al.* 2006)) de 7,30; 7,80 e 5,40 e as amostras de *P. microphyllus* apresentaram RIN de 8,50; 8,30 e 8,20. O sequenciamento foi obtido pela plataforma Illumina HiSeq2500, pelo LaCTAD (UNICAMP), com geração de *paired end reads* de 100 pares de bases (pb).

##### 4.7.1 Montagem de novo e análise do banco de dados

Utilizando o servidor público (<http://galaxyproject.org/>) da plataforma Galaxy (Afgan *et al.* 2018), os *reads* sequenciados passaram por uma seleção para verificação da qualidade das sequências, sendo “trimadas” aquelas com baixa qualidade. Para isto foi utilizada a ferramenta TRIMMOMATIC (Bolger *et al.* 2014) com média de qualidade exigida = 20 e a abordagem *sliding window trimming* que atua escaneando a *read* partindo da região 5' e removendo o final 3' quando a qualidade média de um grupo de bases está abaixo do *threshold* exigido.

Após esta etapa as *reads* de ambas as espécies foram reunidas e através da plataforma Trinity (Grabherr *et al.* 2011) foi feita a montagem *de novo* e geração de um genoma de referência para o gênero *Pilocarpus*. Com o intuito de saber quais transcritos eram diferencialmente expressos entre os dados de *P. microphyllus* e *P. spicatus*, as *reads* iniciais (trimadas) de cada espécie foram mapeadas através da ferramenta Tophat (Trapnell *et al.* 2009) contra o genoma de referência recém-criado. Após o mapeamento as *reads* foram montadas pela ferramenta Cufflinks (Trapnell *et al.* 2012). As montagens dos transcritos das duas espécies foram unidas e pela ferramenta Cuffdiff foram comparadas obtendo os transcritos diferencialmente expressos entre elas. Os transcritos diferencialmente expressos e significativos estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) foram então analisados no software Blast2GO

(Conesa *et al.* 2005), onde foi realizado um blastx contra o banco de dados de *Arabidopsis* com *e-value* de 1.0E-3, retorno de dois hits por sequência e tamanho mínimo de alinhamento dos hits de 33 bases. Posteriormente foi realizado, utilizando ainda o software Blast2GO, o mapeamento e anotação dos transcritos, sendo a anotação realizada com base nos seguintes parâmetros: *e-value* mínimo dos hits de 1.0E-6 para geração de GO (Gene Ontology), *Annotation Cut-Off* (menor termo que se encontra acima do limite estabelecido) = 55 e *GO-Weight* = 5.

A partir deste banco de dados foi realizada uma busca para saber se teriam sequências relacionadas aos aminoácidos histidina e treonina e sequências do citocromo P450 (enzimas que podem estar atuando dentro da via de biossíntese na conversão de um alcaloide a outro).

Para os transcritos com valor de expressão FPKM > 0 (fragmentos por quilobase de transcrito por milhão de fragmentos mapeados) para ambas as espécies, foi calculado o valor de  $\log_2$  da razão (*fold change*) entre os valores de FPKM de *P. microphyllus* pelos valores de *P. spicatus*. Dessa maneira os transcritos com valores positivos de  $\log_2$  apresentam maior expressão em *P. microphyllus* e os de valor negativo apresentam maior expressão em *P. spicatus*. Estes dados foram utilizados para a construção de um mapa de calor facilitando a visualização dos resultados e pontuação dos transcritos com maior diferença de expressão entre as duas espécies.

Uma análise final foi realizada, onde as sequências anotadas pelo Blast2GO foram analisadas através do banco de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa e Goto 2000) e as sequências classificadas em suas possíveis vias metabólicas.

#### **4.7.2 Alinhamento das CYP450 e montagem da árvore filogenética**

As sequências de CYP450 com valores de expressão (FPKM) maiores que zero para ambas as espécies foram selecionadas e analisadas no software MEGA7 (Kumar *et al.* 2016) para alinhamento das sequências e montagem da árvore filogenética. O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado pela ferramenta MUSCLE (Edgar 2004) utilizando a metodologia *Neighbor Joining*.

A árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbor Joining*, que fornece não somente a topologia, mas também o comprimento dos ramos no final da árvore (Saitou e Nei 1987). A árvore foi construída seguindo os seguintes parâmetros: distância p com supressão *pairwise* (método para lidar com os gaps entre os alinhamentos das sequências,

comparação sempre dois a dois (Nei e Kumar 2000)) e teste de filogenia pelo método *bootstrap* com  $n=1000$ .

#### 4.8 Análise estatística

Para as análises estatísticas e apresentação dos dados dos ensaios de extração de alcaloides foram utilizados os valores em porcentagem (% de um determinado alcaloide em relação ao total de alcaloides encontrados) ou em  $\mu\text{g}$  de alcaloide / mg massa seca.

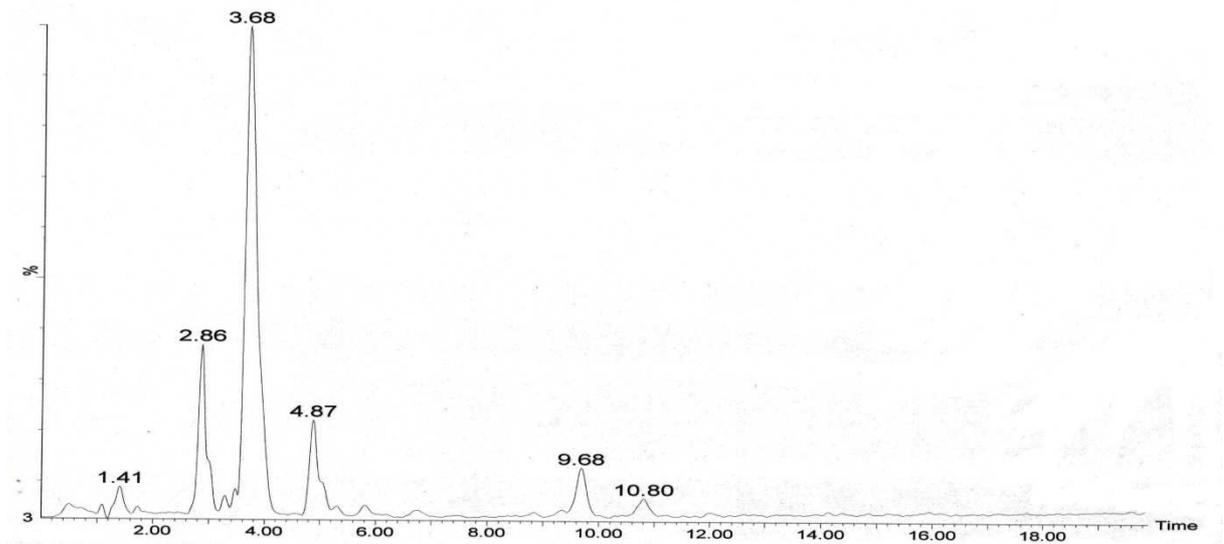
Os ensaios contendo diferentes tratamentos foram realizados utilizando delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo a análise estatística dos dados realizada no software R (RStudio 2018) e/ou no Minitab® Statistical Software (Minitab 2021) com análises de variância (ANOVA), análise de resíduos, teste de normalidade (Anderson-Darling), igualdade de variâncias, teste de médias Tukey com intervalo de confiança de 95% ou teste Games-Howell (95% de confiança) no caso de não assumir variâncias iguais entre as variáveis e análise de componentes principais (PCA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Purificação de alcaloides

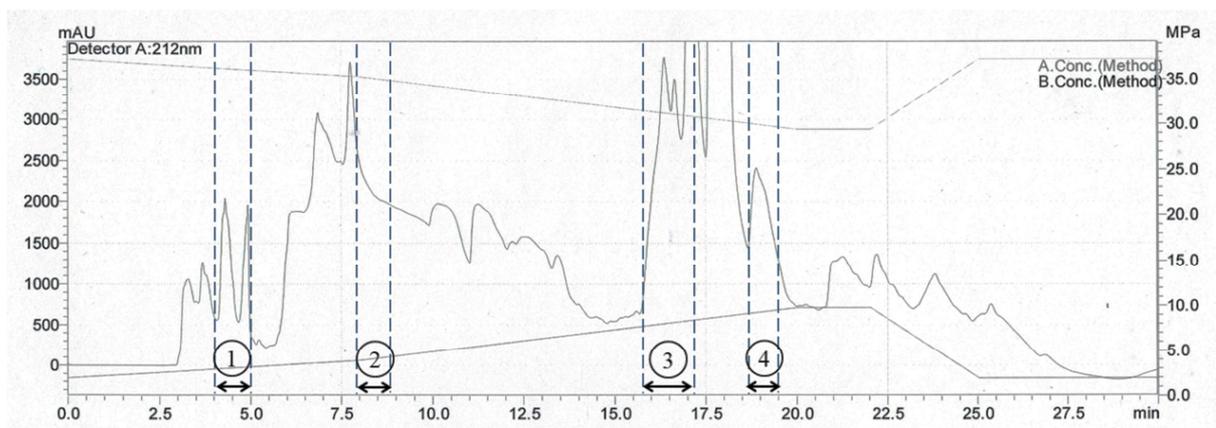
Primeiramente foi realizada a extração de alcaloides da pasta remanescente de extração cedida pela empresa Centroflora com o intuito de obter compostos que poderiam servir como padrões em ensaios de fornecimento de alcaloides a folhas das duas espécies de jaborandi estudadas. Os extratos foram injetados em HPLC-MS onde foi possível observar os picos dos íons referentes aos alcaloides: pilosinina ( $m/z$  181), pilosina ( $m/z$  287), traquilofilina ( $m/z$  259) e anidropilosina ( $m/z$  269), que podem ser observados na figura 7, com os tempos de retenção de 1,41; 4,87; 9,68 e 10,80 min, respectivamente. A pilocarpina ( $m/z$  209) pode ser observada no tempo de 3,68 min. No total foram extraídos aproximadamente 600 ml de solução de alcaloides, o que resultou após a liofilização no total de 6 g de alcaloide seco. Os alcaloides secos foram solubilizados e aplicados em coluna preparativa. O padrão do cromatograma na HPLC preparativa pode ser visto na figura 8, com detalhe para os picos coletados.

Foram isoladas diversas frações de cada alcaloide encontrado na pasta. As frações foram analisadas em espectrômetro de massas para confirmar alguns parâmetros como:  $m/z$  do alcaloide, tempo de retenção e presença de apenas um único pico.



**Figura 7.** Cromatograma do extrato de alcaloides da pasta remanescente da extração de pilocarpina de folhas de jaborandi, onde pode-se observar os compostos: pilosinina ( $m/z$  181, tempo de retenção de 1,41), pilosina ( $m/z$  287, tempo de retenção de 4,87), traquilofilina ( $m/z$  259, tempo de retenção de 9,68) e anidropilosina ( $m/z$  269, tempo de retenção de 10,80).

As frações contendo os mesmos compostos foram agrupadas para posterior neutralização e extração por clorofórmio. Dos alcaloides isolados, apenas a pilosina ( $m/z$  287) apresentou quantidade suficiente para ser utilizada nos ensaios de indução de alcaloides em folhas de jaborandi, como será mostrado a seguir.



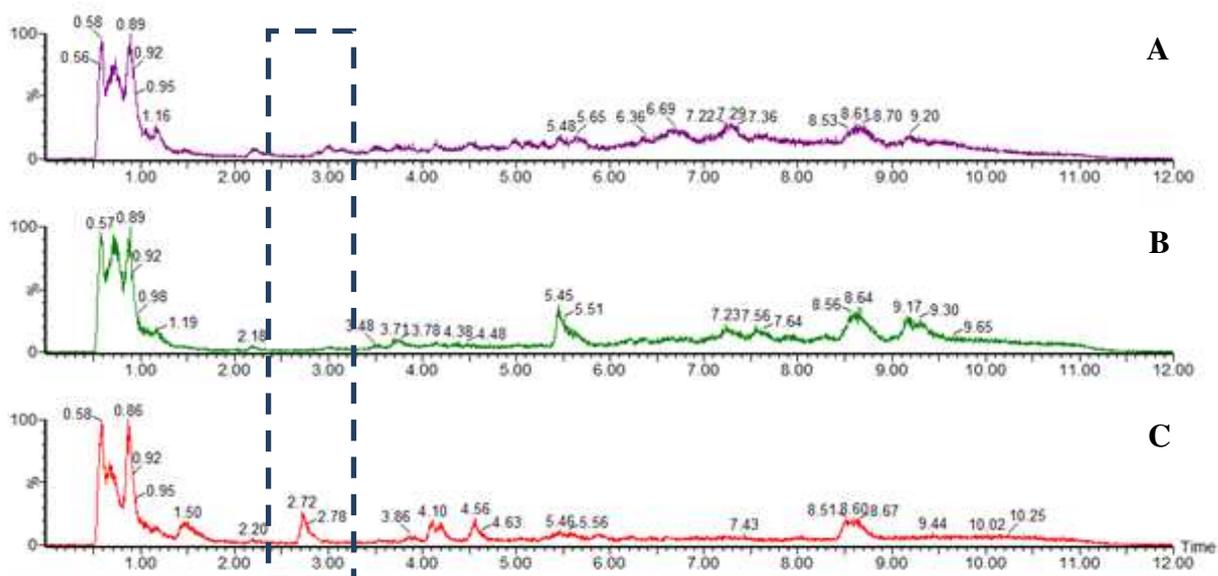
**Figura 8.** Cromatograma em HPLC preparativa do extrato de alcaloides utilizado para a coleta e isolamento dos compostos. Detalhe para os picos dos íons coletados, sendo 1: pilosinina ( $m/z$  181), 2: pilosina ( $m/z$  287), 3: traquilofilina ( $m/z$  259) e 4: anidropilosina ( $m/z$  269).

## 5.2 Caracterização de alcaloides em *P. spicatus*

O perfil de alcaloides em diferentes partes da planta (folhas jovens, folhas adultas e raiz) de três indivíduos de *P. spicatus* (Psp1, Psp2 e Psp3) foi analisado e os cromatogramas de íons totais (TIC) podem ser visualizados na figura 9.

Foi possível observar que a maior intensidade de picos dos íons ocorre nos três primeiros minutos da corrida, sendo este período, portanto, analisado para verificar quais os compostos estão presentes nos diferentes materiais vegetais e em qual concentração.

Ao analisar os picos foi possível encontrar o total de dois alcaloides, tomando como base o trabalho de Sawaya *et al.* (2015), sendo eles: íons com  $m/z$  193 (3-nor-7(11) dehydropilocarpine, tempo de retenção de 0,58 min) e  $m/z$  179 (4-(3H-imidazol-4-ylmethyl)-3-methyl-5H-furan-2-one, tempo de retenção de 0,97 min). Outros picos foram encontrados, porém não foi possível realizar análises para a identificação e determinação da natureza destes compostos, que não foram descritos anteriormente nos trabalhos com *Pilocarpus*. Em uma análise exploratória foi possível observar que dentre estes compostos desconhecidos existe um com tempo de retenção de  $2,92 \pm 0,2$  min e  $m/z$  391 que não está presente em nenhuma amostra foliar, apenas nas amostras de raízes, podendo ser o indicativo de um marcador das raízes (detalhe em tracejado na figura 9). A elucidação de sua estrutura poderá definir a natureza desse composto.



**Figura 9.** Cromatograma do extrato de alcaloides de *P. spicatus* do ensaio de caracterização. Amostra de folhas adultas (A). Amostra de folhas jovens (B). Amostra de raiz (C). Destaque em tracejado para o composto com  $m/z$  391 presente apenas nas amostras de raízes.

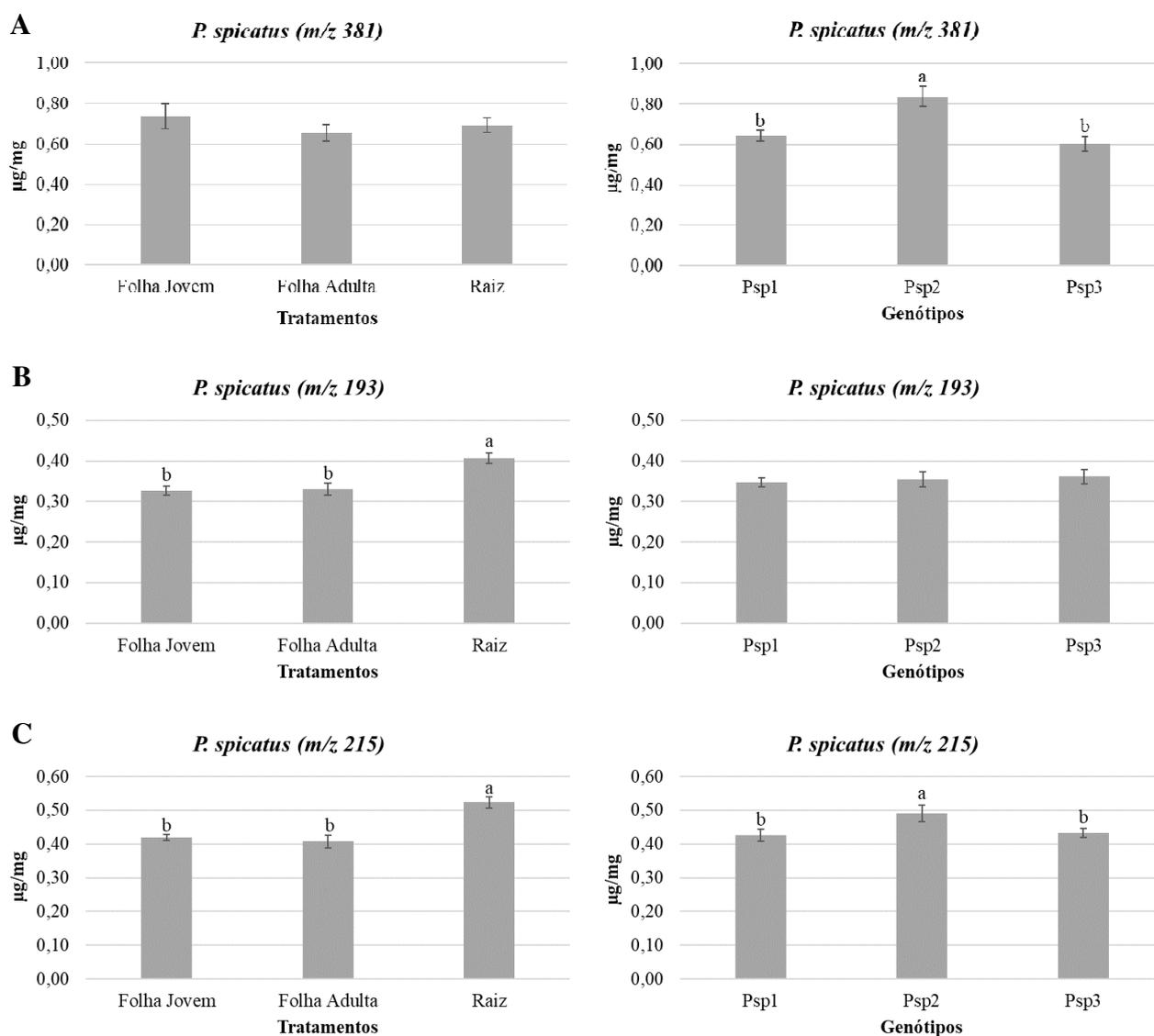
Os dados foram analisados quanto à concentração através da curva realizada para o padrão comercial pilocarpina, sendo os dados da curva extrapolados para todos os alcaloides e compostos encontrados. Para o composto com  $m/z$  381 foi possível verificar que não houve diferença significativa na concentração, tendo variação de apenas 0,04  $\mu\text{g}/\text{mg}$  entre as amostras foliares e radiculares analisadas (figura 10A). Dentre os indivíduos testados, o Psp2 apresentou maior concentração do composto com  $m/z$  381 em comparação aos demais (figura 10A). Com relação ao alcaloide 3-nor-7(11)-*dehydropilocarpine* ( $m/z$  193) não houve diferença entre os indivíduos testados, tendo todos eles apresentado concentração similar do alcaloide. Porém, foi possível observar diferença entre os tecidos, com maior concentração nas amostras de raízes, passando de uma média de 0,33  $\mu\text{g}/\text{mg}$  nas amostras de folhas para 0,4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para as amostras de raiz (figura 10B). O mesmo comportamento foi visto para o composto com  $m/z$  215 que também apresentou maior concentração nas raízes de *P. spicatus* quando comparado com o perfil de compostos das folhas. Para este composto foi observado maior concentração no indivíduo Psp2 em comparação com Psp1 e Psp3, que apresentaram concentrações semelhantes entre si (figura 10C).

O alcaloide 4-(3*H*-imidazol-4-ylmethyl)-3-methyl-5*H*-furan-2-one ( $m/z$  179), com base nos dados apresentados por Sawaya *et al.* (2015), é um dos primeiros alcaloides na via de biossíntese da pilocarpina. Este alcaloide foi encontrado apenas nas amostras de folhas jovens e folhas adultas, não havendo nenhum traço em raízes de *P. spicatus*. Os três indivíduos apresentaram concentrações similares do alcaloide em folhas adultas, com média de concentração de  $0,47 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Valores próximos foram encontrados para as folhas jovens, exceto pelo indivíduo Psp3, no qual a concentração do alcaloide foi significativamente maior, atingindo 1,02  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , fazendo este indivíduo diferir dos demais (figura 11A).

Os alcaloides com  $m/z$  179 e  $m/z$  193 foram descritos anteriormente por Sawaya *et al.* (2011), sendo encontrados em amostras foliares de *P. spicatus*. Ambos os compostos seriam antecessores à pilocarpina na via de biossíntese (Sawaya *et al.* 2015), o fato desta espécie não produzir pilocarpina demonstra uma possível ausência da enzima responsável pela conversão do alcaloide 3-nor-7(11)-*dehydropilocarpine* ( $m/z$  193) em pilocarpina.

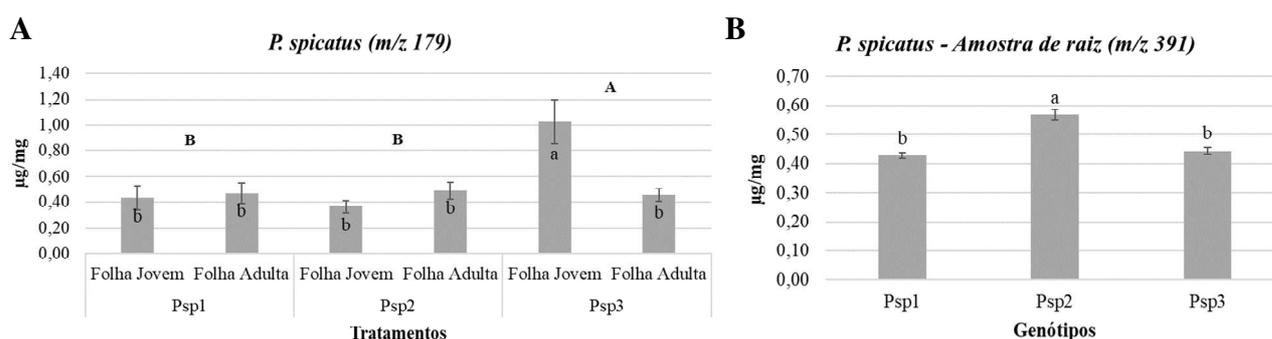
Assim como o alcaloide 4-(3*H*-imidazol-4-ylmethyl)-3-methyl-5*H*-furan-2-one ( $m/z$  179) foi encontrado exclusivamente nas amostras foliares, o composto com  $m/z$  391 por sua vez, foi observado apenas nas raízes de *P. spicatus*, estando em maior concentração no indivíduo Psp2, com variação de 0,43  $\mu\text{g}/\text{mg}$  a 0,57  $\mu\text{g}/\text{mg}$  nas demais plantas estudadas (figura 11B).

Abreu *et al.* (2011) em um trabalho de caracterização de metabólitos em diferentes estágios de desenvolvimento e diferentes partes das plantas de *P. microphyllus*, observaram maiores concentrações de pilocarpina em tecidos foliares mais jovens em comparação com folhas adultas, tronco e raiz. O alcaloide 3-nor-8(11)-*dihydropilocarpine* foi encontrado apenas em folhas de plantas adultas, não sendo quantificado em folhas de plantas jovens, mostrando alterações no padrão de metabólitos dependendo do tipo de tecido estudado e estágio de desenvolvimento da planta, assim como visto no presente estudo com *P. spicatus*.

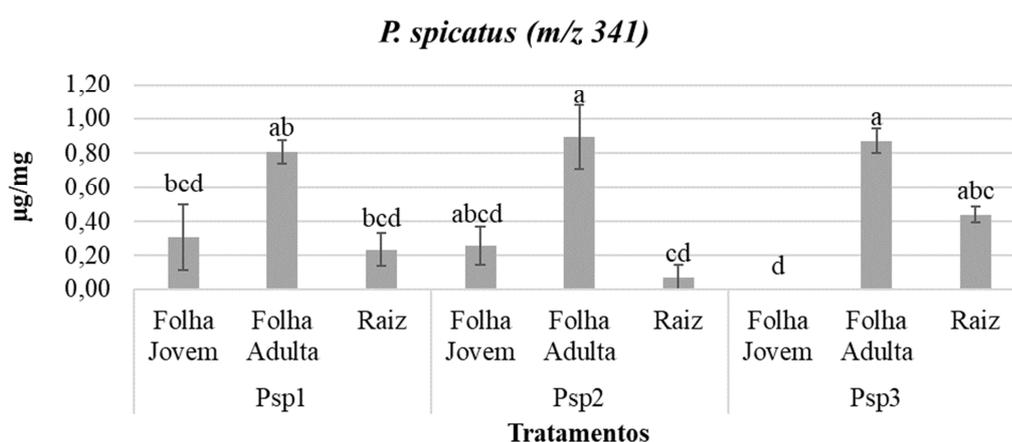


**Figura 10.** Dados de concentração ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) dos alcaloides e demais compostos encontrados no ensaio de caracterização do perfil de *P. spicatus* para os tratamentos e indivíduos estudados. A. Composto com  $m/z$  381. B. Alcaloide com  $m/z$  193. C. Composto com  $m/z$  215. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ . Barras = erro padrão.

O sexto composto encontrado foi o com  $m/z$  341, sendo este presente nas três partes das plantas estudadas, porém, com maior variação de concentração. Não foi possível observar diferença estatística no perfil do composto entre os indivíduos testados, apenas entre os tecidos, sendo a maior concentração encontrada nas amostras de folhas adultas, para as folhas jovens e raízes a concentração encontrada foi similar, exceto pelo indivíduo Psp3, no qual não foi encontrado o composto em folhas jovens (figura 12).

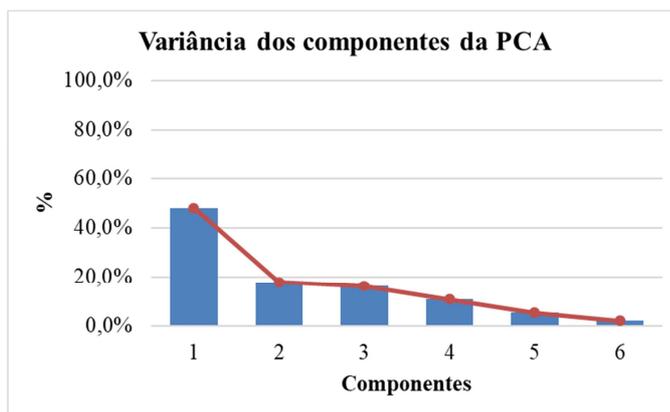


**Figura 11.** Dados de concentração ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) dos compostos encontrados no ensaio de caracterização do perfil de alcaloides de *P. spicatus* para os tratamentos e indivíduos estudados. A. Alcaloide com  $m/z$  179, onde letras maiúsculas mostram diferença entre os indivíduos e minúscula diferença entre os tratamentos. B. Composto com  $m/z$  391. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ . Barras = erro padrão.



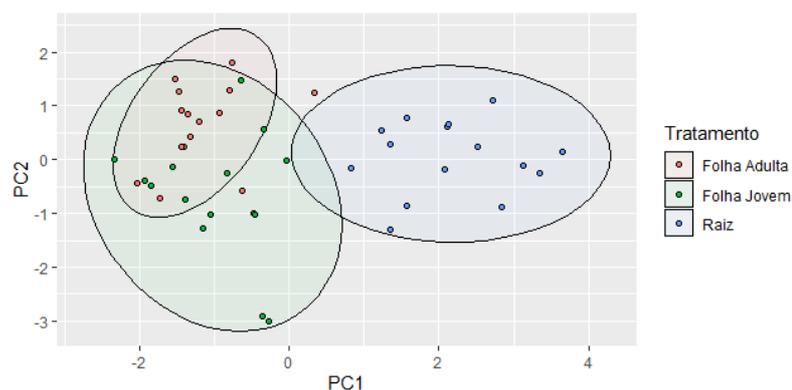
**Figura 12.** Dados de concentração ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) do composto com  $m/z$  341 encontrado nos diferentes tratamentos e indivíduos estudados de *P. spicatus*. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ , sendo as comparações realizadas entre os tratamentos, dentro de cada indivíduo testado. Barras = erro padrão.

Com os dados obtidos foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para obter uma visão mais clara do peso de cada composto encontrado nas variações dos tratamentos e indivíduos estudados. O total de seis componentes principais foi obtido, sendo que destes, os três primeiros explicaram 81,9% de toda a variação dos dados, como pode ser visto ao somar a proporção de variância de cada um dos componentes (figura 13).

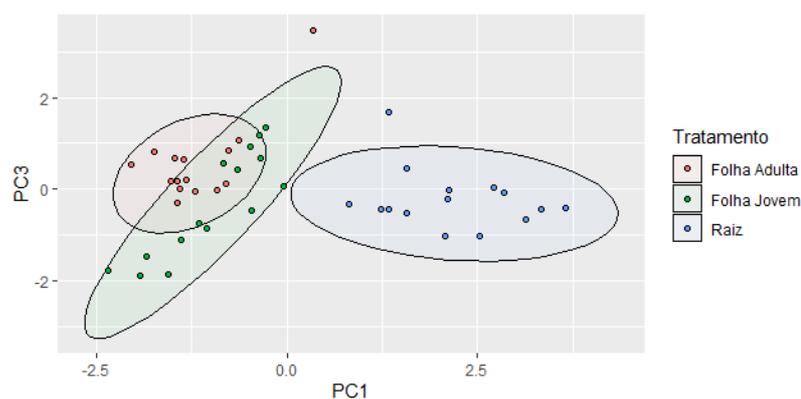


**Figura 13.** Porcentagem de variância dos seis componentes principais obtidos na análise dos dados (PCA) do ensaio de caracterização do perfil de alcaloides de *P. spicatus*, sendo a soma dos três primeiros totalizando 81,9% de toda a variação dos dados obtidos.

Ao observar a clusterização dos dados obtida pelo plano bidimensional da PC1 x PC2 (figura 14) e da PC1 x PC3 (figura 15) é possível observar a sobreposição das amostras foliares e a separação das amostras de folhas e raiz. Para saber quais são os principais componentes responsáveis por esta diferenciação, foi analisado o gráfico denominado *biplot* (Gabriel 1971), no qual se pode observar que para a PC1 os compostos com maior *score* positivo de variação são os com  $m/z$  193 e  $m/z$  215, sendo exatamente os compostos com maior concentração nas raízes quando comparado com as folhas e o composto com  $m/z$  391, presente apenas nas raízes (figura 16). Já com *score* negativo estão os compostos com maior concentração em folhas ( $m/z$  179 e  $m/z$  341). Sendo assim, através da análise de PCA foi possível pontuar os principais compostos responsáveis pela maior fonte de variação dos tratamentos estudados, representado pela PC1, sendo esta responsável pela separação do perfil de folhas e raízes.

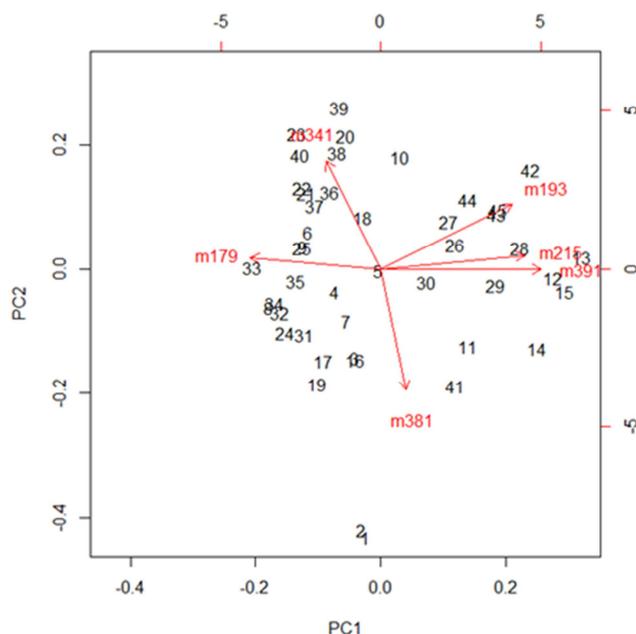


**Figura 14.** Resultado da análise de componentes principais. Agrupamento dos dados da PC1 (48% da variação) versus PC2 (17,8% da variação) nos diferentes tratamentos estudados.



**Figura 15.** Resultado da análise de componentes principais. Agrupamento dos dados da PC1 (48% da variação) versus PC3 (16,2% da variação) nos diferentes tratamentos estudados.

No trabalho realizado por Abreu *et al.* (2011), foi possível através da análise de componentes principais, separar o perfil de metabólitos das diferentes partes (amostras foliares, caule e raiz) de plantas jovens de *P. microphyllus*, além da separação do perfil de plantas em estágios diferentes de desenvolvimento (plantas jovens x plantas adultas).



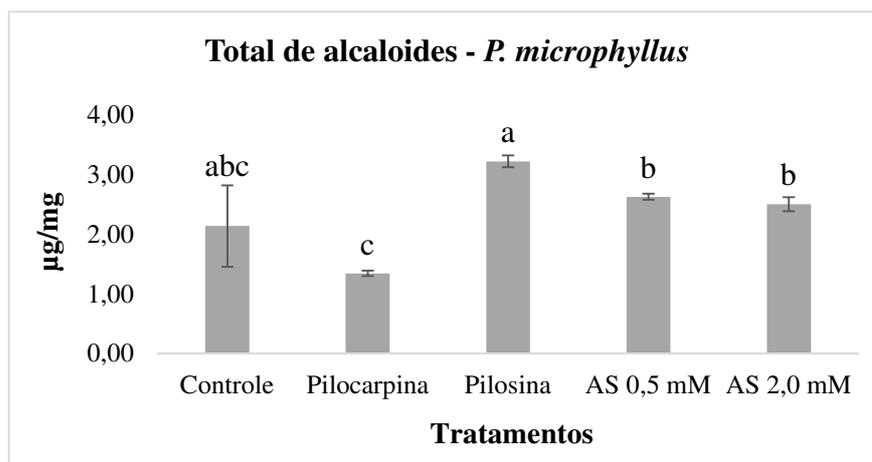
**Figura 16.** Resultado da análise de componentes principais. Gráfico Biplot com a sobreposição dos escores de cada amostra e das variáveis analisadas no ensaio de caracterização do perfil do extrato de alcaloides de *P. spicatus* para a PC1 (48% da variação) versus PC2 (17,8% da variação), em vermelho pode-se observar os compostos identificados.

### 5.3 Ensaio Indução de alcaloides

#### 5.3.1 Ensaio de Indução 1

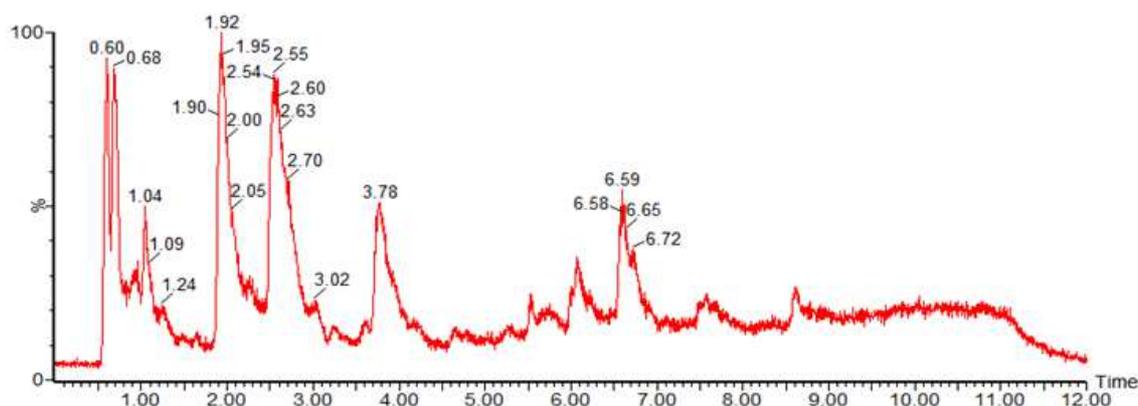
Folhas de duas espécies de jaborandi foram imersas em diferentes soluções (tratamentos) com o intuito de verificar a ocorrência de alterações nos níveis de alcaloides produzidos. Os dados das folhas coletadas com apenas três dias de ensaio não geraram resultados diferentes de concentração de alcaloides entre as soluções testadas, sendo este tempo insuficiente para gerar dados contrastantes, foi possível observar diferença apenas entre o controle e os demais tratamentos, porém não entre os tratamentos, que era o intuito do ensaio.

Para o tempo de seis dias e a espécie *P. microphyllus*, ao colocar o pecíolo das folhas em solução de pilosina, o total de alcaloides extraídos a partir das folhas foi superior estatisticamente ao total encontrado nos demais tratamentos (com exceção do controle), o inverso foi observado no tratamento em solução de pilocarpina, que apresentou a menor concentração de alcaloides totais, sendo observado valor inferior que a metade do que foi encontrado nos tratamentos em solução de pilosina e ácido salicílico (AS) (figura 17).



**Figura 17.** Total de alcaloides obtidos na espécie *P. microphyllus* (em µg/mg) após 6 dias das folhas imersas nas diferentes soluções de elicitores e alcaloides. Barras = desvio padrão. Letras distintas diferem estatisticamente pelo método Games-Howell com  $p \leq 0,05$ .

O perfil de alcaloides da planta de *P. microphyllus* utilizada no presente trabalho pode ser visualizado no cromatograma proveniente da corrida de LC-MS (figura 18). O total de nove alcaloides/isômeros tiveram seu pico amostrado e a área quantificada, o tempo de retenção e a massa/carga ( $m/z$ ) de cada alcaloide encontrado podem ser vistos na tabela 2.



**Figura 18.** Cromatograma dos alcaloides extraídos da espécie *P. microphyllus*, com detalhe para o tempo de retenção (rt) da pilocarpina (rt = 1,92 min).

**Tabela 2.** Descrição dos alcaloides encontrados na extração a partir de folhas de *P. microphyllus*. Detalhe do tempo de retenção (min) e massa/carga ( $m/z$ ) de cada alcaloide.

Tempo de Retenção (min)	$m/z$	Alcaloide
0,98	193	3-nor-7(11)-dehydropilocarpine
1,04	241	3-(3-methyl-3H-imidazol-4-ylmethyl)-1-phenyl-but-3-en-1-one
1,92	209	Pilocarpina
2,63 / 3,75 / 6,59	287	Pilosina e isômeros
5,76	255	3-Benzylidene-4-(3H-imidazol-4-ylmethyl)-dihydro-furan-2-one
6,01	269	Anidropilosina

Ao manter as folhas com o pecíolo imerso em solução de pilocarpina foi possível observar maior proporção do alcaloide com  $m/z$  193 (tabela 3) em comparação com o tratamento em solução de ácido salicílico 5 mM (1,35% e 0,55%, respectivamente). No trabalho realizado por Sawaya *et al.* (2015), foi observado o aumento do alcaloide com  $m/z$  193 em solução de pilocarpina, mostrando que o alcaloide *3-nor-7(11) dehydropilocarpine* ( $m/z$  193) é um precursor da pilocarpina na via de biossíntese de alcaloides de jaborandi, sendo que o excesso de pilocarpina pode ter ocasionado uma retroinibição da sua formação e, conseqüentemente, acúmulo do composto com  $m/z$  193 e desvio de rota para a produção de anidropilosina. Pode-se observar no presente estudo o aumento de 12,11% para 16,7% de um dos isômeros de pilosina (passo anterior à produção de anidropilosina) e de 3,51% para 3,71% de anidropilosina (tabela 3), o que pode comprovar a mudança de rota de produção de pilocarpina para a produção de anidropilosina, confirmando novamente mais uma parte da rota descrita por Sawaya *et al.* (2015) (tabela 3).

Já para o tratamento em que foi adicionado o alcaloide pilosina na solução de imersão, pode-se observar que os níveis de pilosina e de seus isômeros nas folhas mantiveram-se constantes, não ocorrendo retroinibição.

Com relação aos tratamentos contendo ácido salicílico, a concentração de 0,5 mM manteve o perfil de alcaloides semelhante ao controle, já a concentração de 2 mM ocasionou aumento de 55% para 65,99% de pilocarpina e redução de pilosina e seus isômeros.

Alguns trabalhos citam o uso do ácido salicílico para o aumento do nível de alcaloides, como em *Catharanthus roseus* (L.) (Idrees *et al.* 2013) e *Eschscholtzia californica* (Cho *et al.* 2007). O ácido salicílico, entre outras características, apresenta um importante papel na tolerância das plantas a estresses abióticos e atua como um sinalizador envolvido na resistência sistêmica adquirida pelas plantas ao ataque de patógenos (Avancini *et al.* 2003; Idrees *et al.* 2011; Verpoorte e Memelink 2002). Avancini *et al.* (2003) em seu trabalho com

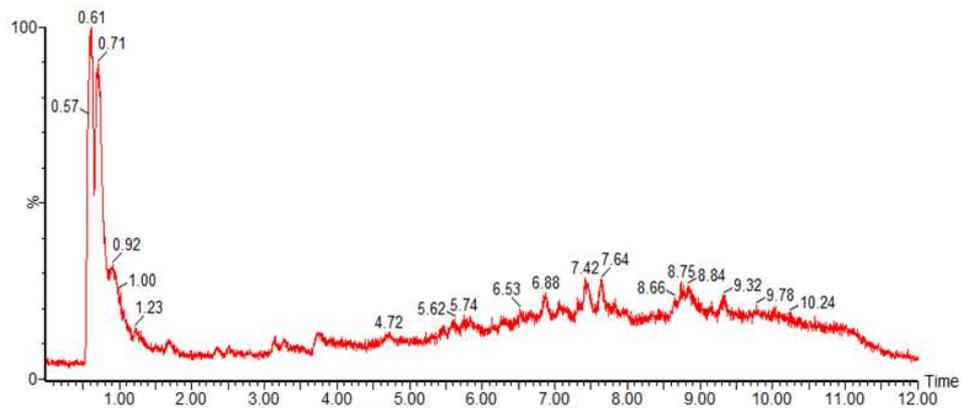
aplicação de ácido salicílico via spray foliar, verificou um aumento significativo de pilocarpina em folhas de jaborandi após 9 dias da aplicação, corroborando com os dados aqui apresentados.

Os alcaloides com  $m/z$  241,  $m/z$  269,  $m/z$  255 e  $m/z$  287 foram os que mantiveram os níveis mais estáveis dentre os tratamentos testados.

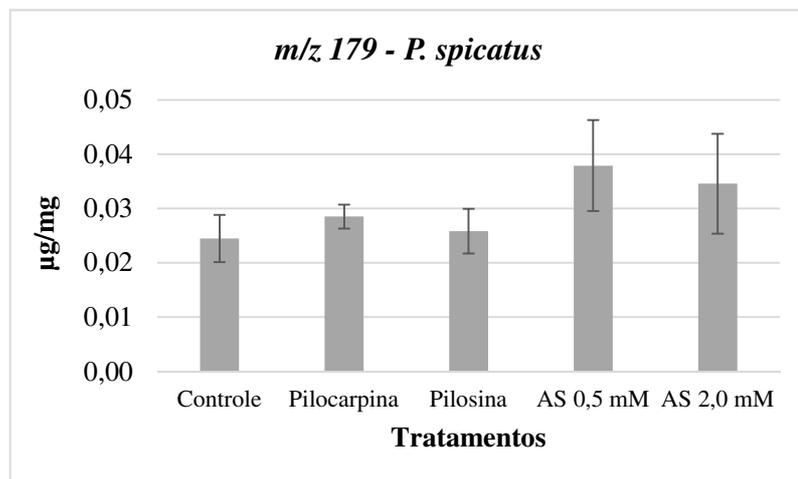
**Tabela 3.** Dados do ensaio de indução de alcaloides da espécie *P. microphyllus*. Perfil de alcaloides apresentado em porcentagem ( $\pm$  desvio padrão) para os diferentes tratamentos. Letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de médias Tukey ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos.

Tratamentos	Perfil de alcaloides (%)							
	$m/z$ 193	$m/z$ 241	$m/z$ 209	$m/z$ 287	$m/z$ 287	$m/z$ 287	$m/z$ 269	$m/z$ 255
<b>Controle</b>	0,85 $\pm$ 0,29 (ab)	5,58 $\pm$ 1,31	55 $\pm$ 3,54 (bc)	10,28 $\pm$ 2,56	12,22 $\pm$ 1,74 (ab)	12,11 $\pm$ 5,61 (ab)	3,51 $\pm$ 0,41	0,45 $\pm$ 0,08
<b>Pilocarpina</b>	1,35 $\pm$ 0,22 (a)	6,22 $\pm$ 1,86	47,95 $\pm$ 4,2 (c)	10,5 $\pm$ 2,16	13,08 $\pm$ 2,22 (a)	16,7 $\pm$ 2,92 (a)	3,71 $\pm$ 0,45	0,5 $\pm$ 0,11
<b>Pilosina</b>	0,83 $\pm$ 0,44 (ab)	5,59 $\pm$ 3,11	58,24 $\pm$ 8,33 (abc)	10,36 $\pm$ 0,66	11,84 $\pm$ 1,15 (ab)	8,83 $\pm$ 4,4 (ab)	3,86 $\pm$ 0,36	0,45 $\pm$ 0,06
<b>AS 0,5 mM</b>	0,55 $\pm$ 0,09 (b)	4,73 $\pm$ 1,23	60,43 $\pm$ 1,67 (ab)	10,18 $\pm$ 0,59	11,77 $\pm$ 0,51 (ab)	8,37 $\pm$ 0,5 (ab)	3,54 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,09
<b>AS 2,0 mM</b>	0,79 $\pm$ 0,18 (ab)	5,74 $\pm$ 1,24	65,99 $\pm$ 3,65 (a)	8,45 $\pm$ 1,4	9,54 $\pm$ 1,48 (b)	5,78 $\pm$ 1,5 (b)	3,29 $\pm$ 1,11	0,41 $\pm$ 0,04

Os mesmos tratamentos foram aplicados em *P. spicatus*, porém nesta espécie só foi possível detectar o alcaloide com  $m/z$  179 (*4-(3H-imidazol-4-ylmethyl)-3-methyl-5H-furan-2-one*), com tempo de retenção de 0,92 min (figura 19). O total de alcaloides não se alterou dentre os tratamentos testados, ficando em média com 0,03  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (figura 20). O alcaloide *4-(3H-imidazol-4-ylmethyl)-3-methyl-5H-furan-2-one* ( $m/z$  179), conforme dito anteriormente seria um dos primeiros alcaloides na via de biossíntese da pilocarpina dando origem ao alcaloide *3-nor-7(11)-dehydropilocarpine* ( $m/z$  193), sendo este o precursor da pilocarpina e encontrado nas amostras de *P. microphyllus* deste ensaio.



**Figura 19.** Cromatograma dos alcaloides extraídos a partir de amostras foliares da espécie *P. spicatus*.

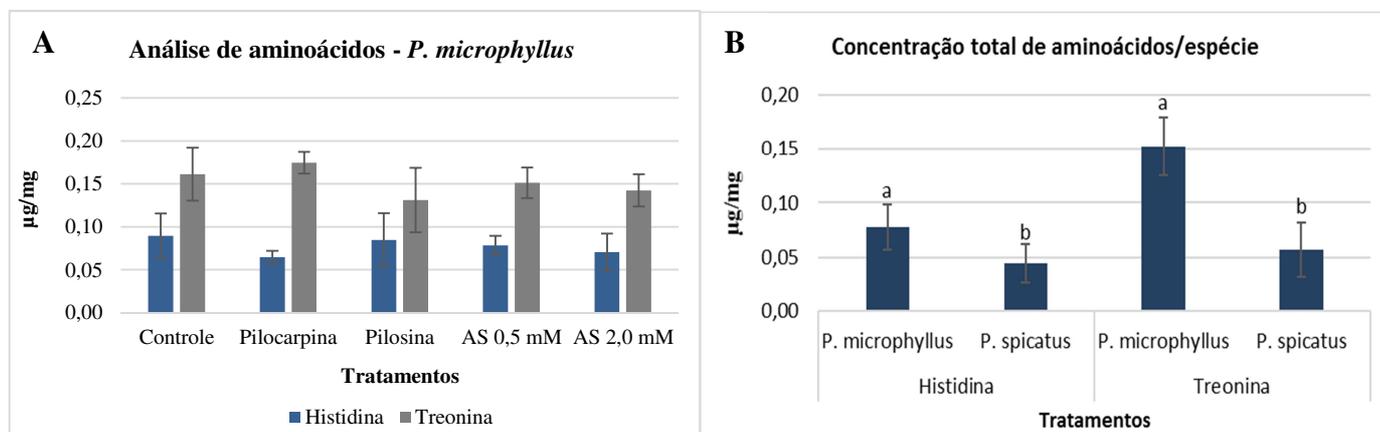


**Figura 20.** Dados do ensaio de indução de alcaloides da espécie *P. spicatus*. Perfil de alcaloides apresentado em µg/mg para os diferentes tratamentos. Barras = erro padrão.

### 5.3.2 Análise de aminoácidos nos tratamentos de indução 1

As mesmas amostras foliares dos tratamentos testados no item 5.3.1 foram utilizadas para a análise de histidina e treonina (possíveis precursores do alcaloide pilocarpina). Pode-se observar que não houve diferença significativa na concentração dos aminoácidos entre os tratamentos testados, porém o que se pode observar é a maior concentração de treonina em relação ao aminoácido histidina para a espécie *P. microphyllus* (figura 21A). Para *P. spicatus* não houve diferença de concentração entre os tratamentos e nem entre os aminoácidos. Porém foi realizado um comparativo entre as espécies *P. spicatus* e *P. microphyllus*, onde foi possível observar que tanto para histidina quanto para treonina a

concentração dos aminoácidos é maior em *P. microphyllus* do que em *P. spicatus* (figura 21B), dado que corrobora com o fato da primeira espécie apresentar maiores concentrações de alcaloides em comparação com a segunda.



**Figura 21.** Análise dos aminoácidos histidina e treonina da espécie *P. microphyllus* para todos os tratamentos testados no ensaio de indução de alcaloides (A). Comparação da concentração dos aminoácidos histidina e treonina entre as espécies *P. microphyllus* e *P. spicatus* independente do tratamento testado (B). Letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de médias Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras = desvio padrão.

### 5.3.3 Ensaio de Indução 2

O segundo ensaio de indução teve por objetivo tentar alterar os níveis dos alcaloides presentes nas folhas através da suplementação de aminoácidos que são possíveis precursores da via de biossíntese de pilocarpina. O ensaio foi realizado com a espécie *P. microphyllus*, que contém alta concentração de pilocarpina. Ao analisar os dados provenientes da corrida de HPLC-MS verificou-se que os tratamentos testados não foram capazes de provocar oscilação nas concentrações dos alcaloides nas folhas. Neste ensaio foram identificados e quantificados 12 alcaloides/isômeros, sendo a pilocarpina encontrada em maior quantidade representando 25,9% dos alcaloides encontrados (tabela 4).

**Tabela 4.** Dados do ensaio de indução de alcaloides (2) da espécie *P. microphyllus*. Perfil de alcaloides apresentado em porcentagem ( $\pm$ DP) para os diferentes tratamentos. Letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de médias Tukey ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos testados.

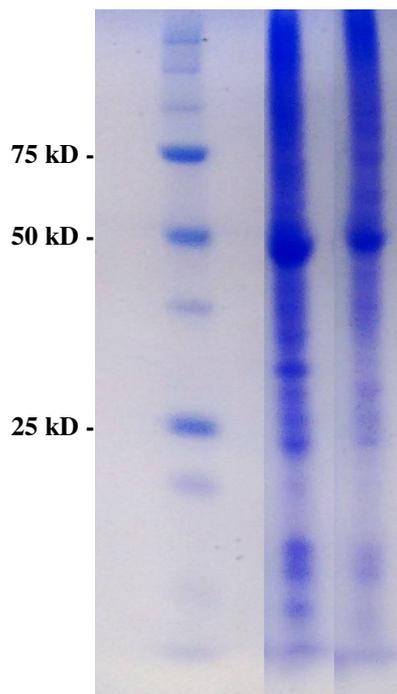
Perfil de alcaloides % (tempo de retenção)						
Tratamentos	m/z 193 (0,98)	m/z 241 (1,06)	m/z 209 (1,92)	m/z 287 (2,53)	m/z 287 (3,75)	m/z 287 (6,58)
Sem aminoácidos	1,42 $\pm$ 0,31	3,37 $\pm$ 0,44 (ab)	23,86 $\pm$ 4,32	9,32 $\pm$ 0,79	12,12 $\pm$ 1,14	4,96 $\pm$ 1,12
Histidina (5 mM)	1,26 $\pm$ 0,11	4,00 $\pm$ 0,46 (a)	28,09 $\pm$ 1,63	8,43 $\pm$ 0,41	11,33 $\pm$ 0,58	4,31 $\pm$ 1,3
Treonina (5 mM)	1,19 $\pm$ 0,08	2,94 $\pm$ 0,65 (b)	25,45 $\pm$ 1,65	9,29 $\pm$ 0,66	12,22 $\pm$ 0,77	4,04 $\pm$ 0,43
Phenilalanina (5 mM)	1,41 $\pm$ 0,20	3,45 $\pm$ 0,59 (ab)	24,23 $\pm$ 5,56	9,21 $\pm$ 1,13	12,38 $\pm$ 1,76	4,79 $\pm$ 0,83
Mix de aminoácidos	1,42 $\pm$ 0,30	3,44 $\pm$ 0,73 (ab)	24,92 $\pm$ 3,80	9,20 $\pm$ 0,93	12,10 $\pm$ 1,21	4,53 $\pm$ 0,70

Perfil de alcaloides % (tempo de retenção)						
Tratamentos	m/z 269 (2,39)	m/z 269 (3,62)	m/z 269 (6,01)	m/z 255 (2,09)	m/z 255 (3,45)	m/z 255 (5,76)
Sem aminoácidos	26,06 $\pm$ 1,45	8,07 $\pm$ 0,80	3,46 $\pm$ 0,20	3,66 $\pm$ 0,28	2,20 $\pm$ 0,08	1,49 $\pm$ 0,21
Histidina (5 mM)	24,38 $\pm$ 1,26	7,52 $\pm$ 0,28	3,87 $\pm$ 0,29	3,31 $\pm$ 0,26	2,11 $\pm$ 0,11	1,39 $\pm$ 0,12
Treonina (5 mM)	26,78 $\pm$ 1,75	7,97 $\pm$ 0,40	3,51 $\pm$ 0,60	3,42 $\pm$ 0,35	1,93 $\pm$ 0,28	1,27 $\pm$ 0,10
Phenilalanina (5 mM)	25,76 $\pm$ 3,10	8,28 $\pm$ 1,02	3,45 $\pm$ 0,41	3,43 $\pm$ 0,23	2,15 $\pm$ 0,25	1,45 $\pm$ 0,17
Mix de aminoácidos	25,81 $\pm$ 2,05	8,11 $\pm$ 0,72	3,38 $\pm$ 0,40	3,54 $\pm$ 0,42	2,13 $\pm$ 0,36	1,43 $\pm$ 0,28

De acordo com os resultados obtidos não foi possível obter uma conclusão em relação à participação dos aminoácidos testados na via de biossíntese de pilocarpina. Conforme dito anteriormente, em meados dos anos 70 foi realizado um estudo com aminoácidos marcados ( $^{14}\text{C}$ ) em ramos de *P. pennatifolius*, onde não foi verificado resultado positivo para a incorporação de histidina e treonina (Brochmann–Hanssen *et al.* 1975). Apesar dos resultados encontrados, ainda existe a hipótese de estes dois aminoácidos serem precursores da via de biossíntese, uma das abordagens que será tratada neste trabalho é a busca de enzimas que possam atuar na desaminação destes aminoácidos, sendo este o primeiro passo para o início da biossíntese dos alcaloides em jaborandi.

#### 5.4 Extração de proteínas e análise proteômica

As amostras de proteínas, após a extração, foram avaliadas quanto a sua qualidade pelo gel de eletroforese, que pode ser visualizado na figura 22.

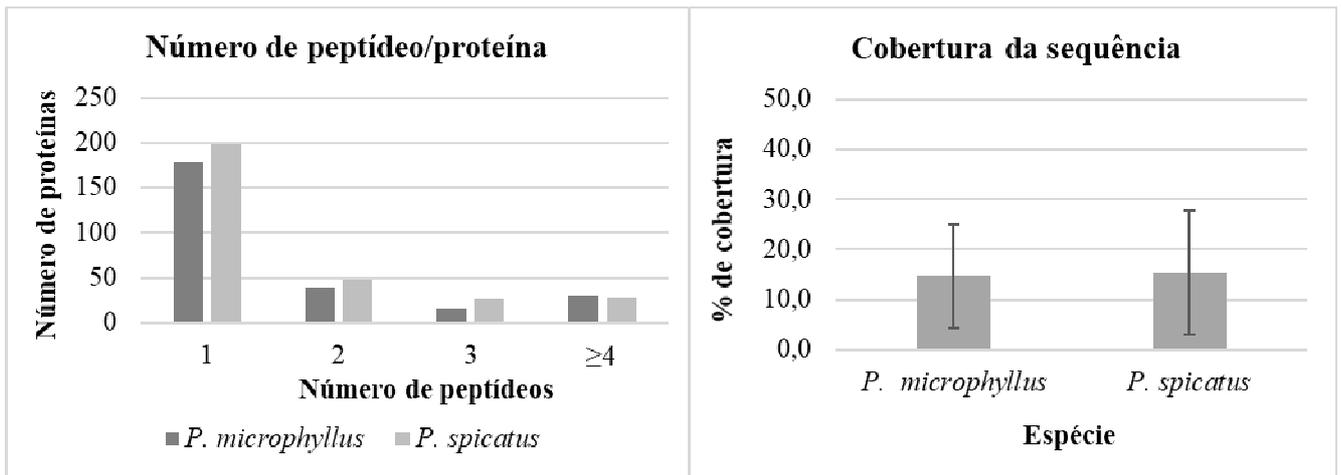


**Figura 22.** Gel de poliacrilamida com as amostras da extração total de proteínas de jaborandi. Coluna 1: Marcador Bio-Rad 250 kD, Coluna 2: Amostra de *P. microphyllus* (1  $\mu$ g) e Coluna 3: Amostra de *P. spicatus* (1  $\mu$ g).

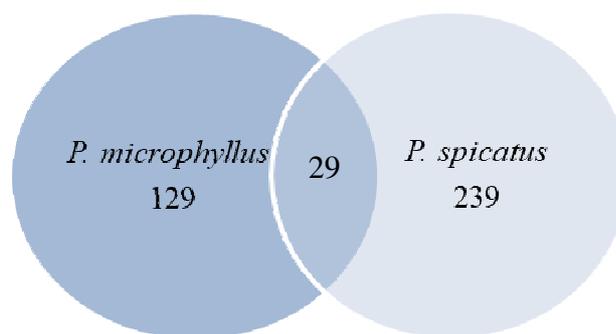
Na análise de proteômica foi encontrado o total de 4168 proteínas mapeadas em 397 códigos proteicos distintos (podendo ter proteínas com o mesmo nome, porém mapeadas de espécies diferentes). Ao analisar o número de peptídeos encontrados em cada uma das proteínas, pode-se observar que aproximadamente 67% apresentaram apenas um peptídeo e os demais 33% estão distribuídos entre proteínas com mais de dois peptídeos (figura 23A). Das proteínas que apresentaram dois ou mais peptídeos foi realizada a média da porcentagem de cobertura destas sequências (*sequence coverage %*), ficando a média em 15% (figura 23B). Existe um número variável de cobertura de sequência protéica encontrado em literatura, como por exemplo, 44% em um trabalho recente com *Arabidopsis* (Mergner *et al.* 2020), faixa entre 15% e 57% encontrada em dados de raízes de *Zea Mays L.* (Li *et al.* 2007) e de 9% a 58% em dados de folhas de *Oryza sativa L. cv. Dongjin* (Lee *et al.* 2010a). Fairchild *et al.* (2010) em seu estudo, concluiu que um dos fatores que pode aumentar a taxa de cobertura de sequência é a escolha apropriada da coluna cromatográfica que é utilizada para a análise dos peptídeos, sendo a correlação entre estas variáveis dependentes do diâmetro médio das partículas que são injetadas, comprimento da coluna cromatográfica e do sistema de fases utilizado.

Das 397 proteínas encontradas no presente trabalho apenas 29 delas apresentavam intensidade de sinal acima de zero para as duas espécies estudadas, como pode ser visto no

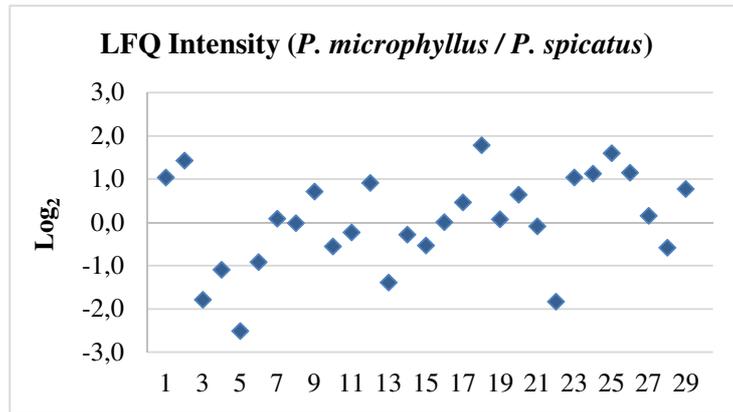
diagrama de Venn (figura 24). Ao avaliar as 29 proteínas, verificou-se que em 55,2% delas a intensidade foi maior em *P. microphyllus* em comparação a *P. spicatus*. Na figura 25 pode-se visualizar a dispersão do  $\log_2$  da razão entre *P. microphyllus* e *P. spicatus*, onde valores  $>0$  significam maior intensidade do íon cromatográfico em *P. microphyllus* e valores  $<0$  maior intensidade detectada em *P. spicatus*.



**Figura 23.** A. Número de peptídeos de cada uma das proteínas encontradas na análise de Proteômica de duas espécies de jaborandi. B. Porcentagem de cobertura das sequências de proteínas na análise de proteômica de duas espécies de jaborandi.

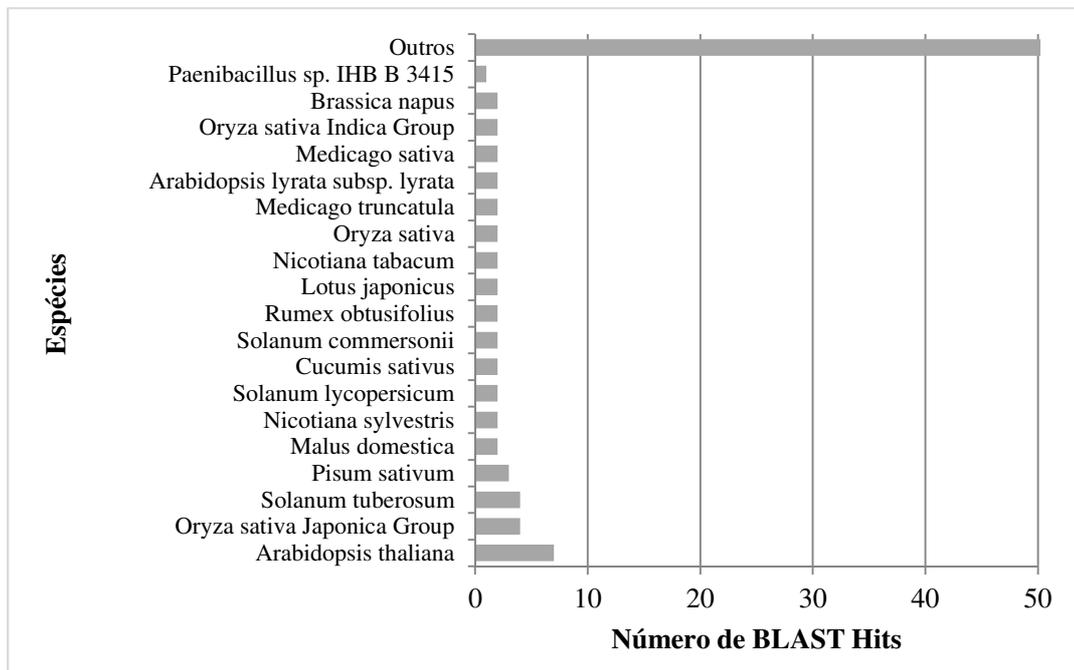


**Figura 24.** Diagrama de Venn com o número total de proteínas expressas em cada espécie estudada de jaborandi. Dados provenientes da análise de proteômica.



**Figura 25.** Log<sub>2</sub> da razão entre as áreas dos picos cromatográficos (LFQ intensity) de *P. microphyllus* sobre *P. spicatus*. Dados provenientes da análise de proteômica de jaborandi.

As sequências de proteínas que estavam presentes em ambas as espécies passaram por um blastp contra o banco de dados *nonredundant* (nr) do NCBI através do software Blast2GO. Na figura 26 pode ser visualizada a distribuição de espécies que retornaram sequências semelhantes para todos os BLAST hits de proteínas de *Pilocarpus*.



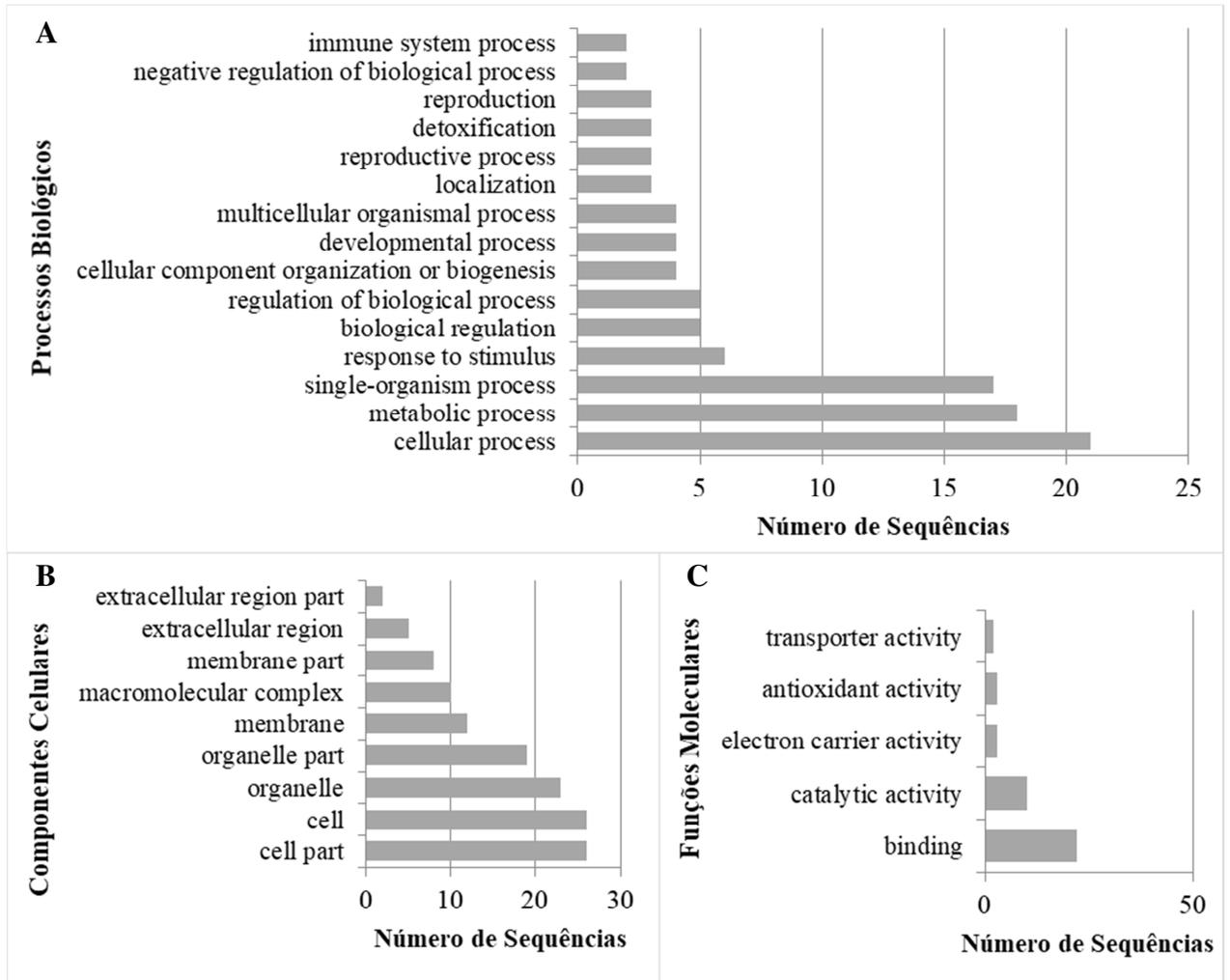
**Figura 26.** Distribuição de espécies dos blast hits das sequências de proteínas encontradas nas duas espécies de jaborandi estudadas.

Após o blastp as sequências foram mapeadas e anotadas, gerando um total de 179 anotações, que foram classificadas em processos biológicos (figura 27A), componentes

celulares (figura 27B) e funções moleculares (figura 27C), sendo em sua grande maioria proteínas atuantes em processos celulares e metabólicos, com atividades catalíticas e de ligação (*binding*).

De forma geral, as proteínas que foram encontradas em maior quantidade estão relacionadas aos sistemas fotossintéticos (19,8%) e à proteína ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase – rubisco (14,7%), ou seja, o mínimo de 34,5% das proteínas encontradas estão relacionadas diretamente à fotossíntese.

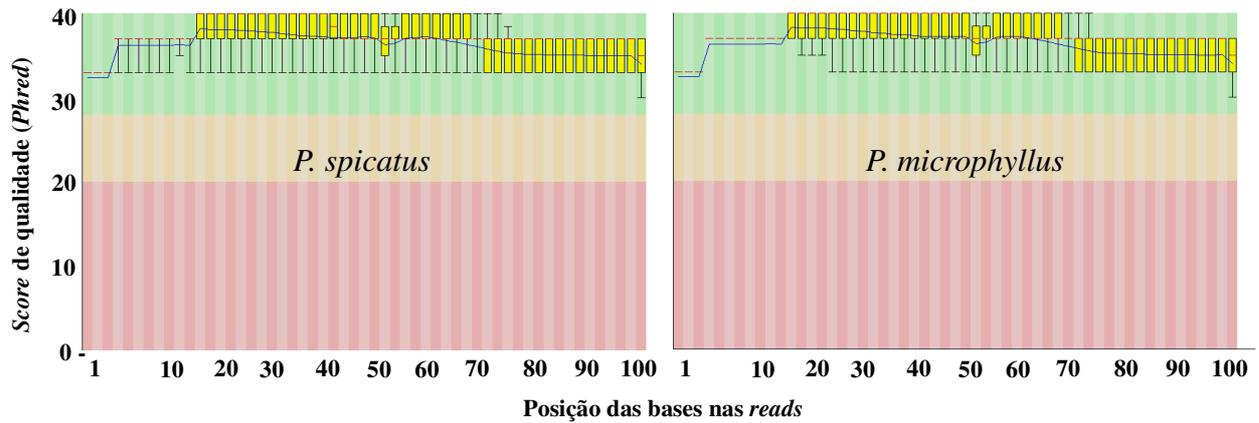
Com relação à biossíntese dos alcaloides imidazólicos em *Pilocarpus*, foi realizada uma busca com diversas palavras-chave entre as sequências de proteínas encontradas com o intuito de encontrar enzimas do citocromo P450 ou que façam parte do catabolismo de aminoácidos e que possam estar atuando na via de biossíntese. Após a busca foi obtido como retorno positivo apenas uma sequência de aminoácidos de *P. spicatus* que no alinhamento foi mapeada como histidina amônia-liase (HAL), porém de *Homo sapiens* (P42357). A enzima HAL, até o momento, foi descrita apenas em animais e microrganismos, não sendo encontrada nos membros dos filos *Plantae* (Emiliani *et al.* 2009; MacDonald e D’Cunha 2007). Esta mesma sequência de proteína de *Homo sapiens* (P42357) foi utilizada no NCBI para a realização de um blastp contra *A. thaliana*. O melhor resultado de alinhamento obtido foi com a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) de *Arabidopsis*, com 75% de cobertura da sequência, 29% de identidade e E-value de  $4^{-48}$ . A PAL faz parte das enzimas liases de aminoácidos aromáticos, sendo responsável pelo primeiro passo da via dos fenilpropanoides (Barros e Dixon 2019). Trabalhos mostram a similaridade entre as enzimas PAL e HAL através de comparações de sequências de aminoácidos (Röther *et al.* 2002; Taylor *et al.* 1990).



**Figura 27.** Classificação das sequências de proteínas dos dados de jaborandi em processos biológicos (A), componentes celulares (B) e funções moleculares (C).

### 5.5 Extração de RNA e sequenciamento

Após o sequenciamento as *reads* geradas foram trimadas pela ferramenta TRIMMOMATIC permanecendo aquelas em que as bases apresentavam qualidade  $\geq 20$  como pode ser visto na figura 28. O total de *reads* sequenciadas de cada uma das amostras variou de 798.742 a 11.497.388 (tabela 5), de forma geral foi obtido um total de *reads* para *P. spicatus* de 17.700.062 e para *P. microphyllus* de 13.903.705. As *reads* apresentaram tamanho entre 2-101 pares de bases, sendo que 89,3% ( $\pm 8,8\%$ ) e 85,9% ( $\pm 5,5\%$ ) das *reads* de *P. spicatus* e *P. microphyllus*, respectivamente, continham de 98 a 101 pares de bases.

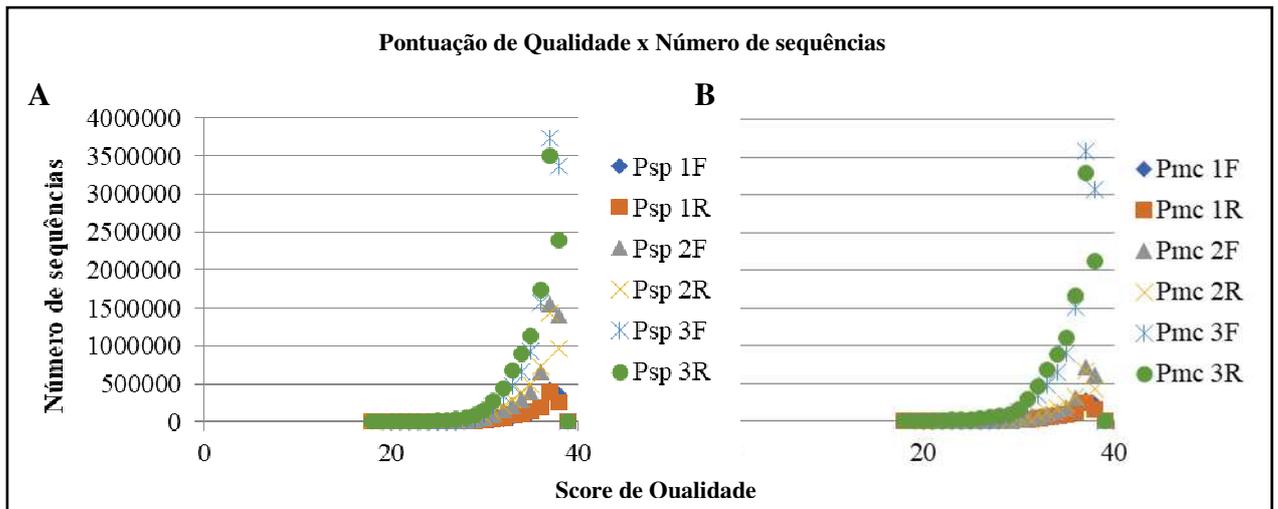


**Figura 28.** Pontuação de qualidade por base com detalhe ao *threshold* de qualidade exigido ( $Q \geq 20$ ) para as *reads* sequenciadas.

**Tabela 5.** Total de *reads* das amostras de *Pilocarpus* sequenciadas, sendo três amostras de cada espécie estudada.

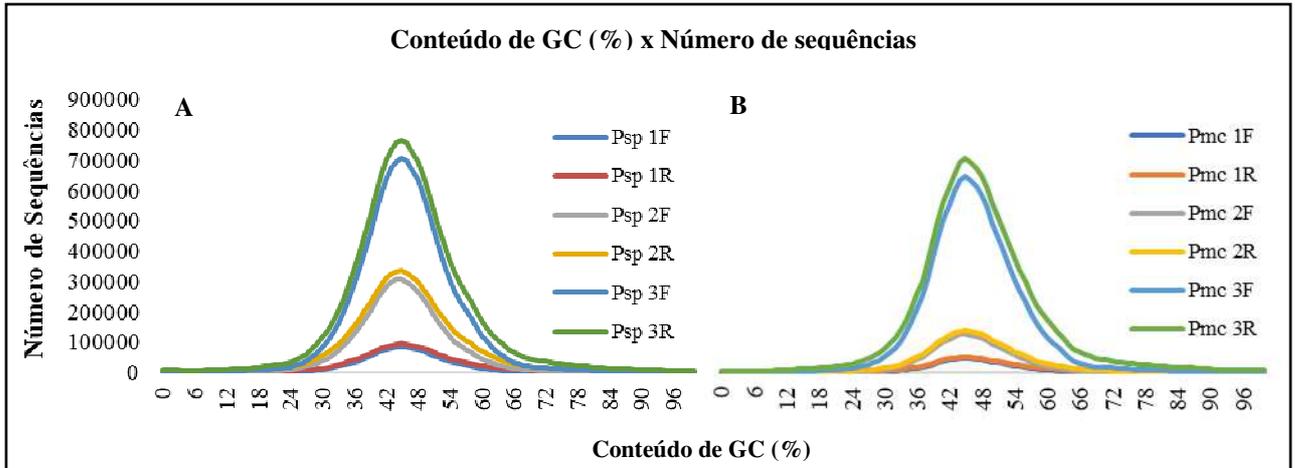
Amostra	Número de Reads
<i>P. spicatus</i> 1	1.352.756
<i>P. spicatus</i> 2	4.849.918
<i>P. spicatus</i> 3	11.497.388
<i>P. microphyllus</i> 1	798.742
<i>P. microphyllus</i> 2	2.152.678
<i>P. microphyllus</i> 3	10.952.285

Após o processo de trimagem 98,1% ( $\pm 1,2\%$ ) das *reads* de *P. spicatus* (figura 29A) e 98,3% ( $\pm 1,1\%$ ) das sequências de *P. microphyllus* (figura 29B) apresentaram qualidade  $\geq 30$ , ou seja, probabilidade de uma base incorreta de 1 em 1000, sendo a acurácia de 99,9% (Ewing e Green 1998).



**Figura 29.** Pontuação de qualidade das *reads forward* (F) e *reverse* (R) sequenciadas após a ferramenta TRIMMOMATIC. A. Sequências de *P. spicatus* (Psp) e B. Sequências de *P. microphyllus* (Pmc).

Em relação à porcentagem de bases GC nas *reads* sequenciadas, tanto para *P. spicatus* (figura 30A) quanto para *P. microphyllus* (figura 30B) as sequências apresentaram em sua grande maioria o total de 45% de bases GC, sendo este também um parâmetro de qualidade do sequenciamento. Para as regiões exônicas o conteúdo GC normal é representado por aproximadamente 49-51%, podendo ter um desvio de 10% deste valor (Guo *et al.* 2013), sendo assim as *reads* sequenciadas estão dentro dos parâmetros normais de qualidade. Níveis diferentes podem representar algum tipo de contaminação. Yang *et al.* (2019) em seu trabalho com transcrito de folhas de *Citrus sinensis* observou conteúdo de GC de 45,36% a 46,58%. Demais trabalhos com espécies da família das Rutáceas também observaram valores de GC% próximos aos encontrados no presente estudo, como por exemplo, 43,38% para *Zanthoxylum bungeanum* (Feng *et al.* 2017), 43,43% a 44,28% para *Shiranihi* (*Citrus* cv.) e 43,46% a 44,43% para *Huangguogan* (*Citrus* cv.) (Xiong *et al.* 2017).

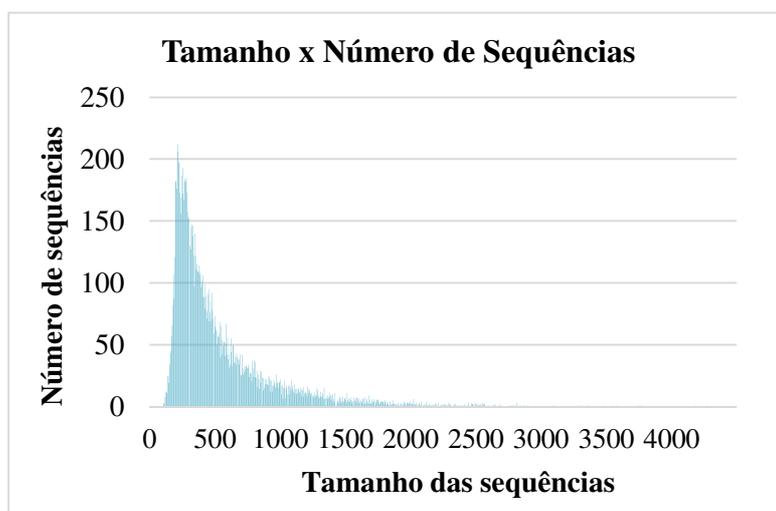


**Figura 30.** Distribuição do conteúdo GC (%) nas *reads forward* (F) e *reverse* (R) sequenciadas de jaborandi. A. Sequências de *P. spicatus* (Psp) e B. Sequências de *P. microphyllus* (Pmc).

### 5.5.1 Montagem *de novo* e análise do banco de dados

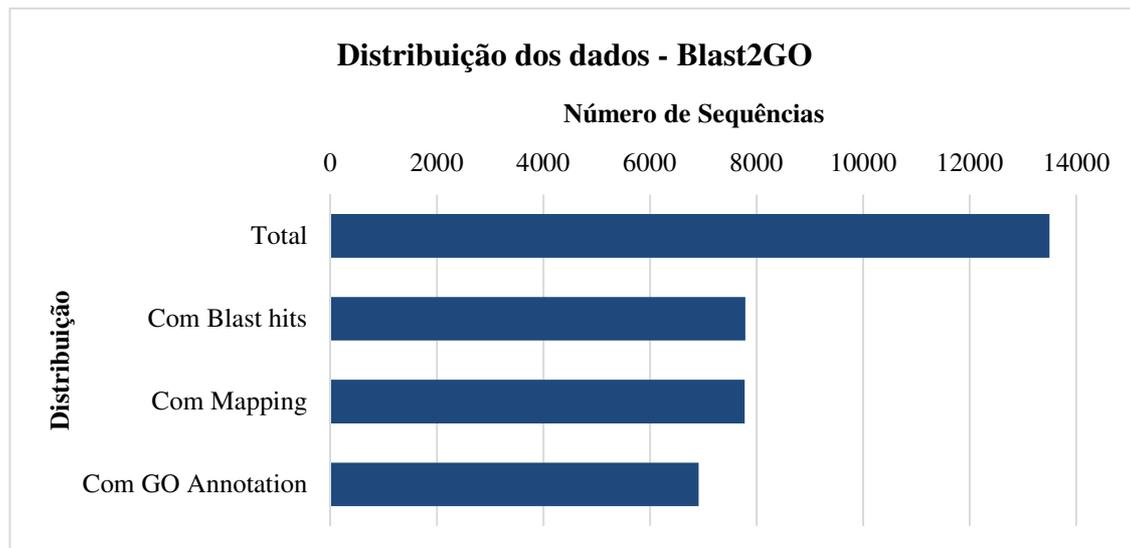
Ao final da montagem dos transcritos foi realizado um comparativo pela ferramenta Cuffdiff dos dados das duas espécies. Foram obtidas 23.098 sequências com expressão diferencial entre *P. spicatus* e *P. microphyllus*, sendo destas, 13.497 (58,4%) estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Os transcritos diferencialmente expressos (13.497) foram então analisados pelo Blast2GO. O tamanho médio das sequências analisadas foi de 534 pb variando de pequenas sequências de apenas 105 pb a sequências de 4495 pb (figura 31).



**Figura 31.** Tamanho das sequências analisadas pelo Blast2GO provenientes dos dados dos genes diferencialmente expressos de *Pilocarpus*.

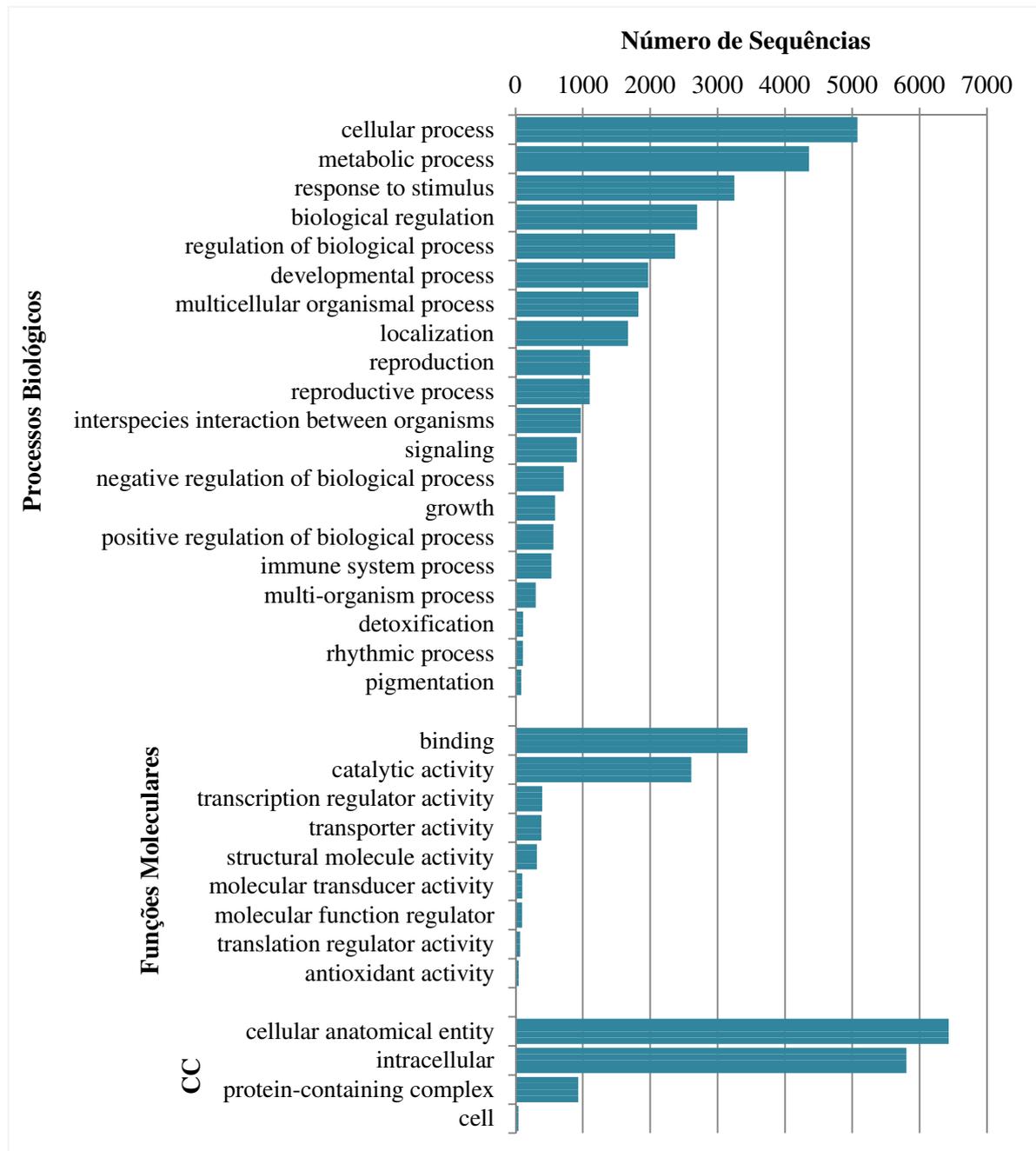
No software Blast2GO, foi realizado um blastx contra o banco de dados de *Arabidopsis*. Das 13.497 sequências, 5710 não apresentaram hits. O valor médio de similaridade dos alinhamentos com maior score (HSP - *High-scoring Segment Pair*) para os hits encontrados foi de 76,7%  $\pm$ 12,4%. As sequências com hits seguiram para o mapeamento e anotação dos transcritos conforme ilustrado na figura 32.



**Figura 32.** Total de sequências de *Pilocarpus* que passaram por blast, mapeamento e anotação após análise no software Blast2GO.

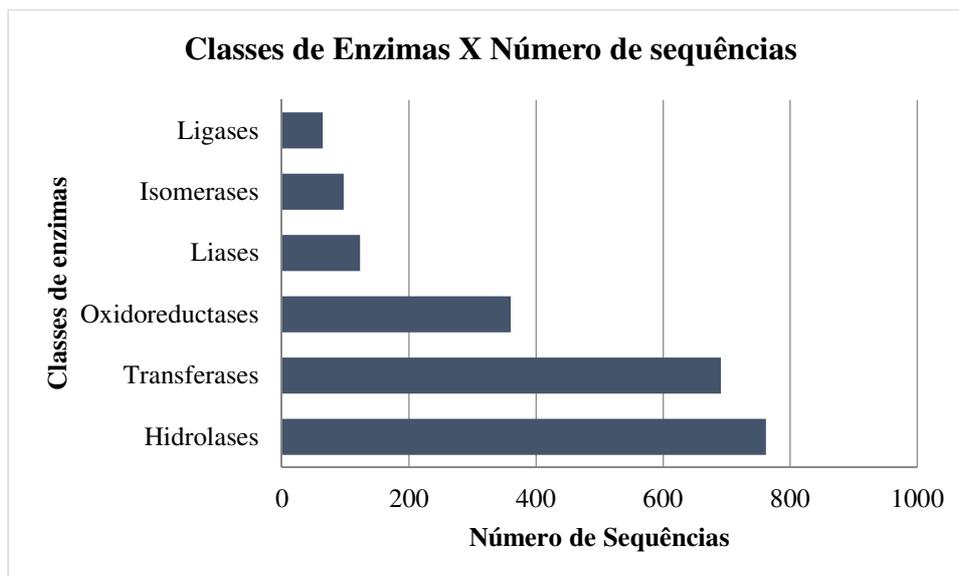
No total, 6911 transcritos foram anotados gerando 61048 anotações do Gene Ontology (GO), que proporcionam o conhecimento das funções dos transcritos, sendo eles categorizados entre processo biológico (em qual processo o produto do gene contribui), função molecular (atividade do produto do gene) e componentes celulares (onde o produto do gene está ativo) (Consortium 2019) (figura 33).

De forma geral a grande maioria das sequências está envolvida em processos celulares e metabólicos com atividades catalíticas e de ligação atuando em toda a anatomia celular.



**Figura 33.** Distribuição das sequências em suas respectivas classes do Gene Ontology, estando divididas entre: processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares (CC).

Em relação às sequências codificadoras de enzimas, aproximadamente 70% geraram enzimas classificadas como transferases e hidrolases, sendo 33% e 36,3%, respectivamente. As demais classes de enzimas somam juntas pouco mais de 30% (figura 34).



**Figura 34.** Classificação das sequências dos genes diferencialmente expressos de *Pilocarpus* nas respectivas classes de enzimas, com o total de sequências para cada classe.

Através do software Blast2GO as sequências foram mapeadas contra o banco de dados KEGG para verificar a função biológica e classificação dos transcritos em suas respectivas vias metabólicas. No total, 1246 sequências foram mapeadas em 136 vias metabólicas. Dentre as vias, as que apresentaram o maior número de sequências envolvidas foram: metabolismo de purina, metabolismo de tiamina e biossíntese de antibióticos, com 302, 278 e 235 sequências respectivamente. Em relação à biossíntese de alcaloides, foram encontradas sequências envolvidas em três vias metabólicas, biossíntese de alcaloides isoquinolínicos, biossíntese de alcaloides tropanicos, piperidínicos e piridínicos e biossíntese de alcaloides indólicos, com 7, 4 e 1 sequência, respectivamente. O total de 27 sequências foram mapeadas em vias que envolvem enzimas do citocromo P450. Para as vias de metabolismo de glicina, serina e treonina foram encontradas 55 sequências envolvidas e apenas sete sequências relacionadas ao metabolismo de histidina.

### 5.5.2 Seleção de genes de interesse

A partir do mapeamento realizado no Blast2GO dos genes diferencialmente expressos, foi realizada uma busca dentre os transcritos para a seleção de alguns genes de interesse que possam atuar na biossíntese dos alcaloides imidazólicos em *Pilocarpus*, em especial na biossíntese de pilocarpina.

Em relação aos possíveis precursores da pilocarpina, foi realizada uma primeira análise com base no aminoácido L-treonina. A enzima responsável pelo catabolismo da

treonina e conversão em ácido  $\alpha$ -cetobutírico é a treonina desidratase (ou treonina amônia-liase, treonina desaminase) (Jander e Joshi 2009), nos dados de GDE (genes diferencialmente expressos) foram encontrados cinco transcritos anotados como treonina desidratase, destes, quatro apresentaram expressão maior ou estavam presentes apenas em *P. spicatus* e apenas um transcrito apresentou expressão maior em *P. microphyllus*.

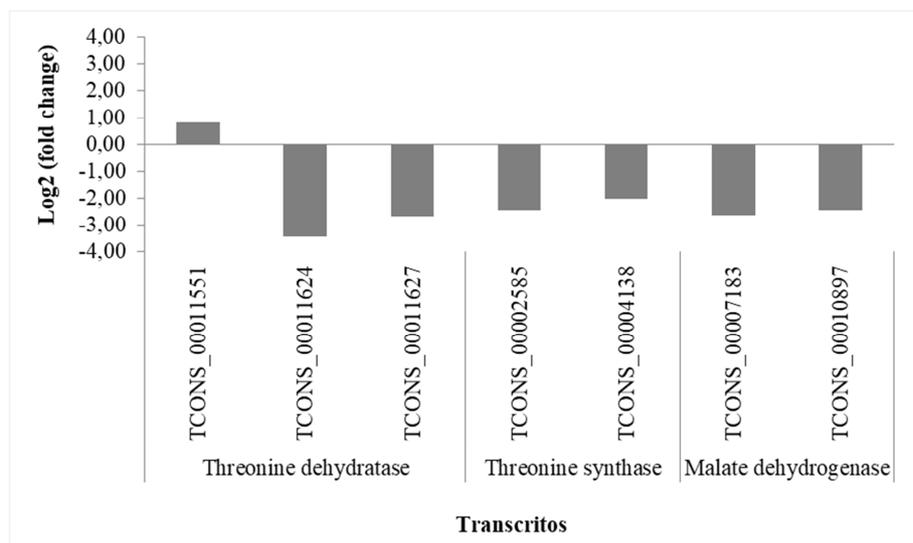
Ao caminhar na via de biossíntese da treonina, foram selecionadas mais duas enzimas, só que desta vez que antecedem a formação do aminoácido, para verificar se há a interação entre a maior concentração de precursores dos aminoácidos e maior diversidade de alcaloides, sendo elas, treonina sintase (EC 4.2.3.1) que catalisa a última reação na biossíntese da treonina (Jander e Joshi 2009) e malato desidrogenase (EC 1.1.1.37), sendo uma de suas funções a atuação no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) oxidando malato para a formação de oxaloacetato (Taiz *et al.* 2017), que por sua vez atua na formação do aspartato, precursor do aminoácido treonina (Jander e Joshi 2009). Para a enzima treonina sintase foram encontrados dois transcritos, sendo eles presentes em ambas as espécies, porém mais expressos em *P. spicatus*. Já para a malato desidrogenase foram encontrados cinco transcritos, sendo três presentes apenas em *P. microphyllus* e dois mais expressos em *P. spicatus*. Os dados de  $\log_2$  da razão entre *P. microphyllus* / *P. spicatus* para os dados de expressão dos transcritos presentes em ambas as espécies pode ser visto na figura 35, onde valores acima de zero indicam maior expressão em *P. microphyllus*.

Com relação ao aminoácido L-histidina, foi realizada uma busca para histidina amônia-liase (HAL), que potencialmente seria uma das primeiras enzimas a atuar na rota de biossíntese de pilocarpina, porém esta não foi encontrada nos dados de RNAseq de *Pilocarpus*. Trabalhos citam a HAL como sendo uma enzima presente apenas em procariotos e animais, não estando presente em plantas. Existe a hipótese de que a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) seja proveniente da HAL evolutivamente (MacDonald e D’Cunha 2007), sendo altamente encontrada em plantas, alguns fungos e apenas um procarioto, não estando presente em bactérias verdadeiras e animais (MacDonald e D’Cunha 2007; Wu *et al.* 2014).

Calabrese *et al.* (2004) mostraram em seu estudo, similaridades na estrutura e no mecanismo catalítico das enzimas HAL e PAL. Com relação às sequências de aminoácidos, alinhamentos entre três sequências de HAL e quatro sequências de PAL mostraram de 20% a 26% de identidade entre as duas enzimas (Taylor *et al.* 1990). A fenilalanina amônia-liase atua na desaminação do aminoácido aromático L-fenilalanina para a formação de cinamato na via de fenilpropanoides, se tornando uma das enzimas mais estudadas em plantas. Apesar da similaridade entre as enzimas é esperado que o mecanismo de desaminação seja diferente

entre a HAL e PAL, já que a cadeia lateral da L-histidina é um anel imidazólico enquanto da L-fenilalanina é um anel fenólico (Barros e Dixon 2019).

O trabalho realizado por Watts *et al.* (2006) demonstrou que a seletividade para o substrato da enzima amônia-liase TAL é definido por apenas um aminoácido presente no sítio ativo da enzima. Ao realizar uma mutação neste aminoácido em específico, a enzima que tinha como substrato a tirosina, passa a atuar como PAL, utilizando a fenilalanina como substrato. O inverso foi realizado com a *PAL1* de *A. thaliana*, que após a mutação passou a ter atividade de TAL. Segundo este trabalho, a análise da sequência de aminoácidos da enzima pode permitir uma predição, porém sem precisão, do substrato de maior interesse da enzima.

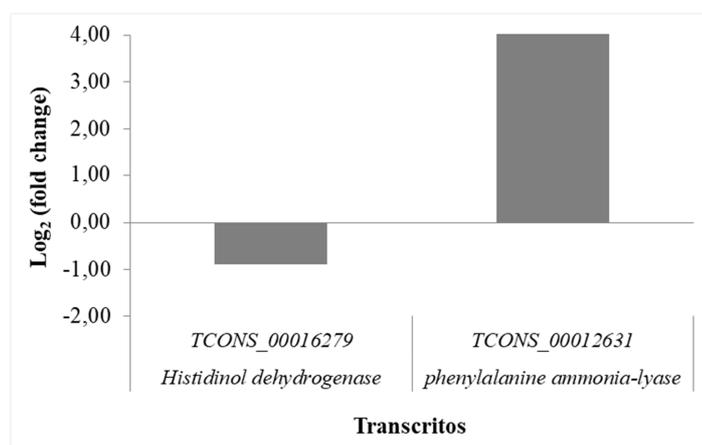


**Figura 35.** Dados de expressão representados pelo valor de  $\log_2$  da razão entre *P. microphyllus* e *P. spicatus* para os transcritos relacionados à via do aminoácido treonina. Dados provenientes da análise dos genes diferencialmente expressos entre as duas espécies estudadas de *Pilocarpus*.

Desta forma, levando em consideração a similaridade entre as enzimas, foi realizada uma nova busca nos dados dos genes diferencialmente expressos à procura de sequências da enzima fenilalanina amônia-liase. Como resultado, foram encontrados três transcritos referentes à PAL, sendo dois deles presentes apenas em *P. spicatus* e o terceiro presente em ambas as espécies, porém altamente expresso em *P. microphyllus*. Com relação à biossíntese de histidina, o último passo para a formação do aminoácido se dá pela enzima histidinol desidrogenase (HDH, EC 1.1.1.23) (Ingle 2011), o mesmo foi encontrado no

transcritoma de jaborandi em apenas um transcrito presente em ambas as espécies, porém com expressão maior em *P. spicatus* (figura 36).

De acordo com os dados do RNAseq não foi possível observar uma correlação clara entre os possíveis aminoácidos precursores da via e a biossíntese de pilocarpina. Ao analisar a rota descrita por Sawaya *et al.* (2015) o primeiro alcaloide formado após o catabolismo dos aminoácidos seria o de  $m/z$  179 (4-(3H-imidazol-4-ylmethyl)-3-methyl-5H-furan-2-one), este alcaloide de acordo com os resultados obtidos anteriormente por outros trabalhos e confirmado nos resultados obtidos no presente trabalho, não é encontrado na espécie *P. microphyllus*, podendo este ser o motivo pelo qual as enzimas que atuam na biossíntese ou catabolismo dos aminoácidos estejam presentes em ambas as espécies, porém mais expressas em *P. spicatus*.



**Figura 36.** Dados de expressão representados pelo valor de  $\log_2$  da razão entre *P. microphyllus* e *P. spicatus* para os transcritos relacionados à via do aminoácido histidina e para a enzima PAL. Dados provenientes da análise dos genes diferencialmente expressos entre as duas espécies estudadas de *Pilocarpus*.

Além da ação de amônia-liases, outra forma de retirada do nitrogênio dos aminoácidos é através da ação de aminotransferases (Hildebrandt *et al.* 2015). Segundo Conceição (2004), a ação da enzima histidina aminotransferase (HAT) foi vista em amostras proteicas de raízes de *P. pennatifolius*. Dessa forma, foi realizada uma busca para a enzima HAT nos dados do transcrito de *Pilocarpus* do presente trabalho, porém sem sucesso.

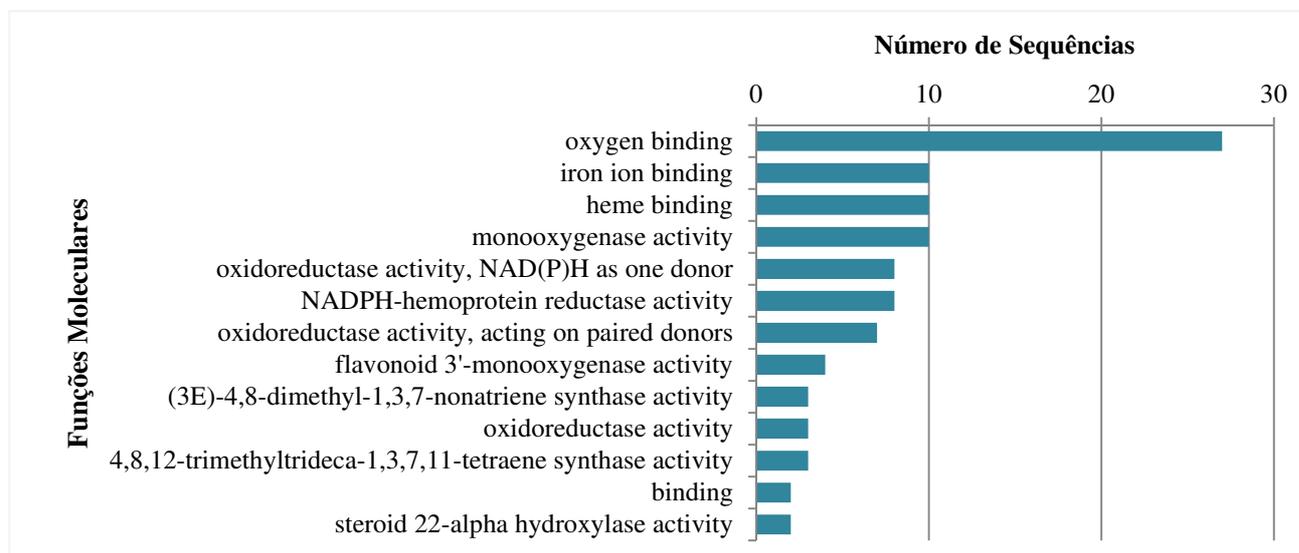
Ambas as espécies aqui estudadas de jaborandi apresentam a via de biossíntese de alcaloides imidazólicos, porém a grande diferença está no maior número de compostos presentes na espécie *P. microphyllus*, bem como na presença do alcaloide de principal ação farmacológica, a pilocarpina. Levando em consideração que o início da via pode ser de igual

expressão para ambas as espécies, foi realizada uma busca para as enzimas com atuação como aminotransferases nos dados dos transcritos totais de cada espécie, antes da análise e geração do arquivo com as sequências diferencialmente expressas. Para as aminotransferases, foram encontradas em ambas as espécies as enzimas relacionadas ao triptofano aminotransferase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase 2, tirosina transaminase e histidinol fosfato aminotransferase 1 (que atua na biossíntese do aminoácido histidina), não sendo encontrado, portanto, a enzima HAT.

A conversão de um alcaloide a outro pode ser dada pelas enzimas do citocromo P450. Nos dados dos GDE foram encontrados 45 transcritos mapeados em 27 membros distintos da superfamília P450 (26 genes e 1 pseudogene). Ao analisar a anotação destes 45 transcritos e os respectivos termos do GO, foi possível observar, dentro da classe de processos biológicos, que 23 transcritos de CYP450 encontrados nos dados dos genes diferencialmente expressos de *Pilocarpus* estão atuando em processos metabólicos primários (GO:0044238) e/ou secundários (GO:0019748), além destes, 17 transcritos foram classificados atuando em processos de biossíntese (GO:0009058), sendo 5 mais especificamente, atuando em processos de biossíntese de compostos aromáticos (GO:0019438) ou heterocíclicos (GO:0018130). Como os alcaloides alvos do presente estudo são compostos por um anel imidazólico, estes transcritos poderiam estar atuando na via de biossíntese destes compostos. Ao verificar qual família de CYP é mapeada por estes transcritos, verificou-se que um deles foi classificado como CYP79A2 (expresso em ambas as espécies, porém com expressão maior em *P. microphyllus*), e os outros quatro transcritos como CYP711A1 (presentes apenas em *P. spicatus*). Com relação à classe de GO referente a funções moleculares dos transcritos, é possível observar na figura 37 todos os termos em que se classificaram as enzimas CYP450 encontradas nos dados de *Pilocarpus*, sendo a principal delas a reação mais comum entre as P450 que é a de ligação de oxigênio.

Os 45 transcritos mapeados nos 27 membros distintos da superfamília P450 foram agrupados nos respectivos clados baseados na nomenclatura da superfamília. O clado com maior número de sequências encontradas foi o CYP71 com um total de 29 sequências (64,4%) (tabela 6). Dos 45 transcritos, 21 apresentaram expressão em apenas uma das espécies, *P. microphyllus* ou *P. spicatus*, nota-se porém, que foram encontrados transcritos distintos, cada um presente em uma determinada espécie (*P. spicatus* ou *P. microphyllus*), que se traduzem para as mesmas enzimas, sendo elas: CYP77A5 pseudogene, CYP88A3 e CYP90A1, ou seja, elas estão presentes em ambas as espécies, porém a partir de transcritos diferentes. Destas, duas enzimas podem ser observadas também na figura 38 que apresentam transcritos que

foram encontrados em ambas as espécies, porém com expressão diferencial, sendo neste caso as enzimas CYP77A5 pseudogene e CYP90A1 mais expressas em *P. microphyllus* como se pode verificar através dos valores de  $\log_2$  da razão de FPKM de *P. microphyllus* / *P. spicatus*, 3,88 e 1,42, respectivamente.



**Figura 37.** Distribuição das sequências de CYP450 dos genes diferencialmente expressos entre *P. microphyllus* e *P. spicatus* em seus respectivos termos do *Gene Ontology* para funções moleculares.

Os demais 24 transcritos que estão presentes em ambas as espécies, porém com expressão diferencial, foram utilizados para a construção de um mapa de calor utilizando os valores de  $\log_2$  (FPKM de *P. microphyllus* / *P. spicatus*). Deste grupo de transcritos, aqueles com  $\log_2$  positivo são mais expressos em *P. microphyllus*, dentre eles se destacam: CYP82G1 (TCONS\_00011991), CYP77A5 pseudogene (TCONS\_00021699) e CYP72A10 (TCONS\_00019654), com valores de 4,06, 3,89 e 3,87, respectivamente.

**Tabela 6.** Distribuição, em diferentes clados, das famílias de P450 encontradas nos transcritos diferencialmente expressos de *Pilocarpus*, separados entre aqueles que apresentaram expressão apenas em *P. microphyllus*, *P. spicatus* ou em ambas as espécies.

Espécie	CYP51	CYP71	CYP72	CYP74	CYP85	CYP86	CYP97	CYP710	CYP711	CYP727	Total
<i>P. microphyllus</i>		3			2						5
<i>P. spicatus</i>		9			3				4		16
Ambas as espécies		17	2		1	3	1				24
Total		29	2		6	3	1		4		45

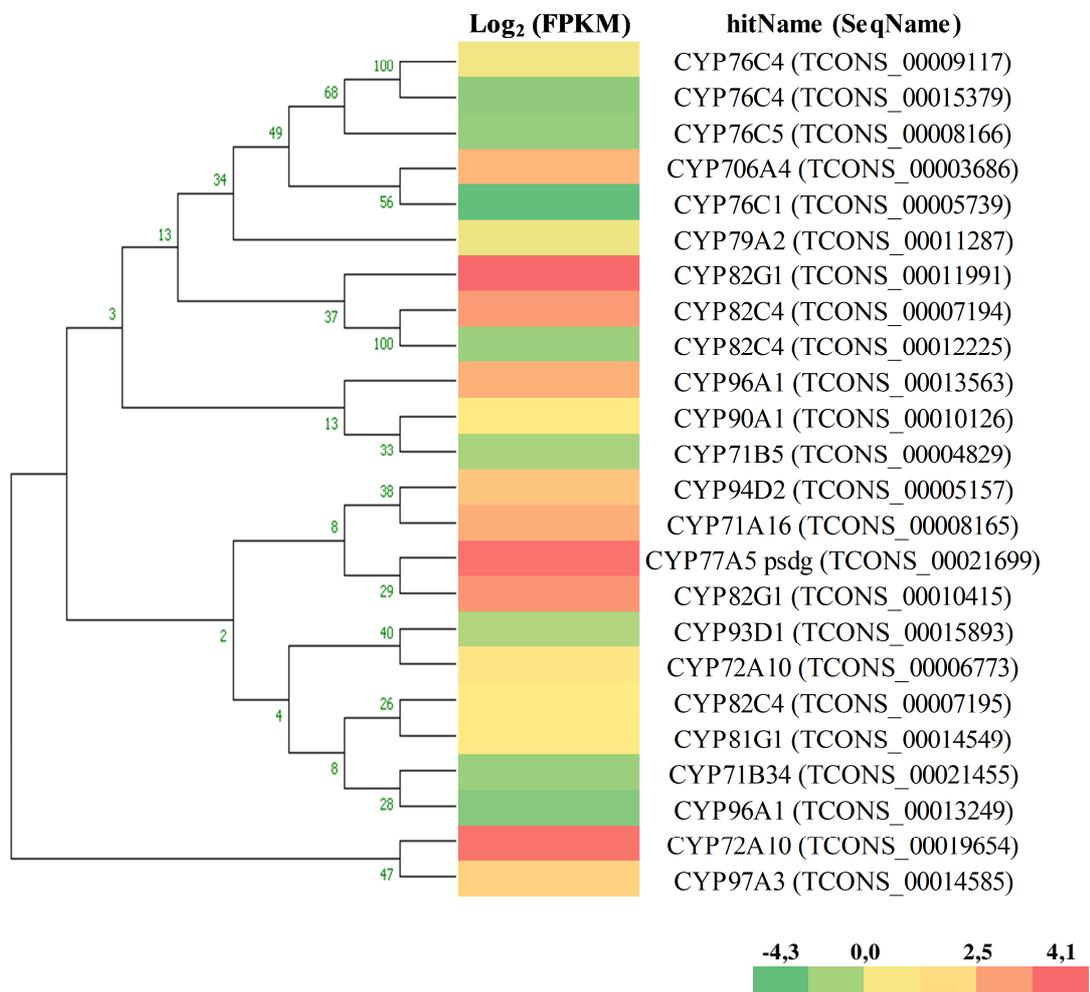
A enzima CYP82G1 aparece como o primeiro e quarto transcrito com maior diferença de expressão entre as duas espécies, sendo mais expresso em *P. microphyllus*. A família CYP82 pertence ao clado CYP71, sendo uma das oito famílias deste clado que foram primeiramente encontradas na angiosperma *Magnoliids* (Bak *et al.* 2011; Nelson e Werck-Reichhart 2011). O estudo desenvolvido por Lee *et al.* (2010b) mostrou a ação da enzima CYP82G1 na biossíntese do terpeno volátil *C*<sub>16</sub>-homoterpene (*E,E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT) através da quebra da ligação C-C proporcionada pela enzima, transformando o precursor *C*<sub>20</sub> - (*E,E*)-geranyllinalool em *C*<sub>16</sub> - TMTT. O transcrito TCONS\_00010415 mapeado como CYP82G1 ficou agrupado na análise filogenética realizada no presente trabalho com o transcrito TCONS\_00021699 referente ao pseudogene CYP77A5, sendo o segundo transcrito com maior diferença de expressão entre *P. microphyllus* e *P. spicatus*. Os pseudogenes fazem parte das regiões não codificadoras do genoma, são cópias de genes que podem ter algum tipo de deficiência, como por exemplo, um *stop* códon prematuro, estes genes são considerados como não funcionais, porém podem auxiliar na compreensão da evolução dos genes funcionais em plantas e podem atuar na regulação gênica (Panchy *et al.* 2016; Vanin 1985; Zou *et al.* 2009).

Demais enzimas da família CYP82 foram mapeadas nos dados de *Pilocarpus* como CYP82C2, CYP82C3 e CYP82C4. Foi demonstrado no trabalho realizado por Kruse *et al.* (2008) que as enzimas CYP82C2 e CYP82C4 utilizam a furanocumarina 8-MOP (8-Methoxy-psoralen) como substrato, tendo a ação de hidroxilação na posição 5 e formação do composto 5-hydroxy-8-methoxy-psoralen, sugerindo ser uma enzima que atuaria na catálise deste metabólito. As furanocumarinas foram primeiramente encontradas nas famílias Apiaceae e Rutáceae (Kruse *et al.* 2008). A enzima CYP82C4 também foi descrita como a responsável pela oxidação do composto fraxetina para a formação da cumarina sideretina (5,7,8-trihydroxy-6-methoxycoumarin), composto exudado pela raiz em condições de deficiência de ferro auxiliando na mobilização e redução do ferro insolúvel (Rajniak *et al.* 2018). Outra ação de enzima da família CYP82 pode ser vista na biossíntese do composto intermediário tropinona na via de biossíntese de alcaloides tropânicos em *Atropa belladonna* (Bedewitz *et al.* 2018).

O transcrito TCONS\_00019654 foi mapeado como a enzima CYP72A10. Trabalhos mostram que membros da subfamília CYP72A atuam no metabolismo e desenvolvimento das plantas, como por exemplo, a enzima CYP72A1 que participa na biossíntese do alcaloide indólico secologanina, na etapa final de conversão através da reação oxidativa de quebra da ligação C-C do anel do composto loganina (Irmiler *et al.* 2000) e a

enzima CYP72A9 que tem papel na hidroxilação do C13 dos ácidos giberélicos 13H-GAs (com alta atividade) para a formação dos seus respectivos 13OH-GAs (baixa atividade), causando nanismo em transgênicos com superexpressão do gene em *Arabidopsis thaliana* (He *et al.* 2019).

A mesma ação de oxidação na via de biossíntese do ácido giberélico é vista na enzima CYP88A3 que atua nos três passos entre o composto KA (ácido *ent-kaurenoic*) e a formação do GA<sub>12</sub> (Helliwell *et al.* 2001). A enzima CYP88A3 aparece na lista dos genes diferencialmente expressos em dois transcritos, sendo eles TCONS\_00007508 e TCONS\_00007523 com expressão em *P. microphyllus* e *P. spicatus*, respectivamente.



**Figura 38.** Dados de expressão representados pelo valor de log<sub>2</sub> da razão entre *P. microphyllus* e *P. spicatus* para os transcritos presentes em ambas as espécies e mapeados em enzimas do citocromo P450. Árvore filogenética inferida a partir de 1000 repetições do teste de bootstrap, os valores representam a porcentagem do número de repetições em que os grupos taxonômicos se agruparam juntos (n=1000).

Além dos 45 transcritos descritos anteriormente, foram encontrados oito transcritos mapeados como NADPH- *cytochrome* P450 *reductase* 2, sendo dois deles expressos apenas em *P. microphyllus*, quatro expressos apenas em *P. spicatus* e dois expressos em ambas as espécies, porém com expressão diferencial entre elas.

A grande maioria das reações das P450 são classificadas como monooxigenases. Nestes casos a molécula de oxigênio se liga ao ciclo catalítico (agrupamento heme e ferro) e é ativada por reações redox. As P450 são capazes de incorporar oxigênio em moléculas alifáticas e aromáticas. A ativação do oxigênio depende de transportadores de elétrons como a proteína NADPH- citocromo P450 redutase (CPR) (Kahn e Durst 2000; Schuler *et al.* 2006).

Diversos trabalhos mostram a atuação das proteínas NADPH- citocromo P450 redutase como suporte a reações das P450 monooxigenases, como por exemplo, a atuação em conjunto com a enzima ácido cinâmico *4-hydroxylase* P450 isolada de *Scoparia dulcis* L (Yamamura e Mabuchi 2020), na redução de quatro P450s envolvidas na biossíntese de alcaloides indólicos monoterpênicos através de duas classes de CPR (Parage *et al.* 2016) e o uso de cepas contendo CPR de *Arabidopsis* para o estudo da relação de enzimas da família CYP88A na biossíntese de giberelina (Helliwell *et al.* 2001).

Diversas reações realizadas pelas enzimas do CYP450 aqui descritas são factíveis de estarem ocorrendo dentro da via de biossíntese de pilocarpina e dos demais alcaloides em *Pilocarpus*, como a quebra de ligações e abertura de anéis entre os compostos com *m/z* 285 e *m/z* 259 e entre *m/z* 209 e *m/z* 227, além de reações de hidroxilação como, por exemplo, entre os compostos com *m/z* 195 e *m/z* 273 e redução entre *m/z* 285 e *m/z* 287.

## 6 CONCLUSÃO

Diversos trabalhos mostram o perfil de alcaloides em diferentes épocas, condições de cultivo, localidades, presença de indutores, porém em sua grande maioria com foco em espécies produtoras de pilocarpina. O presente trabalho é o primeiro a trazer dados de proteômica e transcrito de duas espécies de *Pilocarpus*, sendo uma delas, *P. microphyllus*, de interesse comercial, altamente utilizada e produtora de pilocarpina e *P. spicatus*, que apresenta menor diversidade de alcaloides. Para *P. spicatus* também foi realizada uma caracterização dos alcaloides em diferentes partes das plantas, mostrando compostos que são capazes de diferenciar o perfil entre a parte aérea e radicular desta espécie.

Os ensaios de indução de alcaloides reforçaram os dados obtidos por Sawaya *et al.* (2015), dando suporte para a via de biossíntese de alcaloides sugerida, apresentando uma continuidade aos trabalhos previamente realizados com *Pilocarpus*, confirmando os dados obtidos com relação à modulação da concentração dos alcaloides em ensaios com indutores.

Os dados de proteômica por sua vez, trouxeram a imagem de processos biológicos essenciais das duas espécies, como por exemplo, proteínas e enzimas relacionadas à fotossíntese, porém não trouxe resultados conclusivos com relação à via de biossíntese de alcaloides nas espécies estudadas do gênero *Pilocarpus*, apenas a presença da enzima fenilalanina amônia-liase em *P. spicatus*.

A hipótese da atuação das enzimas amônia-liases na via de biossíntese dos alcaloides imidazólicos em *Pilocarpus* foi testada. A enzima treonina desaminase, por exemplo, foi encontrada nos dados do transcrito do presente trabalho, podendo o aminoácido treonina estar atuando na via de biossíntese dos alcaloides imidazólicos em *Pilocarpus*.

A enzima PAL foi encontrada nos dados de transcrito de *Pilocarpus*, sendo esta mapeada em três transcritos diferencialmente expressos entre as espécies aqui estudadas. Tanto a enzima PAL quanto a PTAL (fenilalanina-L-tirosina amônia-liase) estão envolvidas em vias de biossíntese de metabólitos secundários em plantas, fazendo parte das enzimas liases de aminoácidos aromáticos (Barros e Dixon 2019; Feduraev *et al.* 2020), podendo, portanto, estarem atuando também na biossíntese de alcaloides imidazólicos em *Pilocarpus*.

O uso do inibidor não específico de aminotransferases aminoetoxivinilglicina (AVG) resultou no aumento da concentração do aminoácido histidina em folhas e raízes de *Brassica napus L.* no trabalho realizado por Le Deunff *et al.* (2019), que trouxe a hipótese da inibição do catabolismo do aminoácido em questão através das enzimas triptofano aminotransferase de *Arabidopsis* (TAA1) / triptofano aminotransferase *related* (TAR) por conta da promiscuidade da atividade destas enzimas. A enzima triptofano aminotransferase *related* (TAR) foi encontrada nos dados de transcrito de *Pilocarpus* estando presente em ambas as espécies.

Os resultados mostrados no presente trabalho trazem a atuação das enzimas triptofano aminotransferase *related*, fenilalanina amônia-liase e treonina amônia-liase nas espécies aqui estudadas, podendo ser o ponto de partida para trabalhos futuros para a confirmação destas enzimas na desaminação dos aminoácidos histidina e treonina, podendo estar atuando no início da biossíntese dos alcaloides. O completo entendimento do início da

via de biossíntese através da desaminação da histidina se torna difícil pelo fato da via de catabolismo do aminoácido não estar bem estabelecida em plantas (Hildebrandt *et al.* 2015).

Com relação à biossíntese de alcaloides já foram demonstradas diversas reações mediadas por enzimas CYP450 como formação de pontes metilenodioxí, acoplamento fenólico C-C e C-O, quebra de ligação C-C e rearranjo de esqueleto de carbono (Mizutani e Sato 2011).

Apesar do alto volume de trabalhos relacionados às enzimas CYP450, muitas funções catalíticas ainda são desconhecidas, sabe-se, porém, da relação destas enzimas com diversas reações do metabolismo vegetal, como resposta a estresses, capacidade de fitorremediação, resistência a herbicidas e atuação na via de biossíntese de compostos com ação farmacológica (Rasool e Mohamed 2016). Diversos trabalhos utilizando expressão heteróloga e mutação genética estão auxiliando na definição das funções das CYP450 (Schuler *et al.* 2006).

Assim como o presente trabalho, diversos estudos utilizam dados de transcrito com análises de expressão diferencial de genes, tendo como um dos focos a seleção de genes codificadores para as enzimas do CYP450, além da utilização de dados de metabolômica para auxiliar na elucidação das vias de biossíntese de alcaloides em plantas, como em *Papaver* (Oh *et al.* 2018), *Tabernanthe iboga* (Farrow *et al.* 2018), *Coptis japonica* (Ikezawa *et al.* 2008), entre outros. Foi possível encontrar nos dados do RNAseq de *Pilocarpus* 27 membros distintos da superfamília P450, sendo as enzimas CYP79A2 e CYP711A1 atuantes em processos de biossíntese de compostos aromáticos ou heterocíclicos, além de enzimas que já foram descritas em outros trabalhos atuando em vias de biossíntese de compostos do metabolismo secundário de plantas e que foram mais expressas em *P. microphyllus*, como CYP82G1 e CYP72A10.

O presente trabalho traz, portanto, um banco de dados de proteômica e transcrito e uma primeira seleção de enzimas que irão auxiliar na elucidação da rota de biossíntese de alcaloides em jaborandi, podendo ser utilizadas em trabalhos futuros.

"As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP".

## REFERÊNCIAS

- Abreu I, Andreazza N, Sawaya A, Eberlin M, Mazzafera P (2007a) Cell suspension as a tool to study the biosynthesis of pilocarpine in jaborandi. *Plant Biology* 9:793-799
- Abreu IN, Choi YH, Sawaya AC, Eberlin MN, Mazzafera P, Verpoorte R (2011) Metabolic Alterations in Different Developmental Stages of *Pilocarpus microphyllus*. *Planta Med* 77:293-300
- Abreu IN, Mazzafera P, Eberlin MN, Zullo MAT, Sawaya AC (2007b) Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 21:1205-1213
- Abreu IN, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Mazzafera P (2005) Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). *In Vitro Cell Dev-Pl* 41:806-811 doi:10.1079/Ivp2005711
- Afgan E et al. (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46 doi:10.1093/nar/gky379
- Allevato D, Kiyota E, Mazzafera P, Nixon KC (2019a) Ecometabolomic Analysis of Wild Populations of *Pilocarpus pennatifolius* (Rutaceae) Using Unimodal Analyses. *Frontiers in plant science* 10:258
- Allevato DM, Groppo M, Kiyota E, Mazzafera P, Nixon KC (2019b) Evolution of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae). *Phytochemistry* 163:132-146
- Andreazza N, Abreu IN, Sawaya A, Eberlin M, Mazzafera P (2009) Production of imidazole alkaloids in cell cultures of jaborandi as affected by the medium pH. *Biotechnology letters* 31:607-614
- Andreazza NL, Abreu IN, Sawaya ACHF, Mazzafera P (2015) Characterisation of the membrane transport of pilocarpine in cell suspension cultures of *Pilocarpus microphyllus*. *Journal of plant physiology* 175:37-47 doi:10.1016/j.jplph.2014.11.002
- Apuya NR et al. (2008) Enhancement of alkaloid production in opium and California poppy by transactivation using heterologous regulatory factors. *Plant biotechnology journal* 6:160-175

Avancini G, Abreu IN, Saldaña MD, Mohamed RS, Mazzafera P (2003) Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry* 63:171-175

Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Höfer R, Paquette S, Werck-Reichhart D (2011) Cytochromes P450. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 9

Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 389:1017-1031

Barros J, Dixon RA (2019) Plant Phenylalanine/Tyrosine Ammonia-lyases. *Trends in plant science*

Bathe U, Tissier A (2019) Cytochrome P450 enzymes: a driving force of plant diterpene diversity. *Phytochemistry*

Bedewitz MA, Jones AD, D'Auria JC, Barry CS (2018) Tropinone synthesis via an atypical polyketide synthase and P450-mediated cyclization. *Nature communications* 9:1-13

Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254

Brochmann-Hanssen E, Nunes M, Olah C (1975) On the biosynthesis of pilocarpine. *Planta Med* 28:1-5

Calabrese JC, Jordan DB, Boodhoo A, Sariaslani S, Vannelli T (2004) Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry* 43:11403-11416

Centroflora (2020). Disponível em: <<https://www.centroflora.com.br/>>. Accessed Fev 24 2020

Cho H-Y, Lee-Parsons CW, Yoon S-YH, Rhee HS, Park JM (2007) Enhanced benzophenanthridine alkaloid production and protein expression with combined elicitor in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Biotechnology letters* 29:2001-2005

Conceição APSd (2004) Estabelecimento de culturas in vitro de *Pilocarpus pennatifolius* Lemmaire e estudos iniciais sobre a biossíntese do alcalóide pilocarpina. Universidade de São Paulo

Conesa A, Götzt S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676

Consortium GO (2019) The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research* 47:D330-D338

Dang T-TT, Facchini PJ (2014) Cloning and characterization of canadine synthase involved in noscapine biosynthesis in opium poppy. *FEBS letters* 588:198-204

de Sá ÉR, Costa AN, Costa RK, Souza JL, Ramos RM, Lima FdC (2021) In silico study of the interactions of *Pilocarpus microphyllus* imidazolic alkaloids with the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2. *Molecular Simulation* 47:74-87

Durst F, Nelson DR (1995) Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug metabolism and drug interactions* 12:189-206

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797

Ehrling J, Hamberger B, Million-Rousseau R, Werck-Reichhart D (2006) Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Reviews* 5:239-270

Emiliani G, Fondi M, Fani R, Gribaldo S (2009) A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biology Direct* 4:1-12

Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* 8:186-194

Fairchild JN, Walworth MJ, Horváth K, Guiochon G (2010) Correlation between peak capacity and protein sequence coverage in proteomics analysis by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217:4779-4783

Farrow SC, Kamileen MO, Meades J, Ameyaw B, Xiao Y, O'Connor SE (2018) Cytochrome P450 and O-methyltransferase catalyze the final steps in the biosynthesis of the anti-addictive alkaloid ibogaine from *Tabernanthe iboga*. *Journal of Biological Chemistry* 293:13821-13833

Feduraev P, Skrypnik L, Riabova A, Pungin A, Tokupova E, Maslennikov P, Chupakhina G (2020) Phenylalanine and Tyrosine as Exogenous Precursors of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Secondary Metabolism through PAL-Associated Pathways. *Plants* 9:476

Feng S, Zhao L, Liu Z, Liu Y, Yang T, Wei A (2017) De novo transcriptome assembly of *Zanthoxylum bungeanum* using Illumina sequencing for evolutionary analysis and simple sequence repeat marker development. *Scientific reports* 7:1-11

Gabriel KR (1971) The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* 58:453-467

Gavilano LB, Siminszky B (2007) Isolation and characterization of the cytochrome P450 gene CYP82E5v2 that mediates nicotine to nornicotine conversion in the green leaves of tobacco. *Plant and cell physiology* 48:1567-1574

Givot I, Smith T, Abeles RH (1969) Studies on the mechanism of action and the structure of the electrophilic center of histidine ammonia lyase. *Journal of Biological Chemistry* 244:6341-6353

Grabherr MG et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29:644-652 doi:10.1038/nbt.1883

Guo Q et al. (2014) De novo transcriptome sequencing and digital gene expression analysis predict biosynthetic pathway of rhynchophylline and isorhynchophylline from *Uncaria rhynchophylla*, a non-model plant with potent anti-alzheimer's properties. *BMC genomics* 15:676

Guo Y, Ye F, Sheng Q, Clark T, Samuels DC (2013) Three-stage quality control strategies for DNA re-sequencing data. *Briefings in bioinformatics* 15:879-889

He J et al. (2019) CYP72A enzymes catalyse 13-hydrolyzation of gibberellins. *Nature plants* 5:1057-1065

Heldt H, Heldt F (2005) Secondary metabolites fulfill specific ecological functions in plants. *Plant Biochemistry* 3:402-412

Helliwell CA, Chandler PM, Poole A, Dennis ES, Peacock WJ (2001) The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:2065-2070

Hildebrandt TM, Nesi AN, Araújo WL, Braun H-P (2015) Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant* 8:1563-1579

Holmstedt B, Wassén SH, Schultes RE (1979) Jaborandi: an interdisciplinary appraisal. *J Ethnopharmacol* 1:3-21

Hostettmann K, Wolfender J, Rodriguez S (1997) Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med* 63:2-10

Hua W, Zheng P, He Y, Cui L, Kong W, Wang Z (2014) An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq. *Molecular biology reports* 41:4817-4825

Hurkman WJ, Tanaka CK (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology* 81:802-806

IBGE (2014) *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura*. 29:1-56

IBGE (2016) *Produção da extração vegetal e silvicultura* 31:1-54

Idrees M, Naeem M, Aftab T, Khan MMA (2011) Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:987-999

Idrees M, Naeem M, Aftab T, Khan MMA (2013) Salicylic acid restrains nickel toxicity, improves antioxidant defence system and enhances the production of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.). *Journal of hazardous materials* 252:367-374

Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2008) Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C–C phenol coupling of (S)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry* 283:8810-8821

Ingle RA (2011) Histidine biosynthesis. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 9

Irmiler S et al. (2000) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *The Plant Journal* 24:797-804

Jander G, Joshi V (2009) Aspartate-derived amino acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 7

Jun X, WANG X-y, GUO W-z (2015) The cytochrome P450 superfamily: key players in plant development and defense. *Journal of Integrative Agriculture* 14:1673-1686

Kahn RA, Durst F (2000) Function and evolution of plant cytochrome P450. *Recent advances in phytochemistry* 34:151-190

Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 28:27-30

Katona A, Toşa MI, Paizs C, Rétey J (2006) Inhibition of Histidine Ammonia Lyase by Heteroaryl-alanines and Acrylates. *Chemistry & biodiversity* 3:502-508

Kruse T et al. (2008) In planta biocatalysis screen of P450s identifies 8-methoxypsoralen as a substrate for the CYP82C subfamily, yielding original chemical structures. *Chemistry & biology* 15:149-156

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33:1870-1874

Latosinska A et al. (2015) Comparative analysis of label-free and 8-Plex iTRAQ approach for quantitative tissue proteomic analysis. *PloS one* 10

Lau W, Sattely ES (2015) Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. *Science* 349:1224-1228

Le Deunff E, Beauclair P, Deleu C, Lecourt J (2019) Inhibition of Aminotransferases by Aminoethoxyvinylglycine Triggers a Nitrogen Limitation Condition and Dereglulation of Histidine Homeostasis That Impact Root and Shoot Development and Nitrate Uptake. *Frontiers in plant science* 10

Lee K et al. (2010a) Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *Journal of plant physiology* 167:161-168

Lee S, Badiyan S, Bevan DR, Herde M, Gatz C, Tholl D (2010b) Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:21205-21210

Li K, Xu C, Zhang K, Yang A, Zhang J (2007) Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics* 7:1501-1512

Li R, Reed DW, Liu E, Nowak J, Pelcher LE, Page JE, Covello PS (2006) Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement. *Chemistry & biology* 13:513-520

Liepman AH, Olsen LJ (2004) Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23:73-89

Lima DF et al. (2017) Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. *PloS one* 12

MacDonald MJ, D'Cunha GB (2007) A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology* 85:273-282

Mansuy D (1998) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative biochemistry and physiology Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* 121:5

Marguerat S, Bähler J (2010) RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences* 67:569-579

Maroli AS et al. (2018) Omics in weed science: A perspective from genomics, transcriptomics, and metabolomics approaches. *Weed Science* 66:681-695

Marques JV et al. (2013) Next generation sequencing in predicting gene function in podophyllotoxin biosynthesis. *J Biol Chem* 288:466-479

Mergner J et al. (2020) Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome. *Nature*:1-6

Minitab LLC (2021). Minitab. [www.minitab.com](http://www.minitab.com). “Minitab® e todas as outras marcas registradas e logotipos dos produtos e serviços da Empresa são a propriedade exclusiva da Minitab, LLC. Todas as outras marcas referenciadas permanecem como propriedade de seus respectivos proprietários. Acesse [minitab.com](http://minitab.com) para obter mais informações.”

Mizutani M, Sato F (2011) Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507:194-203

Mokochinski JB, Soares DX, Bruns RE, Mazzafera P, Sawaya A Optimization of extraction conditions of free amino acids in plants by factorial design. In: *Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2013*. pp 7-11

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497

Namdeo A (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev* 1:69-79

Nei M, Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press,

Nelson D, Werck-Reichhart D (2011) A P450-centric view of plant evolution. *The Plant Journal* 66:194-211

Nelson DR, Ming R, Alam M, Schuler MA (2008) Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes. *Tropical Plant Biology* 1:216-235

Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S (2004) Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiology* 135:756-772

- Oh J et al. (2018) Transcriptome profiling of two ornamental and medicinal Papaver herbs. *International journal of molecular sciences* 19:3192
- Oliveira PDD (2007) *Filogenética de Pilocarpinae (Rutaceae)*. Universidade de São Paulo
- Panchy N, Lehti-Shiu M, Shiu S-H (2016) Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiology* 171:2294-2316
- Parage C et al. (2016) Class II cytochrome P450 reductase governs the biosynthesis of alkaloids. *Plant Physiology* 172:1563-1577
- Pauli HH, Kutchan TM (1998) Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal* 13:793-801
- Pinheiro CUB (1997) Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): A wild species and its rapid transformation into a crop. *Econ Bot* 51:49-58 doi:Doi 10.1007/Bf02910403
- Pinheiro CUB (2002) Extractivism, cultivation and privatization of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) in Maranhão, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 16:141-150
- Pirani JR, Groppo M (2020) in *Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB866>>. Accessed 02 Nov 2021
- Rai A, Yamazaki M, Takahashi H, Nakamura M, Kojoma M, Suzuki H, Saito K (2016) RNA-seq transcriptome analysis of *Panax japonicus*, and its comparison with other *Panax* species to identify potential genes involved in the saponins biosynthesis. *Frontiers in plant science* 7:481
- Rajniak J, Giehl RF, Chang E, Murgia I, von Wirén N, Sattely ES (2018) Biosynthesis of redox-active metabolites in response to iron deficiency in plants. *Nature chemical biology* 14:442-450
- Rasool S, Mohamed R (2016) Plant cytochrome P450s: nomenclature and involvement in natural product biosynthesis. *Protoplasma* 253:1197-1209
- Reuther GR (1991) Process for the preparation of pilocarpine from in vitro cultures of pilocarpus. U.S. Patent n. 5,059,531, Oct. 22
- Rezaian M, Krake L (1987) Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine. *J Virol Methods* 17:277-285

Röther D, Poppe L, Morlock G, Viergutz S, Rétey J (2002) An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from *P. crispum*. *European journal of biochemistry* 269:3065-3075

RStudio Team (2018). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc. Boston, MA <http://www.rstudio.com/>.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4:406-425

Santos AP, Moreno PRH (2004) *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40:116-137

Sawaya A, Abreu IN, Andrezza NL, Eberlin MN, Mazzafera P (2008) HPLC-ESI-MS/MS of imidazole alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules* 13:1518-1529

Sawaya A, Costa Y, Mazzafera P (2015) Unraveling the biosynthesis of pilocarpine in *Pilocarpus microphyllus*. *Nat Prod Commun* 10:721-724

Sawaya ACHF, Vaz BG, Eberlin MN, Mazzafera P (2011) Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. *Genet Resour Crop Ev* 58:471-480 doi:10.1007/s10722-011-9660-2

Schmidt T, Heise N, Merzweiler K, Deigner H-P, Al-Harrasi A, Csuk R (2021) Concise Synthesis of Both Enantiomers of Pilocarpine. *Molecules* 26:3676

Schroeder A et al. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* 7:1-14

Schuler MA, Duan H, Bilgin M, Ali S (2006) Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochemistry Reviews* 5:205-237

Segal K, Lisnyansky I, Nageris B, Feinmesser R (1996) Parasympathetic innervation of the salivary glands. *Operative Techniques in Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 7:333-338

Shen C et al. (2017) Identification and analysis of genes associated with the synthesis of bioactive constituents in *Dendrobium officinale* using RNA-Seq. *Scientific reports* 7:1-11

Sourcetechn (2020). Disponível em <<http://www.sourcetechn.com.br/>>. Accessed Feb 24 2020

Souza LA, Mourão KS, Moscheta IS, Rosa SM (2003) Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem.(Rutaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26:175-184

Su X, Lu G, Guo H, Zhang K, Li X, Cheng H (2018) The dynamic transcriptome and metabolomics profiling in *Verticillium dahliae* inoculated *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports* 8:1-11

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora,

Tang Q et al. (2011) An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis. *BMC genomics* 12:343

Taylor R, Lambert M, Sexsmith E, Sadler S, Ray P, Mahuran D, McInnes R (1990) Cloning and expression of rat histidase. Homology to two bacterial histidases and four phenylalanine ammonia-lyases. *Journal of Biological Chemistry* 265:18192-18199

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25:1105-1111

Trapnell C et al. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7:562

Tyanova S, Temu T, Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols* 11:2301

Umbarger HE (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual review of biochemistry* 47:533-606

Valdez IH, Wolff A, Atkinson JC, Macynski AA, Fox PC (1993) Use of pilocarpine during head and neck radiation therapy to reduce xerostomia and salivary dysfunction. *Cancer* 71:1848-1851

Vanin EF (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annual review of genetics* 19:253-272

Verpoorte R, Memelink J (2002) Engineering secondary metabolite production in plants. *Current opinion in biotechnology* 13:181-187

Wang M et al. (2020) Metabolome and transcriptome analyses reveal chlorophyll and anthocyanin metabolism pathway associated with cucumber fruit skin color. *BMC plant biology* 20:1-13

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10:57-63

Werck-Reichhart D, Bak S, Paquette S (2002) *Cytochromes P450*. The *Arabidopsis* book/American Society of Plant Biologists 1

Wu Z, Gui S, Wang S, Ding Y (2014) Molecular evolution and functional characterisation of an ancient phenylalanine ammonia-lyase gene (NnPAL1) from *Nelumbo nucifera*: novel insight into the evolution of the PAL family in angiosperms. *BMC evolutionary biology* 14:100

Xiaoxia L, Jianguo Z, Ying L, Guodong R (2020) Metabolome and transcriptome analyses reveal tissue-specific variations in gene expression and metabolites of olive. *Journal of plant biology* 63:73-82

Xiong B et al. (2017) Transcriptome analyses of two citrus cultivars (Shiranuhi and Huangguogan) in seedling etiolation. *Scientific reports* 7:1-11

Yamamura Y, Mabuchi A (2020) Functional characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase and cinnamic acid 4-hydroxylase encoding genes from *Scoparia dulcis* L. *Botanical studies* 61:1-11

Yang L-T, Zhou Y-F, Wang Y-Y, Wu Y-M, Ye X, Guo J-X, Chen L-S (2019) Magnesium deficiency induced global transcriptome change in *Citrus sinensis* leaves revealed by RNA-Seq. *International journal of molecular sciences* 20:3129

Zhuang J, Zhang J, Hou X-L, Wang F, Xiong A-S (2014) Transcriptomic, proteomic, metabolomic and functional genomic approaches for the study of abiotic stress in vegetable crops. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33:225-237

Zou C, Lehti-Shiu MD, Thibaud-Nissen F, Prakash T, Buell CR, Shiu S-H (2009) Evolutionary and expression signatures of pseudogenes in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 151:3-15

## ANEXOS

## I - Documento referente à bioética e/ou biossegurança



Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A57F2DD

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A57F2DD**  
 Usuário: **Paulo Mazzafera**  
 CPF/CNPJ: **056.661.348-41**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso:

Pesquisa Científica       Bioprospecção       Desenvolvimento Tecnológico

**Espécie**

**Pilocarpus jaborandi**

**Pilocarpus spicatus**

Título da Atividade: **Biossíntese de pilocarpina em *Pilocarpus microphyllus* e *P. spicatus***

**Equipe**

**Paulo Mazzafera**

**UNICAMP**

**Mariana Crotti Franco**

**Universidade Estadual de Campinas**

Data do Cadastro: **14/01/2020 23:01:04**

Situação do Cadastro: **Concluído**

II - Declaração de direitos autorais

### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ESTUDO DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE PILOCARPINA EM JABORANDI POR MEIO DE ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.


Campinas, 20/02/2022

Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) autor(a): **Mariana Crotti Franco Grandi**  
RG n.º 45849059-3

Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) orientador(a): **Dr. Paulo Mazzafera**  
RG n.º 83368401