Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Departamento de Bioquímica e Imunologia

# Enrico Cerioni Spiropulos Gonçalves

Estudos estruturais e funcionais de uma lipase de *Beauveria bassiana* imobilizada e expressa em *Aspergillus nidulans*: sensibilidade de linhagens celulares de glioblastoma aos hidrolisados de óleos brasileiros

Ribeirão Preto - São Paulo

2018

# **ENRICO CERIONI SPIROPULOS GONÇALVES**

Estudos estruturais e funcionais de uma lipase de *Beauveria bassiana* imobilizada e expressa em *Aspergillus nidulans*: sensibilidade de linhagens celulares de glioblastoma aos hidrolisados de óleos brasileiros

> Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

> > Área de Concentração: Bioquímica

# Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Ribeirão Preto - São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação Serviço de Documentação Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

# Ficha Catalográfica

Spiropulos, E. C. G

Estudos estruturais e funcionais de uma lipase de *Beauveria bassiana* imobilizada e expressa em *Aspergillus nidulans*: sensibilidade de linhagens celulares de glioblastoma aos hidrolisados de óleos brasileiros / Enrico Cerioni Spiropulos Gonçalves; Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli. Ribeirão Preto – São Paulo, 2018.

186 p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Área de concentração: Bioquímica.

1. Lipase; 2. pExpyr; 3. Expressão heteróloga; 4. Caracterização enzimática; 5. Hidrólise; 6. Glioblastoma

Nome: SPIROPULOS, E. C. G

Título: Estudos estruturais e funcionais de uma lipase de *Beauveria bassiana* imobilizada e expressa em *Aspergillus nidulans*: sensibilidade de linhagens de glioblastoma aos hidrolisados de óleos brasileiros.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Aprovado em: \_\_\_/\_\_/\_\_\_

## Banca Examinadora

Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Ribeirão Preto – São Paulo

## Apoio e Suporte à pesquisa

Este trabalho foi realizado com apoio das seguintes entidades e instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, Demanda Social.
- 2) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FMRP/USP.
- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto FFCLRP/USP
- 4) Departamento de Genética de Ribeirão Preto FMRP/USP.

## Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com:

Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Matins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. - 3. ed. ver. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p.: il. - - (Caderno de estudos; 9).

DOI: 10.11606/9788573140569

Dedico este trabalho à minha família

## AGRADECIMENTOS

Ao longo da realização deste trabalho, inúmeros obstáculos, dificuldades e aprendizagens fizeram parte do Mestrado. Tudo isso eu devo a várias pessoas e instituições.

Primeiramente aos meus pais - Marco e Thais - pois eu sei o quanto foi árdua a batalha deles para que eu possa ter realizado este trabalho. Por isso eu dedico grande parte desta confecção a eles. Sem o suporte deles, isso jamais teria sido realizado. Depois aos meus irmãos – Marcella, Renato e Giordano – pelos conselhos e carinho de sempre, e aos meus queridos familiares; Igor, Francesco e Lorenzo. Agradeço também ao Alexandre pelos momentos de amor, alegria e suporte nos momentos difíceis.

Aos meus colegas batalhadores de bancada: Malena, Paula, Juliana, Vanessa, José, Mariana R., Ana Claudia, Rosy, Tássio, Ana Silvia, Manu, Alex e Inaiá, por todas as dicas e os momentos de risada os quais foram importantes no dia a dia. Desejo a estas pessoas sempre o melhor e muita felicidade.

Ao suporte técnico do Maurício e da Mariana C., pois graças a eles, muito dos meus experimentos puderam ser realizados, e pela amizade e risadas.

A Dra. Ana Paula L. Montaldi por toda ajuda nos experimentos com culturas celulares e glioblastoma.

A professora Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli por aceitar, direcionar e elaborar minhas idéias malucas ao longo deste trabalho.

A professora Dra. Elza T. S. Hojo, por aceitar auxiliar nosso laboratório com os experimentos de glioblastoma, sempre com todo recurso possível.

A todos os membros da banca pela disponibilidade a elaboração deste trabalho.

Aos departamentos da Bioquímica, Genética e a FFCLRP pelo apoio financeiro e estrutural.

A CAPES pela disponibilidade dos recursos financeiros.

"Simplicidade é o maior objetivo, alcançável quando você supera todas as dificuldades. Depois de uma grande quantidade de notas e mais notas, é a simplicidade que surge como a recompensa máxima da arte"

(Frédéric François Chopin)

### **RESUMO**

SPIROPULOS, E. C. G. Estudos estruturais e funcionais de uma lipase de *Beauveria bassiana* imobilizada e expressa em *Aspergillus nidulans*: sensibilidade de linhagens celulares de glioblastoma aos hidrolisados de óleos brasileiros. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2018.

Esse trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de uma cepa transformante de Aspergilus nidulans para produção de uma lipase de Beauveria bassiana (denominada Bbl1) por meio do vetor pExpyr, utilizando xarope de milho como fonte de carbono indutora. Para isso utilizou-se o gene sob referência XP 008602131.1 (denominado bbl1) do NCBI que foi introduzido em vetores de pGEM-T, para multiplicação, e no pExpyr, para expressão. Foi feita a modelagem molecular dessa enzima, revelando cavidades hidrofóbicas para interação com substrato, e a "tampa", considerada característica comum das lipases "verdadeiras". A produção de Bbl1 em cultivos contendo maltose foi aproximadamente o dobro em relação à cepa selvagem B. bassiana. Posteriormente, com o intuito de melhorar a produção e baratear os custos de fermentação desta cepa, a maltose e o tampão HEPES (insumos caros e utilizados em escala laboratorial, porém inviáveis em padrão industrial) foram substituídos respectivamente por xarope de milho e tampão fosfato de sódio; o resultado foi a obtenção de quase 40 U.mL<sup>-1</sup> de atividade de lipases em Erlenmeyer de 125 mL, quadruplicando a produção em relação a cepa selvagem. A Bbl1 foi purificada em colunas de Octyl-Sepharose e DEAE-celulose. Essa enzima demonstrou-se estável em solução com 0,5% de tween-20 e tween-80, e hiper-ativada na presença destes dois detergentes e de Triton X-100. Além disso, os ácidos oleico e linoleico demonstraram-se como inibidores análogos a não-competitivos. O estudo de imobilização revelou que o suporte de Octyl-Sepharose é o mais ideal para ativação de Bbl1, sendo que a atividade relativa da mesma foi cerca de 123%, em relação a mesma enzima em solução aquosa. Quanto à estabilidade térmica e ao pH, a imobilização promoveu um ganho de estabilidade nas temperaturas de 30°C até 60°C nos derivados de Octyl, Phenyl, Butyl, DEAE-celulose, MANAE e PEI, e na faixa de pH de 3 até 9 nesses mesmos suportes estudados, em comparação à enzima em solução. Por meio de estudos cinéticos, observou-se que a velocidade máxima de Bbl1 imobilizada em Octyl foi 2,39 vezes maior e o respectivo valor de K<sub>0.5</sub>, 2,7 vezes menor em relação à Bbl1 livre. O padrão de inibição pelos ácidos oleico e linoleico sofreu alteração em Bbl1 imobilizada, sendo dependente da concentração destes inibidores. Os produtos hidrólise dos óleos de açaí e buriti foram fracionados em fases polares e apolares e aplicados em culturas de monocamada de linhagens celulares de glioblastoma LN-18. Observou-se os produtos de hidrólise do óleo de buriti provocaram redução na viabilidade respiratório das células de glioblastoma até 120 horas de exposição, enquanto que nos cultivos de células de fibroblasto observou-se um "ganho" de viabilidade neste mesmo período de cultivo. Por fim, esse trabalho permitiu a gratificação em obter uma cepa de A. nidulans transformante para expressão de lipase – uma enzima comercialmente onerosa e com poucos trabalhos envolvendo sua produção de forma heteróloga. Além disso, tornou-se a utilização destas enzimas na hidrólise de óleos brasileiros como um potencial agente à obtenção de insumos para o tratamento de glioblastoma.

Palavras-chave: lipase, pExpyr, expressão heteróloga, caracterização enzimática, hidrólise, glioblastoma

## ABSTRACT

SPIROPULOS, E. C. G. Structural and functional studies of a *Beauveria bassiana* lipase immobilized and expressed in *Aspergillus nidulans*: sensitivity of glioblastoma cell lines to hydrolysates of brazilian oils. Dissertation (Master degree in Biochemistry) – Medical school of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto; 2018.

The objective of this work was to obtain and characterize a transforming strain of Aspergilus nidulans to produce a Beauveria bassiana lipase (called Bbl1) using the pExpyr vector, having corn syrup as inducing carbon source. For this purpose, the NCBI reference gene XP\_008602131.1 (designated bbl1) was used, which was introduced into pGEM-T vectors for storage, and pExpyr for expression. The molecular modeling of this enzyme was performed, revealing hydrophobic cavities for the interaction with substrate, and the "lid", considered a common characteristic of "true" lipases. Production of Bbl1 in cultures containing maltose was approximately double that of *B. bassiana* wild strain. Later, in order to improve the production and to reduce the costs of fermentation of this strain, maltose and HEPES buffer (expensive and laboratory-grade inputs, however, not viable in an industrial standard) were replaced by corn syrup and sodium phosphate buffer; the result was the obtaining of almost 40 U.mL<sup>-1</sup> of lipase activity in Erlenmeyer of 125 mL, quadrupling the production in relation to the wild strain. Bbl1 was purified on Octyl-Sepharose and DEAE-cellulose columns. This enzyme showed to be stable in solution with 0.5% tween-20 and tween-80, and hyperactivated in the presence of these two detergents and Triton X-100. In addition, oleic and linoleic acids have shown to be non-competitive analogues. The immobilization study revealed that Octyl-Sepharose support is the most ideal for the activation of Bbl1, and the relative enzymatic activity was about 123% in relation to the same non-immobilized enzyme. As for thermal stability and pH, immobilization promoted a stability gain at temperatures of 30 ° C to 60 ° C in the Octyl, Phenyl, Butyl, DEAEcellulose, MANAE and PEI derivatives, and in the pH range of 3 up to 9 in these same supports, compared to the enzyme in solution. By means of kinetic studies, it was observed that the maximum rate of Bbl1 immobilized on Octyl was 2.39 higher and the respective value of K<sub>0.5</sub>, 2.7 lower than the free Bbl1. The inhibition pattern for oleic and linoleic acids was altered in immobilized Bbl1, being dependent on the concentration of these inhibitors. The hydrolysis products of açai and buriti oils were fractionated in polar and nonpolar phases and applied to monolayer cultures of LN-18 glioblastoma cell lines. It was observed that the buriti oil hydrolysis products were able to cause a reduction in the respiratory viability of glioblastoma cells up to 120 hours of exposure, whereas in the fibroblast cell cultures a viability "gain" was observed in the same culture period. Finally, this work allowed the gratification in obtaining a strain of transforming A. nidulans for lipase expression - a commercially expensive enzyme with few studies involving its production in a heterologous way. In addition, the use of these enzymes in the hydrolysis of Brazilian oils has become a potential agent to obtain inputs for the treatment of glioblastoma.

Keywords: lipase, pExpyr, heterologous expression, enzymatic characterization, hydrolysis, glioblastoma

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações catalisadas por lipase
<b>Figura 2</b> - Estrutura do motivo $\alpha/\beta$ hidrolase em lipase
Figura 3 - Mecanismo de catálise de lipase
Figura 4 - Equilíbrio dinâmico entre conformações aberta e fechada da lipase
<b>Figura 5 -</b> Representação hipotética da velocidade inicial, <i>v</i> <sub>0</sub> , e da concentração do substrato, [S], para catálise enzimática
Figura 6 - O modelo reacional Ping Pong bi-bi
Figura 7 - Esquema do vetor pExpyr para expressão de proteínas-alvo de interesse
Figura 8 - Predição da sequência de peptídeo sinal da tradução de <i>bbl1</i> 71
Figura 9 - Eletroforese da extração de DNA de <i>B. bassiana</i> em gel de agarose 0,8%72
Figura 10 - Eletroforese da amplificação do gene <i>bbl1</i> das amostras obtidas na extração de DNA, em gel de agarose 0,8%
<b>Figura 11 -</b> Eletroforese do resultado da purificação do amplificado de <i>bbl1</i> utilizando dois kits comerciais em gel de agarose 0,8%
<b>Figura 12 -</b> Eletroforese da amplificação de <i>bbl1</i> das colônias de <i>E. coli</i> transformadas com o produto da ligação pGEM-T+ <i>bbl1</i> , em gel de agarose 0,8%
<b>Figura 13 -</b> Eletroforese da amplificação do gene <i>bbl1</i> inserido no vetor pGEM-T+ <i>bbl1</i> , após miniprep, em gel de agarose 0,8%
<b>Figura 14 -</b> Eletroforese dos produtos de digestão dos vetores pExpyr e pGEM-T+ <i>bbl1</i> com as enzimas de restrição Not1 e XBaI, gel de agarose 0,8%
<b>Figura 15</b> - Eletroforese da amplificação de <i>bbl1</i> das colônias de <i>E. coli</i> transformadas com o produto da ligação pExpyr+ <i>bbl1</i> , em gel de agarose 0,8%
<b>Figura 16 -</b> Eletroforese dos produtos de digestão dos vetores pExpyr+ <i>bbl1</i> com as enzimas de restrição Not1 e XBaI, em gel de agarose 0,8%77
Figura 17 - Alinhamento entre estruturas primárias de proteínas Bbl1 e lipase de referência em banco de dados
<b>Figura 18 -</b> Modelagem gráfica de Bbl1 utilizando lipase b de <i>C. antarctica</i> como <i>template</i> – Campo de visão I
<b>Figura 19 -</b> Modelagem gráfica de Bbl1 utilizando lipase b de <i>C. antarctica</i> como <i>template</i> – Campo de visão II
<b>Figura 20 -</b> Modelagem tridimensional de Bbl1 utilizando lipase b de <i>C. antarctica</i> como <i>template</i> – Campo de visão III
Figura 21 - Infográfico contendo os resultados preliminares da expressão de <i>bbl1</i> em <i>A. nidulans</i> A773
Figura 22 - Expressão e prévia caracterização de Bbl1 em A. <i>nidulans</i> A773
<b>Figura 23 -</b> Condições de cultivo e seus efeitos na produção de Bbl1, proteínas totais e morfologia de $A_{bbl1+}$

<b>Figura 24 -</b> Perfil proteico, em SDS semi-desnaturante e zimograma, de lipases e esterases dos extratos de cultivo de $A_{bbl1+}$ e $A_{bbl1-}$ em diferentes condições de cultivo
Figura 25 - Efeito da glicose sobre a secreção de Bbl1
<b>Figura 26 -</b> Valores absolutos de biomassa, açúcar redutor residual, proteínas extracelulares e atividade de lipase, de cultivos de $A_{bbl1+}$
<b>Figura 27 -</b> Perfil proteico do cultivo de $A_{bbl1+}$ em biorreator, em diferentes períodos
Figura 28 - Perfil proteico das etapas de purificação de Bbl195
Figura 29 - Efeito de surfactantes sobre atividade e estabilidade de Bbl1
Figura 30 - Efeito de sais e 2-mercaptoetanol sobre atividade de Bbl1
Figura 31 - Hidrólise de pNPP por Bbll1 em tampão McIlvaine, acetato ou na ausência de tampão99
Figura 32 - Estabilidade da atividade de Bbl1, em diferentes solventes
Figura 33 - Estabilidade de Bbl1 em diferentes temperaturas101
Figura 34 - Relação linear semi-recíproca entre temperaturas e logaritmo natural das respectivas constantes k <sub>desn</sub>
Figura 35 - Estabilidade de Bbl1 em diferentes pH103
Figura 36 - Planejamento fatorial da hidrólise de pNPP por Bbl1 não-imobilizada105
<b>Figura 37</b> - Efeito da concentração do substrato pNPP sobre a atividade hidrolítica de Bbl1 e lipase obtida da Palatase® 20.000L (Novozymes)106
Figura 38 - Relação linear semi-recíproca entre temperaturas e logaritmo natural das respectivas constantes k <sub>cat</sub>
Figura 39 - Determinação de CI <sub>50</sub> para inibidores de ácido graxos109
Figura 40 - Efeito da concentração do substrato pNPP sobre a atividade hidrolítica de Bbl1 na presença de inibidores110
Figura 41 - Perfil de imobilização de Bbl1 em diferentes suportes113
Figura 42 - Estabilidade térmica de derivados de Bbl1115
Figura 43 - Estabilidade dos derivados de Bbl1 em pH118
Figura 44 - Planejamento fatorial da hidrólise de pNPP por Bbl1 imobilizada123
Figura 45 - Efeito da concentração do substrato pNPP sobre a atividade hidrolítica de Bbl1 imobilizada em Octyl
<b>Figura 46 -</b> Relação linear semi-recíproca entre temperaturas e logaritmo natural das respectivas constantes k <sub>cat</sub> para derivado de Bbl1 em Octyl
Figura 47 - Determinação de CI50 para inibidores de ácido graxos em Bbl1 imobilizada em Octyl127
<b>Figura 48 -</b> Efeito da concentração do substrato pNPP sobre a atividade do derivado de Bbl1 na presença de inibidores
Figura 49 - Viabilidade das células de fibroblasto e glioblastoma na presença dos produtos de hidrólise do óleo de açaí
<b>Figura 50 -</b> Viabilidade das células de fibroblasto e glioblastoma na presença dos produtos de hidrólise do óleo de buriti

Figura 51 - Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise do óleo de açaí e buriti......132

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças entre esterases e lipases
Tabela 2 - Reações catalisadas por lipases e seus diferentes substratos e produtos
Tabela 3 - Primers para lipase bbl1 de B. bassiana
<b>Tabela 4 -</b> Parâmetros cinéticos do cultivo de Abbl1+ em Erlenmeyer e em biorreator
Tabela 5 - Quadro de purificação de Bbl194
Tabela 6 - Hidrólise de pNPP por Bbll1 em tampão McIlvaine, acetato ou na ausência de tampão98
<b>Tabela 7 -</b> Valores de $t_{50}$ e $k_{desn}$ de Bbl1, em diferentes temperaturas
Tabela 8 - Valores de t <sub>50</sub> de Bbl1, em diferentes pH
<b>Tabela 9 -</b> Planejamento de experimentos para avaliar o efeito da temperatura e pH sobre a atividade de hidrólise de pNPP de Bbl1
Tabela 10 - ANOVA para o planejamento experimental de segunda ordem da hidrólise de pNPP por Bbl1
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de pNPP pelas lipases Bbl1 e da Palatase® 20.000L (Novozyme)
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de pNPP por Bbl1 na presença de diferentes concentrações de ácidos oleico e linoleico
Tabela 13 - Parâmetros de imobilização de Bbl1 após 24 horas
<b>Tabela 14 -</b> Valores de $t_{50}$ e $k_{desn}$ dos derivados de Bbl1 em diferentes temperaturas
Tabela 15 - Valores de t <sub>50</sub> dos derivados de Bbl1 em diferentes pH
<b>Tabela 16 -</b> Planejamento de experimentos para avaliar o efeito da temperatura e pH sobre a atividade de hidrólise de pNPP de Bbl1
Tabela 17 - ANOVA para o planejamento experimental de segunda ordem da hidrólise de pNPP por         Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose
<b>Tabela 18 -</b> ANOVA para o planejamento experimental de segunda ordem da hidrólise de pNPP porBbl1 imobilizada em CNBr-Sepharose
<b>Tabela 19 -</b> ANOVA para o planejamento experimental de primeira e segunda ordem da hidrólise depNPP por Bbl1 imobilizada em DEAE-celulose
Tabela 20 - Parâmetros de pH e temperatura ideias e valor de atividade específica esperada para os derivados de Bbl1
Tabela 21 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de pNPP pela lipase Bbl1 imobilizada em Octyl125
Tabela 22 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de pNPP por Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose, na presença de diferentes concentrações de ácidos oleico e linoleico

## LISTA DE SIGLAS

% - Porcentagem  $(5' \rightarrow 3')$  – Ordem *senso* de leitura de nucleotídeo

(m/v) – Razão massa e volume

(v/v) - Razão entre volume

< - menor

> - maior

°C – Graus Celsius

 $\mu_0$  – Taxa de crescimento

 $\mu g - Micrograma$ 

 $\mu L - Microlitro$ 

µM - Micromolar

µmol – Micromol

1000X - 1000 vezes concentrado

20X - 20 vezes concentrado

 $A_{bbll}$  - Cepa transformante de *A. nidulans* com vetor pExpyr vazio

*A*<sub>bbl1+</sub> - Cepa transformante de *A. nidulans* com vetor pExpyr+*bbl1* 

APS - Persulfato de Amônio

Asn (ou N) - Asparagina

BB11 – Beauveria bassiana lipase 1

bbl1 – gene da Beauveria bassiana lipase 1

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BSA – Soro Albumina Bovina

C1 - 0,025 miligramas de hidrolisado por mililitro de meio de cultivo

C2 - 0,05 miligramas de hidrolisado por mililitro de meio de cultivo

C3 - 0,10 miligramas de hidrolisado por mililitro de meio de cultivo

C4 - 0,15 miligramas de hidrolisado por mililitro de meio de cultivo

C5 - 0,20 miligramas de hidrolisado por mililitro de meio de cultivo

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio

CI<sub>50</sub> – Concentração de inibidor para 50% de velocidade máxima

CNBr – Brometo de Cianogênio

CoCl<sub>2</sub> - Cloreto de Cobalto

CTAB (ou CTBA) – cetyl trimethylammonium bromide

CuSO<sub>4</sub> – Sulfato de cobre II

DEAE - Dietilaminoetil

DH5a – Células de *Escherichia coli* eletrocompetentes

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA – deoxyribonucleic acid

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

dNTP - Nucleosídeo trifosfato

DSPS – solução KCl-ácido cítrico

E<sub>a</sub> – Energia de ativação

E<sub>a(d)</sub> – Energia de desnaturação

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FeSO<sub>4</sub> – Sulfato ferroso

g (em itálico) – Força Gravitacional

g – Grama

g.g<sup>-1</sup> – Grama de biomassa por grama de açúcar consumido

g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> – Grama de açúcar consumido por grama de biomassa por hora de cultivo

h – Hora

 $h^{-1}$  – Por hora de cultivo

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – Ácido Bórico

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido Fosfórico

HCl – Ácido Clorídrico

HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1piperazin etanol sulfônico

His (ou H) - Histidina

 $K_{0,5}$  – Termo generalista para concentração de substrato equivalente a 50% de velocidade máxima

k<sub>cat</sub> – Número de turnover (ou catalítica)

KCl - Cloreto de potássio

kDa-kilo Dalton

kdesn - Constante de desnaturação

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monobásico de potássio

kpb – mil pares de base

L – Litro

lag - Fase lag de crescimento microbiano

LB – Meio Luria-Bertani

LB+Amp – Meio LB com ampicilina

Lis – Lisina

LN-18 – Linhagem celular de glioblastoma multiforme

log - Fase log de crescimento microbiano

M - Molar

malt - Meio mínimo com 5% de maltose

<u>malt+HEPES</u> – Meio mínimo com 5% de maltose e 100 mM de HEPES

<u>malt+PO</u> – Meio mínimo com 5% de maltose e 100 mM de tampão fosfato de sódio

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de Magnésio

 $\min-Minuto$ 

mL – Mililitro

mM-Milimolar

MMWC - Mililitros de água

MnCl<sub>2</sub> - Cloreto de Manganês

Mw – Molecular weight

n - Número amostral

Na<sub>2</sub>EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético dissódico

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-Molibdato de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaNO3 - Nitrato de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ng – Nanograma

nm - Nanômetro

PCR – Polimerase Chain Reaction

PEG - polietilenoglicol

PEI – Polietilenoimina

pExpyr - Vetor de expressão

pExpyr+*bbl1* – vetor pExpyr ligado ao gene *bbl1* 

pGEM-T – Vetor de clonagem

pGEM-T+*bbl1* – vetor pGEM-T ligado ao gene *bbl1* 

pH - potencial hidrogeniônico

pI - Ponto isoelétrico

pKa - Constante de ionização ácida

pNPP-4-nitrofenil-palmitato

PVP-40 – polyvinylpyrrolidone 40 kDa

*pyrG89* – gene de *Aspegillus nidulans* que codifica uma orotidina 5'-fosfato descarboxilase

*pyroA4* – gene de *A. nidulans* envolvido com a biossíntese de piridoxina

 $q_{Bbl1}$  – Taxa específica de produção de atividade enzimática por unidade de biomassa por hora de cultivo

 $q_s$  – Taxa específica de consumo de açúcar por unidade de biomassa por hora de cultivo

rpm-Rotação por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Ser (ou S) - Serina

STC – solução Sorbitol-Tris-CaCl<sub>2</sub>

T - Temperatura

 $t_{50}$  – Tempo para 50% de um determinado parâmetro

TAE - (Tris-acetato-EDTA)

TEMED-Tetrametiletilenediamino

 $T_m$  – Temperatura de anelamento

TMZ – Telozolomida

U - unidade de atividade enzimática

U.g<sup>-1</sup> – Unidades de atividade enzimática por grama de açúcar consumido ou Unidade de atividade enzimática por grama de derivado

U.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> – Unidades de atividade enzimática produzidas por grama de açúcar consumido por hora de cultivo

U.mg<sup>-1</sup> – Unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína

U.mL<sup>-1</sup> – Unidades de atividade enzimática por mililitro de solução

V – Volts

v – Volume

v.v.m. – Volume de ar por volume de líquido por minuto

V<sub>máx</sub>-Velocidade máxima

*wA3* – gene de *A. nidulans* envolvido com pigmentação

WT – wild-type

<u>xaro+PO</u> – Meio mínimo com 5% de xarope de milho e 100 mM de tampão fosfato de sódio <u>xaro+PO+agi</u> – Meio mínimo com 5% de xarope de milho e 100 mM de tampão fosfato de sódio sob agitação de 150 rpm

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

XTT - Sal tetrazolium

 $Y_{s/Bbl1}$  – Síntese de unidades enzimáticas por consumo de açúcar

 $Y_{s/x} - S \text{intese} \text{ de biomassa por consumo de açúcar} \\$ 

YT - Meio Triptona e extrato de levedura

ZnSO<sub>4</sub> – Sulfato de Zinco

 $\alpha - alpha$ 

 $\beta$  - beta

GYT - Meio YT com 10% glicerol

IPTG - *isopropyl*  $\beta$ -*D*-1*thiogalactopyranoside* 

# SUMÁRIO

1. Introdução	.22
1.1. Comércio e propriedades gerais de lipases	.23
1.2. Propriedades bioquímicas de lipases	.25
1.2.1. Classificação das lipases	.25
1.2.2. Tipos de reações catalisadas por lipase	.26
1.2.3. Estrutural conformacional e mecanismo catalítico das lipases	.27
1.2.4. Cinética de lipases	.34
1.2.5. Energia de ativação nos estudos cinéticos	.34
1.3. Imobilização de lipases	.35
1.4. Expressão heteróloga de lipases e vetor pExpyr	.37
1.5. Tratamento de glioblastoma – um novo panorama para utilização de	
lipases	.38
1.5.1. Células de glioblastoma e mecanismos de resistência	.38
1.5.2. Óleos naturais, tratamento de glioblastoma e outras linhagens	
tumorais	.39
2. Objetivos	.42
2.1. Objetivos específicos	.42
3. Material e Métodos	.44
3.1. Metodologia e técnicas de biologia molecular	.44
3.1.1. Seleção do gene bbl1 e construção de primers	.44
3.1.2. Extração de DNA genômico de B. bassiana	.44
3.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase	.46
3.1.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose	.46
3.1.5. Purificação da sequência de <i>bbl1</i> em gel de agarose	.46
3.1.6. Preparo de células de <i>E. coli</i> DH5α	.46
3.1.7. Ligação de <i>bbl1</i> em vetor pGEM-T	.47
3.1.8. Transformação por eletroporação	.47
3.1.9. Confirmação de inserção de vetor contendo <i>bbl1</i> em células de <i>E</i> .	
coli	.48
3.1.10. Obtenção dos vetores pExpyr	.48
3.1.11. Digestão dos vetores pExpyr e pGEM-T+bbl1 com Not1 e XBaI	.49
3.1.12. Ligação de <i>bbl1</i> em pExpyr e confirmação por digestão dupla con	m
Not1 e XBaI	49
3.1.13. Sequenciamento automático do plasmídeo pExpyr+bbl1	.50
3.1.14. Alinhamento das sequências e modelagem molecular	.50
3.1.15. Preparo de protoplastos e transformação de A. nidulans	50
3.2. Metodologia analíticas	.52
3.2.1. Reação para detecção de atividade de lipase	.52
3.2.2. Dosagem de proteínas	.53
3.2.3. Determinação de açúcares redutores totais no meio de cultura	.53
3.2.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições	
semi-desnaturantes	.54

	3.2.5. Revelação proteica em gel de poliacrilamida	54
	3.2.6. Revelação de atividade lipolítica em gel de poliacrilamida	55
3.3.	Procedimentos experimentais	55
	3.3.1. Expressão de enzima recombinante	55
	3.3.2. Comparação do extrato de Abbl1+ em relação ao WT e Abbl	56
	3.3.3. Efeito do xarope de milho e tampão fosfato no meio de cultura	56
	3.3.4. Efeito da glicose na expressão de <i>bbl1</i>	57
	3.3.5. Estudo de escalonamento	57
	3.3.6. Purificação de Bbl1	59
	3.3.7. Efeito dos surfactantes em Bbl1	60
	3.3.8. Efeito de sais e 2-mercaptoetanol na atividade de Bbl1	60
	3.3.9. Efeito de solventes orgânicos	61
	3.3.10. Imobilização de Bbl1 em suportes de interação hidrofóbica e	
iônica		61
	3.3.11. Imobilização de Bbl1 em suporte CNBr-Sepharose	63
	3.3.12. Estabilidade da atividade enzimática em diferentes	
temperatui	ras	63
	3.3.13. Estabilidade da atividade enzimática a diferentes valores de p	)H64
	3.3.14. Otimização de experimentos para hidrólise de pNPP	64
	3.3.15. Análise e tratamento dos dados cinéticos	65
	3.3.16. Inibição dos ácidos graxos oleico e linoleico sobre hidrólise de	,
<i>p</i> NPP		65
3.4.	Estudo de viabilidade de células de glioblastoma LN-18 e fibroblasto C	CD-
1072Sk na	presença de hidrolisados do óleo de açaí e buriti	66
	3.4.1. Hidrólise dos óleos de buriti e açaí	66
	3.4.2. Análise das fases polar e apolar da hidrólise de buriti e açaí po	r
cromatogra	afia de camada delgada	67
	3.4.3. Linhagens celulares	67
	3.4.4. Preparação das soluções estoque dos hidrolisados para utilizaç	ção em
cultivos de	células	67
	3.4.5. Preparo do meio de cultivo de células	68
	3.4.6. Cultivo celular	68
	3.4.7. Viabilidade celular avaliada pelo kit XTT	69
3.5.	Repetibilidade dos experimentos	69
4. Resultad	los	71
4.1.	Transformação de A. nidulans	71
	4.1.1. Escolha do gene codificador de Bbl1 e formulação de primers.	71
	4.1.2. Extração do DNA de <i>B. bassiana</i> e amplificação do gene <i>bbl1</i>	72
	4.1.3. Clonagem de bbl1 no vetor pGEM-T, seleção de colônias positi	ivas
por PCR d	le colônia e digestão da ligação e do vetor de expressão pExpyr	74
	4.1.4. Clonagem no vetor de expressão pExpyr	76
	4.1.5. Análise do sequenciamento do gene bbl1 inserido no pExpyr	78
	4.1.6. Modelagem gráfica de Bbl1	80

4.1.7. Expressão do gene bbl1 em Aspegillus nidulans, seleção de colônia-
mãe e caracterização prévia da lipase expressa82
4.2. Estudo de crescimento da cepa transformante A. nidulans
4.2.1. Alterando condições do cultivo de A <sub>bbl1+</sub> 84
4.2.2. Efeito da glicose na produção de Bbl1
4.2.3. Escalonamento e crescimento de Abbl1+ em biorreatores
4.3. Purificação de Bbl1 a partir de extrato de cultivo em biorreator
4.4. Caracterização bioquímica de Bbl1 purificada utilizando <i>p</i> NPP como
substrato95
4.4.1. Efeito e estabilidade de surfactantes na atividade de Bbl1
4.4.2. Efeito de sais e 2-mercaptoetanol na atividade de Bbl196
4.4.3. Estabilidade de Bbl1 em solventes orgânicos
4.4.4. Estabilidade térmica de Bbl1100
4.4.5. Estabilidade de Bbl1 em diferentes pH102
4.4.6. Otimização da temperatura e pH por planejamento de experimentos
e análise de superfície de resposta103
4.4.7. Efeito da concentração de substrato e energia de ativação da
atividade de hidrólise de <i>p</i> NPP por Bbl1, em comparação à enzima comercial Palatase <sup>®</sup>
(Novozymes)105
4.4.8. Inibição da hidrólise de $p$ NPP por ácidos oleico e linoleico na
hidrólise de <i>p</i> NPP108
4.5. Caracterização bioquímica de Bbl $1$ imobilizada utilizando $p$ NPP como
substrato110
4.5.1. Imobilização de Bbl1 em diferentes suportes110
4.5.2. Estabilidade térmica dos derivados114
4.5.3. Estabilidade dos derivados em pH116
4.5.4. Planejamento de experimentos dos derivados de Bbl1 para hidrólise
de <i>p</i> NPP119
4.5.5. Efeito da concentração de substrato e energia de ativação da
hidrólise de <i>p</i> NPP por Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose124
4.5.6. Estudo de inibição do derivado Octyl-Sepharose por ácidos oleico e
linoleico126
4.6. Efeito de hidrolisado dos óleos de buriti e açaí em células de glioblastoma
LN18 e fibroblasto128
5. Discussão134
Conclusões155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS157

# INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

### 1.1. Comércio e propriedades gerais de lipases

Lipase é o nome comum para um grupo de enzimas pertencentes à classe de hidrolases (EC 3.1) que catalisa a hidrólise de ligações éster (EC 3.1.1). São também definidas como carboxilesterases (hidrolases de éster carboxílicos) incluindo esterases (EC 3.1.1.1) e lipases "verdadeiras" (EC 3.1.1.3) que são amplamente distribuídas na natureza. Alguns autores consideram como enzimas lipolíticas outras hidrolases que catalisam acilglicerídeos, tal como as cutinases (EC 3.1.1.74) que hidrolisam as ligações éster da cutina, um polímero vegetal, e as fosfolipases A e B (FOJAN et al., 2000; SARMAH et al., 2018).

Estas enzimas são extremamente versáteis e altamente eficientes. Elas desempenham um importante papel fisiológico convertendo triacilglicerídeos em moléculas mais polares, como diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e glicerol, na presença de água. São valorizadas comercialmente porque agem em moderadas, sendo estáveis a solventes orgânicos, apresentam ampla especificidade em diferentes substratos e geralmente demonstram regio- e estereoseletividade em catálise (JAVED et al., 2018).

Em geral, as lipases não requerem cofatores, agem em uma ampla gama de pH e são estáveis em altas temperaturas (VILLENEUVE et al., 2000; HASAN et al., 2006; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; SARMAH et al., 2018). Estas enzimas podem ser produzidas por muitos micro-organismos e demais eucariotos. A biodiversidade de lipases descrita pertence a bactérias (45%), fungos (21%), animais (18%), plantas (11%) e Algas (3%) (SARMAH et al., 2018). Lipases de micro-organismos são preferidas aos de fonte animal e vegetal porque são produzidas em menor tempo, as condições necessárias de crescimento dos micro-organismos são mais facilmente controladas e menos custosas; além de possibilitarem a manipulação genética para expressão de enzimas com maior eficiência catalítica. Por conseguinte, são mais viáveis do ponto de vista econômico e industrial (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Vários gêneros de micro-organismos podem ser usados para produzir lipases, como fungos dos gêneros *Trichosporon, Botrytis, Pichia, Fusarium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus, Penicillium, Geotrichum, Tulopis e Candida*; e bactérias dos gêneros *Streptomyces, Chromobacterium, Pseudomonas, Bacillus, Enterococcus e Staphylococcus* (FABER, 2004; SARMAH et al., 2018).

Uma série de propriedades pode ser enunciada que agrega valor ao uso de lipases e microorganismos no comércio e na pesquisa:

- Grandes quantidades de lipases podem ser purificadas graças às tecnologias de recombinantes, facilitando a produção em massa deste insumo;
- São enzimas que atuam em uma faixa extensa de temperatura (10 a 90°C) e pH, o que elimina a necessidade de gastos de energia e adição de reagentes no meio reacional;
- Geralmente são produzidas por micro-organismos termofílicos e, assim, muitas lipases são estáveis a altas temperaturas;
- Lipases permanecem ativas em solventes orgânicos;
- A imobilização de lipases garante reutilização do derivado inúmeras vezes;
- As reações catalisadas por lipases apresentam maior custo-benefício em comparação àquelas realizadas por métodos químicos tradicionais;
- São enzimas que catalisam diferentes tipos de reações, produzindo uma variedade de produtos. Isso possibilita o uso desta classe de enzimas nas áreas de cosmética, farmacêutica, médica, engenharia e na produção de combustíveis.

Um dos micro-organismos produtores de lipases é *Beauveria bassiana*. Esse fungo é conhecido pela propriedade entomopatológica, sendo capaz de sintetizar pigmentos não-peptídicos e policetídeos os quais atuam no controle de pragas e insetos transmissores de doenças (FANCELLI et al., 2013). A ação parasitária deste micro-organismo também decorre da secreção de proteases, quitinases e, especialmente, lipases; enzimas que atuam diretamente sobre o exoesqueleto e nas reservas gordurosas dos hospedeiros (PEKRUL; GRULA, 1979). Do ponto de vista biotecnológico, esse micro-organismo mostrou-se eficiente à obtenção de lipases em escala laboratorial, as quais apresentam elevada atividade catalítica, potencial em converter resíduos industriais em matrizes energéticas (como biodiesel) e possibilitar a obtenção de ácidos graxos essenciais à alimentação (VICI et al., 2015). Todavia, a produção dessa classe de enzima depende de condições específicas, usufruindo de fontes de carbono oleaginosas e prolongado tempo de cultivo submerso. Tais obstáculos, dificultam a utilização desse micro-organismo em escala industrial, resultando em elevados custos na manutenção dos cultivos.

Em decorrência às dificuldades da produção de lipases por *B. bassiana*, em escala industrial, a expressão heteróloga emerge como uma alternativa, possibilitando a produção dessas enzimas por meio de micro-organismos modelos, cujas propriedades fisiológicas e genéticas são conhecidas.

## 1.2. Propriedades bioquímicas das lipases

### 1.2.1. Classificação das lipases

As lipases "verdadeiras" preferem substratos altamente hidrofóbicos que tendem a formar agregados em água, como óleos e gorduras. Esses substratos contêm triacilglicerídeos com extensas cadeias alifáticas ( $\geq$ 10 átomos de carbono) (FOJAN et al., 2000; BORNSCHEUER, 2002; GIRALDO et al., 2007). Por esta razão, a atividade das lipases "verdadeiras" está diretamente correlacionada com a área de substrato e não com a concentração de substrato (CERNIA et al., 2002; LASZLO et al., 2007). Por outro lado, as esterases têm capacidade de hidrolisar substratos de menor cadeia de carbônica (< 10 átomos de carbono). Desse modo, a atividade de esterases é restrita às ligações éster de substratos mais solúveis em água (FOJAN et al., 2000).

Lipases têm níveis consideráveis de atividade e estabilidade em sistemas não-aquosos, diferentemente de muitas outras enzimas. A catálise promovida por essas enzimas ocorre em uma interface lipídio-água, onde o substrato geralmente forma um equilíbrio entre os estados de monômeros livres, micelas e agregados emulsificados. Esse fenômeno pertencente às lipases é conhecido como ativação interfacial.

A ativação interfacial foi descrita por HOLWERDA et al. (1936), e SCHONHEYDER e VOLQVARTZ (1945). Através da atividade de lipase pancreática sobre o substrato trieptanoína, os autores observaram que a hidrólise foi aumentada quando a concentração deste substrato excedeu a sua concentração micelar crítica (CMC). SARDA e DESNUELLE (1958) observaram que esterases eram ativas apenas em substratos dispersos em solução, enquanto que as lipases "verdadeiras" mostravam maior atividade em substratos formando agregados. Assim, foi proposto que o fenômeno da ativação interfacial seria uma característica deste último grupo de lipases que poderia distingui-lo das esterases. No entanto, nem todas as lipases têm a ativação interfacial, assim, a classificação baseada na especificidade pelo comprimento da cadeia de carbono é mais utilizada. A tabela 1 resume as diferenças comumente abordadas para diferenciar as lipases "verdadeiras" de esterases. Ao longo do escopo do presente trabalho o termo lipases "verdadeiras" será reduzido a apenas lipases para facilitar a dissertação que se segue.

Característica	Esterase	Lipase	
Substratos preferenciais	Triglicerídeos cujas cadeias alifáticas contém menos de 10 átomos de carbonos	Triglicerídeos cujas cadeias alifáticas contém mais de 10 átomos de carbono	
Solubilidade do substrato em água	Alta	Muito baixa	
Quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos	Baixa	Alta	
Ativação interfacial	Não	Sim	
Presença de uma "tampa"	Não	Presente na maioria	
Enantiosseletividade	Variável	Geralmente alta	
Estabilidade orgânica do solvente	Geralmente baixa	Alta	

 Tabela 1 - Diferenças entre esterases e lipases. Informações com base em algumas características químicas da enzima ou do substrato.

Fonte: Adaptado de PÉREZ et al.  $(2018)^1$ 

## 1.2.2. Tipos de reações catalisadas por lipases

A reação de hidrólise catalisada por lipases é reversível. Entretanto, uma característica das lipases é que na baixa presença de água, e frequentemente em solventes orgânicos, elas são catalisadores eficazes na síntese de ésteres, por esterificação. Estes processos básicos de hidrólise e esterificação podem ser combinados em um padrão sequencial para dar origem a um grupo de reações de transesterificação. Dependendo do substrato inicial, a reação é chamada acidólise (quando o grupo acil é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (entre um éster e um álcool) ou interesterificação (entre dois ésteres) sem qualquer formação ou consumo de água (Figura 1).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Capítulo de livro no prelo.: PÉREZ, M. M.; SPIROPULOS, E. C. G.; VICI, A. C.; SALGADO, J. C. S.; POLIZELI. *Fungal Lipases – Versatile Tools for White Biotechnology*. In: YADAV, A. N.; MISHRA, S.; SINGH, S.; GUPTA, A. *Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi*. Springer, 2018.



**Figura 1 - Reações catalisadas por lipase.** Tipo de reação depende dos grupos químicos dos substratos utilizados. Fonte: Adaptado de PÉREZ et al. (2018).

## 1.2.3. Estrutura conformacional e mecanismo catalítico de lipases

Estudos sobre a estrutura tridimensional da lipase mostraram que este grupo de enzimas contém um motivo de  $\alpha/\beta$  hidrolase, o qual é compartilhado com muitas esterases e peptidases. Este motivo consiste em oito folhas  $\beta$  rodeadas por seis hélices  $\alpha$  (Figura 2), embora tenha sido relatado que a lipase de *Bacillus subtilis* não possua as cadeias  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2.



**Figura 2 - Estrutura do motivo**  $\alpha/\beta$  hidrolase em lipase. Os resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica estão representados em amarelo. Fonte: PÉREZ et al. (2018).

Lipases contêm um pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly, em que X pode ser qualquer resíduo de aminoácido e o resíduo de Ser forma um giro  $\gamma$ -*like* entre  $\beta$ 5 e a seguinte hélice  $\alpha$  (MALA; TAKEUCHI, 2008). No entanto, AKOH et. al (2004) descreveram uma subclasse de lipases que possuem uma sequência distinta do Gly-X-Ser-X-Gly denominado Gly-Asp-Ser-Leu. A Serina descrita anteriormente é parte da tríade catalítica juntamente com os resíduos de His e Asp / Glu (BRADY et al., 1990; JAEGER et al., 1999).

Estudos tridimensionais mostraram a existência de regiões de interação hidrofóbicas próximas à tríade catalítica, que, às vezes, são referidas como um "túnel", conectando a tríade catalítica ao núcleo da lipase (CYGLER et al., 1994; NORIN et al., 1994; PLEISS et al., 1998; HOLMQUIST, 1998). A forma e as dimensões desse "túnel" podem estar associadas à regiosseletividade e à enantiosseletividade da lipase (SCHMITT et al., 2002), explicando porque algumas lipases são capazes de hidrolisar uma, duas ou todas as cadeias acil; e pelo fato da hidrólise ser seletiva para cadeias saturadas ou insaturadas em um triglicerídeo. Por exemplo, o "túnel" da lipase B de Candida antarctica é descrita como um funil elíptico de 9,5 x 4,5 Å. No fundo deste funil há uma zona hidrofílica formada pelos resíduos catalíticos Serina e Aspartato. Ao longo desta região de interação hidrofóbica a maioria dos resíduos de aminoácidos são hidrofóbicos, constituídos por resíduos de valina, leucina e isoleucina. Moléculas de água são necessárias para hidrolisar o complexo enzimático acil; entretanto, a existência de uma superfície hidrofóbica limitaria o acesso ao sítio ativo. Desse modo, assumese que tais moléculas de água estão aderidas à zona hidrofílica presente no túnel, descrita anteriormente. Estudos recentes estão fornecendo ferramentas para modificar esse túnel, aumentando a síntese de grupos específicos com valor biotecnológico (LAGUERRE et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017).

Para explicar como a tríade catalítica funciona na presença de um substrato, as etapas de hidrólise no triacilglicerol serão esquematizadas a seguir (Figura 3). Todavia deve-se enfatizar que a esterificação e a transesterificação ocorrem no mesmo esquema alterando a ordem explicada ou os substratos representados. A reação começa com um ataque nucleofílico da hidroxila do resíduo de Ser sobre a carbonila do grupo éster do lipídeo. Forma-se um intermediário tetraédrico cujo -O é estabilizado por dois grupos -NH do anel de His. Isto promove a protonação do anel imidazol, que é estabilizado pelas cargas negativas do resíduo Asp / Glu. Em um dado momento, o hidrogênio do anel de His é doado para -O, que estava estabilizando a estrutura, resultando em um diacilglicerol livre. A cadeia de ácido graxo permanece covalentemente ligada à enzima por meio do resíduo de Ser e é estabilizada por ligação de hidrogênio com o resíduo Asp; este complexo é chamado de acil-enzima (JAEGER

et al., 1999; BORNSCHEUER, 2002). Uma molécula de água é ativada pelo anel His, promovendo um ataque nucleofílico do íon hidroxila sobre o átomo do carbono da carbonila do complexo acil-enzima. Um segundo complexo tetraédrico é formado, mas desta vez o anel His doa um hidrogênio (anteriormente fornecido pela água) para -O de Ser, que desestabiliza a ligação covalente com a cadeia do ácido graxo, liberando-o e recuperando o estado inicial da enzima (JAEGER et al., 1999; BORNSCHEUER, 2002).



**Figura 3 - Mecanismo de catálise lipase. (1)** Sítio ativo da lipase. **(2)** Ligação do lipídeo à enzima e ativação do resíduo de serina nucleofílico com formação do intermediário tetraédrico e estabilização de O- pela interação com dois grupos -NH. **(3)** O complexo acil-enzima é formado e, em seguida, sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água (hidrólise) ou outro aceptor (transesterificação). **(4)** A liberação do produto e o local catalítico é restaurado. Fonte: PÉREZ et al. (2018).

Como já mencionado, um aspecto particular de bioquímica de lipases, que a difere de esterases e outras enzimas, é o aumento da atividade enzimática quando a concentração dos substratos atinge seu respectivo CMC (GUERRA et al., 2011). Quando um composto lipídico atinge sua CMC, suas moléculas arranjam-se em micelas ou membranas lipídicas. Desde então, conhece-se que a presença de micelas ou uma interface hidrofóbica é importante para ativação das lipases (HASAN et al., 2009). A explicação foi obtida com estudos tridimensionais que descobriram a existência de um conjunto de hélices-α recobrindo o sítio catalítico desta enzima,

denominada "tampa". Essa estrutura apresenta duas interfaces, uma constituída de resíduos de aminoácidos polares; e outra, apolar (JAEGER et al., 1999; LOTTI; ALBERGHINA, 2007).

A "tampa" não ocorre em todas as lipases, mas quando é presente, esta estrutura cobre o local catalítico tornando-o inacessível aos substratos nos meios aquosos. Quando uma interface de lipídios é encontrada, a superfície hidrofóbica da "tampa" expõe-se ao substrato, permitindo-o interagir com o sítio ativo (CYGLER; SCHRAG, 1997). Alguns estudos apontaram que modificações sobre a "tampa" interferem na estabilidade frente a diferentes temperaturas e solventes orgânicos (KHAN et al., 2017; MAIANGWA et al., 2017). Por causa da "tampa", a especificidade da lipase é maior por compostos com ligações éster cujas cadeias acil são longas. A hidrofobicidade direciona a formação de interações de Van der Waals entre a superfície apolar da "tampa" e os substratos hidrofóbicos, removendo a camada de solvatação ao redor da enzima, estabilizando a interação enzima-substrato e direcionando espacialmente os grupos éster do substrato aos resíduos catalíticos da lipase.

A "tampa" apresenta flexibilidade conformacional, e cada lipase pode apresentar diferentes níveis de mobilidade nesta estrutura. Em geral, existem dois estados conformacionais: um aberto, tornando o sítio ativo acessível ao substrato, e outro fechado cuja "tampa" bloqueia a interação entre solvente e os resíduos catalíticos. Entretanto, há estados intermediários entre essas duas formas da enzima, as quais são moldadas perante efeito de íons, solvente, pH e temperatura (LOUWRIER et al., 1996). Acredita-se que o mecanismo de abertura e fechamento está envolvido no mecanismo catalítico da lipase (GROCHULSKI et al., 1994; GONZALEZ-NAVARRO et al., 2001) sendo explicado pela atividade interfacial. As conformações aberta e fechada da lipase coexistem em equilíbrio (Figura 4). Em um sistema ausente de micelas ou interfaces lipídicas, sugere-se que o estado fechado predomina nas lipases em solução. Em contrapartida, na presença de superfícies hidrofóbicas ocorre o deslocamento da "tampa", expondo o sítio catalítico e permitindo a atividade catalítica da enzima sobre o substrato.



**Figura 4 - Equilíbrio dinâmico entre conformações aberta e fechada da lipase.** O equilíbrio químico ilustrado ocorre no momento da catálise reacional. Fonte: Adaptado de PÉREZ et al. (2018).

#### 1.2.4. Cinética de lipases

Conforme explicado por GUERRA et al. (2011), em uma reação de hidrólise catalisada por lipases, na ausência de solventes orgânicos ou agentes emulsificantes, a relação entre concentração de substrato e velocidade inicial é de natureza sigmoide. Isso é explicado pela atividade interfacial; apenas quando a concentração do substrato atinge seu CMC, ocorre a formação de uma interface lipídica que proporciona o deslocamento da "tampa" da lipase, aumentando consideravelmente sua atividade. Todavia, em um sistema reacional na presença de solventes orgânicos ou agentes emulsificantes, que permitam suficientemente a ativação interfacial, esta relação demonstra-se hiperbólica independentemente se a concentração do substrato está abaixo ou acima do CMC (Figura 5).



Figura 5 - Representação hipotética da velocidade inicial,  $v_0$ , e da concentração do substrato, [S], para catálise enzimática. Ausência de ativação interfacial (a) e durante a ativação interfacial (b). Em (a) ocorre uma elevação brusca na atividade lipolítica quando o substrato atinge o CMC (concentração micelar crítica – indicada pela seta) pois é o momento que é formada a interface lipídeo-polar. Em (b), na presença de detergentes ou solventes orgânicos, a lipase catalisa a reação mesmo em concentração de substrato abaixo de seu respectivo CMC. Isso ocorre, pois, o detergente/solvente orgânico forma a interface necessária para ativação da lipase. A relação entre concentração de substrato e velocidade inicial em (a) é sigmoide e em (b), hiperbólica. Fonte: Adaptado de PÉREZ et al. (2018).

A discussão da cinética das lipases concerne em descrever um modelo que considere os diferentes tipos de reações catalisadas por esse grupo de enzimas e as particularidades químicas, como deslocamento da "tampa" e atividade interfacial. Assume-se que a atividade de lipase não é explicada pelo modelo reacional de Michaelis-Menten (HERMANSYAH et al., 2007), que diz que uma enzima catalisa uma reação convertendo um substrato em um produto. CHULALAKSANANUKUL et al. (1999) propôs que o mecanismo Ping Pong bi-bi explicaria as reações catalisadas por esta enzima (Figura 6). Esse modelo considera que dois substratos e dois produtos são necessários para um ciclo de reação: a enzima reage com o primeiro substrato ligando-se a ele covalentemente, resultando em um complexo acil-enzima e liberando o primeiro produto da reação. Em seguida, um segundo substrato reagiria com o complexo, acil-enzima, formando o segundo produto e recuperando o estado inicial da enzima (BISSWANGER, 2002).



**Figura 6 - O modelo reacional Ping Pong bi-bi.** A enzima livre (E) interage com o primeiro substrato (A) formando-se o primeiro produto (P) e o complexo acil-enzima (F), que são liberados em solução. Em seguida, o segundo substrato (B) reage com o complexo acil-enzima, resultando na formação do segundo produto (Q) e a reconstituição da enzima livre. Os estados EA e FP são os complexos intermediários da formação do produto P. Os estados FB e EQ são os intermediários da formação do produto Q. Os  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$ ,  $k_{-3}$  e  $k_4$  são as constantes de reação para as etapas ilustradas na figura. Fonte: Adaptado de BISSWANGER (2002).

Os substratos e produtos podem ser diferentes dependendo da reação catalisada pelas lipases. Desse modo a tabela 2 denota quais são os componentes nas reações catalisadas por lipases, utilizando as legendas na figura 6.

**Tabela 2 - Reações catalisadas por lipases e seus diferentes substratos e produtos.** Substratos e produtos presentes nos diferentes tipos de reações catalisadas por lipases, segundo seus grupos ou nomes químicos. As letras representam os substratos e produtos conforme o modelo de Ping Pong bi-bi, segundo BISSWANGER (2002). Os termos A e B denotam, respectivamente, o primeiro e segundo substrato na reação e, P e Q são o primeiro e segundo produto formados, na devida ordem.

Tipo de reação	Substrato A	Produto P	Substrato B	Produto Q
Hidrólise	Éster	Álcool	Água	Ácido graxo
Esterificação	Ácido graxo	Água	Álcool	Éster
Transesterificação	Éster	Álcool / ácido graxo / éster / amina	Álcool / ácido graxo / éster	Éster / amida

Fonte: Adaptado de PÉREZ et al. (2018).

Em termos de inibição enzimática, os produtos liberados nas reações por lipases podem apresentar alguma semelhança com os reagentes podendo competir pelo sítio ativo da enzima. Além disso, os produtos, os reagentes e até o solvente utilizado podem interagir em regiões diferentes do sítio ativo, nas etapas ilustradas pela figura 6, proporcionando inúmeras possibilidades de inibição. JANSSEN et al. (1999) descreveu que o álcool e ácidos graxos influenciam na cinética de esterificação de lipase de *Candida rugosa*, atuando como inibidores da reação. MÉNDEZ et al. (2009) demonstrou que o *n*-propanol e ácidos graxos promovem inibição da hidrólise por lipase de *Rhizopus oryzae*. CHEW et al. (2008) mostrou que a hidrólise do óleo de palmito catalisada por uma lipase comercial é inibida na presença de ácidos graxos. VENY et al. (2017) concluiu que o metanol é um forte inibidor da transesterificação.

Apesar da literatura, os estudos de cinética em lipase necessitam ser elucidados. Muitas considerações devem ser feitas para elaboração de novos modelos que englobem as peculiaridades das lipases: inibição por produtos e reagentes, a ordem das etapas segundo Ping Pong bi bi, atividade interfacial, interações lipase-lipase e até mesmo agitação. Acima de tudo, não apenas visualizar o modelo, mas quais substâncias, de preferência as mais abundantes nos substratos-alvo de sua aplicação industrial, podem atuar sobre a atividade da enzima como íons ou ácidos graxos. Desse modo, experimentos simples de cinética permitirão compreender quais parâmetros afetam a taxa de catálise enzimática, representando um enorme impacto nos ajustes de custos e predição de lucros em uma empresa que usufrui de enzimas.

## 1.2.5. Energia de ativação nos estudos enzimáticos

As reações catalisadas por enzima e a desnaturação proteica podem ser descritas nos conformes de constantes de reação, k, que quantifica a taxa na qual as mesmas ocorrem em condições de temperatura e pressão específicas (BISSWANGER, 2002). Em uma reação enzimática, o termo kcat rege o número máximo de moléculas de substrato que são convertidas em produtos por unidade de tempo, quando a enzima está saturada com substrato (PINTO; DE MENEZES, 2009). Para estudos de estabilidade térmica, o termo k<sub>desn</sub> indica a quantidade de enzimas desnaturadas por unidade de tempo (PRAJAPATI et al., 2013). O k<sub>desn</sub> é determinado por outro parâmetro experimental, o t<sub>50</sub>, que denota o tempo em que 50% da atividade proteica mantém-se em solução (CHAPLIN; BUCKE, 1990), conforme Equação 1.

$$t_{50} = \frac{0.693}{k_{desn}}$$
 (Equação 1)

As constantes de reação ( $k_{cat}$  e  $k_{desn}$ ) são dependentes da temperatura, de acordo com a teoria cinética dos gases (PELEG, 2012). Desse modo podem ser descritas conforme a Equação de Arrhenius, a qual exprime a relação entre a taxa de reação, k, com a energia de ativação,  $E_a$ , para uma dada reação (Equação 2).

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$$
 (Equação 2)

Sendo A o fator de frequência, ou fator de Arrhenius, a qual indica a taxa de colisão e a fração de colisões com orientação apropriada para que a reação ocorra; R a constante dos gases e T temperatura em Kelvin. Essa função pode ser descrita em sua forma logarítmica, obtendose uma relação linear entre o logaritmo natural da constante de reação e o inverso da temperatura (Equação 3).

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT}$$
 (Equação 3)

Uma característica peculiar nos estudos com enzimas é que; acima de uma dada temperatura perde-se a relação linear descrita anteriormente. O resultado disso é a queda da constante de reação com o aumento de temperatura. Esse fenômeno é explicado pela desnaturação proteica, sendo visualizada nos gráficos sob a forma de um "sino" (BARTON, 1979).

#### 1.3. Imobilização de lipases

A imobilização de enzimas tem papel importante nas aplicações biotecnológicas. O principal motivo para realização de estudos na área é a reutilização de enzimas e alteração nas propriedades catalíticas e químicas, possibilitando ganho na produtividade para aquisição de um dado insumo farmacêutico ou industrial (MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013). No caso de lipases, a imobilização provê condições não-aquosas que são necessárias para as reações de esterificação e transesterificação (PETKAR et al., 2006). A explicação mais adotada quanto às alterações nas características de uma proteína após imobilização é a alteração na estrutura tridimensional da enzima (CLARK; BAILEY, 1983); podendo facilitar ou dificultar a interação do substrato com o sítio ativo da enzima (ZHANG et al., 2018), estabilizar ou desestabilizar interações cruciais na estrutura da proteína (CLARK, 1994) e impedir a inibição provocada por produtos e compostos presentes no meio reacional (OZDURAL et al., 2003).

Em muitos casos, a imobilização modula a régio- e enantiosseletividade. PEREIRA et al. (2017) demonstrou que uma lipase de *Hypocrea pseudokoningii* apresentou alteração em sua enantiosseletividade dependendo do tipo de suporte utilizado. Nesse trabalho, os derivados de glioxil e CNBr hidrolisaram, preferencialmente, o isômero-S de 2-butiril-2-fenilacético em mistura racêmica, enquanto que o derivado de glutaraldeído, o isômero-R.

A imobilização de uma dada enzima em um suporte depende das características químicas e geométricas de ambas além das condições do meio como pH, temperatura e tipo de solvente empregado (MOHAMAD et al., 2015). No caso de lipases, são citadas as imobilizações em suportes hidrofóbicos, iônicos e por ligação covalente unipontual ou multipontual (SOUZA et al., 2017; TURATI et al., 2017).

Da imobilização covalente unipontual, o suporte mais utilizado é o brometo de cianogênio (CNBr). Nesse tipo de imobilização, a ligação covalente é formada com os grupos amino laterais (preferencialmente aqueles expostos ao solvente, com excepcional enfoque ao resíduo amino-terminal da proteína) em condições brandas (DATTA et al., 2013). Os derivados formados nesse tipo de imobilização são considerados excelentes modelos de estudo das propriedades químicas da enzima pois simula condições ausentes de interferências intramoleculares. Para lipases, essa consideração é importante visto que essa classe de enzimas tende a formar agregados devido a superfície hdrofóbica de suas "tampas" (LIOU et al., 1998).

Nos estudos de imobilização iônica, os suportes dietilaminoetil (DEAE), monoamino-

*N*-aminoetil (MANAE) e carboximetil (CM) são os mais empregados. DEAE e MANAE apresentam resíduos nitrogenados carregados positivamente, enquanto que CM, grupos carboxílicos carregados negativamente. Desse modo, a presença de cargas na superfície da enzima é importante para imobilização, a qual depende principalmente do pH e da sequência primária da proteína. Além disso, tais suportes podem ser empregados em polímeros de celulose, agarose ou sintéticos que podem, respectivamente, promover interações anômalas com a enzima ou promover impedimentos estéricos e tensões na estrutura da proteína (DATTA et al., 2003).

Os suportes hidrofóbicos são os mais empregados em lipases. Esses exploram a existência de uma superfície hidrofóbica nas "tampas" destas enzimas (MANOEL et al., 2015), a qual proporciona interações fracas com as cadeias alifáticas ou aromáticas apolares nestes suportes; como Octyl (8 carbonos), butil (4 carbonos), fenil ou sepabeads C-18 (18 carbonos). Todavia, tais interações hidrofóbicas não são restritas apenas à "tampa", mas qualquer superfície hidrofóbica presente na enzima. Uma característica muito comum (porém não obrigatório) neste tipo de imobilização é a hiperativação: fenômeno decorrente do deslocamento da "tampa" após imobilização, expondo o sítio ativo ao meio reacional (MANOEL et al., 2015). Isso é análogo à ativação interfacial provocada por solventes orgânicos, agentes emulsificantes ou quando o substrato atinge o CMC. Além disso, a vantagem desse tipo de imobilização é a alta especificidade por lipases; nesse caso inúmeros procedimentos de purificação adotam esses tipos de suporte devido a obtenção desta enzima pura em um único passo (PALOMO et al., 2004).

Um campo ainda explorado na imobilização de lipases é a utilização de polímeros que revestem a superfície da enzima (imobilizada ou não-imobilizada), potencializando a atividade hidrolítica de lipases. O PEI (polietilenoimina), que pode ser utilizado tanto para imobilizar enzimas (em um suporte de agarose, por exemplo) ou revesti-las após imobilização em outro suporte, é um polímero amplamente e recentemente estudado nas técnicas de imobilização de lipases. O PEI ao recobrir a enzima, gera um ambiente hidrofílico que ajuda a reduzir o contato da enzima com a fase hidrofóbica durante a hidrólise; isso direciona a lipase para a região interfacial entre o óleo (hidrofóbico) e o solvente aquoso (hidrofílico). Além disso, o PEI favorece a estabilização da enzima e inibe o contato do oxigênio com os produtos de hidrólise, evitando a formação de espécies reativas de oxigênio (ANDERSSON; HATTI-KAUL, 1999; BRECCIA; ANDERSSON; HATTI-KAUL, 2002; ZHANG; ROCHEFORT, 2011)
#### 1.4. Expressão heteróloga de lipases e vetor pExpyr

Em razão do que foi discutido sobre a utilização de lipases no mercado, a expressão heteróloga apresenta-se como medida a aumentar a obtenção deste insumo industrial, além de auxiliar nos estudos bioquímicos dessas enzimas. Já são descritos trabalhos detalhando a expressão de lipases em *Escherichia coli* (KRUGENER et al., 2009; LIU et al., 2017; ALNOCH et al., 2018), *Aspergillus oryzae* (HOEGH et al., 1995) e *Trichoderma reesei* (QIN et al., 2012) o que tornou a produção de lipases independente das matrizes oleaginosas, comumente utilizadas para induzir a expressão desta enzima em cepas selvagens. Entretanto algumas dificuldades são pertinentes que limitam a utilização destes sistemas heterólogos em escala laboratorial: baixa atividade lipolítica nestas cepas, necessidade de substâncias indutoras com alto custo financeiro, síntese de lipases inativas ou que necessitam de uma etapa adicional para ativação. Acredita-se que esses motivos sejam responsáveis pelo desestímulo a pesquisa para obtenção de novas cepas transformantes para alta produção de lipases.

O vetor pExpyr (SEGATO et al., 2012) apresentou-se como potencial para expressão de lipases, primeiramente pela inexistência de cepas produtoras de lipases com esse vetor e por usufruir da maltose como molécula indutora (Figura 7). A maltose pode ser encontrada em substratos derivados da hidrólise parcial de alimentos ricos em amido, o que baratearia os custos de produção de enzimas por meio deste vetor. Nesse vetor, a presença do gene *pyrG* codifica a orotidina-5'-fosfato descarboxilase, envolvida na síntese de bases pirimídicas, permitindo a seleção de colônias transformadas com esse vetor. A cepa *A. nidulans* A773 tem esse gene delecionado, por isso a seleção por auxotrofia. Além disso, esse vetor é do tipo integrativo, ou seja, incorporado dentro do DNA cromossômico da célula hospedeira, o que garante estabilidade e viabilidade a maior prazo dos fungos transformantes.



**Figura 7 - Esquema do vetor pExpyr para expressão de proteínas-alvo de interesse.** glaAp – região promotora de glucoamilase de *Aspergillus niger* induzida por maltose, ATG – códon de iniciação; glaAsp – peptídeo-sinal de glucoamilase de *A. niger*; trpCt – operon de triptofano para parada de tradução; pyrG – gene de CTP-sintase de *A. niger*; trpCt – marcador de zeocina; ecAMP – marcador de ampicilina;  $pUC_{19}$  – vetor molde utilizado na elaboração de pExpyr; Not1 e XbaI – enzimas de restrição. Fonte: Adaptado de SEGATO et al. (2012).

#### 1.5. Tratamento de glioblastoma – um novo panorama para utilização de lipases

#### 1.5.1. Células de glioblastoma e mecanismos de resistência

O glioma maligno é o tipo mais comum de tumor cerebral (OSTROM et al., 2014). Glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais frequente e mais agressivo nesta classe (TANAKA et al., 2013). A maioria dos pacientes sobrevivem de 12 a 15 meses após diagnóstico e menos de 5% destes sobrevivem em 5 anos (CARLSSON et al., 2014). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se cerca de 11.320 novos casos incidentes de tumores do sistema nervoso central no Brasil para o ano de 2018. Desse modo, há necessidade de identificar novos tipos de tratamentos e terapias mais eficazes principalmente acessíveis pelo Sistema Único de Saúde, levando-se em consideração a diversidade cultural e econômica do país.

Tumores do tipo GBM apresentam alta capacidade de invasão no tecido cerebral além de propensão para disseminação cranioespinhal, compreendendo tumores bem agressivos com crescimento rápido e prognóstico clínico curto. A ausência de limites anatômicos e a heterogeneidade celular e genética são características do GBM que tornam os tratamentos difíceis e pouco eficientes.

Dentre os medicamentos mais indicados mundialmente está a telozolomida (TMZ), um agente alquilante de moderada toxicidade administrado oralmente e capaz de passar integralmente pela barreira hematoencefálica (LEE, 2016). A TMZ é rapidamente absorvida e sofre hidrólise formando o monometil triazeno 5-(3-metilazeno-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) o qual, em seguida, reage com a água para liberar o 5-aminoimidazor-4-carboxamida (AIC) e o cátion metilazonium. Esse cátion adiciona um grupo metil no DNA nas posições N<sup>7</sup> e O<sup>6</sup> da guanina e N<sup>3</sup> da adenina. Essa metilação é dita como responsável pela morte celular nas linhagens malignas, bloqueando a duplicação do DNA, promovendo quebras e *gaps* cromossômicos e apoptose.

Entretanto cerca de 60% das GBM possuem mecanismos de resistência à TMZ (LEE, 2016). O mecanismo principal é mediado pela enzima metilguanidina-metiltransferase (MGMT), uma proteína monomérica de 22 kDa que atua restaurando a O<sup>6</sup>-metil-G na guanina, pela transferência do grupo metil adicionado pela TMZ a um resíduo interno de cisteína (SILBER et al., 2012). Esse mecanismo, assim como outros presentes em GBM, como reparo *mismatch* (MMR - *DNA* <u>*Mismatch* <u>*Repair*</u>) e por excisão de bases (BER – <u>*Base* <u>*Excision*</u> <u>*Repair*</u>) torna necessária a investigação de novos tratamentos que possam viabilizar estratégias a contornar a sobrevida destas linhagens tumorais.</u></u>

O presente trabalho utilizou-se de uma linhagem de glioblastoma multiforme, LN-18 (DISERENS et al., 1981) cujo crescimento ocorre em monocamada, facilitando os estudos *in vitro*. Essa linhagem é caracterizada pela mutação em p53 e possíveis deleções em genes supressores de tumor, p16 e p14ARF.

#### 1.5.2. Óleos naturais, tratamento de glioblastoma e outras linhagens tumorais

Óleos naturais são substâncias heterogêneas de origem animal ou vegetal e que apresentam diferentes efeitos antitumorais (RUSSO et al., 2015). Alguns trabalhos mostraram serem capazes de induzir morte celular das linhagens resistentes por meio de substâncias alcalóides e aromáticas presentes em sua composição. DE QUEIROZ et al. (2014) demonstraram que o óleo de *Melissa officinalis* L. é capaz de induzir morte celular por apoptose em linhagens GBM. Foi observado que o componente citral deste óleo, em concentrações até 182  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, induz apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio além de ativar a via de caspase-9.

Além da presença de substâncias fenólicas e alcaloides, esses óleos podem apresentar triacilglicerídeos constituídos de diferentes cadeias alifáticas poli-insaturadas com potencial antitumoral (D'ELISEO; VELOTTI, 2016). Dentre eles, é relatado o efeito dos ômegas-3 (ácidos eicosapentaenoico e docosahexaenoico) que são obtidos de uma dieta rica em óleos de peixes. Inúmeros trabalhos apresentaram eficácia na utilização destas substâncias na indução de apoptose em linhagens tumorais de próstata, mama e cólon, por via de sinalização por Wnt/β-catenina, ativação de proteínas cinases, inibição da via Cox-2/PGE2 e inibição de NF-kB (LIM et al., 2009; SONG et al., 2011; KIM et al. 2018). Outros demonstraram que essas substâncias são capazes de promover um aumento na sensibilidade destas células tumorais aos tratamentos convencionais (MERENDINO et al., 2013). KIM et al. (2018) demonstraram que os ômegas-3 são capazes de induzir apoptose em três linhagens de GBM por meio da diminuição da expressão da via Akt e mTOR. Neste mesmo trabalho, observou-se que ômegas-3 promoveram redução no crescimento de gliomas primários em camundongos.

Os óleos naturais podem complementar a dieta cetogênica, caracterizada pela alta quantidade de gorduras (*high fat*) em privação de carboidratos (*low carb*), resultando em uma menor concentração de glicose no sangue. Essas dietas vêm sido estudadas como adjuvantes no tratamento contra glioblastoma multiforme (MARTIN-MCGILL et al., 2017; WINTER et al., 2017; SCHWARTZ et al., 2018). Sob condições fisiológicas, células cerebrais obtêm energia a partir de glicose ou corpos cetônicos, todavia, em muitos tumores há maior dependência das vias glicolíticas como suporte energético (efeito Warburg). Em vista disso, a principal hipótese

no uso de dietas cetogênicas se baseia na privação de glicose às células tumorais, promovendo redução de proliferação e angiogênese, tornando-as mais susceptíveis às respostas imunes e oxidativas.

O açaí (*Euterpe oleracea*) tem um mercado tradicional e consolidado, principalmente na região amazônica, pelo hábito de incorporação deste fruto na alimentação da população brasileira. Em vista de um fenômeno mercadológico, esse fruto e seus derivados começaram a ser aceitos em outras regiões do país e no exterior, evidenciando um potencial financeiro associado a esse insumo (SUFRAMA, 2003). No ponto de vista clínico, existem trabalhos que demonstram a ação antitumoral do açaí (SILVA et al., 2014). FRAGOSO et al., (2013) demonstraram que uma dieta com 2,5 a 5,0% de açaí desidratado foi capaz de reduzir o número de tumores invasivos de cólon. HOGAN et al., (2010) por outro lado demonstraram que extratos ricos de antocianinas providos do açaí são capazes de reduzir a viabilidade de células de glioblastoma e de câncer de mama. Por outro lado, não foram encontrados trabalhos a respeito do uso do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) no tratamento contra linhagens tumorais, e, portanto, não é conhecido o efeito biológico deste insumo sobre células cancerígenas.

Nesse contexto, não foram relatados usos de produtos de hidrólise lipolítica de óleos de açaí e buriti sobre o tratamento de GBM. Presumiu-se, como hipótese desta parte do trabalho que a hidrólise dos óleos açaí e buriti, catalisada por lipases fúngicas, poder-se-ia aumentar a diversidade de compostos (dentre eles ácidos graxos e diacilglicerídeos) os quais apresentariam efeitos biológicos sobre essas linhagens tumorais. Além disso assume-se pelas propriedades hidrofóbicas dos óleos de serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, considerado o maior obstáculo aos tratamentos de tumores cerebrais. Esses resultados, se promissores, contribuiriam na elaboração de novos tratamentos e no entendimento da ação destes insumos sobre linhagens de glioblastoma multiforme além de potencializar a utilização de lipases em um cenário farmacêutico ainda não explorado.

# **OBJETIVOS**

#### 2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos gerais: a obtenção de uma cepa de *A. nidulans* para expressão de uma lipase de *B. bassiana*, a imobilização desta enzima em diferentes suportes, a caracterização bioquímica desta lipase não-imobilizada e imobilizada, e a aplicação dos hidrolisados dos óleos de açaí e buriti em linhagens de glioblastoma.

#### 2.1. Objetivos específicos

- 1) Seleção de gene de lipase de *B. bassiana* (*bbl1*);
- 2) Obtenção de vetores pGEM-T e pExpyr ligados a *bbl1*;
- Confirmação da indução de *bbl1* em A. *nidulans* em meios contendo maltose, após inserção de vetor pExpyr ligado ao gene de interesse;
- Alteração da fonte de carbono indutora, tampão e agitação nos cultivos do transformante a fim de aumentar a secreção da lipase;
- 5) Estudo de escalonamento para cultivo do transformante em biorreatores;
- 6) Purificação de Bbl1;
- Estabilidade de Bbl1 purificada em solução frente a surfactantes, sais, solventes orgânicos, temperatura e pH;
- Planejamento fatorial para obtenção de condições de temperatura e pH ideais para hidrólise de substrato sintético;
- Obtenção de valores cinéticos de Bbl1 em comparação a uma lipase comercial e inibição frente a ácidos graxos;
- 10) Obtenção de diferentes derivados de imobilização da lipase de interesse;
- 11) Caracterização frente a pH e temperatura dos derivados de imobilização;
- 12) Seleção de melhores derivados quanto às propriedades de estabilidade a fim de submetê-los a planejamento fatorial na obtenção de valores de pH e temperatura ideais para hidrólise de substrato sintético e compará-los com os mesmos valores da lipase em solução;
- Obtenção de valores cinéticos e de inibição frente a ácidos graxos do derivado com maior atividade específica;
- 14) Hidrólise dos óleos de buriti e açaí;
- 15) Caracterização prévia dos produtos de hidrólise em cromatografia de camada delgada;
- 16) Tratamento de linhagem LN-18 com os produtos de hidrólise dos óleos de açaí e buriti das frações polares, apolares ou mistura de ambas as fases.

# MATERIAL E MÉTODOS

#### 3. Material e métodos

#### 3.1. Metodologia e técnicas de biologia molecular

#### 3.1.1. Seleção do gene bbl1 e construção dos primers

A seleção do gene *bbl1* se baseou em uma etapa prévia ao desenvolvimento deste projeto. Uma lipase de *Beauveria bassiana* foi identificada por SPIROPULOS (2015) e sequenciada segundo uma lipase de referência XP\_008602131.1 (*B. bassiana* ARSEF 2860). A partir disso, a sequência de proteína foi submetida ao software SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011) para determinar a sequência de peptídeo sinal. O intuito desse procedimento foi para remover esse peptídeo da lipase de interesse visto que no vetor pExpyr há um peptídeo sinal de glucoamilase (SEGATO et al., 2012). O sistema pExpyr foi construído com um promotor e peptídeo sinal de glucoamilase de *A. niger* e *operon* de triptofano para término de tradução. A inserção de um gene de interesse neste vetor depende de dois sítios de restrição; Not1 *upstream* ao gene e XBaI, *downstream*. A partir dessa informação foram construídos os primers utilizados nesse trabalho (Tabela 3).

**Tabela 3 - Primers para lipase** *bbl1* de *B. bassiana*. Os *primers foward* e *reverse* foram elaborados segundo sequência da lipase em estudo obtida do banco de dados NCBI, adicionando-se sítios de restrição para as enzimas Not1 e XBaI. **Refêrencia:** XP\_008602131.1 (*B. bassiana* ARSEF 2860). T<sub>m</sub> corresponde à temperatura de anelamento provido pelo fabricante.

Primer	$T_m (^{\circ}C)$	Sítio de restrição	Sequência (5'→3')*
bbl1-foward	65,6	Not1	<u>GCGGCC</u> GCCTAACCATTCCTGAGCAGAGCATCACCACT
bbl1-reverse	62,4	XBaI	TCTAGATTATATATGCTTGCCCTGAGACAGGCCACT

\* Os sítios de restrição estão sublinhados e as regiões de anelamento em negrito

#### 3.1.2. Extração de DNA genômico de B. bassiana

Cerca de 1.10<sup>8</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> foram inoculados em seis Erlenmeyers com 25 mL de meio Khanna suplementado com 1% de óleo de canola (Sigma-Aldrich). Essas condições foram utilizadas devido a capacidade de induzir a expressão da lipase em estudo, em *B. bassiana*, segundo SPIROPULOS (2015). Os frascos foram incubados a 30 °C com uma agitação de 100 rpm por 3 dias. Após isso, os micélios foram filtrados em bomba a vácuo utilizando papel filtro (Whatman n°1) e armazenado overnight a -20°C. O micélio foi repartido em várias porções contendo 0,1 g de biomassa, cada qual submetido a um procedimento de extração de DNA diferente. O sobrenadante do cultivo foi quantificado em ensaio para a atividade de lipases (**seção 3.2.1**.) e concentração de proteínas (**seção 3.2.2**.). Por mera convenção, as lipases obtidas do extrato de *B. bassiana* foram denominadas WT (*wild-type*), indicando que são providas do fungo de origem.

O primeiro método de extração de DNA o convencional utilizando clorofórmio. O micélio foi macerado com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana sobre gelo, com auxílio de pistilo. O macerado foi transferido em tubos Eppendorf os quais foram armazenados e mantidos em -20°C para uso futuro. Em um destes tubos Eppendorf foram adicionados 600  $\mu$ L de solução de lise (Na2EDTA 0,5 M pH 8: 10% de SDS: água Milli-Q na proporção 1 : 1 : 8) e deixou em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 13.000 g por 5 minutos e o sobrenadante transferido a um novo tubo Eppendorf. Neste sobrenadante, adicionaram-se 40 µL de uma solução acetato de potássio 5 M, pH 8,0, homogeneizado suavemente 5 vezes e mantido em gelo por 10 minutos para precipitação de proteínas e sais. Em seguida, centrifugou-se a 13.000 g por 10 minutos e transferiu o sobrenadante para um outro tubo Eppendorf. Até esse passo, manteve-se 500 µL da amostra e adicionou-se 500 µL de solução clorofórmio e 3-metil-butanol (na proporção 24 : 1 - Fluka), homogeneizou-se e centrifugou a 13.000 g por 5 minutos. O sobrenadante transferido a um tubo Eppendorf. Ao sobrenadante, adicionou-se 1,2 mL de 95% de álcool etílico gelado (previamente a  $-20^{\circ}$ C), agitou suavemente e centrifugou a 13.000 g por 10 minutos para precipitação de DNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet secado por Speed Vac (Christ CT 02-50 SR - Analitica) por 20 minutos. Suspendeu-se o DNA em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e Na<sub>2</sub>ETDA 1 mM).

O segundo método de extração utilizou-se de CTAB (baseado no kit The Synergy<sup>TM</sup> Plant DNA Extraction). Repetiu-se as etapas iniciais de maceração até a separação em da biomassa de *B. bassiana* em tubos Eppendorf. A cada 0,1 g de micélio macerado adicionou-se 750 µL de solução de extração (0,1% de PVP-40, 0,05% de CTAB, NaCl 5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M, Tris-HCl 1 M pH 7,4 e 0,001% de β-mercaptoetanol). A amostra foi incubada a 65°C por 1 hora. Em seguida adicionou-se 450 µL de solução clorofórmio e 3-metil-butanol (na proporção 24 : 1 - Fluka). Centrifugou-se a mistura a 2.000 g a 20°C por 15 minutos. Em seguida transferiu-se o sobrenadante a um tubo Eppendorf, no qual procedeu-se às mesmas etapas de precipitação com 95% de álcool etílico ou 95% de isopropílico, conforme descrito anteriormente. O DNA de ambos os procedimentos de extração foi quantificado quanto a proporção A<sub>260/280</sub> para verificar pureza em relação a proteínas em Nano Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific). As soluções de DNA foram mantidas a -20°C até o momento de uso.

#### 3.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – <u>Polimerase Chain Reaction</u>)

As reações de PCR foram realizadas para amplificação do gene *bbl1*. Para tal, elaborouse uma solução contendo 3  $\mu$ L de amostra de DNA (50 ng no mínimo), 3  $\mu$ L de solução MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Thermo Scientific), 2,5  $\mu$ L de solução tampão de Taq Polimerase (Thermo Scientific), 2  $\mu$ L de uma solução de dNTP 2,5 mM total, 1  $\mu$ L de Taq Polimerase (Thermo Scientific), 1  $\mu$ L de cada *primer* e 13,5  $\mu$ L de água Milli-Q. Essa solução foi submetida a 35 ciclos de reação de polimerase, cada qual composta por 30 segundos a 95°C (etapa de desnaturação), seguida de 30 segundos a 55°C (etapa de anelamento) e 3 minutos a 72°C (extensão).

#### 3.1.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os géis de eletroforese serviam para confirmar a obtenção de DNA neste trabalho e a amplificação do gene *bbl1*, cuja realização sempre era feita posterior a quantificação por Nano Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific). Para a corrida, cerca de 30 a 50 ng de amostra de DNA foram diluídos em água Milli-Q estéril; o volume a ser utilizado dependia da concentração final da solução. Para a preparação dos géis, 0,4 g de agarose foi adicionada à 50 mL do tampão TAE composto por Tris-HCl 89 mM, ácido acético 89 mM e Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM, pH 8,0. A mistura do gel foi aquecida em forno micro-ondas até obtenção de solução homogênea, em seguida resfriada e adicionada uma alíquota de 1,5 µL de Nancy-520 (Sigma-Aldrich). O tampão de corrida foi o TAE e a separação eletroforética a 100 V. A visualização das bandas foi realizada após a corrida sob luz ultravioleta em fotodocumentador (LPIX – Molecular Imaging, Loccus biotecnologia). Utilizou-se 1 µL de marcador de pares de bases (Thermo Scientific).

#### 3.1.5. Purificação da sequência de bbl1 em gel de agarose

A banda corresponde a *bbl1* no gel de agarose foi recortada separada em dois tubos Eppendorf e submetida a purificação com dois kits; Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) e Illustra<sup>TM</sup> GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, EUA). Ao término do procedimento, o extrato *bbl1* foi recuperado em 20  $\mu$ L de água Milli-Q estéril pré-aquecida por 10 segundos em micro-ondas e quantificado em Nano Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific). O intuito dessa execução foi para avaliar a viabilidade dos dois kits. Após purificação 1  $\mu$ L das soluções contendo *bbl1* foi aplicado em gel de agarose.

#### 3.1.6. Preparo de células E. coli DH5a competentes para inserção de vetor

Uma alíquota de E. coli DH5a foi repicada em placas contendo meio Luria-Bertani (LB; triptona 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g.L<sup>-1</sup>) contendo 2% de ágar e incubado a 37°C overnight. Em seguida uma colônia desta placa foi inoculada em Erlenmeyer contendo 5 mL de meio TY (triptona 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>). Essa cultura foi mantida a 37°C a 200 rpm overnight. Após esse período de pré-crescimento, uma alíquota de 2 mL foi inoculada em 1 Erlenmeyer com 500 mL de meio TY. O frasco foi mantido a 37°C e 200 rpm. A cada 20 minutos, alíquotas eram retiradas deste frasco e media-se a absorbância a 600 nm. Quando a absorbância chegou a 0,3, o frasco foi transferido a uma bacia contendo gelo. Alíquotas de 50 mL foram transferidos a tubos cônicos (tipo Falcon<sup>®</sup>) e manteve-se os mesmos em gelo por 15 minutos. Depois de refrigeradas, as culturas eram sedimentadas por centrifugação a 5.000 g por 5 minutos e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células suspendidas com 5 mL de água Milli-Q gelada. As células então foram reunidas em um único tubo cônico. Repetiu-se a centrifugação 3 vezes utilizando água Milli-Q gelada. Em seguida o precipitado de células foi suspendido em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado, seguido de centrifugação 5.000 g por 5 minutos e a 4°C. Esse último passo foi repetido duas vezes. Após a última centrifugação, as células foram suspendidas em 1 mL de meio GTY (glicerol 10% (v/v) em meio TY). Todos esses passos foram realizados em gelo. As células foram separadas em crio tubos em alíquotas de 80 µL e mantidas em -80°C (por no máximo 1 mês) para uso posterior (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

#### 3.1.7. Ligação de bbl1 em vetor pGEM-T

Após a extração e purificação de *bbl1* de *B. bassiana*, procedeu-se a ligação desse gene com o vetor pGEM-T (pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I, Promega, USA). O intuito desse passo foi obter uma reserva de *E. coli* DH5 $\alpha$  contendo a sequência de *bbl1*. Para a reação de ligação 1  $\mu$ L da solução de extrato de *bbl1* (150 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>; seção 3.1.5.) foi misturado a 1  $\mu$ L de vetor pGEM-T (50 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 5  $\mu$ L de tampão da T4 DNA ligase, 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase e 2  $\mu$ L de água Milli-Q estéril. A mistura foi mantida a 25°C por 1 hora e, em seguida, armazenada a 10°C *overnight*. A proporção de vetor : gene de interesse (1:3) utilizada foi calculada segundo fabricante.

#### 3.1.8. Transformação por eletroporação

As células *E. coli* DH5 $\alpha$  e cubetas de eletroporação foram mantidas em gelo. Para cada amostra a ser eletroporada, utilizou-se uma cubeta de 0,1 cm. Uma alíquota de 80 µL foi adicionada à 2 µL do produto de ligação ou vetor fechado. A mistura foi suavemente

homogeneizada em gelo e, em seguida, transferida à cubeta de eletroporação e mantida em repouso por 2 minutos. Batidas suaves no fundo serviam para remoção de bolhas. A eletroporação (Eporator, Eppendorf<sup>®</sup>, EUA) ocorreu por 1 pulso com média de 2300 V por 5,3 milissegundo. Em seguida adicionou-se 1 mL de meio LB, transferiu a mistura a um tubo Eppendorf novo e manteve-se em agitação a 100 rpm por 1 hora, a 37°C. Após esse período, a solução de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada foi inoculada em placa contendo meio LB com 50 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina (Amp). A ampicilina foi utilizada como marcador de seleção, pois os vetores utilizados neste trabalho usufruem de resistência a esse antibiótico, o que permitiu a seleção de colônias com inserção do plasmídeo após eletroporação.

#### 3.1.9. Confirmação de inserção de vetor contendo bbl1 em células de E. coli DH5a

O produto da ligação foi inserido em células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , conforme descrito em (**seção 3.1.8.**) e inoculada em placa contendo meio LB com 50 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina (LB+Amp), IPTG (Fermentas, Life Sciences) e X-Gal (Fermentas, Life Sciences), e mantidas a 37°C *overnight*. Após incubação, colônias positivas (brancas) foram repicadas diretamente da placa em 10 µL de água Milli-Q. Dessa solução 2 µL foram submetidos a PCR da mesma maneira que descrito em **seção 3.1.3.**, seguida de análise em gel de agarose ("PCR de colônia"). Os demais 8 µL foram inoculados em 5 mL de meio LB+Amp e mantidas a 37°C *overnight*.

Seguido do crescimento, as células de *E. coli* contendo o produto de ligação foram centrifugadas a 5.000 *g* por 5 minutos e a 4°C. O sobrenadante descartado e uma parte do precipitado de células foi ressuspendido em 1 mL de meio GTY (glicerol 10% em meio TY), distribuído em alíquotas de 80  $\mu$ L em crio tubos e armazenados em -80°C. A outra parte do precipitado teve o DNA plasmidial (pGEM-T+*bbl1*) extraído com o kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega, EUA). Ao término do procedimento, o DNA plasmidial foi recuperado em 20  $\mu$ L de água Milli-Q estéril pré-aquecida por 10 segundos em micro-ondas e quantificado em Nano Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific). Confirmou-se a presença de *bbl1*, após PCR, e do vetor (pGEM-T+*bbl1* ou pExpyr+*bbl1*) em gel de agarose.

#### 3.1.10. Obtenção dos vetores pExpyr

Para obtenção de pExpyr que foram utilizados para ligação com *bbl1*, 2  $\mu$ L (contendo cerca de 100 ng de vetor) de solução deste vetor foi eletroporado em células *E. coli* DH5 $\alpha$ . Após crescimento em meio LB+Amp por overnight a 37°C e 200 rpm, a cultura foi centrifugada a 5.000 g por 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante descartado. O DNA plasmidial foi extraído

utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega, EUA). Ao término do procedimento, o DNA plasmidial foi recuperado em 20  $\mu$ L de água Milli-Q estéril pré-aquecida por 10 segundos em micro-ondas e quantificado em Nano Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific). A solução de pExpyr continha 50 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de vetor.

#### 3.1.11. Digestão dos vetores pExpyr e pGEM-T+bbl1 com Not1 e XBaI

Ambas as soluções contendo pExpyr (**seção 3.1.10**.) e pGEM-T+*bbl1* (**seção 3.1.7**.) foram submetidas à digestão dupla com as enzimas de restrição Not1 e XBaI. Uma solução de digestão foi preparada com 10  $\mu$ L de tampão Tango 10X (para solução final de Tris-HCl 66 mM pH 7,9; acetato de magnésio 20 mM; acetato de potássio 132 mM; soroalbumina bovina (BSA) 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> – Thermo Scientific), 1  $\mu$ L de Not1 (10 U.L<sup>-1</sup> – Thermo Scientific), 1  $\mu$ L de XBaI (10 U.L<sup>-1</sup> – Thermo Scientific) e 13  $\mu$ L de água Milli-Q estéril. Essa solução foi incubada a 37°C por uma noite. Após a digestão, inativou-se as enzimas de restrição a 80°C e confirmou-se a separação da banda de *bbl1* e a linearização do vetor pExpyr em gel de agarose. Essas bandas foram recortadas e purificadas com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel PCR Clean-Up System (Promega, USA). Ao término do procedimento, o extrato *bbl1* foi recuperado em 20  $\mu$ L de água Milli-Q estéril pré-aquecida por 10 segundos em micro-ondas e quantificado em Nano Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific).

#### 3.1.12. Ligação de bbl1 em pExpyr e confirmação por digestão dupla com Not1 e XBaI

Para a reação de ligação 2,5  $\mu$ L da solução de extrato de *bbl1* (60 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> obtida em **seção 3.1.11**) foi misturado a 1,7  $\mu$ L de vetor pExpyr linearizado (30 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> obtida após digestão descrita na **seção 3.1.11.**, 1  $\mu$ L de tampão da T4 DNA ligase 10X, 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase e 0,2  $\mu$ L de água Milli-Q estéril. A mistura foi mantida a 25°C por 1 hora e, em seguida, armazenada a 10°C por uma noite. A proporção de vetor : gene de interesse (1:3) utilizada foi calculada segundo fabricante. O produto de ligação foi inserido em *E. coli* DH5 $\alpha$ , plaqueadas em meio LB+Amp e, em seguida, confirmou-se a presença do gene *bbl1* por PCR de colônia. As colônias positivas foram inoculadas em 150 mL de meio LB+Amp e mantidas a 37°C, 200 rpm *overnight*. As colônias foram centrifugadas a 5.000 *g*, a 4°C e 5 minutos. O sobrenadante descartado e o precipitado de células *E. coli* transformadas com o plasmídeo pExpyr+*bbl1*. Uma porção do precipitado por suspendido em 1 mL de glicerol 10%, distribuídos em crio tubos e mantidos a -80°C. A outra parte deste precipitado foi submetida à extração de DNA plasmidial por PureYield<sup>TM</sup> Plasmid Midiprep System (Promega, USA). Ao término do procedimento, o extrato pExpyr+*bbl1* foi recuperado em 200  $\mu$ L de água Milli-Q estéril pré-aquecida por 10

segundos em micro-ondas e quantificado em Nano Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific).

Por fim cerca de 1  $\mu$ L da solução pExpyr+*bbl1* (257 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>) foi digerido com Not1 e XBaI da mesma maneira que descrito em **seção 3.1.11.** Nessa reação foram realizados dois controles: um contendo apenas os reagentes utilizados na reação de digestão e um contendo o vetor pExpyr+*bbl1* sem os reagentes de digestão, sendo que cada um foi mantido a 37°C *overnight*. Cerca de 1  $\mu$ L do produto de digestão foi analisado em gel de agarose.

#### 3.1.13. Sequenciamento automático do plasmídeo pExpyr+bbl1

O sequenciamento do plasmídeo foi realizado conforme o método de SANGER et al. (1977) no Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP, Ribeirão Preto). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit Big-Dye Terminator (Applied Biosystems – Foster-City, EUA), conforme as instruções do fabricante. A análise do DNA foi feita em sequenciador automático (ABI 3500 XL Genetic Analyzer – Life Technologies, Carlsbad, EUA). Para o sequenciamento, amplificou-se o plasmídeo pExpyr+*bbl1* no sentido *foward* e *reverse* (com os primers de *bbl1*) em duplicata. O resultado do sequenciamento foi analisado no software BioEdit 7.1, para remoção da sequência constituinte ao pExpyr.

#### 3.1.14. Alinhamento das sequências e modelagem molecular

O programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) foi utilizado para busca de similaridade de sequências de aminoácidos e nucleotídeos, assim como realizar os alinhamentos com tais sequências semelhantes a de interesse. As sequências de proteínas foram obtidas dos nucleotídeos pelo software Translate Tool (https://web.expasy.org/translate/). A 3D estrutura de Bbl1 foi modelada utilizando software Swiss-Model 0 (https://swissmodel.expasy.org/) baseado na estrutura cristalina de lipase b de Candida antarctica (número de acesso PDB: 4k6g, UPPENBERG et al., 1994). As figuras baseadas no cristal e modelagens das estruturas 3D foram geradas no programa SwissPDB Viewer (https://spdbv.vital-it.ch/), permitindo a determinação de bolsões hidrofóbicas e cavidades na enzima, assim como a delimitação dos resíduos da tríade catalítica e da região da "tampa" de lipases.

#### 3.1.15. Preparo de protoplastos e transformação de Aspergillus nidulans

Inoculou-se esporos de *A. nidulans* A773 (*pyrG89;wA3;pyroA4* - Fungal Genetics Stock Center – St. Louis, MO, EUA) em placas contendo meio mínimo suplementado com uracila e uridina 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, ágar 2% e glicose 1%. Esta cepa é auxotrófica a uracila e/ou uridina, requisitando-os no meio de cultura. Cada 100 mL deste meio foi preparado com 5 mL de solução de nitrato 20X (12% de NaNO<sub>3</sub>, 10,4% de KCl, 10,4% de MgSO<sub>4</sub>, 30,4% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,1 mL de elementos traços 1000X (2,2% de ZnSO<sub>4</sub>, 1,1% de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5% de MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,5% de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,16% de CoCl<sub>2</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0,16% de CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, 0,11% de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 4 H<sub>2</sub>O e 5% de Na<sub>2</sub>EDTA), 0,1 mL de piridoxina (1 mg.L<sup>-1</sup>). As placas foram mantidas a 37°C por 3 dias. Após esse período, os esporos foram suspensos e inoculados em 500 mL de meio mínimo líquido com uracila e uridina 2,5 mg.L<sup>-1</sup> e glicose 1%. A suspensão dos esporos utilizou o próprio meio de cultura, cuja concentração final de 1 x 10<sup>8</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>. O frasco foi mantido a 37°C por overnight. Em seguida, filtrou-se e lavou-se o micélio com 250 mL solução de lavagem (MgSO<sub>4</sub> 0,6 M) e após isso, transferiu para um tubo cônico com 20 mL de solução DSPS (KCl 1,1 M, ácido cítrico 0,1 M, pH 5,8) contendo 100 mg de enzimas hidrolíticas de poli (1-3)-glucose de parede celular obtidas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich L1412) e 100 mg de BSA (Sigma-Aldrich). A mistura foi mantida a 37°C por 2 horas. Em seguida filtrou-se em Miracloth (Merck Millipore) e transferiu o filtrado, contendo protoplastos, em novo tubo cônico. Adicionou-se 50 mL de solução STC (sorbitol 1,2 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5) e manteve a 4°C por 10 minutos. Em seguida centrifugou-se a 3.500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente solução STC seguida de centrifugação; o precipitado de protoplastos foi suspendido em 1,5 mL de solução STC. Desta, misturou-se 150 µL de solução de protoplasto com 50 µL de solução de plasmídeo pExpyr+bbl1 e mantidos a 25°C por 10 min. Por outro lado, 150 µL da mesma solução de protoplastos foram misturados a 50 µL de solução pExpyr não-digerido sem inserção de vetor (50 ng.µL<sup>-1</sup> obtida em seção 3.1.10.; a cepa resultante foi utilizada como controle para visualizar se esse fungo produz lipases endógenas. Em seguida adicionou-se 2 mL de solução PEG (60% de polietilenoglicol 4000 em solução de STC) e manteve ambas soluções em repouso por 20 min. Por fim adicionou-se 12 mL de STC e inoculou as misturas em placas contendo meio mínimo suplementado com sorbitol 1,2 M e glicose 1%, em pH 7,5, a 37°C por até 5 dias para obtenção de colônias. Nessa etapa não se adicionou uracila e uridina pois o plasmídeo pExpyr contém uma sequência pyrG a qual codifica uma oritidina 5'-fosfato descarboxilase envolvida na biossíntese de bases pirimídicas. Após esse período, as colônias foram repicadas em outras placas contendo meio mínino com glicose 1%, porém distribuídas em marcação. A linhagem de A. nidulans competente que foi transformada com o plasmídeo pExpyr+bbl1 foi denominada  $A_{bbl1+}$  e a linhagem transformada com pExpyr vazio,  $A_{bbl1-}$ .

As condições utilizadas para expressão de *bbl1* pela cepa  $A_{bbl1+}$  foram: meio mínimo constituído de uma solução 5% de fonte de carbono, 0,1% de elementos traços (2,2% de ZnSO<sub>4</sub>, 1,1% de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5% de MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,5% de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,16% de CoCl<sub>2</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0,16% de CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, 0,11% de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 4 H<sub>2</sub>O e 5% de Na<sub>2</sub>EDTA), 0,1% de solução de sais de nitrato 20X (12% de NaNO<sub>3</sub>, 10,4% de KCl, 10,4% de MgSO<sub>4</sub>, 30,4% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,1% de piridoxina (1 mg.L<sup>-1</sup>), pH 6,5; e crescimento a 37°C. O uso da piridoxina é essencial visto a mutação no gene *pyroA4*, gene responsável pela biossíntese dessa molécula. A agitação foi um parâmetro de estudo, portanto, será especificado ao longo das seções 1.5 e 1.6.

#### **3.2. Metodologias analíticas**

#### 3.2.1. Reação para detecção de atividade de lipase

Lipases atuam sobre o substrato *p*-nitrofenil-palmitato (pNPP – Sigma Aldrich) liberando o 4-nitrofenol e ácido palmítico. Em pH alcalino, o 4-nitrofenol (pKa 7,17) é convertido em 4-nitrofenolato o qual possui máxima absorção em 405-410 nm. Esse método é ideal e simples para verificar a presença desta enzima no extrato e o efeito de moléculas exógenas (como íons, ácidos graxos, solventes) ou condições do meio aquoso (pH e temperatura) sobre a lipase.

Para detecção de atividade lipolítica das amostras, foram realizados dois tipos de metodologias: microensaios e ensaios. Ambos são idênticos quanto a composição do meio reacional, diferindo apenas do volume final. As condições-padrão foram tampão McIlvaine pH 6,0, contendo pNPP 12,0 mM (previamente dissolvida em álcool isopropílico, cuja concentração de pNPP foi de 10% (m/v)), Triton X-100 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich), goma arábica 0,05% (m/v) (Sigma-Aldrich), amostra a ser analisada quanto atividade lipolítica 10% do volume final da reação, 60°C e 5 min. Após esse período é adicionada uma solução de tetraborato de sódio saturado para uma proporção 1:1. Depois disso tudo, 100 µL da mistura são transferidos para placas de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de 96 poços e absorbância mensurada a 410 nm em leitor de placas (SpectraMax – Molecular Devices). Por convenção, 1 unidade de atividade enzimática (U) corresponde a 1  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> de *p*-fenolato formado por minuto de reação. Esse valor pode ainda ser quantificado em relação ao volume de amostra utilizado, U.mL<sup>-1</sup>; ou por quantidade em massa de proteína utilizada, U.mg<sup>-1</sup>. Visando a possibilidade de hidrólise espontânea do substrato sob essas condições, foram adicionadas reações controle nas quais não havia adição de enzima. Os valores de temperatura e pH do meio reacional poder-se-iam variar dependendo da otimização de hidrólise por planejamento reacional (ver Material e Métodos 3.3.14., e as seções 4.4.6. e 4.5.4.). Para os estudos de cinética, a concentração de pNPP no meio reacional foi diferente buscando satisfazer respectiva metodologia (ver Material e Métodos 3.3.15). Desse modo, buscou-se enfatizar as condições específicas utilizadas em cada experimento.

Para o presente trabalho, os microensaios foram realizados em termociclador apenas no intuito de detectar atividade lipolítica das cepas recém transformadas e verificar a melhor temperatura para atividade hidrolítica (ver Resultado **4.1.7.**). Para esta reação, 10  $\mu$ L da amostra contendo lipases, convenientemente diluída ao meio reacional, foi adicionada à 90  $\mu$ L da solução de tampão McIlvaine, contendo *p*NPP, Triton X-100 e goma arábica, em placas de PCR de 96 poços. Ao término dos 5 min de reação, adicionou-se 100  $\mu$ L de tetraborato, seguindo-se a leitura em leitor de placas. Já os ensaios foram realizados em banho-maria, no qual 50  $\mu$ L da enzima diluída foi misturada em 450  $\mu$ L de tampão McIlvaine, com *p*NPP, Triton X-100 e goma arábica. Completou-se a reação com 500  $\mu$ L de tetraborato seguida de leitura a 410 nm.

#### 3.2.2. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada usando um método semelhante de READ e NORTHCOTE (1981) usado em nosso grupo de pesquisa. Para essa metodologia 100  $\mu$ L de amostra, previamente diluída em água, eram misturados a 1 mL de solução reacional diluída em água destilada (solução reacional e água em proporção 1:4). Após 5 min em temperatura ambiente, essa mistura era transferida a uma cubeta de vidro e quantificava-se a absorbância a 595 nm. A solução reacional consistia de 1 g de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Scientific) dissolvido em 100 mL de álcool etílico 95% (v/v) e 200 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 87% comercial (Merck) e homogeneizado overnight. Após isso, 2 mL desta solução estoque foi diluída em 2 mL de álcool etílico 95% (v/v) e 4 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 87% e adicionados 30 mL de água destilada. Curvas-padrão com concentrações de 10-100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de BSA foram utilizadas para determinar a relação entre absorbância e concentração de proteína.

#### 3.2.3. Determinação de açúcares redutores totais no meio de cultura

A quantidade de açúcar redutor total presente no meio de cultura foi determinado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme MILLER (1959). Esse método foi utilizado apenas no experimento de escalonamento (descrito em Material e Métodos 3.3.5. e seção 4.2.3.); para tal 100  $\mu$ L da amostra a ser analisada foram misturados a 100  $\mu$ L do reagente de DNS (5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico – Sigma-Aldrich, 150 g de tartarato de sódio e potássio, 150 mL de NaOH 2 M e água qsp 500 mL). Em seguida as misturas eram fervidas por 5 min e posteriormente adicionados 1 mL de água destilada. O DNS reage com os açúcares

redutores e é convertido em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que possui coloração laranja. Para quantificação, 200 µL deste produto foram transferidos a placa de ELISA de 96 poços e realizada leitura a 540 nm. Reações utilizando o reagente de DNS na presença de diferentes concentrações de glicose foram realizadas com o intuito de se construir uma curva-padrão para quantificação dos açúcares redutores totais.

#### 3.2.4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições semi-desnaturantes

As eletroforeses em condições semi-desnaturante (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE) foram realizadas de forma semelhante a metodologia por LAEMMLI (1970). É dito semi-desnaturante pois o tampão de corrida não contém  $\beta$ -mercaptoetanol, a concentração de SDS do tampão de corrida é menor em relação a metodologia original e não há fervura da amostra após adição do tampão de corrida (KNOW et al., 2011). Os géis consistiam de uma sobreposição do gel de empilhamento em uma matriz de separação, solidificados entre duas placas de vidro cuja espessura era de 1 mm. A matriz de separação consistia em solução acrilamida 12% (mistura de 2,0 mL acrilamida 30%, 1,3 mL Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µL SDS 10%, 50 µL de persulfato de amônio (APS) 10%, TEMED (tetrametiletilenediamino - Sigma-Aldrich) e 1,6 mL água destilada). Após a solidificação da matriz de separação, adicionava-se a solução do gel stacking de acrilamida 3% (mistura de 0,5 mL de acrilamida 30%, 0,38 mL de Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, 30 µL de APS, 50 µL de SDS 10%, 2 µL de TEMED e 2,1 mL de água destilada). O preparo da amostra consistia na concentração de 30-50  $\mu$ g de proteína a um volume de 10  $\mu$ L em Speed-Vac, seguido da adição de 5  $\mu$ L de tampão de corrida (mistura de 1,51 g de Tris, 15 g de sacarose, 4 g de SDS, 0,1 g de Azul de Bromofenol (3,3,5,5-tetrabromofenolsulfonftaleína) e 100 mL água, pH 6,8) e 5 µL de glicerina. As eletroforeses eram realizadas em tampão de corrida pH 8,3 (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,2%) a 10°C. Os primeiros 30 min de corrida eram a 80 V, e, após esse período, aumentava para 120 V e mantinha-se por no máximo mais 1 hora de corrida. O marcador de massa molecular usado foi o Precision Plus Protein All Blue (Biorad).

#### 3.2.5. Revelação proteica em gel de poliacrilamida

Duas metodologias foram utilizadas para revelação de proteínas em gel de poliacrilamida: com Coomasie Brilliant Blue R-250 e por precipitação de prata. No primeiro, o gel de poliacrilamida foi mantido em solução fixadora (álcool etílico com ácido fórmico 1,5%) durante 1h. Em seguida, o gel foi hidratado em água Milli-Q durante 10 min. Por fim, o gel foi incubado com 20 mL de solução corante (0,1 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 – Sigma

Aldrich, 42 mL de metanol, 17 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água Milli-Q) por overnight. Posteriormente o gel era imerso em solução dessecante, composta por metanol 50% (v/v) e glicerol 1% (v/v) até o aparecimento de bandas de proteína.

Para coloração de prata, o gel foi fixado em solução fixadora (álcool etilítico 50%, ácido acético 10%) por 30 minutos. Em seguida, lavou-se com água Milli-Q 3 vezes por 5 minutos cada lavagem e incubou-se o gel em solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5H<sub>2</sub>O 0,2 g.L<sup>-1</sup> por 1 minuto. Seguida lavagem com água Milli-Q 3 vezes por 30 segundos cada lavagem. Incubou-se o mesmo em solução de prata (AgNO<sub>3</sub> 2 g.L<sup>-1</sup>, 0,75 mL formaldeído 37%) por 20 minutos e mantido em agitação a temperatura ambiente. Revelou-se as bandas de proteína em imersão na solução Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 60 g.L<sup>-1</sup>, 0,5 mL.L<sup>-1</sup> de formaldeído 37%, 20 mL.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5H<sub>2</sub>O 0,2 g.L<sup>-1</sup>. A reação de foi interrompida com solução de ácido acético 15%.

#### 3.2.6. Revelação de atividade lipolítica em gel de poliacrilamida

O gel era equilibrado em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 contendo Triton X-100 2,5% por 30 minutos. Esse passo permitia a remoção de SDS remanescente proveniente da eletroforese. Em seguida, incubava-se o gel em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,0 por 30 minutos e, posteriormente, em 20 mL de solução reacional (50 mL de tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,0, 5 mL de *n*-propanol, 0,5 mL de acetona, 60 mg de Fast-Blue RR – Sigma-Aldrich, 20 mg de  $\alpha$ -naftil-acetato e 16 mg de  $\beta$ -naftil-acetato). A hidrólise dos substratos, por lipases, promove a liberação de  $\alpha$  e  $\beta$  naftol capazes de interagir com o sal de diazônio (Fast-Blue RR) através de grupos nitrila. Essa reação leva a formação de complexos que são visualizados como bandas escuras no gel de poliacrilamida.

#### **3.3. Procedimentos experimentais**

#### 3.3.1. Expressão de enzima recombinante

Cada linhagem de  $A_{bbl1+}$ , obtida em **seção 3.1.15.** foi inoculada em 10 mL de meio mínimo líquido em placas acrescido de maltose 5% (m/v) e tampão HEPES (ácido 4-(2hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico – Sigma Aldrich) 100 mM pH 6,0, os quais foram mantidas a 37°C. O repique foi através de uma leve raspagem na superfície da colônia e imersão da ponta da alça no meio de cultura. Após 64 horas, as culturas foram filtradas em bomba à vácuo, separando-se o micélio do sobrenadante. O micélio foi lavado com solução de lavagem (MgSO<sub>4</sub> 0,6 M), macerados com areia (previamente tratada com ácido sulfúrico e ácido nítrico (3:1)) sobre gral de porcelana a 4°C e ressuspendido em 15 mL de tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,0 contendo NaCl 500 mM. A mistura foi sonicada por 10 minutos (S-30H, Elmasonic – Elma<sup>®</sup>) para liberação de enzimas e rompimento de células em pressão osmótica, e em seguida centrifugada a 5.000 *g* por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado em sacos de nitrocelulose (previamente tratados com CaCO<sub>3</sub> 20% a 100°C) com água destilada. Após 1 hora despejou-se a água da diálise e repetiu esse mesmo procedimento por mais 1h. Por fim, dialisou-se a amostra em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,0 por 2h. As amostras obtidas do sobrenadante e do extrato intracelular foram quantificadas quanto a atividade hidrolítica em microensaios.

#### 3.3.2. Comparação do extrato de Abbl1+ em relação ao WT e Abbl-

Após a escolha da placa-mãe com melhor atividade de lipases extracelular em **seção 3.3.1. (ver também seção 4.1.7.)**, procedeu a verificar se *A. nidulans* A773 expressa lipases endógenas e se o sistema de expressão heteróloga é mais vantajoso em termos de abundância em relação ao *B. bassiana*. Para tal as cepas  $A_{bbll+}$  e  $A_{bbll-}$  foram inoculadas (com 1 mL de solução 1 x 10<sup>8</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) em 25 mL de meio mínimo com maltose 5% (m/v) com HEPES 100 mM pH 6,0 em Erlenmeyers de 125 mL e incubadas a 37°C, sem agitação. Após 64h, os meios foram filtrados, os micélios descartados e os sobrenadantes quantificados em ensaios de atividade lipolíticas e concentração de proteína. Este resultado foi comparado com os obtidos de WT (descrito em **Material e Métodos 3.1.2**). Cada cepa foi inoculada em três Erlenmeyers e todo o experimento foi repetido 3 vezes. Ao final, os sobrenadantes das cepas  $A_{bbl+}$  e  $A_{bbl-}$  foram agrupados e revelados em gel de poliacrilamida, para detecção da banda de lipase de interesse. Ainda com o sobrenadante de  $A_{bbl/+}$ , realizaram-se microensaios em faixa de temperatura de 40-80°C em termociclador, permitindo a determinação de temperatura ideal para hidrólise de *p*NPP.

#### 3.3.3. Efeito do xarope de milho e tampão fosfato no meio de cultura

Com intuito de verificar o efeito da substituição da maltose e do tampão HEPES por xarope de milho (Marvi – Cargill Agrícola S. A., São Paulo) e tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a cepa  $A_{bbl1+}$  foi inoculada (com 1 mL de 1 x 10<sup>8</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL em meio mínimo com: maltose 5% sem qualquer espécie de tampão (<u>malt</u>); maltose 5% com tampão HEPES 100 mM pH 6,0 (<u>malt + HEPES</u>); maltose 5% com tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 6,0 (<u>malt + PO</u>); xarope de milho com tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 6,0 (<u>xaro + PO</u>); e o meio <u>xaro + PO</u> em agitação constante de 150 rpm (<u>xaro + PO + agi</u>). Todos os cultivos foram incubados a 37°C por até 64h. Ao término desse período os meios foram filtrados, os micélios descartados e os sobrenadantes quantificados em ensaios de atividade lipolíticas e concentração

de proteína. Estes mesmos sobrenadantes foram concentrados e analisados quanto o perfil proteico em géis de eletroforese.

Paralelamente, foi realizado um *screening* da cepa transformante em meio <u>xaro + PO +</u> <u>agi</u> nas mesmas condições de incubação quanto a produção de lipases. Em intervalos de 24 horas, alíquotas de 2 mL do cultivo eram transferidos a Eppendorfs e centrifugados a 5.000 g, 4°C e por 10 minutos. O sobrenadante era submetido a ensaios de atividade enzimática e o *pellet* de micélio descartado. Esse *screening* durou ao todo 72 horas.

#### 3.3.4. Efeito da glicose na expressão de bbl1

O cultivo de  $A_{bbl1+}$  foi submetido a glicose para averiguar se o mesmo atuaria sobre a expressão de *bbl1*. Em um primeiro grupo de teste,  $A_{bbl1+}$  foi inoculado (com 1 mL de solução 1 x 10<sup>8</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) em Erlenmeyers contendo 25 mL de meio mínimo contendo xarope de milho 5% e tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 6,0 e incubados a 37°C por 150 rpm. Após 16 horas de incubação foram adicionados uma solução de glicose, em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 6,0, para que as concentrações finais dos cultivos fossem 50, 100 e 250 mM de glicose. Em um dado grupo, não foi adicionado solução de glicose. No tempo de adição (16 horas) até 48 horas de crescimento, alíquotas de 2 mL eram extraídas dos cultivos, transferidas a Eppendorfs, centrifugadas a centrifugados a 5.000 g, 4°C e por 10 minutos. O sobrenadante era submetido a ensaios de atividade enzimática e o *pellet* de micélio descartado.

Em um segundo momento, a cepa foi inoculada nas mesmas condições, porém agora em meio contendo glicose 1% (Sigma-Aldrich > 99,5%). Após 16 horas de incubação adicionou-se solução de xarope de milho para que a concentração final fosse 5%. Em um grupo adicionou-se glicose para concentração final 5% ao invés do xarope de milho. Em seguida, alíquotas de 2 mL destes cultivos eram obtidos em intervalos de 1h, centrifugados e quantificados quanto atividade enzimática.

#### 3.3.5. Estudo de escalonamento

A cepa  $A_{bbl1+}$  foi inoculada (com 10 mL de 1 x 10<sup>8</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) em dois Erlenmeyers com 150 mL de meio mínimo suplementado de xarope de milho 5%, tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM pH 6,0 e incubados a 37°C com 150 rpm de agitação. Após 18 horas de crescimento, 43 mL foram transferidos deste pré-inóculo a Erlenmeyer de 2 L, contendo 500 mL deste meio, e em seguida incubado a 37°C e com agitação de 150 rpm. O remanescente do pré-inóculo foi adicionado a um biorreator (BioFlo 310 – New Brunswick) com 3,2 L do mesmo meio, porém sem tampão e acrescido de 350 µL de antiespumante (Sigma-Aldrich). Não se utilizou tampão pois o biorreator possui um sistema de regulação de pH com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH. O biorreator operou em batelada simples com aeração de 3,3 v.v.m., cuja injeção foi contínua por meio de um filtro estéril. A rotação do motor de biorreator foi de 250 rpm e a temperatura mantida a 37°C. O intuito de realizar-se um pré-inóculo foi para desconsiderar a fase lag de crescimento microbiano no estudo de escalonamento.

A cada 3 horas de cultivo, alíquotas de 15 mL do biorreator e 3 mL do Erlenmeyer eram transferidos para tubos cônicos. Esse procedimento foi realizado ao longo de 96 horas. Essas amostras eram filtradas em bomba a vácuo, separando-se o micélio e o sobrenadante. Os micélios eram submetidos a secagem por calor em desumidificador (Moisture Analyzer – MS-70, AND) e mensurados quanto a biomassa seca. Os sobrenadantes, submetidos a ensaios de atividade lipolítica, concentração de proteína e açúcar redutor pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS – **Material e Métodos 3.2.3**). Todos esses valores foram convertidos em razão L<sup>-1</sup> do cultivo (por exemplo: g.L<sup>-1</sup> – grama de biomassa por litro de cultivo).

Os valores de biomassa foram convertidos em suas formas logaritmo na base natural para determinação das fases de crescimento (MAIER, 2009). Conforme AHMAD e HOLLAND (1994), utiliza-se a fase log do crescimento para determinar os parâmetros cinéticos comumente utilizados em indústria, sendo estes:  $\mu_0$  – taxa de crescimento, que denota o valor que a biomassa multiplica-se por hora de cultivo (h<sup>-1</sup>); q<sub>s</sub> – taxa específica do consumo de açúcar por unidade de biomassa por hora de cultivo (g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); q<sub>Bbl1</sub> – taxa específica da produção de atividade enzimática por unidade de biomassa por hora de cultivo (U.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); Y<sub>s/x</sub> – síntese de biomassa por consumo de açúcar (g.g<sup>-1</sup>) e Y<sub>s/Bbl1</sub> – síntese de unidades enzimáticas de lipase por consumo de açúcar (U.g<sup>-1</sup>). As fórmulas utilizadas para cada parâmetro são (Equações 4-8):

Taxa de crescimento (h<sup>-1</sup>) = 
$$\frac{\ln(X_1 - X_0)}{t_1 - t_0}$$
 (Equação 4)

Taxa específica de consumo de açúcar  $(g.g^{-1}.h^{-1}) = \left| \frac{S_1 - S_0}{\frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}} \right|$  (Equação 5)

Taxa específica de produção de atividade de lipase  $(U.g^{-1}.h^{-1}) = \frac{U_1 - U_0}{\frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}}$  (Equação 6)

Síntese de biomassa por consumo de açúcar 
$$(g.g^{-1}) = \frac{X_1 - X_0}{S_1 - S_0}$$
 (Equação 7)

Síntese de atividade de lipase por consumo de açúcar  $(U.g^{-1}) = \frac{U_1 - U_0}{S_1 - S_0}$  (Equação 8)

sendo que  $x_1$  corresponde à biomassa no final da fase log;  $x_0$ , à biomassa no início da fase log;  $t_1$  indica o tempo em que se termina a fase log;  $t_0$ , o tempo de início da fase log;  $S_1$  corresponde a concentração de açúcar redutor ao final da fase log;  $S_0$ , a concentração de açúcar redutor no início da fase log;  $U_1$  corresponde a atividade de lipase no final da fase log; e  $U_0$ , o valor de atividade de lipase no início da fase log.

#### 3.3.6. Purificação de Bbl1

A purificação usufruiu de uma metodologia semelhante a VICI et al. (2015). Para tal, 3 L de sobrenadante do cultivo em biorreator após 96 horas de crescimento (**seção 3.3.5.**) foi concentrado para um volume de 100 mL em Hollow Fiber Cartrige 30.000 MMWC (QuixStand Benchtop System). Em seguida adicionou-se água destilada a um volume final de 1 L e repetiuse a concentração até 100 mL. Esse passo foi repetido mais 1 vez. Por fim, adicionou-se tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6,0 até volume de 1 L e concentrou a amostra para 100 mL novamente.

Em seguida, essa amostra foi aplicada em uma coluna de Octyl-Sepharose (20,0 x 2,0 cm) (GE, Healthcare) previamente equilibrada em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6,0. A velocidade de eluição foi de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, coletando-se cerca de 2 mL do eluente em tubos através do coletor automático (GE, Healthcare). Após a eluição completa da amostra, foram aplicados 100 mL de tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6,0 na coluna para remoção de proteínas não-aderidas à matriz hidrofóbica. O eluente era quantificado quanto a atividade de lipase e concentração de proteínas. Em seguida aplicaram-se 200 mL de solução de Triton X-100 0,5% (v/v) em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6,0 na coluna para eluição de Bbl1. A velocidade foi de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, coletando-se 2 mL do eluente em tubos os quais foram submetidos à dosagem lipolítica e concentração de proteínas. Apenas os tubos contendo atividade de lipase foram reunidos e submetidos à próxima etapa, totalizando um volume de aproximadamente 60 mL.

Para remoção do detergente, esses 60 mL foram aplicados em uma coluna de DEAEcelulose (35,0 x 2,0 cm) (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6,0. A velocidade de eluição foi de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>, obtendo-se 2 mL de eluente em tubos. Em seguida foi aplicada uma série eluotrópica na qual as proteínas desta coluna foram eluídas no mesmo tampão em concentração crescente linear de NaCl (de 0 até 1,5 M), sendo obtidos 200 mL de amostra com atividade de lipase. Em seguida, realizou-se diálise em membrana de nitrocelulose com água destilada por 1 hora em duas repetições, seguida de solução de tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6,0 por 2 horas. A pureza da amostra eluída foi confirmada por gel de poliacrilamida. Todos os passos dessa purificação foram realizados a 25°C.

#### 3.3.7. Efeito dos surfactantes em Bbl1

Em um primeiro momento, a solução de Bbl1 purificada na **etapa 3.3.6.** foi diluída 50 vezes em tampão McIlvaine pH 6,0 e submetida a dosagem enzimática. Especificamente para esse experimento, o meio reacional utilizado não continha Triton X-100 e goma arábica, mas sim diferentes surfactantes que foram adicionados somente no momento da reação: Tween-20 (Sigma-Aldrich), Tween-80 (Sigma-Aldrich), Triton X-100, Triton X-100 com goma arábica, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate* – Sigma-Aldrich) e CTBA (Brometo de hexadeciltrimetilamônio – Sigma-Aldrich). A concentração final de cada detergente no meio reacional foi de 0,1%. Apenas para o conjunto Triton X-100 com goma arábica as concentrações finais foram respectivamente 0,1% e 0,05%. Reações sem adição de surfactante foram utilizados como controle. Esse experimento teve por finalidade averiguar o efeito do surfactante sobre a atividade de hidrólise de *p*NPP por Bbl1.

Em um segundo momento, a solução de Bbl1 purificada foi diluída 50 vezes em tampão McIlvaine pH 6,0, em volume final de 2 mL, com adição dos surfactantes para uma concentração final de 0,5%. Essa mistura foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente e agitação constante. Após esse período, 50 µL destas misturas foram submetidos a dosagem enzimática. Os valores de atividade enzimática obtidos foram comparados com os mesmos no tempo inicial do experimento, obtendo-se uma atividade residual; expressa em porcentagem. Soluções sem adição de surfactante foram utilizados como controle. Esse experimento teve por finalidade verificar a estabilidade de Bbl1 frente a esses surfactantes.

#### 3.3.8. Efeito de sais e 2-mercaptoetanol na atividade de Bbl1

Primeiramente, 10 mL de solução de Bbl1 purificada (**seção 3.3.6.**) foram dialisados em EDTA 100 mM. Em seguida, essa alíquota foi diluída 50 vezes em tampão McIlvaine pH 6,0 e submetida a ensaio lipolítico. Para o intuito deste experimento, diferentes sais e 2-mercaptoetanol foram adicionados à concentração final de 1 mM e 5 mM no momento da hidrólise de *p*NPP. Foram testados os seguintes sais: KCl, NaBr, Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>), CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaCl, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Os valores de atividade de Bbl1 com cada um destes sais foram comparados a dois controles: um controle negativo, que continha Bbl1 sem estar dialisada com EDTA e sem adição de sal no momento da reação de hidrólise. O intuito desse experimento foi verificar se íons poderiam atuar como cofator ou inibidor de Bbl1 na hidrólise de *p*NPP.

Em um segundo momento, a solução Bbl1 dialisada em EDTA foi diluída 50 vezes em duas soluções: uma em tampão acetato 100 mM pH 6,0, e a outra em água destilada. Posteriormente, ambas foram submetidas a ensaios de atividade de lipase utilizando tampão acetato de sódio 100 mM pH 6,0 e água, respectivamente. Os valores de atividade de Bbl1 nestas reações foram comparadas ao valor de atividade enzimática de Bbl1 no controle positivo, descrita anteriormente. O intuito dessa parte foi averiguar se os íons citrato, fosfato, ou acetato afetariam a atividade de Bbl1.

Como terceira parte do experimento, realizou-se o mesmo teste com os diferentes sais e 2-mercaptoetanol, porém dessa vez usufruiu-se do tampão acetato 100 mM pH 6,0 no lugar do tampão McIlvaine. O intuito foi verificar se os íons citrato e fosfato (constituintes do tampão McIlvaine) estariam interferindo no teste de sais sobre hidrólise de pNPP, descrito na primeira parte dessa seção.

Por fim, caso algum sal provocasse inibição ou ativação da atividade de Bbl1 em tampão acetato, realizar-se-ia novamente a referente reação de hidrólise em tampão acetato 100 mM pH 6,0, porém adicionando-se sais de citrato de sódio (100 mM final), ou fosfato de sódio (200 mM). Essa parte do experimento teve por finalidade verificar quais dos íons, citrato ou fosfato do tampão McIlvaine, estariam interferindo no teste de sais; demonstrado na primeira parte deste experimento.

#### **3.3.9. Efeito de solventes orgânicos**

Avaliou-se a estabilidade de Bbl1 em solventes orgânicos; ciclohexano, acetato de etila, metanol, etanol, *n*-propanol, iso-propanol, *n*-butanol, DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) e acetato de etila. A solução de Bbl1 purificada (**seção 3.3.6.**) foi diluída 50 vezes em 1 mL de tampão McIlvaine pH 6,0 e 1 mL de solventes orgânicos. Essa mistura foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente e agitação constante. Após esse período, 50  $\mu$ L destas misturas foram submetidos a dosagem enzimática. Os valores obtidos foram proporcionados com os mesmos no tempo inicial do experimento, obtendo-se uma atividade residual; expressa em porcentagem. Uma solução controle foi elaborada, utilizando tampão McIlvaine pH 6,0 no lugar de solvente orgânco.

#### 3.3.10. Imobilização de Bbl1 em suportes de interação hidrofóbica e iônica

A imobilização em suportes hidrofóbicos foi procedida em matrizes comerciais Octyl-Sepharose (GE - Healthcare), Butyl-Sepharose (GE – Healthcare) Phenyl-Sepharose (GE – Healthcare) Sepabeads C-18 (GE - Healthcare). A adsorção em suportes iônicos foi testada nas resinas DEAE-celulose (Sigma-Aldrich), MANAE-agarose e PEI-agarose (previamente preparadas conforme manual do fabricante).

Para esse experimento de imobilização, 2 gramas de suporte foram misturados a um volume de extrato bruto, obtido em **seção 3.3.5.,** contendo 435 U totais de hidrólise de *p*NPP. Em seguida, adicionou-se à essa mistura tampão fosfato de sódio pH 7,0 para que a concentração final fosse 10 mM de tampão. Essa mistura foi mantida em agitação de rolos a 4°C. Periodicamente, foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante, e, em seguida, submetidas a ensaios de atividade de lipases por hidrólise de *p*NPP. Essa primeira parte do experimento teve por finalidade observar o perfil de imobilização de Bbl1 nos referidos suportes, buscando observar qual a porcentagem do valor de atividade oferecida à imobilização foi adsorvida no suporte. Para tal, os valores de atividade do sobrenadante e do derivado foram expressos em atividade relativa em relação as 435 U iniciais, o qual, portanto, corresponde ao valor de 100% de atividade. Os períodos estudados foram: 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 1440 minutos.

Para fins de normatização: suspensão é o termo correspondente à fração da mistura contendo o derivado de imobilização e o sobrenadante (Suspensão: Derivado + Sobrenadante); o sobrenadante corresponde à porção da mistura sem o derivado; já o derivado é o termo correspondente ao suporte hidrofóbico ou iônico ligado à enzima Bbl1. O derivado foi separado da suspensão com auxílio de um filtro acoplado na ponteira da pipeta. Em vista do que foi descrito, o valor de atividade do derivado correspondeu à diferença entre o valor de atividade enzimática obtido da suspensão e, do sobrenadante.

Em seguida, ao término de 24 horas de imobilização, os derivados foram filtrados, lavados com água destilada e armazenados a 4°C. Como segunda parte dessa seção experimental, construiu-se uma tabela contendo parâmetros de imobilização, para o período de 24 horas, os quais foram: retenção, que representa a proporção entre atividade enzimática do sobrenadante removida pelo suporte em relação as 435 U iniciais; <u>atividade relativa</u>, definida pela razão entre atividade enzimática total no derivado em relação as 435 U oferecidas à imobilização; e <u>atividade específica</u> que representa a atividade no derivado por grama de suporte utilizado na imobilização.

Para todos os experimentos descritos nessa seção, utilizou-se um controle de imobilização de agarose não-ativada. Esse controle foi elaborado misturando um volume de extrato bruto contendo 435 U de atividade de hidrólise e 2 gramas de agarose não-ativada, cuja solução final foi submetida às mesmas condições e análises descritas anteriormente. Esse

controle permitiu verificar se Bbl1 permaneceria estável nas condições de temperatura e pH utilizadas no experimento.

#### 3.3.11. Imobilização de Bbl1 em suporte CNBr-Sepharose

Esse foi o único suporte de interação covalente utilizado no trabalho. Para tal, 2 g de CNBr-Sepharose (Amersham Biosciences) foi ativado com 50 mL de água levemente ácida com HCl, durante 90 minutos a 25°C, em agitação constante. Em seguida, filtrado e imediatamente utilizado na imobilização de Bbl1. A reação de imobilização procedeu-se da mesma forma que em **seção 3.3.10.**; 435 U totais de atividade de Bbl1 foram misturados a 2 g desta resina. Adicionou-se uma solução de tampão fosfato de sódio pH 7,0, cuja concentração foi 10 mM deste tampão em solução. Essa mistura permaneceu em agitação por 20 minutos a 4°C. Posteriormente o derivado foi filtrado, lavado e incubado com solução de etanolamina 1 M pH 8,0 por 1h. Esse procedimento bloqueia os grupos ativados de CNBr remanescentes que poder-se-iam interagir com Bbl1. Em seguida o derivado foi lavado com água destilada e armazenado a 4°C.

#### 3.3.12. Estabilidade da atividade enzimática em diferentes temperaturas

Verificou-se a estabilidade térmica de Bbl1 purificada não-imobilizada ou imobilizada. O intuito desse experimento foi verificar o ganho ou perda de estabilidade da enzima Bbl1 após a imobilização e relatar quais valores de temperatura Bbl1 mantém-se nativa por mais tempo. Para tal, a solução de Bbl1 purificada, obtida na seção 3.3.6., foi diluída 50 vezes em tampão McIlvaine pH 6,0, e 40 mg de cada derivado foram diluídos neste mesmo tampão. O volume final de ambas as soluções foi de 2 mL. Essas soluções foram incubadas em diferentes temperaturas e, periodicamente, retiravam-se alíquotas de 50  $\mu$ L de ambas as soluções as quais foram submetidas à hidrólise de *p*NPP (cujas condições de temperatura e pH foram especificadas em cada experimento na seção dos resultados). Os valores de atividade obtidos da enzima Bbl1, não-imobilizada ou imobilizada, foram proporcionados com o valor de atividade obtido no tempo inicial de incubação em cada temperatura. As temperaturas avaliadas foram: 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Os períodos analisados foram: 2, 4, 8, 24 e 48 horas. Em seguida, foram determinados os valores de t<sub>50</sub> e k<sub>desn</sub> para cada temperatura, segundo CHAPLIN e BUCKE (1990), e PRAJAPATI et al. (2013):

$$t_{50} = \frac{0.693}{k_{desn}}$$
 (Equação 1)

A partir de k<sub>desn</sub> nas diferentes temperaturas determinou-se a energia de desnaturação (E<sub>a(d)</sub>), segundo Arrhenius (PRAJAPATI et al., 2013)

$$\ln(k_{desn}) = A_0 - \frac{E_{a(d)}}{R \times T}$$
 (Equação 3)

sendo  $A_0$  definida como constante de Arrhenius, R a constante gases universal, T a temperatura em Kelvin e  $k_{dens}$  a constante cinética. Os valores de temperatura para a equação de Arrhenius foram convertidos em Kelvin, conforme demanda a literatura.

#### 3.3.13. Estabilidade da atividade enzimática a diferentes valores de pH

Verificou-se a estabilidade de Bbl1 não-imobilizada ou imobilizada em diferentes suportes frente a valores de pH. O intuito desse experimento foi verificar o ganho ou perda de estabilidade da enzima Bbl1 após a imobilização e relatar em quais valores de pH Bbl1 manteve-se nativa por mais tempo. Para tal, a Bbl1 purificada, obtida na seção 3.3.6., foi diluída 50 vezes em tampão McIlvaine pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8, e tampão glicina 200 mM pH 9 e 10. Já os imobilizados, 40 mg de cada derivado foram diluídos nestes mesmos tampões. O volume final de ambas as soluções foi 2 mL. Periodicamente, retiravam-se alíquotas de 50 µL as quais foram submetidas à hidrólise de *p*NPP (cujas condições de temperatura e pH foram especificadas em cada experimento na seção dos resultados). Os valores de atividade foram proporcionados com o valor de atividade enzimática obtido no tempo inicial de cada experimento, expressos em atividade relativa. Os períodos avaliados foram: 1, 2, 3, 6, 24 e 48 horas. Valores de t<sub>50</sub> foram determinados a partir destes resultados.

A temperatura de incubação foi condizente com o valor de estabilidade térmica para Bbl1 não-imobilizada ou imobilizada. Não foi estudada a estabilidade dos suportes iônicos (DEAE-celulose, MANAE e PEI) nos pH 3, 4, ou 5, visto que nesses valores, a enzima Bbl1 desassocia-se do suporte. Além disso, comparou-se o valor de atividade de Bbl1, nãoimobilizada ou imobilizada, em tampão glicina pH 8,0, 200 mM, com a atividade de Bbl1 em tampão McIlvaine pH 8,0; a intenção disso foi observar se a espécie química do tampão poderia ser agente na alteração da atividade enzimática, em sobreposição a influência do pH propriamente dita.

#### 3.3.14. Otimização de experimentos para hidrólise de pNPP

A partir de um planejamento de experimentos, determinou-se os valores de pH e temperatura ideais para hidrólise de *p*NPP tanto da enzima não-imobilizada quanto aderida em Octyl-Sepharose, DEAE-celulose e CNBr-Sepharose. A escolha destes três derivados foi pela

maior estabilidade frente a pH e temperatura. Foi realizado um conjunto de 11 experimentos, três dos quais foram repetições dos pontos centrais. Os valores codificados de temperatura e pH estão nos resultados (**ver Resultados 4.4.6. e 4.5.4.**) por mera conveniência normativa. Para tal, Bbl1 purificada foi diluída 50 vezes em água destilada, já os derivados, 40 mg de cada imobilizado foram suspensos em água destilada. Dessa mistura, 50  $\mu$ L foram utilizados para hidrólise de *p*NPP. O meio reacional de hidrólise de *p*NPP utilizado está descrito em **seção 3.2.1.**, porém o valor de pH do tampão McIlvaine e temperatura modificou-se dependendo do ensaio.

A resposta deste experimento permitiu correlacionar a atividade enzimática e esses dois parâmetros estudados em uma equação polinomial. Para a Bbl1 não-imobilizada, o resultado foi expresso em U.mL<sup>-1</sup> de solução, já para essa enzima imobilizada, expressa em U.g<sup>-1</sup> de derivado. Um teste ANOVA foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão. O software Statistica v.11.0 foi usado para analisar os dados experimentais.

#### 3.3.15. Análise e tratamento dos dados cinéticos

A solução de Bbl1 não-imobilizada, imobilizada no suporte de Octyl, e a lipase de Palatase<sup>®</sup> 20.000L (Novozyme) foram estudadas quanto o perfil cinético. A lipase da Palatase foi purificada da mesma maneira que descrita em **seção 3.3.6**. Os parâmetros cinéticos ( $V_{máx}$ , velocidade máxima ( $U.mg^{-1}$  - atividade enzimática por miligrama de enzima);  $K_{0,5}$ , concentração de substrato equivalente a 50% da  $V_{máx}$  (em mM);  $k_{cat}$ , número de *turnover* (em s<sup>-1</sup>); n, coeficiente de Hill; e  $k_{cat}/K_{0,5}$  (mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) foram determinados por regressão não-linear empregando o software GraphPad Prism 6.0. A hidrólise de *p*NPP foi conforme **seção 3.2.1.**, porém variando-se as concentrações de substrato de 0,24 - 5,01 mM. Os valores de temperatura e pH utilizados respeitaram seus respectivos planejamentos experimentais, e para Palatase, conforme manual do fornecedor.

Como segunda parte do experimento, a partir dos valores de  $k_{cat}$  da hidrólise de *pNPP*, em diferentes temperaturas, obteve-se a energia de ativação (E<sub>a</sub>) da reação por meio da equação de Arrhenius (Equação 3). Os valores de  $k_{cat}$  foram determinados nas seguintes temperaturas: 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C. Para todo o experimento descrito nessa seção, as concentrações de Bbl1 não-imobilizada e imobilizada, e de lipase da Palatase, utilizadas no momento da reação, foram, respectivamente, 9 x 10<sup>-5</sup>, 5 x 10<sup>-5</sup> e 2,5 x 10<sup>-2</sup> mg.mL<sup>-1</sup> (ANEXOS D e E).

#### 3.3.16. Inibição dos ácidos graxos oleico e linoleico sobre hidrólise de pNPP

Primeiramente, desejou-se determinar os valores de CI<sub>50</sub> dos ácidos graxos oleico e linoleico na hidrólise de *p*NPP, utilizando Bbl1 não-imobilizada ou imobilizada em Octyl. Para tal, procedeu-se à hidrólise de *p*NPP, em concentração saturante conforme **seção 3.2.1.**, acrescentando diferentes concentrações dos ácidos graxos oleico (Sigma-Aldrich) e linoleico (Sigma-Aldrich) no meio reacional. As concentrações dos ácidos graxos presentes no momento reacional foram: 0,10 - 9,09 mM para ácido oleico; e 0,10 - 6,52 para ácido linoleico. As soluções de ácidos graxos adicionadas foram preparadas em álcool isopropílico, na proporção 1 : 2 (ácido graxo : isopropanol).

Na segunda parte do experimento, avaliou-se os parâmetros cinéticos (conforme descrito na **seção 3.3.15**) na presença dos ácidos oleico ou linoleico, cujas concentrações no meio reacional foram 0,5, 1,0 e 2,0 mM. Os valores de  $V_{máx}$  e K<sub>0,5</sub> foram avaliados em teste de ANOVA para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados. Para todo o experimento descrito nessa seção, as concentrações de Bbl1 não-imobilizada e imobilizada foram, respectivamente, 9 x 10<sup>-5</sup> e 5 x 10<sup>-5</sup> mg.mL<sup>-1</sup> no meio reacional (ANEXOS D-F).

## 3.4. Estudo de viabilidade de células de glioblastoma LN-18 e fibroblasto CCD-1072Sk na presença de hidrolisados do óleo de açaí e buriti

#### 3.4.1. Hidrólise dos óleos de buriti e açaí

Neste procedimento, cerca de 1400 U totais de extrato bruto foram imobilizados em 6 g de Octyl-Sepharose por 24 horas e em temperatura de 4°C. Em seguida esse derivado foi filtrado, lavado com água destilada, ressuspendido em 60 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 e misturado a 60 g de PEI (polietilenoamino – Sigma-Aldrich). Essa solução foi mantida em agitação a temperatura de 4°C por overnight. Após isso, o derivado Octyl coberto pelo PEI foi filtrado e lavado com água destilada abundantemente.

Esse derivado foi incubado em solução reacional de hidrólise de óleos açaí ou buriti por 48 horas: 3 g de derivado, 15 mL do óleo de açaí ou buriti (Mundo dos Óleos), 60 mL de água destilada, a 57°C e rotação de 200 rpm. Após esse período, o meio reacional de hidrólise de cada óleo foi filtrado em bomba a vácuo com filtro de fundo de cerâmica, removendo-se o derivado. Os sobrenadantes desta filtração foram despejados em funis de separação. Adicionou-se 70 mL de hexano aos funis agitando suavemente e, em seguida, manteve a mistura em repouso por 30 minutos. Após esse período observou-se a formação de um sistema bifásico; uma camada polar (na porção inferior) e outra camada apolar retida no hexano (na porção superior). As fases polares e apolares do hidrolisado de buriti e açaí foram separados, cada qual

continha cerca de 50 mL e 70 mL, respectivamente. As fases apolares foram estocadas em temperatura de -20°C até momento de uso.

As fases polares da hidrólise do açaí e do buriti foram liofilizadas (Liofilizador – L5KR, Edwards) por overnight e, em seguida, ressuspendidas em 10 mL de álcool etílitico. Tais soluções foram sonicadas, para remoção dos agregados, por 20 minutos, e em seguida armazenadas em temperatura de -20°C até momento de utilização.

## **3.4.2.** Análise das fases polar e apolar da hidrólise de buriti e açaí por cromatografia de camada delgada

A investigação dos produtos de hidrólise formados a partir da ação de Bbl1 imobilizada em Octyl e revestida por PEI sobre os óleos de açaí e buriti, foi obtida por cromatografia ascendente em cama delgada de sílico de 5 x 4 cm (TLC Silica gel 60 RP-18, Merck, Germany). Para tal, 2 mL da fase polar suspensa em álcool etilítico e da fase apolar dos hidrolisados de açaí e buriti foram aliquotados em Eppendorfs e colocados em Speed-Vac por 30 minutos. Esse procedimento permitiu a remoção do hexano da fase apolar e do álcool etílico da fase polar. Os pellets formados foram dissolvidos em hexano para que a concentração final fosse 0,5% (v/v). Cerca de 5  $\mu$ L dessa solução foi adicionada em uma placa de sílica por capilares de vidro. Soluções de 0,5% (v/v) de ácido oleico, 1,2-dioleina, 1,3-dioleina (Sigma-Aldrich), óleo de açaí/buriti foram aplicados como padrões. A fase móvel utilizada consistia na mistura de hexano : acetato de etila : ácido acético (90:10:1). A revelação foi realizada com exposição a iodo vaporizado em cuba de vidro até a aparecimento das bandas dos produtos de hidrólise.

#### 3.4.3. Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens celulares de glioblastoma LN-18 (adquirida da *American Type Culture Collection* – ATCC<sup>®</sup>) e de fibroblasto CCD-1072Sk (provida do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ<sup>®</sup>). A linhagem LN-18 apresenta mutação em genes supressores de tumor p53 e possíveis deleções em p16 e p14ARF. Além disso, essa linhagem tumoral apresenta alta atividade de MGMT (LEE, 2016).

## 3.4.4. Preparação das soluções estoque dos hidrolisados para utilização em cultivos de células

Cerca de 2 mL da fase polar, suspendida em álcool etilítico, e da fase apolar, dissolvida em hexano, dos hidrolisados de açaí ou buriti foram aliquotados em tubos cônicos e colocados em Speed-Vac por 30 minutos. Após esse procedimento, pesou-se a massa do tubo Eppendorf com o *pellet* formado remanescente e subtraiu-se o valor do Eppendorf vazio. Isso permitiu determinar a massa dos *pellets*. Para o produto de hidrólise do açaí: o *pellet* da fase polar continha  $20,9 \pm 0,5$  mg e da fase apolar,  $318,9 \pm 1,5$  mg. Para os hidrolisados de buriti: o *pellet* da fase polar continha  $30,5 \pm 0,6$  mg e da fase apolar,  $262,5 \pm 2,1$  mg. Solubilizaram-se esses *pellets* em DMSO obtendo-se uma concentração de 200 mg.mL<sup>-1</sup> das fases polar e apolar de cada hidrolisado. A concentração de DMSO nessas soluções não ultrapassou 80%.

#### 3.4.5. Preparo do meio de cultivo de células

As soluções estoque obtidas conforme **a seção 3.4.4.** foram adicionadas no preparo do meio de cultura para as linhagens celulares LN-18 e fibroblasto. Para tal, prepararam-se meios DMEM/HAM-F10, acrescidos de vermelho fenol e soro bovino fetal 10%, com 5 concentrações da fase polar ou apolar, separadamente, e com a combinação dessas duas fases. As concentrações destas fases foram: 0,025 mg.mL<sup>-1</sup> (C1); 0,050 mg.mL<sup>-1</sup> (C2); 0,10 mg.mL<sup>-1</sup> (C3); 0,15 mg.mL<sup>-1</sup> (C4); e 0,20 mg.mL<sup>-1</sup> (C5). Na combinação de fases, a concentração de cada fase foi igual aos valores descritos anteriormente; por exemplo, C1 do combinado equivale ao meio DMEM/HAM-F10 com 0,025 mg.mL<sup>-1</sup> de fase polar e 0,025 mg.mL<sup>-1</sup> da fase apolar.

Foram elaborados três controles para averiguar a viabilidade celular das linhagens na ausência dos hidrolisados de açaí e buriti. Para tal, foram preparados meios DMEM/HAM-F10 com 0,20 mg.mL<sup>-1</sup> do óleo de açaí ou buriti não-hidrolisado, 0,1% de DMSO, e meio contendo 200 mM da droga clínica Telozolomida (Temodal<sup>®</sup> - Schering Plough).

#### 3.4.6. Cultivo celular

As células das linhagens eram armazenadas a temperatura -80°C até o momento de uso. Nesse instante, elas eram cultivadas em frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM/HAM-F10 (Sigma-Aldrich) acrescido de vermelho fenol e soro bovino fetal 10% (SBF – Cultilab) e mantidas em estufa em temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 50% de confluência. Cerca de 5-7 dias eram necessários para as células atingirem este estado. Posteriormente as células eram semeadas em placas ELISA de 96 poços para crescimento em monocamada. Em cada poço foram adicionados 100  $\mu$ L do meio DMEM/HAM-F10 previamente preparado com acréscimo da fase polar, ou da fase apolar, ou da combinação de ambas, ou dos controles, conforme descrito em **seção 3.4.5**.

O experimento buscou averiguar a viabilidade celular das linhagens LN-18 e fibroblasto em 24 e 120 horas de cultivo na presença dos hidrolisados polar, apolar ou combinação entre ambas as fases, em relação aos cultivos controle. Para isso, semearam-se  $2 \times 10^3$  células em cada poço das placas destinadas a 24 h. Já nas placas destinadas a 120 horas de estudo, 1 x  $10^4$  células por poço.

A viabilidade nas concentrações C1, C2, C3, C4 e C5 da fase polar, apolar e a combinação entre elas, assim como os grupos controles, foram estudadas em triplicata, ou seja, 3 poços em cada placa. Todo o experimento de cultivo celular foi repetido 3 vezes para cada período e para cada linhagem celular, totalizando um n = 9 em cada grupo amostral. Não houve reposição do meio de cultura do

#### 3.4.7. Viabilidade celular avaliada pelo kit XTT

A viabilidade das células tumorais e de fibroblasto foi quantificada com o kit XTT (*Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular*). O princípio do método é baseado na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT por células metabolicamente ativas, formando o formazam, um corante laranja. O produto é quantificado por espectrofotometria, medido em 492 e 690 nm.

Para tal, nos períodos de estudo, o meio de cultura foi removido, mantendo-se as células aderidas à placa de ELISA. Em seguida, adicionou-se, em cada poço da placa, 100  $\mu$ L de meio DMEM sem vermelho fenol adicionados com 10  $\mu$ L da solução XTT. O reagente permaneceu em cultura por cerca de 40-120 minutos em temperatura de 37°C até o momento de leitura colorimétrica.

#### 3.5. Repetibilidade dos experimentos

Todos os experimentos e ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental, totalizando um n = 9. Apenas para a purificação, o procedimento foi realizado 6 vezes com triplicada para cada ensaio, totalizando um n = 18. Os experimentos foram avaliados com base na média e no desvio padrão de cada análise por teste-t ou ANOVA, seguido de *posthoc* de Tukey, utilizando o programa Statistica v.11.0. As relações entre variáveis foram plotadas em gráficos utilizando o programa OriginPro 2017 (OriginLab Corp., Northampton, EUA). Com esse mesmo programa foi obtida a regressão linear ou não-linear caso fosse necessária.

# RESULTADOS

#### 4. Resultados

#### 4.1. Transformação de A. nidulans

#### 4.1.1. Escolha do gene codificador de Bbl1 e formulação de primers

No fungo *B. bassiana* foi identificada uma lipase em gel de SDS semi-desnaturante cuja massa molecular é próxima a 45,13 kDa (SPIROPULOS, 2015). Essa lipase passou a ser denominada Bbl1 (*Beauveria bassiana lipase 1*). O sequenciamento desta enzima revelou semelhança com a lipase sob código de referência XP\_008602131.1, presente no NCBI, sendo codificada por um gene de 1558 nucleotídeos (ANEXO A). O ponto isoelétrico (*pI*) e massa molecular teóricos desta enzima são, respectivamente, 6,11 e 53 kDa de acordo com o programa *Compute pI/Mw*. Por meio da sequência obtida no NCBI, observou-se um peptídeo sinal indicando que a proteína nativa é extracelular. Conforme o programa SignalP, a possível região de clivagem corresponde ao resíduo 34 de Lisina (Figura 8).



**Figura 8 - Predição da sequência de peptídeo sinal na tradução de Bbl1.** Correspondência entre os resíduos de aminoácidos preditos e respectivos *Score* obtidos no software SignalP, indicando maior probabilidade de clivagem de um possível peptídeo sinal no resíduo 34 (Lis<sup>34</sup>). Informações segundo PETERSEN et al. (2011): *C-score*: aponta região de clivagem do peptídeo sinal; *S-Score*: distingue os segmentos que fazem parte do peptídeo sinal e, *Y-Score*: combinação entre *C-Score* e *S-Score* resultando em melhor predição ao sítio de clivagem do peptídeo sinal.

Na elaboração dos *primers*, a sequência do peptídeo sinal foi retirada para possibilitar a tradução da proteína com o peptídeo sinal presente no vetor pExpyr e foram inseridas

sequências de nucleotídeos para clivagem com Not1 e XBaI, permitindo sua inserção nos vetores de pExpyr e pGEM-T.

#### 4.1.2. Extração do DNA de B. bassiana e amplificação do gene bbl1

O método de extração de DNA por CTBA foi mais eficiente em relação ao método convencional utilizando clorofórmio, e tanto a utilização do etanol quanto do isopropanol foram eficientes na precipitação de DNA (Figura 9). Cada uma das amostras (representadas na figura 2) obtidas da extração foi submetida à amplificação utilizando os primers de *bbl1*, confirmando a existência de uma sequência complementar que codifica a lipase de interesse (Figura 10) com aproximadamente 1500 pb.

As bandas correspondentes à amplificação de *bbl1* foram recortadas e purificadas utilizando dois kits; da Promega e da GE. O kit da Promega permitiu maior retenção de DNA na purificação com aproximadamente 94,8 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> em relação a 16,6 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> pelo kit da GE (Figura 11).



Figura 9 - Eletroforese da extração de DNA de *B. bassiana* em gel de agarose 0,8%. Raia 1: marcador de pares de base (kpb); raia 2: corresponde a corrida dos reagentes utilizados nos métodos de extração de DNA; raia 3: resultado da extração de DNA utilizando o método convencional com clorofórmio; raias 4 - 9: correspondem às réplicas experimentais submetidas ao método de extração de DNA com CTBA e etanol como agente precipitante, e raias 10 - 12: correspondem às réplicas experimentais submetidas ao método de extração de DNA com CTBA e etanol como agente precipitante. Para a corrida das raias 4 - 12, foram aplicados 1 µL da solução obtida em Material e Métodos 3.1.2. Demais informações estão descritas nas seções 3.1.2 para extração de DNA e 3.1.4. para Eletroforese de DNA em gel de agarose.


Figura 10 - Eletroforese da amplificação do gene *bbl1* das amostras obtidas na extração de DNA, em gel de agarose 0,8%. Raia 1: marcador de pares de base (kpb); raia 2: corresponde a corrida dos reagentes utilizados na amplificação de DNA; raia 3: resultado da amplificação de *bbl1* das amostras obtidas da extração de DNA pelo método convencional com clorofórmio; raias 4-9: correspondem ao resultado da amplificação de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de DNA com CTBA e etanol, como agente precipitante, e raias 10-12: correspondem ao resultado da amplificação de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de amplificação de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de amplificação de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de amplificação de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de amplificação de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas experimentais submetidas ao método de extração de *bbl1* das réplicas exp



Figura 11 - Eletroforese do resultado da purificação do amplificado de *bbl1* utilizando dois kits comerciais em gel de agarose 0,8%. Raia 1: marcador de pares de bases (kpb); raia 2: resultado da purificação utilizando kit da Promega, raia 3: resultado da purificação com kit da GE. Para as raias 2 e 3, foi aplicado 1  $\mu$ L de amostra purificada. Demais informações estão descritas nas seções 3.1.4. para Eletroforese de DNA em gel de agarose.

# 4.1.3. Clonagem de *bbl1* no vetor pGEM-T, seleção de colônias positivas por PCR de colônia e digestão da ligação e do vetor de expressão pExpyr

Os fragmentos purificados de *bbl1* foram concentrados e em seguida submetidos à ligação com vetor pGEM-T e em seguida inseridos em células de *E.coli* eletrocompetentes (DH5 $\alpha$ ). A priori, foram obtidas 20 colônias positivas em placa, em seguida, confirmou-se a inserção e estabilidade do vetor pGEM-T+*bbl1* nas células por PCR de colônia (Figura 12). A colônia referente à raia 20, conforme figura 12, foi escolhida devido maior intensidade de amplificação de *bbl1* e, em seguida, incubada em crescimento *overnight* em meio líquido LB+Amp e, por fim, submetida a *miniprep*, sendo obtido 300 ng.µL<sup>-1</sup> de vetor pGEM-T+*bbl1*, de aproximadamente 5000 pb. A amostra de *miniprep* foi amplificada por PCR, confirmando a presença do gene *bbl1* próximo a 1500 pb (Figura 13). As células de *E. coli* transformadas foram armazenadas em -80°C sob glicerol 30% para estoque. O vetor pGEM-T+*bbl1* e o vetor pExpyr foram digeridos, concomitantemente, com Not1 e XBaI (Figura 14). Os fragmentos de *bbl1* e vetor pExpyr linearizado obtidos da digestão foram purificados com kit Promega, obtendo-se, respectivamente para cada digestão, 60 ng.µL<sup>-1</sup> e 30 ng.µL<sup>-1</sup>.



Figura 12 - Eletroforese da amplificação de *bbl1* das colônias de *E. coli* transformadas com o produto da ligação pGEM-T+*bbl1*, em gel de agarose 0,8%. Raia 1: marcador de pares de bases (kbp); raias 2 - 21: produto da amplificação de *bbl1* das colônias positivas quanto a inserção do vetor pGEM-T+*bbl1*. As colônias de *E. coli* foram selecionadas como positivas conforme Material e Métodos 3.1.9. Para a corrida das raias 2 - 21, foram aplicados 5 µL da solução obtida após PCR. Demais informações estão descritas nas seções 3.1.3 para procedimentos de PCR e 3.1.4. para Eletroforese de DNA em gel de agarose.



**Figura 13 - Eletroforese da amplificação do gene** *bbl1* inserido no vetor pGEM-T+*bbl1*, após miniprep, em gel de agarose 0,8%. A colônia de *E. coli* utilizada foi escolhida conforme Material e Métodos..., em seguida, incubada em meio LB+Amp *overnight* e submetida a *miniprep* para extração de vetor pGEM-T+*bbl1*. O produto do miniprep foi submetido à amplificação de *bbl1*. Raia 1: marcador de pares de bases (kbp); raia 2: produto da amplificação de *bbl1* da colônia selecionada e; raia 3: produto do miniprep da colônia de *E. coli* selecionada. Para a corrida das raias 2 e 3, foram aplicados 5 µL da solução obtida após PCR e 1 µL da solução obtida do miniprep, respectivamente. Demais informações estão descritas nas seções 3.1.3. para procedimentos de PCR, 3.1.4. para Eletroforese de DNA em gel de agarose e 3.1.9. para seleção de colônia de *E. coli* positiva à inserção do vetor pExpyr+*bbl1*.



**Figura 14 - Eletroforese dos produtos de digestão dos vetores pExpyr e pGEM-T+***bbl1* **com as enzimas de restrição Not1 e XBaI, gel de agarose 0,8%.** Raia 1: marcador de pares de bases (kbp); raia 2: vetor pExpyr linearizado após digestão com enzimas de restrição; raia 3: produto da digestão do vetor pGEM-T+*bbl1*, liberando os fragmentos correspondentes aos (a) vetor pGEM-T e (b) *bbl1*. O substrato pGEM-T+*bbl1* utilizado na digestão foi obtido após *miniprep* da colônia de *E. coli* transformada com esse vetor. Para a corrida das raias 2 e 3, foi aplicado 1 µL da solução obtida da digestão do pExpyr e do pGEM-T+*bbl1*, respectivamente. Demais informações estão descritas nas seções 3.1.3. para procedimentos de PCR, 3.1.4. para Eletroforese de DNA em gel de agarose e 3.1.9. para seleção de colônia de *E. coli* positiva à inserção do vetor pExpyr+*bbl1* e 3.1.11. para digestão plasmidial com as enzimas Not1 e XBaI.

## 4.1.4. Clonagem no vetor de expressão pExpyr

O produto de amplificação de *bbl1* e o vetor pExpyr linearizado, conforme figura 14, foram purificados e procedidos à reação de ligação. O produto desta reação foi inserido em células de *E. coli* DH5 $\alpha$  as quais foram inoculadas em meio LB+Amp. O vetor pExpyr confere resistência à ampicilina, permitindo a seleção de colônias positivas à inserção deste vetor. Ao sucesso deste procedimento, foram obtidas 7 colônias de *E. coli* positivas em placa e, em seguida, confirmou-se a presença a de pExpyr+*bbl1* dentro das células por meio do PCR de colônia (Figura 15). Notou-se a existência de outras bandas de amplificação em todas as colônias além da amplificação do esperado *bbl1* (de 1500 pb), cujos pares de base são, aproximadamente, 1750, 1000, 800 e 400.

Para confirmar que as demais bandas não são fragmentos *bbl1* ou contaminantes, uma digestão dupla do produto de ligação entre pExpyr e *bbl1*, com Not1 e XBaI, foi realizada para liberação do fragmento *bbl1* (Figura 16). Como a região de inserção no pExpyr e as extremidades do gene de interesse estão desenhadas com terminações de clivagem por Not1 e XBaI, espera-se que nesse processo apenas 1 banda seja liberada do vetor. Ainda, comparou-se a digestão dupla do vetor pExpyr+*bbl1* com três controles: um contendo apenas os reagentes utilizados na digestão dupla, outro apenas com o produto de ligação sem os reagentes de digestão dupla, e o produto de amplificação de *bbl1* a partir do vetor pGEM-T+*bbl1*. Segundo a Figura 16 confirmou-se; a ausência de contaminantes nos reagentes utilizados na digestão dupla do pExpyr+*bbl1*, que o gene *bbl1*, de fato, corresponde à banda de 1500 pb, e que a digestão do pExpyr+*bbl1* liberou apenas 1 banda de 1500 pb. Isso provavelmente indica que as bandas de 1750, 1000, 800 e 400 pb correspondem à pareamentos não-esperados associados à reação de amplificação com os *primers* de *bbl1*.

As colônias positivas foram cultivadas em meio LB+Amp líquido por overnight e, em seguida, submetidas ao *midprep*, no qual obteve-se uma amostra com 257 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de vetor pExpyr+*bbl1*.



Figura 15 - Eletroforese da amplificação de *bbl1* das colônias de *E. coli* transformadas com o produto da ligação pExpyr+*bbl1*, em gel de agarose 0,8%. Raia 1: marcador de pares de bases (kbp); raias 2 - 8: produto da amplificação de *bbl1* de colônias de E. coli após transformação com vetor pExpyr+*bbl1*. Como produto desta amplificação obteve-se 5 bandas de amplificação com aproximadamente 1750, 1500, 1000, 800 e 400 pb. Para a corrida das raias 2 - 8, foram aplicados 5 µL da solução obtida após PCR, conforme descrito. Demais informações estão descritas nas seções 3.1.3. para procedimentos de PCR, 3.1.4. para Eletroforese de DNA em gel de agarose, e 3.1.12 para ligação do *bb11* no vetor pExpyr.



**Figura 16 - Eletroforese dos produtos de digestão dos vetores pExpyr+***bbl1* **com as enzimas de restrição Not1 e XBaI, em gel de agarose 0,8%.** Raia 1: marcador de pares de bases (kbp); raia 2: reagentes utilizados na digestão dupla, conforme Material e Métodos; raia 3 e 4: duplicata da digestão dupla do vetor pExpyr+*bbl1* com as enzimas de restrição Not1 e XBaI; raia 5: vetor pExpyr+*bbl1* sem enzimas de restrição e raia 6: gene *bbl1* amplificado do vetor pGEM-T+*bbl1* obtido nos Resultados.... A digestão dupla com Not1 e XBaI permitiu a liberação do gene *bbl1* do vetor pExpyr+*bbl1*. A raia 2 indica ausência de contaminantes dos reagentes usados na digestão dupla. A raia 5 indica ausência de contaminantes no produto de ligação entre pExpyr e *bbl1*. A raia 6 indica que o gene *bbl1* corresponde, de fato, à banda de 1500 pb. Para as raias 2 – 5 foi aplicado 1 μL de solução no gel, e para raia 6, 5 μL da amplificação de *bbl1*. Demais informações estão descritas nas seções 3.1.3. para procedimentos de PCR, 3.1.4. para Eletroforese de DNA em gel de agarose, 3.1.12 para digestão plasmidial com as enzimas Not1 e XBaI.

## 4.1.5. Análise do sequenciamento do gene bbl1 inserido no pExpyr

O sequenciamento do vetor pExpyr+*bbl1* foi tratado no programa BioEdit 7.1 para remoção de sequência consenso do pExpyr. A sequência de 1358 nucleotídeos, correspondente ao gene *bbl1* foi submetida a um alinhamento contra a sequência de nucleotídeos encontrada para a lipase sob referência XP\_008602131.1, usada no começo deste trabalho. O resultado deste alinhamento (ANEXO C) demonstrou a existência de 23 códons degenerados, 24 códons não-homólogos e 1 nucleotídeo não-pareado. Não foi possível verificar se a existência deste nucleotídeo a mais provocaria alternância da leitura de trincas ou, se o mesmo, corresponderia a uma região de *íntron* e, portanto, foi removido da sequência de nucleotídeos de *bbl1*.

Ambas as sequências de nucleotídeos foram traduzidas em suas respectivas estruturas primárias pelo programa *Translate Tool* da ExPASy e, em seguida, a partir da ferramenta BLAST, verificou-se semelhança de 95% entre ambas proteínas (Figura 17). No BLAST, pôde-se determinar a sequência típica de pentapeptídeo G-Y-S-G-G, característica das lipases, e os resíduos de Serina-181, Asparagina-331 e Histidina-363 pertencentes a tríade catalítica. A proteína hipotética obtida teve seu *pI* teórico calculado de 4,60 e 47,8 kDa. Dentre os resíduos não-homólogos, notou-se a substituição do resíduo de Aspartato, indicado ser componente da tríade catalítica da proteína em referência, por um resíduo de Asparagina.

XP_008602131.1 Bbl1	MSLSSSHQINRLHARLIMKFLSLVAAVLPLVSALTIPEQSITTPANDPSSVPPSGLELAE * . :: .
XP_008602131.1 Bbl1	DASALTVPEKRITTPANDPFYVPPSGFESAKPGTVLRERPIVASFFGLIPAPIDSRQLLY KRGRLTIPEQSITTPANDPFYVPPSGFESAKPGTVLRERPIVASFFGLIPAPIDSRQLLY **:**: ****************************
XP_008602131.1 Bbl1	RTTAIDGSAIATVVTIFKPLFAKRDRFISFNTAYDSSASICNPSYNYRLGALQTDVISSA RTTAIDGSAIATVVTIFKPLFAKRDRFISFNTAYDSSASICNPSYNYRLGALQTDVISSA ***********************************
XP_008602131.1 Bbl1	EFLIIQAYLLSGYTVASADYEGPDVAFSVGRLSGMGVLDGIRAVVNYGPKIGLDKNPMVV EFLIIQAYLLSGYTVASADYEGPDVAFSVGRLSGMGVLDGIRAVVNYGPKIGLDKNPMVV ***********************************
XP_008602131.1 Bbl1	NAGYSGGAIASGWAASLHPTYAPDLNLKGFIAGGTPANLTEVLLYVDGTLFAGFVPGALA NAGYSGGAIASGWAASLHPTYAPDLNLKGFIAGGTPANLTEVLLYVDGTLFAGFVPGALA
XP_008602131.1 Bbl1	GQIMPSAYGARLKPVLDKVIGPRGKEALALGTSQCAPVNLIAFAGKSIFDTSFQTLGKDL GQIMPSAYGARLKPVLDKVIAPRGKEALALGTSQCAPVNLIAFAGKSIFDTSFQTLGKDL ************************************
XP_008602131.1 Bbl1	LYDKDVAWVLAESTLGLKKNETPTVPVMLYHSPDDEVIPFAGADGLRKRWCDNGANVRFV LYDKDVAWVLAESTLGLKRRETPNGTVMLYHSQTNEVSLCLGASMLRSAGCDKLANVRFV ***********************************
XP_008602131.1 Bbl1	NYAAGGHVTAEVVAVIDAIKFAGDAFSGSVPGGCASRTVLDDKLNPLALGLSLEPVLAGL NYAAGGHVTAEVVAVIDAIKFAGDAFSGSVPGGCASRTVLDDKLNPLALGLSLEPVLAGL ***********************************
XP_008602131.1 Bbl1	VNILLTLGKKDANFVSGLSQGKHI 504 VNILLTLGKKDANFVSGLSQGKHI 456

**Figura 17 - Alinhamento entre estruturas primárias de proteínas Bbl1 e lipase de referência em banco de dados.** Sequências obtidas da tradução dos genes sob referência XP\_008602131.1, presente no GeneBank, e *bbl1* inserido no vetor pExpyr. A marcação em caixa preta indica o pentapeptídeo característico de lipases (G-X-S-X-G, onde X corresponde a um resíduo qualquer) e as setas demonstram os resíduos (S, N e H) da tríade catalítica. Símbolos: (\*) mesmo resíduo de aminoácido, (:) significa resíduos de aminoácidos com propriedades bioquímicas semelhantes e (.) indica que os resíduos apresentam semelhança funcional baixa. A sequência de *bbl1* foi obtida a partir do sequenciamento do vetor pExpyr+*bbl1*, conforme descrito em Material e Métodos 3.1.13.

### 4.1.6. Modelagem gráfica de Bbl1

A modelagem de Bbl1 foi fornecida pelo programa Swiss-Model utilizando como template a lipase b de *Candida antarctica* (UPPENBERG et al., 1994). Sua estrutura foi representada na figura com auxílio do programa SwissPDB Viewer. Foi identificada nessa estrutura a região correspondente a tampa e os resíduos catalíticos Ser<sup>181</sup>, Asn<sup>331</sup> e His<sup>363</sup> (figura 18). Além disso, pôde-se obter duas regiões hidrofóbicas (Figura 19) e cavidades, que correspondem a "bolsões" com abertura na superfície da proteína (Figura 20).



**Figura 18 - Modelagem gráfica de Bbl1 utilizando lipase b de** *C. antarctica* **como** *template* – **Campo de visão I.** Em amarelo está a região correspondente a tampa e os resíduos catalíticos em rosa.



**Figura 19 - Modelagem gráfica de Bbl1 utilizando lipase b de** *C. antarctica* **como** *template* – **Campo de visão II.** Em amarelo está a região correspondente a tampa. Os resíduos catalíticos em rosa. As regiões hidrofóbicas estão em azul e laranja, segundo predições do SwissPDB Viewer.



**Figura 20 - Modelagem tridimensional de Bbl1 utilizando lipase b de** *C. antarctica* **como** *template* – **Campo de visão III.** Em amarelo está a região correspondente a tampa. Os resíduos catalíticos em rosa. Em roxo e verde estão localizadas as duas cavidades de Bbl1, segundo predições do SwissPDBViewer.

# 4.1.7. Expressão do gene *bbl1* em *Aspegillus nidulans*, seleção de colônia-mãe e caracterização prévia da lipase expressa

O vetor pExpyr+*bbl1* foi inserido em protoplastos de *A. nidulans* A773 (*Fungal Genetics Stock Center* – St. Louis, MO), plaqueados em meio sólido propício e incubados a 37°C para reconstituição da parede fúngica e esporulação, ao longo de 72 horas. Após esse período, obteve-se 200 colônias vegetativas as quais foram repicadas em 10 mL de meio mínimo líquido suplementado com maltose 5% para expressão do gene *bbl1* (Figura 21a). Ao final de 64 horas de crescimento, foram realizados ensaios para quantificação de atividade de lipase nos extratos brutos de cada cultivo e obteve-se 40 colônias capazes de produzir e secretar a enzima Bbl1. A colônia no.34, com maior atividade de 1,693 U.mL<sup>-1</sup> (Figura 21b), foi escolhida como cepa-mãe transformante de *A. nidulans* produtora de Bbl1 e armazenada em glicerol 30% a -80°C. O micélio macerado desses cultivos não revelou atividade lipolítica, indicando que não existe atividade de lipases intracelulares (dados não mostrados).



**Figura 21 - Infográfico contendo os resultados preliminares da expressão de** *bbl1* **em** *A. nidulans* **A773. (a)** Esquema representando o vetor pExpyr+*bbl1* inserido em células de fúngicas, a distribuição dos protoplastos em placa com meio mínino + Piridoxina + Ura + Uri, para reconstituição da parede fúngica, e, a expressão de *bbl1* em meio mínimo, na presença de maltose, e seleção de colônias positivas à secreção de lipase. (b) Cada cultivo foi submetido a um ensaio lipolítico e os valores de atividade extracelular dados em U.mL<sup>-1</sup>. As colônias de *A. nidulans* controle representam cepas transformadas com o vetor pExpyr vazio. Já as colônias numeradas de 3, 6, 7 e 17 até 42 são as que apresentaram atividade lipolítica, pela hidrólise de *pNPP*, superior às respectivas colônias controle. Abreviações: *gla*AP, promotor de glucoamilase de *Aspergillus niger*; ATG, códon de início de transcrição; *gla<sub>ps</sub>*, peptídeo sinal de glucoamilase de *A.niger*; *bb11*, lipase de *B. bassiana* de interesse; *trp*Ct, operon de Triptofano e Not1 e XBaI, enzimas de restrição (Segato *et al.*, 2012). Demais informações em Material e Métodos 3.2.1. para hidrólise de *pNPP* e 3.1.15. para transformação de *A. nidulans*.

A atividade enzimática da colônia no.34 foi considerada baixa em relação à obtida de *B. bassiana* por SPIROPULOS (2015) e pôde estar associada às condições do inóculo, tais como volume de meio e dimensões do recipiente de meio de cultura. Dessa maneira, com intuito de confirmar a viabilidade e a veracidade da expressão de *bbl1* no transformante *A.nidulans* (denominado "A<sub>bbl1+</sub>"), foram analisadas a sua produção de Bbl1 e a secreção de proteínas ao final de 64 horas, em cultivos de 25 mL (em Erlenmeyer de 125 mL) com meio mínimo e maltose 5%, cujo inóculo foi mantido a 37°C e sem agitação. Utilizou-se como controles, a produção desta mesma enzima e proteínas extracelulares de *B. bassiana* (denominado "WT", ou *wild-type*), crescido em condições segundo SPIROPULOS (2015), e pela cepa *A. nidulans* A773 transformada com vetor pExpyr vazio (denominado "A<sub>bbl1</sub>-").

Não foi registrada atividade lipolítica em cepas de  $A_{bbl1}$ - mesmo na presença de maltose 5%, indicando a inexistência de lipases verdadeiras endógenas a cepa utilizada no estudo (Figura 22a). Além disso, notou-se que a produção de lipases foi aproximadamente o dobro na cepa  $A_{bbl1}$  em relação ao WT, confirmando potencial uso dessa cepa para produção de lipases. Tal atividade enzimática foi quase 10 vezes superior àquela registrada nos cultivos de  $A_{bbl1}$  em placa, evidenciando a ocorrência de mudanças na expressão de *bbl1* perante alterações do volume do meio de cultura. Tanto a cepa de  $A_{bbl1}$  quanto a cepa com  $A_{bbl1}$  apresentaram a mesma concentração de proteínas, indicando que a Bbl1 secretada pouco contribui em abundância de proteína, podendo-se supor que tal enzima apresenta um alto número de *turnover*.

Os extratos de meio de cultivo da cepa  $A_{bbl1}$  e  $A_{bbl1}$  foram analisados em gel SDS semi-desnaturante (Figura 22b). Notou-se a existência de uma banda no extrato de  $A_{bbl1}$  a qual inexiste no extrato do cultivo de  $A_{bbl1}$ , cuja massa molecular foi 42 kDa. Tal banda pode corresponder à lipase Bbl1, devido a semelhança de massa registrada por SPIROPULOS (2015). Tais suposições foram confirmados, a posteriori, em géis de zimograma. Uma relação entre atividade enzimática e temperatura de reação foi observada nesse experimento, indicando melhor hidrólise de *p*NPP próximo a 60°C (Figura 22c).



**Figura 22 - Expressão e prévia caracterização de Bbl1 em** *A. nidulans* **A773.** (a) Atividade enzimática e concentração de proteínas dos extratos brutos de cultivos de  $A_{bbl1+}$  e  $A_{bbl1-}$  em meio mínimo com maltose 5%, em comparação ao extrato do cultivo de WT, sob condições específicas para expressão de lipase (segundo Spiropulos 2015). Os cultivos  $A_{bbl1+}$  e  $A_{bbl1-}$  foram mantidos a 37°C e sem agitação. Teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey possibilitaram a determinação da diferença significativa entre os grupos, sendo atribuídos (\*) ao *p* < 0,05 e (\*\*) ao *p* < 0,01. (b) Gel de poliacrilamida 12% em coloração de prata para amostras do extrato bruto do cultivo  $A_{bbl1+}$  e  $A_{bbl1+}$ . A seta indica a banda correspondente à enzima Bbl1. A confirmação da banda de lipase se deu em gel de atividade de lipases (dados não mostrados). **M**, marcador de massa molecular de proteínas em kDa. (c) Determinação da temperatura ideal para hidrólise de *p*NPP utilizando extrato de  $A_{bbl1+}$ . Abreviações:  $A_{bbl1+}$ , colônia de *A. nidulans* A773 transformada com vetor pExpyr+*bbl1*;  $A_{bbl1-}$ , colônia de *A. nidulans* A773 transformada com vetor pExpyr+*bbl1*;  $A_{bbl1-}$ , colônia de *A. nidulans* A773 transformada com vetor pExpyr+*bbl1*;  $A_{bbl1-}$ , colônia de *A. nidulans* A773 transformada com vetor pExpyr+*bbl1*;  $A_{bbl1-}$ , colônia de *A. nidulans* A773 transformada com pExpyr vazio; e WT, colônia de *B. bassiana*. Mais informações em SPIROPULOS (2015) para condições de cultivo de *B. bassiana* para expressão de lipase; Material e Métodos 3.1.15. para soluções de cultivo de *A. nidulans*; 3.3.2. para procedimento experimental desse resultado; 3.2.1. para mensuração de atividade de lipases; e 3.2.2. quantificação de proteínas.

## 4.2. Estudo de crescimento da cepa transformante A. nidulans

#### 4.2.1. Alterando condições do cultivo de Abbl1+

Com o intuito de melhorar a produção enzimática e buscar substitutos para os insumos de maltose e tampão HEPES,  $A_{bbl1+}$  foi inoculado em meio mínimo com xarope de milho e

tampão fosfato, mantendo-se as condições de temperatura e pH (Figura 23). Nesse experimento utilizou-se de diferentes combinações entre as fontes de carbono e o tipo de tampão, verificando-se o efeito sobre a morfologia, produção de lipases e proteínas em 64 horas de incubação.

A maltose, por si, não foi suficiente em induzir a síntese de Bbl1 no meio ausente de tampão (<u>malt</u>), apesar de ser indutora do vetor pExpyr+*bbl1*, resultando na ausência de atividade lipolítica (Figura 23a). A morfologia de  $A_{bbl1+}$  neste meio foi de pouco desenvolvimento de biomassa e pigmentação (Figura 23b) em relação aos demais meios contendo tampão fosfato ou HEPES. Tal cenário foi revertido na presença do tampão HEPES o qual sua combinação com maltose (<u>malt + HEPES</u>) resultou na produção de 8,0 ± 1,0 U.mL<sup>-1</sup>, valor próximo ao observado anteriormente em Figura 22a. Isso indica, portanto, que  $A_{bbl1+}$  necessita da manutenção de pH por intermédio de um tampão para síntese de Bbl1, proteínas e crescimento em Erlenmeyer, mesmo quando todos os recursos; fonte de carbono, fonte de nitrogênio e elementos traços, estejam presentes no meio de cultura. De fato, o pH final deste extrato ficou próximo de 5,0 ± 0,1, indicando que essa queda deve interferir sobre a produção de Bbl1.

A substituição do tampão HEPES por fosfato (<u>malt + PO</u>) impactou positivamente na secreção de Bbl1 e proteínas no meio de cultura, respectivamente de  $18,0 \pm 4,0$  U.mL<sup>-1</sup> e  $42,0 \pm 8,0 \mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Isso indica que além regular o pH extracelular, os íons PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> atuam na fisiologia do fungo, possibilitando maior tradução, transporte e excreção de proteínas.

A síntese de Bbl1 foi maior no meio com xarope de milho, ao invés de maltose como fonte de carbono (<u>xaro + PO</u>). A atividade de Bbl1 neste meio foi de  $25,0 \pm 3,0$  U.mL<sup>-1</sup>. Entretanto não se verificou mudança na concentração de proteínas extracelulares em relação ao meio com maltose (<u>malt + PO</u>). Tudo isso indica que existem componentes no xarope de milho, que agem com sinergia aos açúcares utilizados nas vias glicolíticas, envolvidos na síntese e mobilização de Bbl1.

A agitação constante (xaro + PO + agi) resultou em acréscimo na produção de Bbl1 para  $35,0 \pm 3$  U.mL<sup>-1</sup> e  $55 \pm 8$  µg.mL<sup>-1</sup> de proteínas extracelulares. O desenvolvimento do micélio e pigmentação foi diferente ao observado no meio malt, indicando alterações no crescimento vegetativo e produção de metabólitos secundários (Figura 23b). A agitação possivelmente resultou na homogeneização do meio de cultura e/ou alterações na aeração, explicando o efeito observado. Diferentemente, nos cultivos estacionários, a oxigenação é limitada à superfície adaxial do micélio e o acesso aos nutrientes depende exclusivamente da difusão às hifas.

Um *screening* ao longo de 72 horas revelou pico de produção de Bbl1 aproximadamente em 48 horas (Figura 23c) com 48,00  $\pm$  4,00 U.mL<sup>-1</sup>. Isso representa maior abundância em período menor, quando comparada a produção desta mesma enzima por WT.

Com esses dados, a substituição da maltose e HEPES por, respectivamente, xarope de milho e fosfato com a agitação constante intensificaram o crescimento, quadruplicaram síntese de Bbl1 e quase duplicaram a abundância de proteínas extracelulares no período estudado, além de promoverem alterações na morfologia do fungo.



**Figura 23 - Condições de cultivo e seus efeitos na produção de Bbl1, proteínas totais e morfologia de**  $A_{bbl1+}$ . As condições utilizadas foram representadas por números: (1) <u>malt</u>, meio com maltose 5% e sem tampão; (2) <u>malt+HEPES</u>, meio com maltose 5% e tampão HEPES pH 6,5 100 mM; (3) <u>malt+PO</u>, meio com maltose 5% e tampão fosfato pH 6,5, 100 mM; (4) <u>xaro+PO</u>, meio com xarope de milho 5% e tampão fostato pH 6,5 100 mM; e (5) <u>xaro+PO+agi</u>, meio <u>xaro+PO</u> em agitação constante de 150 rpm. (a) Valores de atividade de lipase e proteínas totais quando  $A_{bbl1+}$  é inoculado em diferentes fontes de carbono e/ou tampão. Os símbolos de significância sobre as barras indicam diferença do valor, da atividade ou da concentração de proteína, em relação a todas as demais condições estudadas, por ANOVA. Símbolos: (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,01; e (\*\*\*) p < 0,001. (b) Morfologia de  $A_{bbl1+}$  nos cultivos estudados. (c) *Screening* mostrando atividade lipolítica de  $A_{bbl1+}$  sob as condições descritas para xaro + PO + agi, em intervalos de 24 horas até 72 horas de cultivo. Demais informações em Material e Métodos 3.2.1. para mensuração da atividade de lipases; 3.2.2. para quantificação de proteínas; e 3.3.3. para os procedimentos utilizados nesse experimento.

Os extratos brutos do experimento anterior foram estudados em géis de SDS semidesnaturante e zimograma para esterases e lipases (Figura 24). Em primeiro lugar, os extratos que apresentaram atividade de Bbl1 (conforme demonstrados na figura 23) possuem uma banda de 42 a 45 kDa. Acredita-se que essa banda corresponda à enzima Bbl1 pelo que foi descrito em SPIROPULOS (2015), e pela predição do Software Compute *pI/Mw*. Não foi possível a identificação da banda por espectrometria de massas devido à baixa visualização nos géis de corados com Coomasie-Blue Silver.

Mesmo sabendo que *A. nidulans* A773 não possui lipases endógenas (conforme demonstrado na figura 22a), notou-se a presença de uma banda com 151 kDa no extrato de  $A_{bbl1}$  ( $A_{bbl1}$  em extrato de <u>malt + HEPES</u>; figura 24a). Provavelmente essa banda corresponde a uma esterase, visto que há inexistência de atividade de hidrólise de *pNPP*; específica para lipases. Essa mesma banda foi presente em todos os cultivos de  $A_{bbl1}$  estudados, com uma pequena variação em kDa. Entretanto, a intensidade da banda, em gel de zimograma, foi maior no cultivo <u>xaro+PO+agi</u> (Figura 24b), acompanhando o mesmo padrão de Bbl1 explicado anteriormente. O extrato <u>malt</u> de  $A_{bbl1+}$  não possui banda de atividade correspondente à enzima Bbl1, confirmando a necessidade de um tampão para sua produção, conforme mencionado anteriormente na figura 23a.

Além dessas duas observações, notou-se a existência de uma terceira banda (de 112 – 117 kDa) no zimograma dos extratos que possuem Bbl1. Como o SDS semi-desnaturante não usufrui de  $\beta$ -mercaptoetanol é provável que tenha ocorrido a aglomeração de Bbl1 durante o preparo da amostra a ser aplicada em gel. Devido à ausência desta banda no extrato malt de  $A_{bbl1+}$ , desconsiderou-se que essa banda seja correspondente a uma outra esterase ou lipase endógena de *A. nidulans* A773.

Desse experimento, o xarope de milho, o fosfato e a agitação provavelmente proporcionaram aumento geral na transcrição e mobilização da esterase endógenas, Bbl1 do vetor pExpyr+*bbl1* e as demais proteínas extracelulares. A única exclusividade observada foi a dependência da estabilidade de pH para síntese de Bbl1. Todas essas observações foram comprovadas em análises *in vitro* e em géis.



Figura 24 - Perfil proteico, em SDS semi-desnaturante e zimograma, de lipases e esterases dos extratos de cultivo de Abbit, e Abbit. em diferentes condições de cultivo. A cepa A<sub>bbl1+</sub> foi inoculada em diferentes meios: malt, meio com maltose 5% e sem tampão; malt+HEPES, meio com maltose e tampão fostato pH 6,5 100 mM; e xaro+PO+agi, meio xaro+PO em agitação constante de 150 rpm. O gel também mostra o perfil proteico e zimograma 5% e tampão HEPES pH 6,5 100 mM; malt+PO, meio com maltose 5% e tampão fosfato pH 6,5, 100 mM; xaro+PO, meio com xarope de milho 5% da cepa Abbil. em meio malt+HEPES

## 4.2.2. Efeito da glicose na produção de Bbl1

A glicose não inibiu a produção de Bbl1 nos cultivos de  $A_{bbl1+}$  em <u>xaro + PO + agi</u> (Figura 25). Todos os cultivos foram inoculados da mesma solução de esporos, por experimento, e a aplicação da hexose, dissolvida em tampão fosfato, foi feita após 16 horas de crescimento do fungo. Cultivos com aplicação de tampão fosfato foram utilizados como controle. As concentrações finais de glicose, 50 mM, 100 mM e 250 mM, não provocaram alterações na atividade lipolítica em comparação aos cultivos controle (Figura 25a), indicando que a ausência de inibição não estava relacionada à concentração deste açúcar.

Decidiu-se, por fim, verificar se a glicose promoveria a expressão de *bbl1* e o tempo necessário desde da aplicação de uma solução de xarope de milho até a obtenção de atividade de Bbl1 no meio extracelular (Figura 25b). Para tal, o fungo  $A_{bbl1+}$  foi cultivado em glicose 5% e, após 16 horas de cultivo, adicionou-se xarope de milho a uma concentração final de 5%. Cultivos com adição de glicose foram utilizados como controle. Nenhum cultivo controle apresentou produção de Bbl1 ao longo do tempo estudado, indicando que a glicose não promoveu a expressão de *bbl1*. Além disso, a detecção de Bbl1, por meio de sua atividade de hidrólise, ocorreu aproximadamente 8 horas após a adição do xarope de milho.



**Figura 25 - Efeito da glicose sobre a secreção de Bbl1.** (a) Cepa  $A_{bbll+}$  inoculada em meio <u>xaro+PO+agi</u> e adição de glicose após 16 horas de crescimento. As concentrações finais de glicose foram de 50 mM ( $\circ$ ), 100 mM ( $\Delta$ ) e 250 mM ( $\Box$ ). Elaborou-se um cultivo de  $A_{bbll+}$  na ausência da adição de glicose ( $\bullet$ ), como controle. (**b**) Cepa  $A_{bbll+}$  inoculada em meio mínimo com glicose 5% seguida da adição de xarope de milho, cuja concentração final foi de 5%, após 16 horas de crescimento. Detectou-se atividade de lipase dos cultivos com adição de xarope de milho ( $\circ$ ), em comparação à atividade de lipase dos cultivos com adição de glicose, considerados controle ( $\bullet$ ). As diferenças significativas foram representadas por (\*\*\*) como *p* < 0,001, por ANOVA. Demais informações em Material e Métodos 3.3.4. para descrição do procedimento desse experimento.

## 4.2.3. Escalonamento e crescimento de Abbl1+ em biorreatores

Para o estudo de escalonamento, compararam-se os valores de biomassa, açúcar residual, concentração de proteínas e atividade lipolítica dos meios extracelulares das matrizes em biorreatores (3,5 L) e Erlenmeyer (0,5 L), a cada 3 horas e ao longo de 96 horas de cultivo (Figura 26).

A fase log (que é do instante de inóculo até a fase estacionária nas condições deste experimento) foi diferente entre os cultivos: no biorreator, 68 horas foram necessárias para atingir o pico de biomassa, em oposição às 36 horas registradas em Erlenmeyer. Ao atingir a fase estacionária, ambos apresentaram concentração de biomassa de aproximadamente  $8,5 \pm 0.9 \text{ g.mL}^{-1}$  e  $8,6 \pm 1,5 \text{ g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Essa primeira informação indica que a taxa de multiplicação de biomassa foi influenciada pelo escalonamento, todavia, o limite de capacidade do meio foi o mesmo, suportando igualmente o máximo populacional.

Os períodos da fase estacionária e início de morte celular também foram diferentes entre os cultivos. A duração da fase estacionária no biorreator foi curta em relação ao Erlenmeyer, sendo de, aproximadamente, 24 e 42 horas respectivamente. Já sua fase de autólise celular iniciou tardiamente (as 92 horas) enquanto que no Erlenmeyer foi em 78 horas. Isso indica que, após estabilidade de crescimento, o meio em Erlenmeyer suportou o máximo populacional por mais tempo, provavelmente pela maior disponibilidade de substratos (açúcar, nitrogênio e sais) exatamente ao atingir essa fase. Entretanto, logisticamente, pelo motivo de nutrir o maior valor de biomassa por mais tempo, esses substratos provavelmente foram exauridos mais rapidamente do que no biorreator.

Quanto à disponibilidade de açúcar ao longo dos experimentos, no cultivo em Erlenmeyer ocorreu esgotamento deste substrato concomitantemente à fase de morte celular. Já no biorreator, o início desta fase não acompanhou a redução total da fonte de carbono do meio, permanecendo próximo de 2,0  $\pm$  0,1 g.L<sup>-1</sup>. Isso indica que em biorreator o açúcar não foi o elemento limitante e o esgotamento da fonte de carbono pôde ser um responsável pela restrição da fase estacionário no Erlenmeyer. Apesar destas considerações sobre a fonte de carbono, é inconclusivo sobre qual componente foi definitivamente limitante para o crescimento de A<sub>*bbl1*+</sub> nestas duas matrizes, pois não foram quantificados o nitrogênio e demais sais residuais, que são outros elementos importantes para o crescimento deste fungo.

A secreção de proteínas para o meio de cultivo no Erlenmeyer não acompanhou, proporcionalmente, o crescimento da biomassa durante a fase log, visto que mais biomassa era formada do que proteínas extracelulares nesta fase. Ao contrário do que foi visto no biorreator, cuja secreção destas proteínas aumentou na mesma proporção que a biomassa formada. Isso aponta que o cultivo em Erlenmeyer favorece mais o crescimento vegetativo do que a produção de proteínas direcionadas ao meio extracelular, enquanto que as condições em biorreator proporcionam igualmente a secreção de proteínas e o crescimento da biomassa. Apesar disso, em termos de abundância de proteína, registrou-se maior concentração de proteínas extracelulares no Erlenmeyer, com  $7,6 \pm 0,5 \ \mu g.mL^{-1}$ , após a fase estacionária e próximo de 72 horas de cultivo. Já no biorreator foi de  $4,8 \pm 0,1 \ \mu g.mL^{-1}$  e próximo de 60 horas de crescimento.

A Bbl1, quantificada através de sua atividade de hidrólise, também foi diferente entre os dois cultivos. A maior produção foi registrada no biorreator, atingindo  $(1,0 \pm 0,2) \times 10^4$  U.L<sup>-1</sup>, cerca de 2,1 vezes maior do registrado em Erlenmeyer. Além disso observou-se que a produção de Bbl1 acompanhou o crescimento em biorreator; o mesmo cenário observado para as proteínas extracelulares, até atingir o pico de atividade em 68 horas. Em contrapartida, a detecção de atividade Bbl1 não foi proporcional ao incremento de biomassa em Erlenmeyer, repetindo o padrão observado quanto as proteínas extracelulares. Seu pico de produção foi registrado em 60 horas de crescimento.

Além da quantidade máxima de Bbl1, o período de produção foi mais longo no biorreator, não sendo possível detectar em qual instante ocorreria a queda de atividade lipolítica. Já no Erlenmeyer, a diminuição de atividade se deu antes mesmo do início de fase de perda de biomassa e junto com o esgotamento de açúcar disponível. Tanto no extrato do biorreator, quanto do Erlenmeyer, não foi quantificada atividade de proteases.

O extrato do biorreator foi analisado em gel (Figura 27) em diferentes períodos, sendo possível observar uma banda de 42 kDa ao longo do cultivo.

A tabela 4 resume todas essas observações em termos de parâmetros cinéticos referentes ao cultivo microbiano. Ressalta-se que, apesar da taxa de crescimento ( $\mu_0$ ) ser menor no biorreator, sua taxa específica de consumo de açúcar ( $q_s$ ) foi 8 vezes maior do que em Erlenmeyer, significando que há maior absorção deste substrato por grama de biomassa e por unidade de hora. A síntese de biomassa por consumo de açúcar ( $Y_{s/x}$ ) foi 1,6 vezes maior em Erlenmeyer, enquanto que a síntese de unidades enzimáticas de lipase por consumo de açúcar ( $Y_{s/Bbl1}$ ) foi 1,8 vezes maior em biorreator.



**Figura 26 - Valores absolutos de biomassa, açúcar redutor residual, proteínas extracelulares e atividade de lipase, de cultivos de**  $A_{bbl1+}$ . Os parâmetros foram avaliados de duas condições: (a) do cultivo em Erlenmeyer (0,5 L) e (b) do cultivo em biorreator (3,5 L). As concentrações dos componentes do meio de cultura e o número de esporos inoculado foram mantidos proporcionais em relação ao volume dos cultivos. As quantificações de cada parâmetro foram realizadas em intervalos de 3 horas, ao longo de 96 horas de incubação. Para cada instante, foram extraídos 15 mL de alíquota dos cultivos. A biomassa foi seca em desumidificador, o açúcar residual foi quantificado pelo método de DNS, a concentração de proteínas por Bradford e a atividade de lipase pela hidrólise de *p*NPP. Demais informações estão em Material e Métodos 3.3.5. para a descrição desse experimento; 3.2.1. dosagem de atividade; 3.2.2. para quantificação de proteínas; e 3.2.3. método do DNS.



**Figura 27 - Perfil proteico do cultivo de**  $A_{bbll+}$  **em biorreator, em diferentes períodos.** Cada raia corresponde um período diferente do cultivo: 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Foram aplicados 20 µL do sobrenadante das alíquotas, obtidas nos períodos estudados. **M**, marcador de massa molecular, em kDa. A seta indica região correspondente à enzima Bbl1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) utilizando coloração pelo método de prata. Demais informações em Material e Métodos 3.3.5. para inóculo em biorreator; 3.2.4. para eletroforese de proteínas; e 3.2.5. para coloração de prata.

**Tabela 4 - Parâmetros cinéticos do cultivo de**  $A_{bbl1+}$  **em Erlenmeyer e em biorreator.** Esses valores foram determinados dentro do intervalo correspondente à fase log de crescimento microbiano (AHMAD; HOLLAND, 1994). A fase log do crescimento em Erlenmeyer foi do instante inicial do inóculo até 36 horas de crescimento; no biorreator, até 63 horas de cultivo. Utilizou-se um pré-inóculo para desconsiderar a fase lag de crescimento. Os parâmetros cinéticos foram:  $\mu_0$ , taxa de crescimento (h<sup>-1</sup>); **q**<sub>s</sub>, taxa específica de consumo de açúcar por biomassa por hora (g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); **q**<sub>Bbl1</sub>, taxa específica de "produção" de atividade de Bbl1 por biomassa por hora (U.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); **Y**<sub>s/x</sub>, síntese de biomassa por consumo de açúcar (g.g<sup>-1</sup>); e **Y**<sub>s/Bbl1</sub>, síntese de unidades enzimáticas de lipase por consumo de açúcar (U.g<sup>-1</sup>). Demais informações em Material e Métodos 3.3.5. para descrição deste experimento e dos valores cinéticos; 3.2.1. para quantificação de atividade de lipase; 3.2.2. para quantificação de proteínas; e 3.2.3. para quantificação de açúcar redutor pelo método de DNS.

Parâmetros cinéticos	Erlenmeyer (0,5 L)	Biorreator (3,5 L)
Taxa de crescimento (h-1)	$0,071 \pm 0,002$	$0,055 \pm 0,003$
Taxa específica de consumo de açúcar (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$0,\!10\pm0,\!02$	$0,\!80\pm0,\!30$
Taxa específica de produção de atividade de lipase (U.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$15,75\pm1,96$	$18,\!84\pm2,\!85$
Síntese de biomassa por consumo de açúcar (g.g-1)	$0,\!457\pm0,\!028$	$0,283 \pm 0,023$
Síntese de atividade de lipase por consumo de açúcar $(U.g^{-1})$	$199,84 \pm 12,03$	$365,43 \pm 87,70$

### 4.3. Purificação de Bbl1 a partir de extrato de cultivo em biorreator

A tampa hidrofóbica e *pI* teórico, de 4,6 em Bbl1, permitiram desenvolver um procedimento de purificação utilizando interação hidrofóbica, com a resina Octyl-Sepharose, e interação iônica, com DEAE-celulose, em pH 7,0.

Um volume de 3,5 L de extrato bruto obtido do crescimento em biorreator foi dialisado, concentrado e equilibrado em Hollow Fiber cartrige 30.000 MMWC. Em seguida procedeu-se à purificação conforme material e métodos 3.3.6. (Tabela 5).

No processo de concentração e equilíbrio no cartucho de 30.000 MMWC, perdeu-se 62% da atividade enzimática do extrato bruto. Essa perda pôde estar associada à formação de interações entre as lipases, o que obstruiria o acesso do substrato nas dosagens enzimáticas. Todavia, foi nessa etapa que ocorreu a melhor separação de proteínas ao longo do procedimento de purificação, diminuindo em 84% a abundância das proteínas.

A amostra remanescente foi aplicada em Octyl-Sepharose e, em seguida, dessorvida com Triton X-100 0,5%. O eluído da coluna teve uma perda de 21% da atividade enzimática e 26% da concentração de proteínas. Entretanto, observou-se uma concentração de Bbl1 em gel SDS semi-desnaturante em uma banda de 45 kDa (Figura 28).

Para remoção do Triton X-100 a amostra eluída em octyl foi aplicada em DEAEcelulose e eluída em gradiente linear de NaCl até 1,5 M. O sal na amostra foi removido por diálise obtendo-se uma solução com Bbl1 purificada em tampão fosfato 10 mM pH 6,0. A atividade específica de Bbl1, após todo o procedimento de purificação, foi de 672,31  $\pm$  25,12 U.mg<sup>-1</sup>. O volume final foi de 200 mL e atividade enzimática,  $45,65 \pm 1,05$  U.mL<sup>-1</sup>. Entretanto, este valor de atividade específica não correspondeu ao valor real, visto que não se considerou o modelo de estado estacionário para dosagens enzimáticas. A elaboração da tabela 5 teve por finalidade apenas demonstrar a eficiência do processo de purificação. O valor da atividade específica de Bbl1 não-imobilizada será discutido nos resultados 4.4.7.

**Tabela 5 - Quadro de purificação de Bbl1.** Purificação realizada a partir do extrato bruto do cultivo em biorreator de  $A_{bbl1+}$ . **Parâmetros analisados:** atividade total de Bbl1 (10<sup>3</sup>, U); quantidade de proteínas extracelulares (mg); atividade específica de Bbl1 em relação a abundância de proteínas extracelulares totais (U.mg<sup>-1</sup>); recuperação (%), definida pela razão entre atividade de Bbl1 obtida após um passo de purificação em relação ao extrato bruto; e fator de purificação que corresponde ao ganho de atividade específica de Bbl1 de uma etapa de purificação em relação ao extrato bruto. **Etapas de purificação: (A)** 3,5 L de extrato bruto do cultivo de  $A_{bbl1+}$  em biorreator; (**B**) solução obtida após diálise, concentração e equilíbrio com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6, em cartucho de 30.000MMWC; (**C**) solução obtida após eluição de Octyl-Sepharose com Triton X-100 0,5% em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0; e (**D**) solução obtida da eluição de DEAE-celulose após gradiente linear salino de NaCl até 1,5 M. O volume final da solução de Bbl1 após a eluição em DEAE-celulose foi 200 mL. Demais informações estão contidas em Material e Métodos 3.3.6. para o procedimento de purificação.

Parâmetros	Α	В	С	D
Atividade total de Bbl1 (10 <sup>3</sup> , U)	33,92 ± 0,88	12,96 ± 0,22	10,18 ± 0,99	9,13 ± 0,21
Quantidade de proteínas extracelulares (mg)	116,55 ± 3,85	18,25 ± 1,10	13,37 ± 0,20	$13,58 \pm 0,40$
Atividade específica de Bbl1 (U.mg <sup>-1</sup> )*	291,03 ± 12,22	$710,14 \pm 44,47$	761,41 ± 74,91	672,31 ± 25,12
Recuperação (%)	100	38,21 ± 1,18	30,01 ± 3,02	$26,92\pm0,93$
Fator de purificação	1	$2,\!44\pm0,\!18$	$2,\!62\pm0,\!28$	2,31 ± 0,13

\*Os valores de atividade específica não respeitaram o modelo do estado estacionário (BISSWANGER 2002); os valores contidos na tabela apenas informam a eficiência do processo de purificação.



**Figura 28 - Perfil proteico das etapas de purificação de Bbl1. Raias: (A)** após concentração, diálise e equilíbrio com 30.000MMWC; (**B**) após eluição de Octyl-Sepharose com Triton X-100 0,5%; (**C**) após eluição de DEAE-celulose com gradiente linear de NaCl até 1,5 M e (**M**) marcador de massa molecular. Para cada raia utilizou-se 20 µg de proteína das soluções obtidas em cada etapa. A seta indica banda correspondente à Bbl1. Gel de poliacrilamida (12%) corado com método de prata. Demais informações estão contidas em Material e Métodos 3.3.6. para descrição do processo de purificação; 3.2.4. para eletroforese de proteínas; e 3.2.5. para coloração de prata.

## 4.4. Caracterização bioquímica de Bbl1 purificada utilizando pNPP como substrato

## 4.4.1. Efeito e estabilidade de surfactantes na atividade de Bbl1

A solução de Bbl1 purificada foi diluída 50 vezes em tampão McIlvaine pH 6,0 e adicionou-se surfactantes, cuja concentração final foi de 0,1%. A solução Triton X-100 e goma arábica foi montada com concentração finais de 0,1% e 0,05%. O efeito de cada surfactante foi comparado em relação a uma solução controle que não houve adição de surfactantes. O Triton X-100, com ou sem goma arábica, e ambos os tipos de Tween intensificaram a atividade de Bbl1. Pôde-se observar, entretanto, que o SDS e o CTBA inibiram a hidrólise de *p*NPP (Figura 29a). O maior ganho foi observado nas soluções reacionais com presença do Triton, já que sua atividade foi 1,6 vezes maior em comparação ao controle. A goma arábica não interferiu significativamente na atividade desta enzima nas soluções com Triton; visto que as misturas Triton X-100 com ou sem goma arábica, não apresentaram diferenças na atividade de lipase.

Apesar do efeito estimulatório proporcionado pelo Triton X-100, seu contato com a enzima ao longo de 24 horas reduziu a atividade de lipase em relação ao tempo inicial, indicando perda de 60% de atividade (Figura 29b). O SDS e CTBA desnaturaram

completamente a enzima visto que não foi registrada atividade residual após 24 horas. Já Tween-20 e -80 possibilitaram um ganho de, respectivamente, 18% e 33% nesta solução de Bbl1.

Esses resultados mostram que se o intuito for a dosagem da hidrólise de pNPP, a presença de Triton em solução aumenta o limite de detecção do método, possibilitando identificar atividade de Bbl1 em amostras mais diluídas. Entretanto, se o objetivo for a realização de longos períodos de hidrólise, o uso de Tween garante mais estabilidade à enzima, potencializando seu uso por mais tempo.



**Figura 29 - Efeito de surfactantes sobre atividade e estabilidade de Bbl1. (a)** Efeitos estimulatórios ou inibitórios de diferentes surfactantes adicionados no momento de hidrólise de *p*NPP, em tampão McIlvaine pH 6,0. A concentração final de cada surfactante foi de 0,1%, para solução com goma arábica, 0,05%. A reação de hidrólise procedeu-se com 12 mM de *p*NPP, a 60°C e durante 5 minutos, cujo volume final de reação foi 0,5 mL.(b) Estabilidade de Bbl após 24 horas de contato com diferentes surfactantes. A solução final, mantida em temperatura ambiente para o estudo de estabilidade a surfactantes, continha 2 mL de tampão McIlvaine pH 6,0 com 185 µg.mL<sup>-1</sup> de Bbl1 e 0,5% de surfactante. Valores sobre as barras representam o ganho ou perda de atividade de lipase após 24 horas, em relação ao tempo inicial. **Surfactantes:** (A) Tween-20; (B) Tween-80; (C) Triton X-100; (D) Triton X-100 + goma arábica; (E) SDS; (F) CTBA e (G) solução sem adição de surfactante. Símbolos de significância representam a comparação de cada condição em relação a solução sem adição de surfactante por ANOVA. **Símbolos:** (\*) *p* < 0,05; (\*\*) *p* < 0,01 e (\*\*\*) *p* < 0,001. Demais informações estão contidas em Material e Métodos 3.3.7. para descrição deste experimento; e 3.2.1. para hidrólise de *p*NPP.

### 4.4.2. Efeito de sais e 2-mercaptoetanol na atividade de Bbl1

Observou-se que nenhum íon, nas concentrações de 1 mM e 5 mM, promoveu inibição ou ativação de Bbl1 (p > 0,05; ANOVA). Os valores de atividade enzimática aos diferentes sais foram comparados a duas amostras controles: controle positivo, solução de Bbl1 dialisada com EDTA e sem adição de sal; e controle negativo, solução de Bbl1 não submetida à diálise com EDTA e sem adição de sal (Figura 30). Como nenhuma diferença foi observada entre os controles, provavelmente é um indício que não existe cofator iônico em Bbl1.

Todas essas reações foram executadas em tampão McIlvaine pH 6,0, portanto, questionou-se se os íons constituintes do tampão (fosfato, citrato e sódio) estariam influenciando sobre o resultado observado. Para tal, a amostra Bbl1 dialisada com EDTA 100 mM foi usada na hidrólise de *p*NPP com tampão McIlvaine pH 6,0, em comparação a mesma reação em tampão acetato 100 mM pH 6,0 e uma amostra sem tampão. Nenhuma diferença, entre as condições, foi observada (Tabela 6; p > 0,05; ANOVA). Desse modo acreditou-se que os íons citrato, fosfato e acetato não interferiram diretamente na atividade de hidrólise por Bbl1; visto que a substituição do tampão McIlvaine, cujos íons constituintes são citrato, fosfato e sódio, pelo tampão acetato, em comparação à reação sem tampão, não promoveu alterações na atividade de hidrólise de *p*NPP por Bbl1.

Em seguida, o mesmo planejamento utilizado para averiguar o efeito de sais e 2mercaptoetanol foi executado, porém em tampão acetato 100 mM pH 6,0: apenas o sal Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>).3H<sub>2</sub>O apresentou efeito inibitório, com uma redução de aproximadamente 80% da atividade em relação ao controle negativo (dados não mostrados). Em seguida, realizou-se essa mesma reação em tampão acetato com Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>).3H<sub>2</sub>O 5 mM, adicionando sais de fosfato ou citrato. Verificou-se que apenas as soluções contendo citrato 100 mM apresentaram valores de atividade enzimática semelhantes ao observado em tampão McIlvaine (Figura 31). Isso indica que; apesar do citrato não intervir diretamente sobre a hidrólise de *p*NPP ele impediu o efeito inibitório de íons Pb sobre a hidrólise de *p*NPP. Tal efeito de inibição não pode ser atribuído ao acetato pois foi demonstrando, pela tabela 6, que o tampão acetato de sódio 100 mM não reduziu a atividade de Bbl1 em relação à mesma reação de hidrólise em tampão McIlvaine.



**Figura 30 - Efeito de sais e 2-mercaptoetanol sobre atividade de Bbl1.** Diferentes sais e 2-mercaptoetanol foram adicionados no momento da reação de hidrólise de *p*NPP, em tampão McIlvaine pH 6,0, sob diferentes concentrações; (**a**) 1 mM e (**b**) 5 mM. A reação de hidrólise procedeu-se com 12 mM de *p*NPP, a 60°C e durante 5 minutos, cujo volume final de reação foi 0,5 mL. A solução estoque de Bbl1 utilizada na reação de hidrólise com os diferentes sais ou 2-mercaptoetanol foi previamente dialisada com EDTA 100 mM e diluída em tampão McIlvaine pH 6,0 à concentração de 185 µg.mL<sup>-1</sup>. Expressou-se o valor de atividade enzimática de cada condição em relação ao valor de atividade enzimática observada no controle negativo; cuja solução de Bbl1 não foi dialisada em EDTA 100 mM e não se adicionou sal no momento da reação. Controle positivo corresponde a solução de Bbl1 previamente dialisada em EDTA 100 mM. O valor de atividade enzimática no controle negativo foi de 34,42  $\pm$  1,62 para **figura (a**), e 33,63  $\pm$  1,41 para **figura (b**). Demais informações em Material e Métodos 3.3.8. para procedimento desse experimento; e 3.2.1. para hidrólise de *p*NPP.

Tabela 6: Hidrólise de *p*NPP por Bbll1 em tampão McIlvaine, acetato ou na ausência de tampão. Para as soluções tampão, foram mantidos valores de pH 6,0 e concentração de 100 mM. A solução reacional sem tampão estava em pH neutro na água. A reação procedeu-se com 12 mM de *p*NPP, volume final de 0,5 mL, 5 minutos de reação e a 60°C. As soluções estoque de Bbl1 foram previamente dialisadas em EDTA 100 mM e diluídas em tampão McIlvaine pH 6,0, ou tampão acetato pH 6,0, 100 mM, ou em água destilada. A concentração final das soluções estoque foram de 185  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Demais informações em Material e Métodos 3.3.8. para procedimento desse experimento; e 3.2<u>.1. para hidrólise de *p*NPP.</u>

Condição	Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )
Tampão McIlvaine	$32,98 \pm 0,97$
Tampão acetato 100 mM	$34,54 \pm 1,04$
Sem tampão	$32,67 \pm 1,31$



**Figura 31 - Hidrólise de** *p***NPP na presença do sal Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>).3H<sub>2</sub>O, sob diferentes condições.** A reação procedeu-se com 12 mM de *p*NPP, volume final de 0,5 mL, 5 minutos de reação, pH 6,0 e a 60°C. A concentração de Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>).3H<sub>2</sub>O na reação de hidrólise foi 5 mM. A solução estoque de Bbl1 utilizada na reação foi previamente dialisada em EDTA 100 mM e diluída em tampão acetato pH 6,0, 100 mM à concentração de 185 µg.mL<sup>-1</sup>. **Cada coluna representa uma condição à hidrólise de** *p***<b>NPP: (A)** tampão acetato de sódio 100 mM; **(B)** tampão acetato de sódio 100 mM com sal de fostato de sódio na concentração de 200 mM; e **(C)** tampão acetato sódio 100 mM com sal citrato de sódio na concentração de 200 mM. O valor de atividade de Bbl1, em cada condição, foi expressa em razão ao valor de atividade de Bbl1 dialisada em EDTA 100 mM e diluída em tampão McIlvaine pH 6,0. O símbolo de significância representa a diferença entre as condições avaliadas por ANOVA; sendo (\*\*\*) *p* < 0,001. Demais informações em Material e Métodos 3.3.8. para procedimento desse experimento; e 3.2.1. para hidrólise de *p*NPP.

#### 4.4.3. Estabilidade de Bbl1 em solventes orgânicos

A Bbl1 purificada foi diluída em diferentes solventes na proporção 1:1 e mantidas a 25°C durante 24 horas. A atividade de hidrólise relativa, em relação à antes da mistura com o solvente, foi usada como parâmetro de verificar a estabilidade. O ciclohexano potencializou em 14%, enquanto os demais solventes diminuíram sua integridade. A maior perda foi com o butanol, n-propanol e iso-propanol em quase 100%. O etanol propiciou perda de 61% da atividade inicial enquanto o metanol apenas 21%, sendo a menor neste estudo (Figura 32). A solução controle, com adição de tampão McIlvaine pH 6,0 ao invés de solvente, indica que não há perda de atividade pelas condições deste experimento.



**Figura 32 - Estabilidade da atividade de Bbl1, em diferentes solventes.** As soluções de Bbl1 foram diluídas em 1 mL de tampão McIlvaine e 1 mL de solvente orgânico, cuja concentração final de Bbl1 foi 185 µg.mL<sup>-1</sup>. Uma solução com adição de tampão McIlvaine, ao invés de solvente, foi utilizada como controle. Tais soluções foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. A reação de hidrólise foi com 12 mM de *p*NPP em tampão McIlvaine, pH 6,0, 5 minutos de reação, e volume final de 0,5 mL. Valores sobre as barras representam o ganho ou perda após 24 horas, em relação ao tempo inicial. Símbolos de significância representam a comparação de cada condição em relação a solução controle por ANOVA; sendo estes: (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,01 e (\*\*\*) p < 0,001. **Os solventes utilizados foram: (A)** solução controle; **(B)** ciclohexano; **(C)** acetato de etila; **(D)** metanol; **(E)** etanol; **(F)** *n*-propanol; **(G)** iso-propanol; **(H)** *n*-butanol; **(I)** DMSO e **(J)** acetona. Demais informações em Material e Métodos 3.3.9. para procedimento desse experimento; e 3.2.1. para hidrólise de *p*NPP.

## 4.4.4. Estabilidade térmica de Bbl1

Uma solução de Bbl1 purificada foi mantida em diferentes temperaturas por 48 horas (Figura 33).

Notou-se que Bbl1 foi mais estável nas temperaturas de 30°C a 60°C em relação às temperaturas de 70°C e 80°C. A maior estabilidade, ao final de 48 horas, foi registrada em 40°C com 42% da atividade inicial, seguida de 40% em 50°C.

Ao longo das primeiras 8 horas, a enzima foi mais estável em 40°C e 50°C em relação a 30°C e 60°C. Para os instantes de 2, 4 e 8 horas, em 30 °C e 60°C, as atividades remanescentes foram, aproximadamente e respectivamente, 90%, 60% e 58%. Em contrapartida, em 40°C e 50°C, respectivamente 100%, 95% e 64%.

Em 70°C, a partir de 4 horas, todas as atividades relativas foram menores em relação às temperaturas de 30°C a 60°C. Em 48 horas a atividade relativa foi 25%. Já em 80°C ocorreu a desnaturação completa de Bbl1 a partir de 8 horas.



**Figura 33 - Estabilidade de Bbl1 em diferentes temperaturas.** Para cada temperatura, diluiu-se Bbl1 em tampão McIlvaine pH 6,0, cuja concentração de enzima e volume de solução finais foram 185 µg.mL<sup>-1</sup> e 2 mL, respectivamente. Periodicamente, quantificou-se a capacidade de hidrólise de Bbl1, submetida em cada temperatura, com 12 mM de *p*NPP em tampão McIlvaine, pH 6,0, com 5 minutos de reação, em volume final de 0,5 mL e a 60°C. Valores expressos em relação à atividade de Bbl1 no tempo inicial do experimento. O valor de 100% de atividade relativa é correspondente a diluição da Bbl1 purificada que é 186,2 U. **Temperaturas avaliadas:** 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. **Períodos avaliados:** 2, 4, 8, 24 e 48 horas. **Legendas:** (•) 30°C; (•) 40°C; (•) 50°C; (□) 60°C; (▲) 70°C e (△) 80°C. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.12. para esse experimento; e 3.2.1. para hidrólise de *p*NPP.

Com o perfil de estabilidade foram determinados os valores de  $t_{50}$  e  $k_{desn}$  para cada temperatura (Tabela 7). O  $t_{50}$  corresponde ao tempo necessário para que 50% da atividade se mantenha. A constante  $k_{desn}$  corresponde a constante da desnaturação de uma proteína, indicando o número de mol de enzima desnaturada por mol de enzima nativa, por uma unidade de tempo. Esses dados indicam que em 40°C a enzima mantém por mais tempo sua atividade e um menor número de moléculas de Bbl1 são desnaturadas por segundo.

**Tabela 7 - Valores de t**<sub>50</sub> **e k**<sub>desn</sub> **de Bbl1, em diferentes temperaturas.** Esses valores foram obtidos a partir do estudo de estabilidade de Bbl1, com solução de 185 µg.mL<sup>-1</sup> de Bbl1 em tampão McIlvaine pH 6,0. **Temperaturas avaliadas:** 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Os valores de t<sub>50</sub> e k<sub>desn</sub> foram determinados conforme PRAJAPATI et al. (2013) e, CHAPLIN e BUCKE (1990). Demais informações descritas em Material e Métodos 3.3.12. para esse experimento.

	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
t <sub>50</sub> (h)	11,81 ± 0,26	22,33 ± 0,44	14,55 ± 0,70	10,04 ± 0,81	5,34 ± 0,60	< 2*
$k_{desn}(10^{-5}, s^{-1})$	$1,\!63\pm0,\!09$	$0,\!86\pm0,\!05$	$1,\!32\pm0,\!09$	$1,\!92\pm0,\!13$	3,60 ± 0,31	> 9,62*

\* sinal de maior (>) ou menor (<) indica a impossibilidade de determinar com exatidão visto à limitação dos períodos avaliados.

A partir das constantes de  $k_{desn}$ , uma relação linear e semi-recíproca entre temperatura e logaritmo natural da  $k_{desn}$ , para as temperaturas de 40°C a 70°C, permitiu determinar a  $E_{a(d)}$  que corresponde a energia de ativação na reação que exprime a conversão de enzimas nativas para enzimas desnaturadas (Figura 34). Seu valor de  $E_{a(d)}$  foi 40,13 ± 3,92 kJ.mol<sup>-1</sup>. As temperaturas de 30 e 80°C foram desconsideradas visto que promoveram desvio na relação linear de Arrhenius.



**Figura 34 - Relação linear semi-recíproca entre temperaturas e logaritmo natural das respectivas constantes k**<sub>desn</sub>. Temperaturas utilizadas: 40, 50, 60 e 70°C; foram convertidas à razão inversa de seu valor em Kelvin ( $10^{-3}$ , K<sup>-1</sup>), 3,19; 3,09; 3,00; e 2,91, respectivamente. As temperaturas de 30 e 80°C foram desconsideradas por induzir desvio na relação linear. A equação gerada corresponde a função de Arrhenius (PRAJAPATI et al., 2013) na qual 3,72 indica a constante de Arrhenius, e 4,82 o coeficiente angular da reta. Esse coeficiente angular é definido pela razão entre  $E_{a(d)}$  e a constante natural dos gases, R. Essa relação linear apresentou um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,97. Demais informações descritas em Material e Métodos 3.3.12. para esse experimento.

## 4.4.5. Estabilidade de Bbl1 em diferentes pH

Quanto à estabilidade em pH, a Bbl1 apresentou, aproximadamente, as mesmas perdas de atividade em todos os valores estudados. A menor estabilidade foi registrada em pH 10 que, após 48 horas, registrou-se 31% de atividade residual enquanto os demais pH foram de, aproximadamente, 40%. Além disso notou-se que em pH 7,0, no período de 3 horas, a atividade residual foi superior em relação aos demais pH (Figura 35).

Com o perfil de estabilidade, determinou-se o valor de  $t_{50}$  para cada pH, sendo o maior valor registrado no pH 7,0, seguido do pH 8,0 e 9,0, com respectivamente 19, 17 e 16 horas (Tabela 8).



**Figura 35 - Estabilidade de Bbl1 em diferentes pH.** Diluiu-se Bbl1 em tampão McIlvaine para os pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8, e em tampão glicina 200 mM para os pH 9 e 10, cuja concentração de enzima e volume de solução finais foram 185 µg.mL<sup>-1</sup> e 2 mL, respectivamente. A solução de cada pH foi mantida a 40°C. Periodicamente, quantificou-se a capacidade de hidrólise de Bbl1, submetida em cada pH, com 12 mM de *p*NPP em tampão McIlvaine, pH 6,0, com 5 minutos de reação, em volume final de 0,5 mL e a 60°C. Valores expressos em relação à atividade de Bbl1 no tempo inicial do experimento. O valor de 100% de atividade relativa é correspondente a diluição da Bbl1 purificada que é 186,2 U. **pH avaliados:** 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. **Períodos avaliados:** 1, 2, 3, 6, 24 e 48 horas. **Legendas:** (•) pH 3,0; (•) pH 4,0; (•) pH 5,0; (□) pH 6,0; (▲) pH 7,0; (△) pH 8,0; (♦) pH 9,0 e (♦) pH 10,0. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.13. para esse experimento; e 3.2.1. para hidrólise de *p*NPP.

**Tabela 8 - Valores de t**<sub>50</sub> **de Bbl1, em diferentes pH.** Esses valores foram obtidos a partir do estudo de estabilidade, com solução de 185  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de Bbl1 em tampão McIlvaine para os pH 3 a 8, e glicina 200 mM para os pH 9 e 10, cujo volume final foi de 2 mL. **pH avaliados:** 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. As soluções de Bbl1 em cada pH foram mantidas em 40°C em diferentes tampões. Demais informações estão contidas em Material e Métodos 3.3.13. para descrição desse experimento.

	рН 3	рН 4	рН 5	pH 6	pH 7	pH 8	рН 9	pH 10
t <sub>50</sub> (h)	$10 \pm 1$	$10 \pm 1$	$11 \pm 1$	$12 \pm 1$	$19\pm2$	$17 \pm 1$	$16 \pm 1$	$8 \pm 1$

## 4.4.6. Otimização da temperatura e pH por planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta

Os valores de pH e temperatura influenciam sobre a estrutura de proteínas, portanto, alteram sua atividade e função. Esses dois parâmetros foram avaliados por meio de planejamento experimental. O intuito foi verificar a intensidade e se essas variáveis afetam,

conjuntamente, a hidrólise de *p*NPP por Bbl1. Para o estudo, utilizou-se o intervalo de temperatura de 31,8°C a 88,2°C, e o pH; 3,18 até 8,82. Todas as reações foram com 12 mM de *p*NPP em volume final de 0,5 mL por 5 minutos de reação. A tabela 9 indica as atividades enzimáticas obtidas nesse experimento.

**Tabela 9 - Planejamento de experimentos para avaliar o efeito da temperatura e pH sobre a atividade de hidrólise de** *p***NPP de Bbl1.** Hidrólise de 12 mM de *p*NPP, com 5 minutos de reação e volume final de 0,5 mL, utilizando uma solução de Bbl1, cuja concentração foi 185 µg.mL<sup>-1</sup>, em água destilada. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.14. para descrição do planejamento experimental.

Ensaios	Temperatura (°C)	рН	Valores observados (U.mL <sup>-1</sup> )
1	40 (-1)	4 (-1)	51,16
2	40 (-1)	8 (1)	61,46
3	80 (1)	4 (-1)	45,18
4	80 (1)	8 (1)	34,53
5	31,8 (-1,41)	6 (0)	58,99
6	88,2 (1,41)	6 (0)	38,51
7	60 (0)	3,18 (-1,41)	39,92
8	60 (0)	8,82 (1,41)	36,06
9	60 (0)	6 (0)	80,42
10	60 (0)	6 (0)	73,63
11	60 (0)	6 (0)	72,69

Os valores codificados das variáveis estão entre parênteses.

Foi feita ANOVA para o modelo de segunda ordem. O nível de significância por meio de  $F_{calc}$  está na tabela 10. Nessa tabela, Temp e pH correspondem aos valores codificados da temperatura e pH, respectivamente.

**Tabela 10 - ANOVA para o planejamento experimental de segunda ordem da hidrólise de** *p***NPP por Bbl1.** O nível de confiança desse experimento foi 99%. Dados obtidos a partir do programa Statisica v. 11.0. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.14. para o planejamento experimental.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F <sub>calculado</sub> QM <sub>R</sub> /QMr	F <sub>tabelado</sub> GLR,GLr	Equação
	Regressão (R)	2539,19	3	846,40	310,96	8,45 (F99%; 3,7)	
Segunda ordem	Resíduo (r)	199,14	7	28,45			= 75,58 – 7,73(Temp) –
	Total (T)	2738,33	10				12,24(Temp) <sup>2</sup> – 17,62(pH) <sup>2</sup>
	$\mathbb{R}^2$	0,93					

Foi observado que o modelo de segunda ordem corroborou com os dados obtidos, já que o F<sub>calc</sub> foi 36,8 vezes maior que o F<sub>tabelado</sub> para 99% de intervalo de confiança. O coeficiente de determinação foi 0,93 para este modelo. Observou-se que o pH não interferiu linearmente na atividade de hidrólise. Todavia, a relação quadrática do pH foi o efeito que mais interferiu. A temperatura influenciou em Bbl1, visto que suas relações linear e quadrática estão presentes no modelo. O gráfico de Pareto (Figura 36a) indica esses efeitos mencionados. A figura 36b indica a superfície de resposta dada pelo modelo de segunda ordem.

Com esse modelo verificou-se que a atividade máxima esperada de hidrólise de *p*NPP por Bbl1 foi de 79,71  $\pm$  7,12 U.mL<sup>-1</sup>. Esse valor corresponde à solução purificada obtida em resultado 3.3.6. Partindo-se do volume desta solução de Bbl1 purificada (200 mL), pôde-se concluir que o planejamento aumentou 1,75 vezes a atividade de hidrólise por Bbl1. Os valores de temperatura e pH ótimos são, respectivamente, 53,6°C (-0,32) e 6,04 (0,02). Por causa disso, esses valores de temperatura e pH ideais passaram a serem utilizados para mensurar atividade de Bbl1 nos estudos de cinética, imobilização e estabilidade de derivados



**Figura 36 - Planejamento fatorial da hidrólise de** *p***NPP por Bbl1 não-imobilizada.** (a) Representação gráfica de Pareto dos efeitos estudados sobre a atividade de hidrólise por Bbl1 e (b) superfície de resposta obtida do modelo de segunda ordem. O intervalo de confiança utilizado foi de 99%. O valor máximo esperado para hidrólise de *p***NPP**, partindo-se da solução obtida na purificação desta enzima (seção 3.3.6.), foi 79,71  $\pm$  7,12 U.mL<sup>-1</sup>, cujos valores de pH e temperatura ideias foram 6,04 e 53,6 °C, respectivamente. Demais informações em Material e Métodos 3.3.14. para descrição do planejamento experimental.

# 4.4.7. Efeito da concentração de substrato e energia de ativação da atividade de hidrólise de *p*NPP por Bbl1, em comparação à enzima comercial Palatase<sup>®</sup> (Novozymes)

Em reações catalisadas por enzimas, além da estabilidade e otimização, os parâmetros cinéticos precisam ser elucidados para verificar a rentabilidade e perfil na produção de produtos,

ou consumo de reagentes ao longo da reação. Muitas enzimas podem ser estáveis e apresentar melhoria quanto a sua atividade após a otimização, entretanto isso não significa que a *eficiência* e a *taxa na conversão* de substratos para produtos são melhores.

Em vista disso, avaliou-se o perfil cinético de Bbl1 em relação à enzima comercial Palatase. Em primeiro lugar, purificou-se a lipase de *Rhizomucor miehei* de uma amostra de Palatase<sup>®</sup> 20.000L. Obteve-se uma solução de 200 mL de lipase purificada em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, cuja atividade específica foi 264,10  $\pm$  85,05 U.mg<sup>-1</sup>. A hidrólise de *p*NPP por Palatase foi feita em pH e temperatura de acordo com o fabricante.

Foram observadas curvas de saturação de *p*NPP na atividade hidrolítica de Bbl (Figura 37a) e Palatase (Figura 37b).



Figura 37 - Efeito da concentração do substrato *p*NPP sobre a atividade hidrolítica de Bbl1 e lipase obtida da Palatase<sup>®</sup> 20.000L (Novozymes). (a) Bbl1 e (b) Palatase. A hidrólise de *p*NPP, para ambas lipases, foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional e 5 minutos de reação. Para Bbl1 foi usada temperatura de 54°C e para lipase da Palatase, 40°C. As concentrações de Bbl1 e Palatase utilizadas no momento de reação foram 9 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 x  $10^{-2}$  mg.mL, respectivamente. As concentrações de *p*NPP utilizadas foram: 0,24 – 5,01 mM. Os coeficientes de determinação foram de 0,987 e 0,977 para as Bbl1 e Palatase, respectivamente. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.15. para a análise dos dados cinéticos; e nos ANEXOS D e E para determinação da concentraçõe e tempo de reação aos estudos cinéticos.

Para Bbl1 a  $V_{máx} = 5367 \pm 188 \text{ U.mg}^{-1}$  e  $K_{0,5} = 0,92 \pm 0,15 \text{ mM}$  e, para Palatase a  $V_{máx}$ = 2097 ± 66 e  $K_{0,5} = 1,57 \pm 0,17 \text{ mM}$ . Segundo o software GraphPad Prism 6.0, a curva obtida para Bbl1 apresentou coeficiente de hill igual a 1,83 ± 0,19, indicando que a saturação de substrato não foi de acordo com modelo matemático de Michaelis-Menten, mas sim sigmoidal. A tabela 11 resume os parâmetros cinéticos utilizando *p*NPP para Bbl1 e Palatase.

**Tabela 11 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de** *p***NPP pelas lipases Bbl1 e da Palatase**<sup>®</sup> **20.000L** (**Novozyme**). A hidrólise de *p*NPP, para ambas lipases, foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional e 5 minutos de reação. Para Bbl1 foi usada temperatura de 54°C e para lipase da Palatase, 40°C. As concentrações de Bbl1 e Palatase utilizadas no momento de reação foram 9 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 x  $10^{-2}$  mg.mL, respectivamente. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.15. para a análise dos dados cinéticos; e no ANEXOS D e E para determinação da concentração e tempo de reação aos estudos cinéticos.

Lipase	$V_{máx}$ (U.mg <sup>-1</sup> )	$\mathbf{k}_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5</sub> (mM)	$k_{cat}/K_{0,5} \ (mM^{-1}s^{-1})$	hill
Bbl1	$5367 \pm 188$	$4367\pm233$	$0,\!92\pm0,\!15$	$4746\pm360$	$1,\!83\pm0,\!19$
Palatase	$2097\pm 66$	$1020\pm53$	$1,\!57\pm0,\!17$	$657 \pm 28$	1

O *turnover* ( $k_{cat}$ ) de *p*NPP, quando saturante na solução, foi cerca de 4,3 vezes maior para Bbl1. Em concentrações próximo ao  $K_{0,5}$  a eficiência de utilização do substrato ( $k_{cat}/K_{0,5}$ ) foi 7,2 vezes maior para Bbl1.

Foram determinados os valores de  $k_{cat}$  para hidrólise de *p*NPP em diferentes temperaturas para Bbl1 e Palatase (ANEXOS F e G). Determinou-se, a partir disso, a relação linear semi-recíproca entre o logaritmo natural de  $k_{cat}$  e o inverso da temperatura (Figura 38). Essa relação permite predizer a energia de ativação (E<sub>a</sub>) da hidrólise de *p*NPP catalisada pelas enzimas (JANICE, 1979; PRAJAPATI et al., 2013; SOLAESA et al., 2016; SOSE et al., 2017). A E<sub>a</sub> corresponde a barreira do estado energético na conversão do *p*NPP em ácido palmítico e *p*-nitrofenol, quando catalisada pelas lipases. Essa energia para reação catalisada por Bbl1 foi de 47,89 ± 6,32 kJ.mol<sup>-1</sup> e para Palatase de 157,63 ± 14,23 kJ.mol<sup>-1</sup>. A existência da concavidade (em forma de "sino") nos valores observados indica que, a partir de uma dada temperatura, a desnaturação térmica da enzima prevaleceu a partir de 60°C e 50°C para Bbl1 e Palatase, respectivamente.



**Figura 38 - Relação linear semi-recíproca entre temperaturas e logaritmo natural das respectivas constantes k**<sub>cat.</sub> (a) Bbl1 e (b) Palatase. Temperaturas utilizadas: 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75 °C; foram convertidas à razão inversa de seu valor em Kelvin (10<sup>-3</sup>, K<sup>-1</sup>), 3,19; 3,14; 3,09; 3,04; 3,00; 2,95; 2,91; e 2,87, respectivamente. A equação linear corresponde a função de Arrhenius (PRAJAPATI et al., 2013), cujo coeficiente angular é definido pela razão entre energia de ativação para hidrólise de *p*NPP (E<sub>a</sub>) e a constante natural dos gases (R). Essas relações apresentaram coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,95 e 0,98 para Bbl1 e Palatase, respectivamente. A reação de hidrólise foi com 3 mM de *p*NPP, para ambas lipases, foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional e 5 minutos de reação. As concentrações de Bbl1 e Palatase utilizadas no momento de reação foram 9 x 10<sup>-5</sup> mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 x 10<sup>-2</sup> mg.mL, respectivamente. Legendas: (•) e (▲) indicam os valores observados para Bbl1 e Palatase, respectivamente. (○) e (△) são os valores teóricos de k<sub>cat</sub> caso não houvesse efeito de desnaturação térmica. As equações foram determinadas a partir dos pontos (•) e (▲) anteriores à prevalência da desnaturação térmica. Demais informações descritas em Material e Métodos 3.3.15. para esse experimento.

## 4.4.8. Inibição da hidrólise de pNPP por ácidos oleico e linoleico na hidrólise de pNPP

Os ácidos oleico e linoleico foram inibidores da hidrólise de *p*NPP catalisada pela Bbl1 (Figura 39). Os CI<sub>50</sub>, constante que indica a concentração do inibidor para retenção de 50% da atividade enzimática inicial, para o ácido oleico foi de  $3,52 \pm 0,09$  mM e linoleico,  $1,89 \pm 0,14$  mM.


**Figura 39 - Determinação de CI**<sub>50</sub> **para inibidores de ácido graxos.** (a) Ácido oleico e (b) ácido linoleico. Concentrações de ácido oleico utilizadas: 0,10 - 9,09 mM. Concentrações de ácido linoleico utilizadas: 0,10 - 6,52 mM. A reação de hidrólise foi com 12 mM de *p*NPP, em tampão McIlvaine pH 6,0, com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e a 54 °C. A concentração de Bbl1 no momento de reação foi 9 x 10<sup>-5</sup> mg.mL<sup>-1</sup>. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.16. para esse experimento.

Em seguida avaliou-se os parâmetros cinéticos ( $V_{máx}$  e K<sub>0,5</sub>), sob condições saturantes de *p*NPP, utilizando diferentes concentrações de ácido oleico ou linoleico. Para fins de normatização, a concentração de 12 mM de *p*NPP não promoveu inibição na atividade de *p*NPP, ou seja, não houve inibição por substrato; entretanto, concentrações de substrato acima deste valor promoveram aumento de turbidez do meio reacional, propiciando erros experimentais (dados não mostrados). Ao ácido oleico, notou-se diminuição da V<sub>máx</sub> em 34, 42 e 48% nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, respectivamente (Tabela 12), em relação ao meio reacional ausente de inibidor. Já na presença de ácido linoleico, nessa mesma ordem de concentração, a perda de V<sub>máx</sub> foi 24%, 30% e 53%.

Nenhuma diferença significativa emergiu entre os valores de  $K_{0,5}$  em ambos inibidores. Nesse caso, assumiu-se que a inibição da hidrólise de *p*NPP, descrita nessas condições experimentais, foi análoga a do tipo não-competitiva (Figura 40).



**Figura 40 - Efeito da concentração do substrato** *p***NPP sobre a atividade hidrolítica de Bbl1 na presença de inibidores. (a)** presença de ácido oleico e (b) ácido linoleico. A hidrólise de *p*NPP, para ambas lipases, foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação, e a 54 °C. A concentração de Bbl1 e utilizada no momento de reação foi 9 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>. As concentrações de *p*NPP utilizadas foram: 0,24 – 5,01 mM. Legendas: (•) sem inibidor; (•) 0,5 mM de inibidor; (•) 1,0 mM de inibidor e (□) 2,0 mM de inibidor. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.16. para esse experimento de inibição.

Inibidores	Concentração (mM)	V <sub>máx</sub> (U.mg <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5</sub> (mM)
	0	$5493 \pm 86$	$0,94\pm0,17$
Ácido	0,5	$3629\pm79$	$1,\!12\pm0,\!09$
oleico	1,0	$3154\pm50$	$1,\!02\pm0,\!11$
	2,0	$2566\pm63$	$1,\!05\pm0,\!10$
ANOVA		< 0,001	> 0,05
	0	$5509 \pm 115$	$0,\!93\pm0,\!04$
Ácido	0,5	$4191\pm55$	$0,\!92\pm0,\!02$
linoleico	1,0	$3831 \pm 156$	$0,95\pm0,09$
	2,0	$2888 \pm 119$	$1,\!03\pm0,\!08$
ANOVA		< 0,001	> 0,05

**Tabela 12 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de** *p***NPP por Bbl1 na presença de diferentes concentrações de ácidos oleico e linoleico.** A hidrólise de *p***NPP** foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e a 54°C. A concentração de Bbl1 no momento da reação foi 9 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>. O ANOVA permite observar diferenças significativas entre os valores de V<sub>máx</sub> e K<sub>0,5</sub> das diferentes concentrações de inibidor. Nível de significância utilizado; 95%. Demais informações em Material e Métodos 3.3.16. para esse experimento.

# 4.5. Caracterização bioquímica de Bbl1 imobilizada utilizando pNPP como substrato

# 4.5.1. Imobilização de Bbl1 em diferentes suportes

Esse experimento iniciou-se com a mistura de 2g de suporte em uma solução do extrato bruto do crescimento de  $A_{bbl1+}$  em biorreator contendo 435 U totais de hidrólise de *p*NPP por Bbl1. A agarose não-ativada correspondeu ao controle experimental, permitindo verificar se

Bbl1 é estável nas condições de pH e temperatura utilizadas no curso da imobilização. Nesse suporte esperou-se que nenhuma enzima ficasse imobilizada, já que a agarose inerte pouco interage com proteínas.

Verificou-se que em todos os suportes, com exceção do Phenyl-Sepharose, a retenção de Bbl1 do extrato bruto foi, aproximadamente, 100% após 24 horas de imobilização (Tabela 13). Entretanto, apenas no suporte de Octy-Sepharose a atividade relativa, em relação aos 435 U totais iniciais, foi superior a 100%. Esse acréscimo aproximado de 23% indicou um fenômeno de hiperativação após a imobilização de Bbl1. A atividade específica neste suporte foi de 241,3  $\pm$  4,9 U.g<sup>-1</sup> de suporte. O suporte de agarose não-ativada permitiu verificar que Bbl1 foi estável nas condições de pH e temperatura utilizada neste experimento, visto que a atividade relativa do sobrenadante foi próximo de 96% em relação a atividade total inicial.

O suporte de Phenyl-Sepharose, além de reter a menor porcentagem de atividade (78,5% do inicial), exibiu a maior perda de imobilizado o que indicou menor estabilidade neste suporte, visto que apenas 2,8% da atividade inicial foi mantida.

**Tabela 13 - Parâmetros de imobilização de Bbl1 após 24 horas.** Reação de imobilização consistiu na mistura de 2 g de suporte com 435 U totais de hidrólise de *p*NPP, provenientes do extrato bruto do crescimento de  $A_{bbl1+}$  em biorreator. A reação de hidrólise foi com 12 mM de *p*NPP em tampão McIlvaine pH 6,0, 0,5 mL de volume reacional, 5 min de reação e a 54°C. Agarose não-ativada correspondeu ao controle de imobilização. Demais informações estão descritas na seção 3.3.10.

Suporte	Retenção (%) <sup>a</sup>	Atividade Relativa (%) <sup>b</sup>	Atividade específica (U.g <sup>-1</sup> de suporte) <sup>c</sup>
Octyl-Sepharose	$98,8 \pm 5,0$	$122,6 \pm 5,0$	$241,3 \pm 4,9$
Butyl-Sepharose	$99,2 \pm 5,2$	$43,8 \pm 3,4$	$40,2 \pm 5,9$
Phenyl-Sepharose	$78,5\pm7,9$	$2,8 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,3$
Sepabeads C-18	$98,5\pm5,7$	$24,9 \pm 4,9$	$50,1\pm9,7$
DEAE-celulose	$99,9 \pm 7,0$	$52,8 \pm 3,3$	$106,9 \pm 4,0$
MANAE-agarose	$99,9 \pm 8,2$	$62,5 \pm 5,4$	$134,9 \pm 6,8$
PEI-agarose	$99,3 \pm 8,7$	$45,3 \pm 3,5$	$100,5 \pm 4,9$
CNBr-Sepharose	$96,6 \pm 5,0$	$35,7 \pm 3,9$	$48,9 \pm 4,3$
Agarose não-ativada	0,0	$96,7\pm3,1^{\textbf{d}}$	0,0

Parâmetros: <sup>a</sup> corresponde a proporção entre a unidade enzimática total do sobrenadante retida pelo suporte após 24 horas e os 435 U totais iniciais, em porcentagem. <sup>b</sup> definida pela razão entre a unidade enzimática total presente no suporte, após 24 horas de imobilização, em relação aos 435 U iniciais. <sup>c</sup> corresponde a unidade enzimática total presente por grama de suporte utilizado na imobilização, após 24 horas.<sup>d</sup> definida pela razão entre a unidade enzimática total enzimática total remanescente no sobrenadante após 24 horas em relação aos 435 U totais iniciais.

O estudo de imobilização foi realizado em diferentes períodos, permitindo a construção dos perfis de imobilização, que correlacionaram a atividade relativa do sobrenadante e do derivado, e o respectivo tempo de imobilização (Figura 41).

Octyl, Butyl, Phenyl e PEI provocaram uma hiperativação, conforme visualizada pela atividade relativa destes derivados. Apenas em Octyl foi observada que essa hiperativação aumentou gradativamente, sendo máxima em 24 horas. Em Phenyl, Butyl e PEI, esse fenômeno ocorreu, respectivamente, nos primeiros 15 minutos, 30 minutos e 30 minutos de reação e, logo em seguida, registrou-se queda contínua na atividade relativa destes derivados.

Para DEAE-celulose, sua atividade relativa manteve-se próximo de 50% do início até o final do experimento. Interessante que a retenção de Bbl1 foi máxima logo nos primeiros 30 minutos de imobilização. Já em MANAE-agarose, a atividade relativa e a retenção de Bbl1 foram máximos no começo do experimento, todavia, ocorreu perda de 38% da atividade relativa em 24 horas de imobilização.

Não foi encontrada a hiperativação de Bbl1 no suporte de Sepabeads C-18. Apesar que a retenção de Bbl1 neste suporte foi aproximadamente 98% e ser uma resina hidrofóbica. Além disso, observou-se perda gradativa de atividade ao longo de 24 horas, indicando menor estabilidade de Bbl1 quando imobilizada nesse suporte.



do sobrenadante e do derivado foram expressos em relação às 435 U oferecidas à imobilização, as quais correspondem a 100% de atividade relativa. Quantificou-se a extrato bruto do cultivo de Abblit, em biorreator. Adicionou-se à mistura tampão fosfato de sódio pH 7,0 com concentração de 10 mM.. Os valores de atividade relativa Figura 41 - Perfil de imobilização de Bbl1 em diferentes suportes. A reação de imobilização consistiu na mistura de 2g de suporte com 435 U totais contidos em atividade pela hidrólise de 12 mM de pNPP, em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e a 54°C. Suportes: (a) Octyl-Sepharose; (b) Phenyl-Speharose; (c) Butyl-Sepharose; (d) Sepabeads C-18; (e) DEAE-celulose; (f) MANAE-agarose; e (g) PEI-agarose. Legendas: (•) atividade elativa do sobrenadante e (o) atividade relativa do derivado. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.10. para esse experimento

# 4.5.2. Estabilidade térmica dos derivados

Uma solução de cada derivado foi mantida em diferentes temperaturas por até 48 horas (Figura 42). O experimento iniciou-se com a mistura de 40 mg de derivado com 2 mL de tampão McIlvaine pH 6,0 conforme explicado em Material e Métodos 3.3.12.

Observou-se, em comparação a Bbl1 não-imobilizada (resultados 4.4.4.), um aumento na estabilidade em todos os suportes nas temperaturas de 30°C a 50°C, visto que não houve perda significativa de atividade relativa. A exceção foi no derivado de Sepabeads C-18, em que registrou perda de 25% da atividade inicial logo na primeira hora de experimento em 50°C.

Em contrapartida, registrou-se perda de estabilidade da Bbl1 nas temperaturas de 70 e 80 °C; sendo registrada 100% de diminuição de atividade nessa última temperatura com 48 horas de incubação. Em 70 °C, todos os derivados mantiveram apenas 10 - 20% da atividade inicial, com exceção do derivado PEI o qual manteve cerca de 30% da atividade inicial com 48 horas. Interessante que: apesar do ganho de estabilidade nas temperaturas de 30°C a 50°C em todos os suportes, em geral houve perda significante da estabilidade enzimática a 70°C quando comparada com a estabilidade de Bbl1 não-imobilizada.

A maior diferença entre os suportes, quanto a manutenção de atividade, foi observada em 60°C. A Bbl1 não-imobilizada manteve cerca de 40% da atividade incial com 48 horas de incubação (ver seção 4.4.4.). Esse valor foi superior em todos os suportes estudados, com exceção do derivado de PEI que também manteve sua atividade relativa próxima de 40%, nesse mesmo período. Analisando os perfis observou-se que: dependendo do tipo de suporte, a estabilidade nos períodos estudados foi diferente. Apenas em CNBr e DEAE manteve-se 80% da atividade residual do suporte nesta temperatura com 48 horas. Já nos suportes de Butyl, Phenyl, Octyl e Sepabeads C-18 a perda foi próxima de 50% nesse mesmo período. O MANAE reteve cerca de 65% da atividade inicial ao fim do intervalo de estudo.





A partir dos perfis, construiu-se a Tabela 14 contendo os valores de  $t_{50}$  e  $k_{desn}$  de Bbl1 imobilizado. Note que, em geral, o ganho de estabilidade foi intenso para todos os suportes nas temperaturas de 30°C a 50°C, visto não ser possível determinar com exatidão o  $t_{50}$  nesta faixa.

**Tabela 14 - Valores de t**<sub>50</sub> e k<sub>desn</sub> dos derivados de Bbl1 em diferentes temperaturas. Esses valores foram determinados em solução de 40 mg de derivado em 2 mL de tampão McIlvaine pH 6,0. O t<sub>50</sub> foi determinado a partir da relação entre atividade relativa do derivado ao longo do período estudado. A constante k<sub>desn</sub> foi determinada com a equação de Arrhenius (PRAJAPATI et al., 2013) utilizando o t<sub>50</sub>. Demais informações em Material e Métodos 3.3.12.

Suporte	Parâmetros	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
Octyl-	t <sub>50</sub> (h)	> 48*	> 48*	> 48*	$106 \pm 2$	< 1*	< 1*
Sepharose	$k_{desn} (10^{-5},  \mathrm{s}^{-1})$	_**	_**	_**	$0,\!18\pm0,\!01$	_**	_**
Phenvl-	t <sub>50</sub> (h)	> 48*	> 48*	> 48*	97 ± 3	< 1*	< 1*
Sepharose	$k_{desn} (10^{-5},  \mathrm{s}^{-1})$	_**	_**	_**	$0,\!20\pm0,\!02$	_**	_**
Butvl-	t <sub>50</sub> (h)	> 48*	> 48*	> 48*	$26 \pm 2$	< 1*	< 1*
Sepharose	$k_{desn} (10^{-5},  \mathrm{s}^{-1})$	_**	_**	_**	$0,\!74\pm0,\!03$	_**	_**
Sepabeads	t <sub>50</sub> (h)	> 48*	> 48*	$2,4 \pm 0,3$	$31,\!50\pm1,\!30$	$1{,}50\pm0{,}10$	< 1*
C-18	$k_{desn}$ (10 <sup>-5</sup> , s <sup>-1</sup> )	_**	_**	$8,1\pm0,5$	$0{,}61\pm0{,}02$	$12,\!83\pm0,\!97$	_**
DEAE-	t <sub>50</sub> (h)	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	$1,\!00\pm0,\!09$	< 1*
celulose	$k_{desn}$ (10 <sup>-5</sup> , s <sup>-1</sup> )	_**	_**	_**	_**	$19,25 \pm 1,70$	_**
MANAE	$t_{50}(h)$	> 48*	> 48*	> 48*	$59\pm2$	$0,\!80\pm0,\!05$	< 1*
agarose	$k_{desn}$ (10 <sup>-5</sup> , s <sup>-1</sup> )	_**	_**	_**	$0,\!37\pm0,\!01$	$24,\!06\pm1,\!75$	_**
DEI	t <sub>50</sub> (h)	> 48*	> 48*	> 48*	$27,50 \pm 1,25$	$6,0 \pm 0,9$	< 1*
PEI	$k_{desn}$ (10 <sup>-5</sup> , s <sup>-1</sup> )	_**	_**	_**	$0{,}70\pm0{,}02$	$3{,}21 \pm 1{,}05$	_**
CND#	t <sub>50</sub> (h)	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	< 1*	< 1*
CINDI	$k_{desn}$ (10 <sup>-5</sup> , s <sup>-1</sup> )	_**	_**	_**	_**	_**	_**

\* sinal de maior (>) ou menor (<) indica a impossibilidade de determinar com exatidão visto à limitação dos períodos avaliados.

\*\* não foi calculada k<sub>desn</sub> devido a impossibilidade descrita em \*

# 4.5.3. Estabilidade dos derivados em pH

Da mesma forma que o estudo de estabilidade térmica dos derivados, observou-se um acréscimo de estabilidade de Bbl1 em todos os suportes em relação a essa enzima nãoimobilizada, com exceção de Sepabeads C-18 e Butyl (Figura 43). Para o Octyl e Phenyl, os perfis de estabilidade foram semelhantes entre si, com maior estabilidade nos pH 3 a 5. Todavia, ocorreu maior perda nos pH 6 a 9 com, aproximadamente, 60% nessa faixa. Já em pH 10, menos de 20% da atividade inicial foi mantida, quase duas vezes menor ao reportado pela mesma enzima não-imobilizada. Nos derivados de Octyl e Phenyl ocorreu uma hiperativação de Bbl1 até 48 horas, nos pH 3 a 5, aumentando a atividade relativa em até 40%; um fenômeno não observado no estudo de estabilidade de Bbl1 não-imobilizada (resultado 4.4.5.).

Das classes dos suportes hidrofóbicos, o Butyl e Sepabeads C-18 apresentaram a menor estabilidade dentre os derivados estudados. Para o Sepabeads C-18 a perda da atividade inicial foi de quase 90%.

Para DEAE, MANAE e PEI, na faixa de pH estudada, registrou-se maior estabilidade no pH 5; visto que nos demais registraram-se valores de atividade relativa semelhantes a Bbl1 não-imobilizada. A diferença entre estes suportes consistiu na capacidade de DEAE manter maior atividade residual no pH 10, em relação à MANAE. Já no PEI, houve perda de atividade no pH 5 em 24 e 48 horas, apesar de corresponder a 73% da atividade inicial. Foi observado que pH inferior a 5 promove a dessorção de Bbl1 da matriz de DEAE, MANAE e PEI, justificando a ausência desses pontos no estudo. Em todos os experimentos, a incubação dos derivados nos variados pH ocorreu a 50°C, pois nessa temperatura os derivados apresentaram maior estabilidade (ver seção 4.5.2.). Não observou-se diferença no valor de atividade relativa dos suportes quando suspendidos em tampão McIlvaine ou glicina pH 8 (dados não mostrados).





A partir dos perfis de estabilidade de pH, determinou-se os valores de  $t_{50}$  em cada valor estudado (Tabela 15).

**Tabela 15 - Valores de t**<sub>50</sub> **dos derivados de Bbl1 em diferentes pH.** Esses valores foram determinados em solução de 40 mg de derivado em 2mL de tampão mantido a 40°C. O t<sub>50</sub> foi determinado a partir da relação entre atividade residual do suporte e tempo demonstrado na figura. Demais informações estão em Material e Métodos 3.3.13. para descrição desse experimento.

Suportes	рН 3	рН 4	рН 5	pH 6	рН 7	pH 8	pH 9	pH 10
Octyl-Sepharose	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	< 1*
Phenyl-Sepharose	$48 \pm 3$	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	$48\pm2$	$24\pm2$	< 1*
Butyl-Sepharose	$14 \pm 1$	$32 \pm 2$	$31 \pm 2$	$23\pm2$	> 48	$53\pm3$	$10 \pm 1$	< 1*
Sepabeads C-18	$12 \pm 2$	$12 \pm 2$	$11 \pm 2$	$7 \pm 1$	$8 \pm 1$	$4 \pm 1$	$4 \pm 1$	$1,5\pm0,7$
DEAE	ND**	ND**	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	$32\pm2$	< 1*
MANAE	ND**	ND**	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	$7 \pm 1$	$1,3\pm0,4$
PEI	ND**	ND**	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	$30\pm4$	$8,5\pm0,\!9$
CNBr	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	> 48*	$3,5 \pm 0,6$

\* sinal de maior (>) ou menor (<) indica a impossibilidade de determinar com exatidão visto à limitação dos períodos avaliados.

\*\* não foi mensurado, visto a dessorção de Bbl1 dos suportes nesses pH

# 4.5.4. Planejamento de experimentos dos derivados de Bbl1 para hidrólise de pNPP

Realizou-se a otimização da hidrólise de pNPP com os derivados de Octyl-Sepharose, DEAE-celulose e CNBr. A escolha destes três baseou-se na maior estabilidade em pH e temperatura e maior atividade específica. Os parâmetros de pH e temperatura ótimos foram comparados com a Bbl1 não-imobilizada. Os valores codificados de temperatura e pH foram os mesmos utilizados pela Bbl1 não-imobilizada. Todavia, a faixa de pH para DEAE foi 5,0 até 8,1. Todas as reações foram com 12 mM de pNPP em volume final de 0,5 mL por 5 minutos de reação.

A tabela 16 indica as atividades enzimáticas obtidas nesse experimento para os três derivados.

**Tabela 16 - Planejamento de experimentos para avaliar o efeito da temperatura e pH sobre a atividade de hidrólise de pNPP de Bbl1.** Quantificou-se a capacidade de hidrólise com 12 mM de pNPP, com 5 minutos de reação e volume final de 0,5 mL McIlvaine foi o tampão utilizado nesse experimento. O valor de atividade descrita em U.g<sup>-1</sup>, corresponde à atividade enzimática total por grama de suporte. Demais informações em Material e Métodos 3.3.14. para descrição desse experimento.

Temperatura (°C)	рН	Observados Octyl (U.g <sup>-1</sup> )	Observados CNBr (U.g <sup>-1</sup> )
40 (-1)	4 (-1)	216,38	25,40
40 (-1)	8 (1)	200,41	6,15
80(1)	4 (-1)	215,74	14,40
80(1)	8 (1)	201,76	2,63
31,8 (-1,41)	6 (0)	245,47	39,68
88,2 (1,41)	6 (0)	249,11	41,50
60 (0)	3,18 (-1,41)	248,11	36,87
60 (0)	8,82 (1,41)	212,35	13,23
60 (0)	6 (0)	202,16	0,23
60 (0)	6 (0)	226,51	55,96
60 (0)	6 (0)	201,28	2,40
Temperatura (	°C)	pH O DI	bservados EAE (U.g <sup>-1</sup> )
40 (-1)	5,4	45 (-1)	38,40
40 (-1)	7,	65 (1)	47,96
80 (1)	5,4	45 (-1)	30,14
80 (1)	7,	65 (1)	51,24
31,8 (-1,41)	6,	55 (0)	24,14
88,2 (1,41)	6,	55 (0)	8,55
60 (0)	5,00	)(-1,41)	92,94
60 (0)	8,10	0 (1,41)	16,42
60 (0)	6,	55 (0)	106,06
60 (0)	6,	55 (0)	105,28
60 (0)	6.	55 (0)	104.18

Os valores codificados estão entre parênteses.

Foi feita ANOVA para os modelos de segunda ordem destes três derivados. O nível de significância por meio de  $F_{calc}$  estão nas respectivas tabelas 17 - 19. Os termos "Temp" e "pH" correspondem aos valores codificados da temperatura e pH, respectivamente.

**Tabela 17 - ANOVA para o planejamento experimental de segunda ordem da hidrólise de pNPP por Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose**. O nível de confiança desse experimento foi 99%. Dados obtidos a partir do programa Statisica v. 11.0. A equação descreve a relação entre os termos de temperatura e pH, cujo resultado é expresso em atividade enzimática por grama de suporte deste derivado, em U.g<sup>-1</sup>. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.14. para o planejamento experimental.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F <sub>calculado</sub> QM <sub>R</sub> /QMr	F <sub>tabelado</sub> GLR,GLr	Equação
Segunda	Regressão (R)	2406,52	2	1203,26	15,81	8,45 (F99%; 2,8)	= 247,57 -
ordem	Resíduo (r)	609,04	8	76,13			$20,73(\text{Temp})^2$
	Total (T)	3803,61	10				– 17,38(рп)
	$\mathbb{R}^2$	0,84					

**Tabela 18 - ANOVA para o planejamento experimental de segunda ordem da hidrólise de pNPP por Bbl1 imobilizada em CNBr-Sepharose.** O nível de confiança desse experimento foi 99%. Dados obtidos a partir do programa Statisica v. 11.0. A equação descreve a relação entre os termos de temperatura e pH cujo resultado é expresso em atividade enzimática por grama de suporte deste derivado, em U.g<sup>-1</sup>. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.14. para o planejamento experimental.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F <sub>calculado</sub> QM <sub>R</sub> /QMr	F <sub>tabelado</sub> GLR,GLr	Equação
	Regressão (R)	2571,07	2	1285,54	9,13	8,95 (F99%; 2,8)	= 33 23 -
Segunda ordem	Resíduo (r)	1125,56	8	140,70			$15,94(\text{Temp})^2$ - 11,29(pH)
	Total (T) R <sup>2</sup>	3696,63 0,69	10				<b>-</b> ·

**Tabela 19 - ANOVA para o planejamento experimental de primeira e segunda ordem da hidrólise de** *p***NPP por Bbl1 imobilizada em DEAE-celulose.** O nível de confiança desse experimento foi 99%. Dados obtidos a partir do programa Statisica v. 11.0. A equação descreve a relação entre os termos de temperatura e pH, cujo resultado é expresso em atividade enzimática por grama de suporte deste derivado, em U.g<sup>-1</sup>. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.14. para o planejamento experimental.

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F <sub>calculado</sub> QM <sub>R</sub> /QMr	F <sub>tabelado</sub> GLR,GLr	Equação
	Regressão (R)	14020,87	3	4673,62	19,35	8,45 (F99%; 3,7)	= 108,51 -
Segunda ordem	Resíduo (r)	1690,74	7	241,53			44,59(Temp) <sup>2</sup> - 16,00(pH)
	Total (T) R <sup>2</sup>	15711,61 0,89	10				$-24,70(\text{pH})^2$

Foi observado que os modelos de segunda ordem corroboraram com os dados obtidos. O  $F_{calc}$  foi 1,87, 1,02 e 2,30 vezes maior que o  $F_{tab}$  com 99% de intervalo de confiança, respectivamente para Octyl, CNBr e DEAE. Todavia, isso foi menor em comparação a Bbl1 livre, podendo indicar erros na transferência de massa nos experimentos. Em todos os modelos, a temperatura quadrática apresentou maior efeito na atividade enzimática (Figura 44), diferentemente da Bbl1 livre cujo pH quadrático foi mais significativo. A temperatura não afetou linearmente a intensidade de atividade enzimática, já que essa variável não se encontra nos modelos. A atividade enzimática em Octyl dependeu de pH quadrático; CNBr, somente de pH em primeiro grau e; DEAE de ambos. Provavelmente, a maneira que Bbl1 se encontra imobilizada interferiu na interação da enzima com o meio reacional, alterando seus parâmetros ótimos de hidrólise de *p*NPP (Tabela 20).



**Figura 44 - Planejamento fatorial da hidrólise de** *p***NPP por Bbl1 imobilizada.** Representação gráfica de Pareto dos efeitos estudados e superfície de resposta sobre a atividade de hidrólise por Bbl1 imobilizada em (a) Octyl-Sepharose, (b) CNBr-Sepharose e (c) DEAE-celulose. Os maiores valores de atividade específica para os derivados de Octyl, CNBr e DEAE foram 249,00; 45,08; e 111,12 U.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Demais informações em Material e Métodos 3.3.14. para descrição do planejamento experimental.

**Tabela 20 - Parâmetros de pH e temperatura ideias e valor de atividade específica esperada para os derivados de Bbl1**. O valor de atividade esperada (U.g<sup>-1</sup>) corresponde à razão entre unidades enzimáticas por grama de derivado. Demais informações em Material e Métodos 3.3.14 para descrição do planejamento experimental.

Suportes	Temperatura (°C)	рН	Valor esperado (U.g <sup>-1</sup> )
Octyl- Sepharose	57,2	5,74	249,00
CNBr- Sepharose	64,4	4,22	45,08
DEAE- Celulose	59,8	6,22	111,12

# 4.5.5. Efeito da concentração de substrato e energia de ativação da hidrólise de *p*NPP por Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose

Foi observada a curva de saturação de *p*NPP na atividade hidrolítica de Bbl imobilizada em Octyl (Figura 45). Dessa vez, conforme o resultado 4.5.4., a temperatura e pH utilizados nas reações foi  $57^{\circ}$ C e 5,8.



**Figura 45 - Efeito da concentração do substrato** *p***NPP sobre a atividade hidrolítica de Bbl1 imobilizada em Octyl.** A hidrólise de *p***NPP**, foi em tampão McIlvaine pH 5,8, com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e a 57°C. A concentração de Bbl1 na reação foi 5 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>. O coeficiente de determinação foi 0,96. As concentrações de *p***NPP utilizadas foram:** 0,24 – 5,01 mM. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.15 para a análise dos dados cinéticos; e no ANEXOS H e I para determinação da concentração e tempo de reação aos estudos cinéticos.

Nessa condição foi registrada  $V_{máx} = 12813 \pm 371 \text{ U.mg}^{-1}$  e  $K_{0,5} = 0,34 \pm 0,04 \text{ mM}$ . Esses valores foram, respectivamente, 2,39 vezes maiores e 2,70 menores aos observados para enzima não-imobilizada. Além disso, a modelagem por GraphPad Prism 6.0 indicou um coeficiente de hill igual a 1. A tabela 21 resume os parâmetros cinéticos para Bbl1 imobilizada em Octyl.

**Tabela 21 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de** *p***NPP pela lipase Bbl1 imobilizada em Octyl.** A hidrólise de *p*NPP foi em tampão McIlvaine pH 5,8 com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e a 57°C. A concentração de Bbl1 utilizada na reação foi 5 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.15 para a análise dos dados cinéticos; e no ANEXOS H e I para determinação da concentração e tempo de reação aos estudos cinéticos.

Enzima	$V_{máx} (U.mg^{-1})$	$\mathbf{k}_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5</sub> (mM)	$k_{cat}/K_{0,5} \ (mM^{-1}s^{-1})$	hill
Bbl1 + Octyl	$12813\pm371$	$10428\pm302$	$0,34 \pm 0,04$	$30670\pm360$	1

O *turnover* ( $k_{cat}$ ) de *pNPP*, quando saturante na solução, foi cerca de 2,39 vezes maior para Bbl1 imobilizada. A queda em  $K_{0,5}$  pode indicar melhor orientação do substrato no sítio catalítico da lipase, quando está aderida a Octyl-Sepharose. De fato, em concentrações próximo ao  $K_{0,5}$ , a eficiência de utilização do substrato ( $k_{cat}/K_{0,5}$ ) foi 6,46 vezes maior para o derivado de Octyl.

Foram determinados os valores de  $k_{cat}$  para hidrólise de *p*NPP em diferentes temperaturas para Bbl1 imobilizada em Octyl (ANEXO J). Determinou-se, a partir disso, a relação linear semi-recíproca entre o logaritmo natural de  $k_{cat}$  e o inverso da temperatura (Figura 46). A E<sub>a</sub> para hidrólise de *p*NPP catalisada pelo derivado de Bbl1 em Octyl foi de 12,89 ± 0,56 kJ.mol<sup>-1</sup>, o que corresponde a uma diminuição de 3,72 vezes em relação a enzima não-imobilizada.



**Figura 46 - Relação linear semi-recíproca entre temperaturas e logaritmo natural das respectivas constantes k**<sub>cat</sub> **para derivado de Bbl1 em Octyl.** Temperaturas utilizadas: 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75 °C; foram convertidas à razão inversa de seu valor em Kelvin  $(10^{-3}, K^{-1})$ , 3,19; 3,14; 3,09; 3,04; 3,00; 2,95; 2,91; e 2,87, respectivamente. A concentração de Bbl1 nas reações foi 5 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>, utilizando 12 mM de *p*NPP, em tampão McIlvaine pH 5,8, cujo volume de reação foi 0,5 mL. A equação linear corresponde a função de Arrhenius (PRAJAPATI et al., 2013), cujo coeficiente angular é definido pela razão entre energia de ativação para hidrólise de *p*NPP ( $E_a$ ) e a constante natural dos gases (R). Essa relação apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,99. Legendas: (•) indica os valores observados de k<sub>cat</sub> em cada temperatura. (○) são os valores teóricos de k<sub>cat</sub> caso não houvesse efeito de desnaturação térmica. As equações foram determinadas a partir dos pontos (•) anteriores à prevalência da desnaturação térmica. Demais informações descritas em Material e Métodos 3.3.15. para esse experimento.

# 4.5.6. Estudo de inibição do derivado Octyl-Sepharose por ácidos oleico e linoleico

Os ácidos oleico e linoleico foram inibidores da hidrólise de *p*NPP catalisada pela Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose (Figura 47). O CI<sub>50</sub> para o ácido oleico foi de  $1,33 \pm 0,11$  mM, para o linoleico,  $2,07 \pm 0,16$  mM. Comparando estes valores aos obtidos pela enzima nãoimobilizada, a imobilização promoveu uma redução do CI<sub>50</sub> do ácido oleico em 2,65 vezes, indicando maior afinidade por esse inibidor. Desse modo, a enzima Bbl1 imobilizada em Octyl é mais sensível ao ácido oleico que o linoleico.

Não houve inibição total do derivado e não foi observada dessorção da Bbl1 nas concentrações utilizadas.



**Figura 47 - Determinação de CI**<sub>50</sub> **para inibidores de ácido graxos em Bbl1 imobilizada em Octyl.** (a) ácido oleico e (b) ácido linoleico. Concentrações de ácido oleico utilizadas: 0,11 - 3,96 mM. Concentrações de ácido linoleico utilizadas: 0,11 - 4,60 mM. A reação de hidrólise foi com 12 mM de *p*NPP, em tampão McIlvaine pH 5,8, com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e a 57°C. A concentração de Bbl1 utilizada na reação foi 5 x 10<sup>-5</sup> mg.mL<sup>-1</sup>. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.16. para esse experimento.

Nas concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM, de oleico e linoleico, a  $V_{máx}$  manteve aproximadamente igual ao valor de reação sem inibidor (Tabela 22). Já o valor de K<sub>0,5</sub> dobrou na presença de oleico e aumentou 1,26 vezes para linoleico. Esse cenário é oposto do registrado pela Bbl1 não-imobilizada, visto que sua  $V_{máx}$  caiu enquanto o K<sub>0,5</sub> manteve-se praticamente igual na presença destes mesmos inibidores.

O interessante ocorreu na concentração de 2,0 mM de ambos inibidores. A  $V_{máx}$  diminui em relação a ausência de inibidor. Para oleico a  $V_{máx} = 8880 \pm 174 \text{ U.mg}^{-1}$  e, linoleico,  $V_{máx} =$ 11390 ± 337 U.mg<sup>-1</sup>. Entretanto o K<sub>0,5</sub> também registrou queda para 0,19 ± 0,02 mM, com ácido oleico, e 0,26 ± 0,05 mM com ácido linoleico.

Dois processos de inibição foram vistos nesse experimento. Primeiramente, quando a concentração do inibidor foi 0,5 mM e 1,0 mM, a inibição semelhou-se ao tipo competitivo. Todavia, para concentração de 2 mM, a queda de  $V_{máx}$  e  $K_{0,5}$  indicou uma aparente inibição mista (Figura 48).



Figura 48 - Efeito da concentração do substrato *p*NPP sobre a atividade do derivado de Bbl1 na presença de inibidores. (a) presença de ácido oleico e (b) ácido linoleico. A hidrólise de *p*NPP foi realizada em tampão McIlvaine pH 5,8 com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e temperatura de 57°C. A concentração de Bbl1 imobilizada utilizada no meio reacional foi 5 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>. As concentrações de *p*NPP utilizadas foram: 0,24 – 5,01 mM. Legendas: (•) sem inibidor; (•) 0,5 mM de inibidor; (•) 1,0 mM de inibidor e (□) 2,0 mM de inibidor. Demais informações estão descritas em Material e Métodos 3.3.16. para esse experimento de inibição.

Tabela 22 - Parâmetros cinéticos da hidrólise de pNPP por Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose, na
presença de diferentes concentrações de ácidos oleico e linoleico. A hidrólise de pNPP foi em tampão McIlvaine
pH 5,8 com 0,5 mL de volume reacional, 5 minutos de reação e a 57°C. A concentração de Bbl1 na reação foi 5 x
10 <sup>-5</sup> mg.mL <sup>-1</sup> . As concentrações de pNPP utilizadas foram: 0,24 - 5,01 mM. Determinaram-se os parâmetros
cinéticos com 0,5; 1,0; e 2,0 mM de ácido graxo na reação. O ANOVA permitiu observar diferenças significativas
entre os valores de V <sub>máx</sub> e K <sub>0,5</sub> entre as concentrações de inibidor. Demais informações descritas na seção 3.3.16.
para este experimento.

Inibidores	Concentração (mM)	V <sub>máx</sub> (U.mg <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5</sub> (mM)
	0	$12813\pm371$	$0,34 \pm 0,04$
Ácido	0,5	$12988 \pm 428$	$0,\!62\pm0,\!07$
oleico	1,0	$12629\pm404$	$0,\!64\pm0,\!08$
	2,0	$8880 \pm 174$	$0,\!19\pm0,\!02$
ANOVA		< 0,05	< 0,05
	0	$12813 \pm 371$	$0,34 \pm 0,04$
Ácido	0,5	$12676\pm226$	$0,\!43 \pm 0,\!03$
linoleico	1,0	$12408 \pm 418$	$0,\!44 \pm 0,\!07$
	2,0	$11390 \pm 377$	$0,26 \pm 0,05$
ANOVA		< 0,05	< 0,05

# 4.6. Efeito de hidrolisado dos óleos de buriti e açaí em células de glioblastoma LN18 e fibroblasto

Os óleos de buriti e açaí foram hidrolisados, na presença de Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose. As fases polar e apolar foram dissolvidas em DMSO e, em seguida, utilizadas (separadamente, ou em conjunto, e em diferentes concentrações) no tratamento de células da linhagem glioblastoma LN18 e fibroblastos, cujo experimento acompanhou a viabilidade celular destas linhagens por 24 e 120 horas, com o método do XTT. Para esse experimento foram elaborados três controles: cultivos destas células em óleo de buriti ou açaí (a escolha dependeu do produto de hidrólise), na presença de 0,1% de DMSO, e com a droga telozolomida. Considerou-se 100% de viabilidade àquela registrada no controle com o óleo buriti ou açaí.

Em 24 horas de incubação, observou-se perda de viabilidade nos dois tipos celulares quando cultivados na mistura das fases polar e apolar do óleo de açaí (Figura 49a e Figura 49c). Nos cultivos de fibroblasto também se registrou menor viabilidade quando expostas a concentração C5 das fases apolar e polar, em 21% e 48%, respectivamente. Mesmo ocorrendo perda de viabilidade em ambas as linhagens, as células de fibroblasto apresentaram maior queda em relação às tumorais. Já em 120 horas, esse efeito não apareceu na linhagem LN18. Em fibroblastos, registrou-se o mesmo perfil de diminuição da viabilidade, tanto na exposição à mistura de fases quanto à fase apolar solenemente.

Os produtos de hidrólise do óleo de buriti exibiram outro cenário nesse experimento (Figura 50). Em 24 horas, as concentrações C4 e C5 da fase apolar e da mistura promoveram perda superior a 50% da viabilidade mitocondrial das células tumorais. Todavia, não se registrou efeitos deletérios nos fibroblastos. Em 120 horas, a perda de viabilidade manteve-se em LN18 quando exposta à mistura, porém tal perda foi menor comparado às mesmas concentrações em 24 horas. Já para as células de fibroblasto, a fase polar promoveu um ganho de viabilidade, chegando até 40%. O tratamento com a fase apolar e mistura de fases dos hidrolisados de buriti foram mais eficientes, em termos de diminuir viabilidade mitocondrial de células cancerígenas, que a utilização da telozolomida 200 mM, droga comumente utilizada no tratamento clínico.



**Figura 49 - Viabilidade das células de fibroblasto e glioblastoma na presença dos produtos de hidrólise do óleo de açaí.** Células de fibroblasto na presença dos produtos de hidrólise do óleo de açaí com 24 horas (**a**) e 120 horas (**b**) de cultivo. Células da linhagem de glioblastoma LN-18 na presença dos produtos de hidrólise do óleo de açaí em 24 horas (**c**) e 120 horas (**d**) de cultivo. As células de fibroblasto e LN-18 foram cultivadas na presença das concentrações C1-C5 da fase polar, apolar ou da mistura de ambas. Utilizaram-se três controles: meio contendo óleo de açaí não-hidrolisado, meio contendo 0,1% de DMSO, e meio contendo 200 mM da telozolomida. Pelo fabricante, a viabilidade celular foi proporcional à densidade óptica mensurada pelo método colorimétrico com sal tetrazolium XTT. Considerou 100% a densidade óptica, do método de XTT, quantificada da cultura ao óleo de açaí não-hidrolisado. Símbolos de significância representam a diferença estatística da viabilidade do cultivo em relação à viabilidade das células cultivadas na presença do óleo de açaí não-hidrolisado. Abreviações: TMZ - telozolomida; C1 – 0,025 mg.mL<sup>-1</sup>; C2 - 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>; C3 – 0,10 mg.mL<sup>-1</sup>; C4 – 0,15 mg.mL<sup>-1</sup>; e C5 – 0,20 mg.mL<sup>-1</sup>. Demais informações em Material e Métodos 3.4. para descrição desse experimento.



**Figura 50 - Viabilidade das células de fibroblasto e glioblastoma na presença dos produtos de hidrólise do óleo de buriti**. Células de fibroblasto na presença dos produtos de hidrólise do óleo de buriti com 24 horas (**a**) e 120 horas (**b**) de cultivo. Células da linhagem de glioblastoma LN-18 na presença dos produtos de hidrólise do óleo de buriti em 24 horas (**c**) e 120 horas (**d**) de cultivo. As células de fibroblasto e LN-18 foram cultivadas na presença das concentrações C1-C5 da fase polar, apolar ou da mistura de ambas. Utilizaram-se três controles: meio contendo óleo de buriti não-hidrolisado, meio contendo 0,1% de DMSO, e meio contendo 200 mM da telozolomida. Pelo fabricante, a viabilidade celular foi proporcional à densidade óptica mensurada pelo método colorimétrico com sal tetrazolium XTT. Considerou 100% a densidade óptica, do método de XTT, quantificada da cultura ao óleo de buriti não-hidrolisado. Símbolos de significância representam a diferença estatística da viabilidade do cultivo em relação à viabilidade das células cultivadas na presença do óleo de buriti não-hidrolisado. Símbolos de significância representam a diferença estatística da viabilidade do cultivo em relação à viabilidade das células cultivadas na presença do óleo de buriti não-hidrolisado, com ANOVA, seguido de *post-hoc* de Tukey; (\*\*) p < 0,01 e (\*\*\*) p < 0,001. Os números sobre as barras verticais indicam a porcentagem de perda ou ganho de viabilidade celular em relação ao cultivo ao óleo de buriti não-hidrolisado. Abreviações: TMZ - telozolomida; C1 – 0,025 mg.mL<sup>-1</sup>; C2 - 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>; C3 – 0,10 mg.mL<sup>-1</sup>; C4 – 0,15 mg.mL<sup>-1</sup>; e C5 – 0,20 mg.mL<sup>-1</sup>. Demais informações em Material e Métodos 3.4. para descrição desse experimento.

Os produtos de hidrólise dos óleos de açaí e buriti, aplicados nas células de glioblastoma LN18 e fibroblastos, foram avaliados quanto composição por cromatografia de camada delgada (Figura 51).

Por meio desta, verificou-se que a fase apolar da hidrólise de açaí reteve monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos e remanescentes de triacilgliceróis. Essa proporção foi encontrada na fase polar, porém em menor quantidade e ausente de monoacilgliceróis. Em relação ao óleo de buriti, a fase apolar conteve maior proporção dos diacilgliceróis, enquanto a fase polar, maior quantidade de ácidos graxos.



Figura 51 - Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise do óleo de açaí e buriti. (a) Produtos de hidrólise do óleo de açaí e (b) buriti. A reação de hidrólise dos óleos de açaí e buriti foi por meio da Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose revestida com PEI, a 57°C e por 48 horas. Abreviações: M1 – padrão de ácido graxo; M2 – padrão de diacilglicerois; Ó. Açaí – óleo de açaí não-hidrolisado; Ó. buriti – óleo de buriti não-hidrolisado; Polar – fase polar do produto; Apolar – fase apolar do produto; MAG – monoacilglicerol; DAG – diacilglicerol; FFA – ácido graxo livre e TAG – triacilglicerol. Caneletas: 5 µL de cada amostra 200 vezes diluída em hexano. Fase móvel - hexano : acetato de etila : ácido acético (90:10:1). Dimensões da placa de sílica: 5 x 4 (cm). Demais informações em Material e Métodos 3.4. para esse experimento.

# DISCUSSÃO

# 5. Discussão

Dentre as ferramentas utilizadas em escala laboratorial, a busca por novas cepas de fungos, bactérias ou até mesmo algas selvagens é ainda o método mais utilizado, visando a diversidade de enzimas produzidas por esses organismos. Entretanto, há o fator nicho ocupado por cada um destes micro-organismos, o que limita a capacidade de produção destes insumos. A escolha, portanto, de micro-organismos que usufruem naturalmente das enzimas de interesse industrial serve como direcionamento para obtenção de cepas naturalmente mais produtoras. Muitas vezes, nestes organismos há a possibilidade de existir um *pool* de enzimas da mesma classe o que enobrece a diversidade de características, ampliando a utilização e comercialização destas enzimas.

Fungos patológicos de plantas e insetos apresentam uma diversidade das enzimas que auxiliam na obtenção de substratos e na atividade parasítica (KING et al., 2011). A produção de um *pool* de enzimas da mesma classe é uma adaptação evolutiva que permite-nos invadir os tecidos dos hospedeiros e completar o processo de infecção, frente aos diferentes mecanismos de defesa presentes nos hospedeiros (FERNADEZ et al., 2012). Fungos entomopatológicos vem sendo utilizados massivamente no controle de pragas principalmente na produção de lipases as quais catalisam a hidrólise de grupos ésteres, lipoproteínas e ceras presentes no corpo do hospedeiro (LEGER et al., 1986). Ao que parece, quando os genes que codificam essas enzimas são duplicados, uma cópia mantém as propriedades originárias da proteína, enquanto a outra é modificada quanto a sequência de aminoácidos, estimulando a divergência funcional. Isso explica por que nesses organismos a mesma classe de enzimas é composta por uma variedade de genes, cada a qual codifica uma enzima com propriedade distintas das demais (MONDAI et al., 2016). Quanto a produção de lipases, a espécie Beauveria bassiana ganha destaque devido à variedade de lipases e capacidade de produzir alta atividade lipolítica. Mais de 19 genes associados a essa classe de enzimas foram detectados previamente em nosso grupo de pesquisa (VICI et al., 2015), cujas proteínas que os codificam podem chegar até 20.000 U de hidrólise por mg de proteína (ZIBAEE et al., 2011). Esse valor é alto em comparação a outros trabalhos recentes: 0,49 U.mg<sup>-1</sup> (KAUR et al., 2016), 196 U.mg<sup>-1</sup> (Li; Liu, 2017), ambos do gênero Bacillus, 400 U.mg<sup>-1</sup> de Lasiodiplodia theobromae (VENKATESAGOWDA et al., 2017) com base na mesma unidade de atividade enzimática.

O grande problema são as características do cultivo destes micro-organismos que são necessárias para promover a expressão destes genes. Pensando em escala laboratorial, mesmo que tais fungos sejam capazes de produzir massivamente essas enzimas de interesse comercial, a produção acaba sendo onerosa em relação ao retorno financeiro. *B. bassiana*, por exemplo,

necessita matrizes oleaginosas como indutoras da produção de lipases, e, devido às propriedades químicas desse substrato, ocorre a formação de um sistema bifásico nos tanques de cultura, o que pode provocar barreiras no cultivo desse micro-organismo, como entupimento de tubulações vinculadas à aeração, enrijecimento de motores e além de ser um substrato de alto valor comercial (XU et al., 2009; DEWEY et al., 2014).

Uma maneira de superar esse problema é a utilização de técnicas de expressão heteróloga, permitindo a expressão destas mesmas enzimas em condições conhecidas nos procedimentos operacionais padrões de uma indústria (ADRIO; DEMAIN, 2010; TAMANO, 2014). O fungo *Aspergillus nidulans* é um dos fungos filamentosos mais estudados e utilizados no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e na produção de insumos comerciais, devido ao crescimento em substratos de baixo custo; e por ser fisiologicamente e geneticamente conhecido. Perante esse cenário, é utilizado na produção de inúmeros insumos por meio da expressão de genes ou circuitos metabólicos (BERKA; BARNETT, 1989; LUBERTOZZI; KEASLING, 2009; CHIANG et al., 2013; NIELSEN et al., 2013; WIENMANN et al., 2018). Além disso, a cepa mutante A773 foi ideal nesse processo: a mutação no gene *pyrG89* permitiu a seleção de cepas transformadas com pExpyr já que nesse vetor há um alelo à expressão deste gene.

Em vista do apresentado, o foco principal do trabalho foi utilizar o fungo *A. nidulans* (obtido do *Fungal Genetics Stock Center* – St. Louis, MO) como vetor de expressão de um gene de lipase de *B. bassiana*, visto não haver trabalhos relacionados a essa mesma temática. Devido a maior proximidade filogenética entre o gênero *Aspergillus* e *Beauveria* (XIAO et al., 2012), em relação a outros gêneros comumente utilizados em expressão heteróloga, como *Saccharomyces* e *Escherichia*, acredita-se que as modificações pós-tradicionais, proteínas auxiliares no enovelamento, glicosilação e fosforilação sejam parecidas, o que não provocaria mudanças conformacionais bruscas na enzima de interesse.

O trabalho apresentou sucesso na inserção de um gene de lipase, denominado *bbl1*, no vetor pExpyr. O sequenciamento do gene inserido indicou semelhança de 95% com o gene referência. O alinhamento das sequências de aminoácidos, entretanto, revelou 23 códons degenerados e 24 códons não-homólogos. Provavelmente isso está associado a divergência populacional entre a cepa de *B. bassiana* mantida na micoteca do laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, com a cepa de *B. bassiana* ARSEF 2860 de referência. Isso condiz com MONDAI et al. (2016) em relação a modificação na sequência de genes que codificam enzimas essenciais na atividade parasítica. Uma diferença que chamou a atenção foi a substituição do resíduo de Aspartato (Asp) por um

resíduo de Asparagina (Asn) na tríade catalítica. Ambos diferem nas propriedades químicas de suas cadeias laterais; o aspartato possui um grupo carboxílico; já a asparagina, um grupo carboxiamida. A Asn é presente na papaína e algumas cisteínas-proteases, as quais possuem uma tríade His-Cys-Asn, ao invés de His-Ser-Asp/Glu, característica das serino-proteases e lipases (AMRI; MAMBOYA, 2012). VERNET et al., (1995) já demonstraram que Asn na papaína participa na orientação geométrica dos resíduos catalíticos, especialmente em providenciar ligações de hidrogênio suficientes para posicionar o grupo imidazol, permitindolhe agir como doador de prótons. Os resíduos de Asp e Glu nas serino-proteases também agem sobre o grupo imidazol da His, porém estabilizando as cargas positivas existentes nesse grupo. SNIJDER et al. (2001) também demonstrou a existência dessa tríade His-Ser-Asn em fosfolipase A de E. coli e essa mesma função de orientação do grupo imidazol foi proposta por meio de seus estudos de cristalografia. Nesse caso, Asn em Bbl1 pode ter função análoga, orientando o grupo imidazol ao resíduo de serina da tríade catalítica, o qual está covalentemente ligado ao substrato no intermediário tetraedral. Além disso, o sequenciamento revelou que esse resíduo nucleofílico se encontra no pentapeptídeo consenso de lipases, G-x-S-x-G, sendo composta por G-Y-S-G-G.

O estudo de modelagem molecular revelou a existência de uma região homóloga a "tampa" encontrada em lipase b de *Candida antarctica* que é formada por 4 α-hélices. Abaixo dessa, duas regiões hidrofóbicas foram computadas, sendo uma delas localizada logo acima do resíduo de serina da tríade catalítica. Além desses bolsões hidrofóbicos, duas regiões correspondentes a "cavidades" foram modeladas. As cavidades representam regiões nãoocupadas na enzima as quais apresentam uma abertura na superfície da enzima. Uma dessas cavidades apresenta um bolsão hidrofóbico, localizada na possível "tampa" de Bbl1, e a outra cavidade localizada logo abaixo da tríade catalítica. Ambas as cavidades se encontram no sítio ativo da enzima. PLEISS et al. (1998) já revelou a existência de um "túnel" composto por resíduos hidrofóbicos localizado sobre a tríade catalítica e a folha-ß central de lipases de diferentes organismos com largura de 4 - 4,5 Å (lipase b de C. antarctica; Pseudomonas cepacia; lipase pancreática humana; Rhizomucor miehei; C. rugosa e Fusaium solani). Acredita-se que a função desse túnel seja estabilizar as cadeias acil do substrato no interior da enzima por interações de Van der Waals, posicionando-o corretamente ao ataque nucleofílico do resíduo de serina da tríade catalítica. A geometria dessa estrutura reflete na especificidade da lipase; túneis mais "côncavos" indicam maior especificidade por cadeias insaturadas, como por exemplo na lipase de C. rugosa (GROCHULSKI et al., 1994). Mutações nos resíduos deste túnel afetam na interação da enzima com substrato e alteraram a eficiência de hidrólise (LAGUERRE et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017). Provavelmente, a região hidrofóbica localizada acima do resíduo catalítico de serina apontado na modelagem de Bbl1 pode, portanto, corresponder ao túnel de interação com a cadeia acil do substrato com a enzima, como demonstrado por esses trabalhos. A existência de uma cavidade sobreposta a esse túnel pode corroborar com essa hipótese, indicando a região por a qual o substrato se insere na enzima. A segunda cavidade pode indicar uma região onde moléculas de água (quando solvente é aquoso) posicionam-se próximas ao sítio catalítico. Quando se trata de hidrólise, moléculas de água são necessárias para hidrolisar a ligação covalente do complexo acil-enzima; entretanto a existência de um bolsão hidrofóbico, para estabilizar a cadeia acil de ácido graxo, limitaria o acesso do solvente ao sítio catalítico. De fato, foi simulado por (SANTINI et al., 2009) que se uma molécula de água tivesse que atravessar essa região hidrofóbica da lipase de Thermomyces lanuginosa ocorreria um desenovelamento da lipase. Entretanto o mesmo trabalho apontou que existe, de fato, um canal hidrofílico próximo ao sítio catalítico que possui uma abertura na superfície da enzima. Através deste, moléculas de água extravasam no momento que ocorre a interação do substrato com o túnel hidrofóbico, cujo fluxo é controlado por um resíduo de tirosina.

Não apenas o sequenciamento do vetor pExpyr + bbll como a expressão da enzima de interesse foi um sucesso nesse projeto. O primeiro experimento da indução de bbl1 em placas apresentou 20% de colônias positivas quanto a produção dessa enzima. Em seguida, quando inoculou-se um representante de A.nidulans transformante de bbl1 no mesmo meio em volume maior, a produção, de unidades enzimática totais no extrato bruto foi o dobro em relação a produção máxima obtida em cultivos de B. bassiana, a cepa selvagem de Bbl1. O mesmo valor foi superior a outros trabalhos que buscaram expressão heteróloga de lipases em E. coli (SYAL; GUPTA, 2016), Pichia pastoris (JALOULI et al., 2017), apesar das lipases apresentarem propriedades distintas. Além disso, as substituições da maltose e do tampão HEPES por xarope de milho e tampão fosfato, respectivamente, com a manutenção de agitação constante dos cultivos, quase quadruplicaram a produção de atividade lipolítica e duplicaram a produção de proteínas extracelulares além de promover crescimento em biomassa visível nas culturas microbianas. Isso torna o trabalho inovador pois pela primeira vez uma lipase foi expressa em um vetor cujo indutor é um açúcar, evitando a necessidade de produtos sintéticos onerosos no crescimento do micro-organismo utilizado. Além disso, o A. nidulans é conhecido por produzir enzimas glicohidrolases (KATO et al., 2002) e, nesse caso, o próprio micro-organismo é capaz de desenvolver condições para manutenção de moléculas indutoras do vetor pExpyr no meio de cultura.

É conhecido que, em crescimento microbiano, a produção de metabólitos (neles incluem as proteínas que serão direcionadas ao meio extracelular) é influenciada pelos componentes do meio de cultura, agitação, aeração e temperatura (ZHOU et al., 2018). A maltose promove a expressão do gene bbl1 por meio do vetor pExpyr devido a existência de um promotor de glucoamilase (glnAP) de A. niger (SEGATO et al., 2012). Esse dissacarídeo é um indutor do fator de transcrição AmyR, que, conjuntamente com as proteínas do complexo Hap, interage com glnAP e outros promotores da via de síntese de enzimas amilolíticas em A. nidulans, além de aumentar a expressão destes próprios fatores de transcrição (TSUKAGOSHI et al., 2001). Outros genes, homólogos ao presente no loci MAL de S. cerevisiae, são expressos, os quais incluem a maltase (MALS) e maltase-permease (MALT), participando do metabolismo de maltose em A. nidulans (VONGSANGNAK et al., 2009). A substituição da maltose por xarope de milho promoveu um aumento significativo na produção de Bbl1. O xarope de milho importado é produzido a partir da hidrólise parcial do amido do milho, transformando-o em dextrinas, maltoses, glicose e outros açúcares complexos (em menor quantidade) como isomaltose ou α-isoamil maltosídeo (HOBBS, 2009). Até 31% de sua composição de carboidratos é de maltose, justificando a continua expressão de *bbl1* em meios com essa fonte de carbono. Todavia, outros açúcares também são fortes indutores de enzimas amilolíticas em A. nidulans, incluindo o promotor glnAP, como isomaltose, o qual em baixas concentrações é capaz de promover a expressão desses genes em quantidades superiores a indução por apenas maltose (TSUKAGOSHI et al., 2001). Isso justificaria a maior produção de lipases na presença dessa fonte de carbono.

Uma questão pertinente foi elaborada após esse experimento em relação a composição do xarope de milho. O xarope de milho apresenta grandes quantidades de glicose, podendo chegar até 51% de sua composição; esse açúcar, entretanto, é considerado um inibidor da expressão de genes aminolíticos em *A. niger* via CreA (GANZLIN; RINAS, 2008; ADNAN et al., 2018), o qual remodela a cromatina ao interagir com os promotores desses genes, impedindo a interação com os fatores de transcrição. Quando  $A_{bbl1+}$  foi inoculado em meios com xarope de milho e em seguida adicionou-se glicose, não foi visualizada redução na produção de atividade de Bbl1 em até 48h de cultivo. Pensou-se que a existência de xarope de milho antes à adição de glicose poder-se-ia impedir a atividade inibitória dessa hexose. Desse modo, o mesmo experimento foi realizado, porém invertendo-se a ordem de adição da fonte de carbono; cresceu-se  $A_{bbl1+}$  em meio com glicose e em seguida adicionou-se o xarope de milho. A produção de Bbl1 ocorreu normalmente após 3h da adição do xarope de milho, indicando que o efeito inibitório da glicose inexiste nesse transformante. Algumas explicações foram elaboradas: o

sistema CreA em *A. nidulans* não reconhece o promotor *glnAP* de *A. niger* presente no vetor pExpyr ou os locais de inserção do vetor pExpyr+*bbl1* no material genético de *A. nidulans* impedem o reconhecimento deste promotor por essa via. De fato, quanto à *A. nidulans*, são as enzimas xilanolíticas e celulolíticas as menos expressas na presença de glicose (RIES et al., 2016), podendo haver especificidades e funcionalidades distintas entre as duas espécies.

Foi observado a necessidade de um tampão extracelular tanto na produção de Bbl1 quanto no crescimento de *A. nidulans*. O gênero *Aspergillus* é conhecido por produzir ácidos orgânicos no meio extracelular, promovendo redução do valor de pH no meio extracelular (LEI, 2016). Devido ao aumento do gradiente de concentração desse insumo, consequentemente o pH intracelular diminui podendo levar ao acúmulo de NADH e a diminuição da expressão de proteínas e crescimento em biomassa (DIANO et al., 2007) e, portanto, a existência de um tamponamento extracelular evitaria o acúmulo de ácidos orgânicos e, por fim, a redução do pH intracelular. Recentemente, alguns grupos estão buscando correlacionar a diminuição de pH intracelular e alterações no perfil de expressão de genes relacionados com enzimas amilolíticas no gênero *Aspergillus* (YIN et al., 2017; WANG et al., 2018), podendo haver uma relação com os resultados observados. O tampão fosfato pôde não apenas atuar na regulação de pH, mas também fornecer íons e cofatores para enzimas importantes de seu metabolismo celular, o que justificaria o aumento na produção de proteínas extracelulares, Bbl1 e crescimento em biomassa.

Ambas agitação e aeração são importantes em todos os processos aeróbicos; aumento no balanço ATP/ADP, NAD<sup>+</sup>/NADH, glicólise, fosforilação oxidativa, metabolismo de proteínas e, pela homogeneização do meio, garantindo acesso igual aos nutrientes e oxigênio dissolvidos no meio (ZHOU et al., 2018). Em culturas estacionárias, a oxigenação é restrita a apenas a superfície superior do micélio e o acesso aos componentes do meio depende apenas da difusão de suas moléculas químicas. Apesar de não ter sido encontrados trabalhos que correlacionasse a agitação ou oxigenação com a expressão de genes amilolíticos, van Veluw et al. (2013) demonstraram que culturas de *A. niger* em agitação apresentam maior expressão de AmyR, o que poderia justificar a maior expressão de *bbl1* por meio do promotor *glnAP*.

O estudo de escalonamento do cultivo de  $A_{bbl1+}$  em biorreatores revelou diferenças de crescimento em biomassa, produção de proteínas extracelulares e Bbl1 assim como na viscosidade do meio. Foi constatado uma produção de aproximadamente 1 x 10<sup>4</sup> U.L<sup>-1</sup>, sendo aproximadamente o dobro do registrado em um cultivo em Erlenmeyer. Os parâmetros de cultivo (Tabela 1) revelam essa distinção; os cultivos em Erlenmyer foram mais propensos a utilizar a fonte de carbono para a produção de biomassa, enquanto que no biorreator, para

síntese de Bbl1. O resultado disso foi a maior taxa de crescimento em Erlenmeyer, todavia, maior produção de Bbl1 no biorreator. Isso aponta que existe alguma diferença entre os dois cultivos que levam a alterações fisiológicas. GARCIA-OCHOA e GOMEZ (2009) e SRIVASTAVA et al. (2011) mencionam que o escalonamento provoca alterações na transferência de oxigênio para o micélio em submersão. De tal maneira que WONG (2013) demonstrou haver diferenças na oxigenação, refletindo em alterações nos cultivos microbianos. Segundo esses trabalhos, a oxigenação é um dos parâmetros que dificilmente será escalonado proporcionalmente a medida que o volume do cultivo aumenta; o que cria uma diminuída distribuição uniforme do oxigênio no meio líquido, podendo ocasionar uma situação de hipóxia. A. nidulans, assim como o gênero Aspergillus, sofre inúmeras alterações metabólicas por causa do oxigênio (DIANO et al., 2007; GRAHL et al., 2012; KROLL et al., 2014; SONGSERM et al., 2018). Em culturas ricas em oxigênio, quase toda fonte de carbono absorvida do meio de cultura é orientada rapidamente para produção de biomassa enquanto poucos metabólitos são secretados. O oxigênio por ser o aceptor final de elétrons acaba provocando ativação das vias glicolíticas e do ciclo de Krebs, provocando maior eficiência na conversão da fonte de carbono em biomassa e moléculas energéticas; NADH, FADH<sub>2</sub> e ATP.

Entretanto, quando o meio é limitante em oxigênio, a baixa quantidade desse aceptor final de elétrons afeta a reoxidação de NADH, e, portanto, diminui a produção de ATP. Como consequência, ocorre uma redução na produção de biomassa e direcionamento das reações do ciclo do ácido cítrico a fim de regular o balanço NADH/NAD<sup>+</sup>; a produção de malato e fumarato via oxaloacetato e malato são mecanismos a fim de reconstituir NAD<sup>+</sup> citossólico, ocorrendo um acúmulo de ácidos orgânicos nas células de A. nidulans. Além disso, foi demonstrado que a redução na produção de ATP afeta a atividade de ATPases, que são responsáveis em manter a homeostase do pH intracelular. Como mecanismo alternativo, há secreção desses ácidos orgânicos no meio extracelular provocando uma estabilidade a curto prazo do pH dentro das células. O estresse pela falta de oxigênio leva a predominância das vias fermentativas para produção de ATP, entretanto, o consumo de açúcares tende a ser maior para compensar a baixa produção desse ganho energético. Esse acúmulo de fonte de carbono no interior celular é direcionado a vias de síntese anapleuróticas, para síntese de aminoácidos, e poliols, como manitol, glicerol, arabitol e eritritol, que são moléculas consideradas "reservas" energéticas e capazes de reter moléculas de água por interações de hidrogênio em A. nidulans (DUKEMA et al., 1985). A falta de oxigênio é interpretada como um estresse ao ambiente exposto, podendo direcionar os açúcares adquiridos para síntese de metabólitos, feromônios, enzimas hidrolíticas,

inibidores de outros fungos e bactérias e estruturas reprodutivas no gênero *Aspergillus* (CHI; CRAVEN, 2013).

Desse modo é plausível que culturas de  $A_{bbl1+}$  em biorreatores ocorreu a privação de oxigênio. Esse cenário levaria a diminuição da produção de biomassa e acúmulo de maltose no citoplasma, o que justificaria a reduzida taxa de crescimento e aumento da taxa específica de consumo de açúcar. O estresse pela falta de oxigênio direcionaria a fonte de carbono adquirida para síntese de metabólitos, como polissacarídeos (elementos que podem provocar aumento da viscosidade do meio de cultura) e vias fermentativas, e não à síntese de biomassa, indicando uma menor Y<sub>s/x</sub>. Por esse mesmo motivo, Bbl1 passaria a ser mais expressa devido ao acúmulo de maltose intracelular, já que pouco desse dissacarídeo estaria sendo utilizado para síntese de ATP e biomassa, conforme apresentado anteriormente.

A fim de estudar as propriedades da enzima Bbl1 foi elaborado um procedimento de purificação utilizando-se Octyl-Sepharose (semelhante a PEREIRA et al., 2017). Em seguida foi removido o Triton X-100 por interação com DEAE-celulose. Cerca de 30% da atividade total inicial foi mantida ao final deste procedimento de purificação. A maior perda ocorreu na etapa de lavagem em concentrador para remoção dos componentes do meio de cultura. Isso provavelmente se deve ao fato que o aumento da concentração de lipases leva a interações enzima-enzima formando aglomerados (HAN, 1990) impedindo a atividade catalítica correta da Bbl1. A purificação da enzima foi confirmada em gel SDS semi-desnaturante com uma banda de 47 kDa, cuja solução final apresentou uma atividade específica de 672 U.mg<sup>-1</sup> de Bbl1.

O teste de atividade e estabilidade frente a surfactantes revelou que Bbl1 é mais ativa na presença de Triton X-100, com ou ausência da goma arábica, seguido do tween-20 e -80. Entretanto, após 24h de exposição, esse mesmo surfactante provocou alterações significativas na estrutura da enzima, levando a desnaturação. Em termos de estabilidade, o Tween-80 provocou até aumento na atividade de Bbl1 após o período estudado. Na presença de surfactantes ou solventes orgânicos, a "tampa" da lipase sofre modificações, expondo o resíduo de serina do sítio catalítico ao substrato. Essas alterações podem ter ocasionado desenovelamento das  $\alpha$ -hélices que compõem a "tampa" quando exposto ao Triton X-100. A perda da estrutura da "tampa" da lipase promove alterações significativas na estrutura como um todo (MAIANGWA et al., 2017), justificando o observado. Já foi relatado em lipases de *C. antarctica, C. rugosa, Thermomyces lanuginosus, Burkholderia cepacia, Geobacilus zalihae, Rhizomucor miehei* que a estrutura e posição da tampa depende das condições e tipo de solvente (TRODLER et al., 2009; REHM et al., 2010; STAUCH et al., 2015; PUTRI et al., 2016; SKJOLD-JORGENSEN et al., 2016). Desse modo, pode-se hipotetizar que na presença de um dado surfactante (por exemplo Triton X-100), a conformação da "tampa" é diferente da conformação quando a mesma lipase é exposta a outro surfactante (tween), e cada uma proporciona um grau de estabilidade diferente na enzima como um todo. O SDS e CTBA foram os únicos surfactantes iônicos utilizados; ambos provocaram completa desnaturação de Bbl1, provavelmente por desestabilizar ligações iônicas que participam na estabilidade conformacional desta enzima. Dos solventes orgânicos estudados, apenas o ciclohexano não provocou alterações bruscas na atividade de Bbl, sendo registrado aumento de 14% em relação ao controle. O ciclohexano deve estabilizar a conformação aberta de Bbl1, não desencadeando desnaturações bruscas em sua "tampa" em 24h de exposição; pelo menos efeito observado na presença de tween-20 e -80. Quanto aos solventes álcoois, observou-se uma relação proporcional entre perda de atividade residual e tamanho da cadeia alifática: quanto maior o número de carbonos, maior a perda de atividade enzimática. Todavia, a hidrofobicidade dos álcoois não pode ser a única explicação da desnaturação, visto que o ciclohexano (solvente mais apolar no experimento) não promoveu tal efeito; a existência de uma hidroxila permite a interação com resíduos polares importantes na estabilidade da proteína no momento que há exposição do sítio catalítico pela ativação interfacial, ocasionando a desestabilidade.

Quanto ao teste com íons, primeiramente não se observou efeito inibidor ou ativador de Bbl1 na atividade de hidrólise. Esperava-se que íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  atuariam aumentando atividade, visto que isso foi relatado com algumas lipases de *B. bassiana* (ZIBAEE et al., 2013; VICI et al., 2015). Por meio de outros estudos, algumas lipases apresentam hiperativação na presença destes íons pois auxiliam na estabilidade da "tampa" em sua conformação aberta (MAIANGWA et al., 2017). Apesar disso, foi observado que o íon citrato, proveniente do tampão McIlvaine, atua como protetor de Bbl1 frente aos íons Pb. A substituição do meio reacional por outro tampão (após assegurar que a atividade de Bbl1 não sofreria mudanças) apontou que a ausência de citrato e na presença de Pb diminui a atividade hidrolítica de *p*NPP por Bbl1.

A termoestabilidade é um parâmetro importante na viabilidade de uso de enzimas para aplicação industrial. Diferentes forças fracas atuam conjuntamente na estabilidade de proteínas; de fato, a co-operatividade é descrita como elemento crucial para manutenção da estrutura nativa de tal modo que, a partir de uma dada temperatura, o desenovelamento proteico é abrupto (NELSON; COX, 2014). Muitos autores descrevem a desnaturação proteica como um equilíbrio químico entre o estado nativo da proteína e o(s) estado(s) desnaturado(s) da mesma (MORONI et al., 2015; SCHON et al., 2017). Sendo uma reação química, pode ser descrita por

parâmetros termodinâmicos e cinéticos (GHORI et al., 2011; PRAJAPATI et al., 2014); o que justifica os estudos de estabilidade em diferentes temperaturas ao longo de um intervalo de tempo, como realizado no presente trabalho. A perda de atividade residual ao longo do tempo, indica que a desnaturação térmica é cinética, podendo ser descrita em termos de constante de equilíbrio de desnaturação (k<sub>desn</sub>); quanto menor esse valor, mais lentamente se procede a reação de desnaturação. A desnaturação depende da temperatura, portanto, diferentes valores  $k_{desn}$  são obtidos para a mesma enzima. Já que a temperatura afeta a taxa de reação, a mesma pode ser descrita por Arrhenius (PRAJAPATI et al., 2014), cuja expressão relaciona as atividades inicial e residual após um instante de tempo para cada temperatura. Com os valores de t<sub>50</sub>, que corresponde ao instante em que 50% da atividade inicial é remanescente, é possível através da expressão de Arrhenius determinar a k<sub>desn</sub> para uma dada temperatura. Por meio disso, foi observado que Bbl1 é mais estável nas temperaturas de 40°C e 50°C, apresentando menores valores de k<sub>desn</sub>. Todavia, esses valores absolutos de k<sub>desn</sub> e t<sub>50</sub> são referentes a concentração de Bbl1 e tampão utilizados nesse experimento, visto que a estabilidade de uma proteína é, muitas vezes, proporcional concentração destes elementos (KIM et al., 2005; BYE; FALCONER, 2013; CAO et al., 2016).

A k<sub>desn</sub> em sua forma logaritmo, em base natural, podem ser relacionadas com o inverso da temperatura; o coeficiente angular da expressão obtida é proporcional a energia de ativação da desnaturação ( $E_{a(d)}$ ) que corresponde a diferença de energia entre o estado nativo e de transição, se considerar a desnaturação como uma reação química. Para Bbl1 o valor dessa energia foi próximo de 40 kJ.mol<sup>-1</sup>. Esse valor de energia reflete indiretamente às interações que estabilizam ou desestabilizam a conformação da enzima; podendo ditar o grau de cooperatividade entre as interações. Entretanto, é impossível predizer, por meio desse valor, qual interação é mais ou menos relevante; são necessários estudos complementares, como mutagênese ou cristalografia, para se determinar quais são os resíduos mais participativos na termoestabilidade de Bbl1. RUSLAN et al. (2012) promoveu aumento da termoestabilidade da lipase de *G. zalihea* por meio da mutagênese, garantindo pontes salinas as quais foram responsáveis pelo ganho de estabilidade. XIE et al. (2014) proporcionou aumento de rigidez no sítio catalítico da lipase b de *C. antarctica*, o que resultou em ganho de estabilidade térmica.

Outro parâmetro estudado foi a estabilidade frente a pH. Variações no pH conferem diferentes conformações em uma proteína, já que as cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos podem adquirir ou perder prótons, provocando alterações nas cargas e, portanto, nas interações que as regem. Bbl1 mostrou-se estável na faixa de pH de 3 a 10, com atividade residual próximo de 40% em 48h, uma propriedade intrínseca desta lipase em relação às

apresentadas ao longo do texto; uma alta estabilidade ao pH, com maiores valores de  $t_{50}$  em pH 7 até 9.

Após a caracterização da estabilidade de Bbl1 foi realizada a otimização dos valores de pH e temperatura para hidrólise de pNPP. A interação enzima e substrato depende das condições reacionais, principalmente pH e temperatura. Ambos interferem diretamente: na geometria do sítio catalítico, pois mudando o espaçamento entre os resíduos His-Ser-Asn de Bbl1 pode-se afetar os passos de reação; na acessibilidade do substrato ao sítio catalítico; na velocidade dos choques entre as moléculas; na solubilidade do substrato e até mesmo na conformação da "tampa" de lipases (KHAN et al., 2017). Além da reação, propriamente dita, o sistema reacional é submisso à desnaturação da Bbl1, conforme mencionado anteriormente, criando um balanço entre eficiência de catálise e manutenção da estrutura da proteína. O planejamento de experimentos é uma ferramenta que permite avaliar diversos parâmetros convergentes sobre uma dada análise, destacando quais são mais relevantes para o estudo. Foram observados que os melhores valores de pH e temperatura para hidrólise de pNPP foram, respectivamente, 6,04 e 53,6°C; valores próximos ao registrado em extrato bruto de B. bassiana (SPIROPULOS, 2015), o que indica pouca alteração na conformação nativa desta enzima após expressão heteróloga. O valor de atividade enzimática após otimização foi de aproximadamente 80 U.mL<sup>-1</sup>, o que significa uma atividade específica de quase 1200 U.mg<sup>-1</sup> Bbl1 após todo o procedimento de purificação. Esses valores são condizentes com lipases de B. bassiana (VICI et al., 2015) e diferente de outros fungos; por exemplo TAKÓ et al. (2017) demonstrou que inúmeras lipases de Rhizomucor miehei (cuja uma dada lipase é comercialmente importante) apresentam temperatura ótima entre  $30^{\circ}$ C -  $40^{\circ}$ C e pH de 5 – 6.

Apesar das características de estabilidade e otimização, a eficiência catalítica e afinidade pelo substrato também são propriedades relevantes para indústria. É interessante acrescentar valor econômico e competitivo para pesquisa, portanto, comparou-se tais características com a lipase de Palatase<sup>®</sup> Novozymes, *R. miehei*, vendida mundialmente, visto que essa consciência possibilita a geração de patentes nas instituições públicas, podendo alavancar o desenvolvimento social e econômico do país. Os parâmetros  $k_{cat}$  e  $K_{0,5}$  devem ser analisados individualmente quanto eficiência em diferentes concentrações de substrato. Muitos autores utilizam (as vezes erroneamente) a relação  $k_{cat}/K_{0,5}$  para descrever essa propriedade (EISENTAHL et al., 2007). A enzima Bb11 demonstrou maior *turnover* em relação a lipase de Palatase indicando que, soluções com altas concentrações de *p*NPP, a taxa de conversão deste substrato a palmitato e fenolato é elevada. Além disso, quando se avalia os respectivos valores de K<sub>0,5</sub>, Bb11 indica uma menor concentração de substrato necessária para atingir metade da
$V_{máx}$  da hidrólise de *p*NPP. Isso indica uma tendência aparente de maior afinidade por esse substrato. Todavia, deve-se tomar cuidado ao considerar heurística essa relação, visto que lipase possui cinética explicada por modelos de bisubstrato; o próprio coeficiente de hill de Bbl1 foi maior que 1 hidrólise de *p*NPP, indicando uma relação sigmoide na concentração de substrato e velocidade reacional. Essa relação pode ser explicada pelo efeito da tampa da lipase, como demonstrado por (GUERRA et al., 2011); segundo o qual esse tipo de relação se deve a uma ativação interfacial "incompleta" em algumas moléculas de lipase, provavelmente pela solubilização de *p*NPP no sistema reacional.

Da mesma forma que foi explicado para  $k_{desn}$ , a reação de hidrólise de *p*NPP catalisada por Bbl1 ou palatase é dependente da temperatura (Figura 28). O aumento de k<sub>cat</sub> com aumento de temperatura pode indicar maior velocidade dos choques da enzima com o substrato ou mudança na conformação da "tampa" de lipases. Entretanto, essa relação não é mantida em todas as temperaturas, pois, como foi visto, existe o efeito desnaturação da enzima (BARTON, 1979). Isso é observado pelo decaimento de k<sub>cat</sub> com aumento de temperatura, visivelmente pela formação de uma concavidade. Entretanto, caso não houvesse a desnaturação da enzima, a relação k<sub>cat</sub> e inverso de temperatura manter-se-ia linear, criando os pontos teóricos que são explicados pela relação de Arrhenius. O coeficiente dessa relação linear é proporcional a energia de ativação ( $E_a$ ) da hidrólise de *pNPP*; para Bbl1 foi aproximadamente 48 kJ.mol<sup>-1</sup> e Palatase, 158 kJ.mol<sup>-1</sup>. Isso indica que Bbl1 possui "mecanismos" mais eficientes para diminuir a energia de ativação de hidrólise de pNPP: pela maior afinidade da enzima, removendo a camada de solvatação do substrato, ou melhor posicionamento dos resíduos catalíticos, ou a existência de cadeias laterais dentro da enzima que estabilizam o substrato ao ataque nucleofílico (NELSON; COX, 2014). NOORMOHAMADI et al., (2013) caracterizaram a hidrólise de *p*NPP com uma lipase de *Pseudomonas* sp com E<sub>a</sub> de 31 kJ.mol<sup>-1</sup>. (PRAJAPATI et al., 2013) mostrou que uma lipase de *C. flavigena* possui E<sub>a</sub> de 39 kJ.mol<sup>-1</sup>. Por meio desses resultados, tanto cinética como termodinamicamente, a lipase Bbl1 apresenta potencial de uso industrial, entretanto, estudos complementares para assegurar essa viabilidade em diferentes substratos precisam ser elaborados, acrescentando valor sobre o uso dessa enzima.

A Bbl1 foi susceptível à inibição por ácidos graxos oleico e linoleico. Tais moléculas foram estudadas quanto ao potencial inibitório pois são os mais constituintes da maioria dos óleos naturais. Os valores de CI<sub>50</sub> podem predizer a afinidade a um dado inibidor, apesar do valor K<sub>i</sub><sup>app</sup> ser mais indicado pois independe da concentração da enzima (CER et al., 2009). Entretanto o valor de CI<sub>50</sub> foi utilizado apenas para facilitar o presente estudo visto que todos os experimentos cinéticos utilizaram a mesma concentração de Bbl1. O ácido linoleico pareceu

ser mais eficiente como inibidor da hidrólise de pNPP por Bbl1. TSAI e CHIANG (1991) descreveu a inibição competitiva da hidrólise de óleo de oliva por ácidos oleicos na lipase de C. rugosa. TAKÓ et al. (2017) demonstrou inibição da hidrólise de pNPP catalisada por lipases de R. miehei e Rhizopus oryzae na presença de diferentes ácidos graxos; em geral quanto maior a cadeia alifática do inibidor, mais aparente foi a inibição competitiva, todavia, quanto menor a cadeia, maior a ativação interfacial das lipases, provavelmente pela interação cooperativa destes curtos ácidos graxos com a superfície da enzima. De fato, o produto de hidrólise de pNPP contém um ácido graxo (palmitato), portanto, acreditava-se que ácidos graxos de uma forma geral competiriam pela tríade catalítica, independentemente do tamanho da cadeia do substrato. Entretanto, para Bbl1 a inibição por ácidos oleico e linoleico foi do tipo não-competitivo. Isso indica que tais inibidores devem estar interagindo com uma região diferente da tríade catalítica, tanto na enzima livre ou no complexo enzima-substrato (NELSON; COX, 2014). A análise de modelagem molecular indicou apenas uma região hidrofóbica, com acesso pela superfície da enzima, localizada acima da tríade catalítica e, portanto, acredita-se que os inibidores devem interagir com esse "túnel" predito por esse modelo, já descrito anteriormente. Apesar de serem encontrados indícios que descrevem essa região hidrofóbica, não foram encontrados estudos estruturais/cristalografia que correlacionam essa região e a inibição por ácidos graxos em lipases. Provavelmente o efeito não-competitivo se deve a obstrução desse túnel pelos inibidores, tanto o oleico ou linoleico interage com as cadeias laterais hidrofóbicas dessa região, impedindo o fluxo de substrato e produtos ou a estabilização do substrato na enzima, todavia, não interagem especificamente com os resíduos da tríade catalítica. Isso explicaria por que a taxa de catálise diminui ( $V_{máx}$ ) mesmo não modificando a afinidade aparente por pNPP ( $K_{0.5}$ ). Pelo fato do CI<sub>50</sub> ser menor do ácido linoleico, e considerando que tal inibidor se liga ao "túnel" de Bbl1, provavelmente a forma dessa região deve corresponder a geometria desse inibidor.

Além dos estudos com enzimas livres, a imobilização apresenta uma vertente que possibilita realçar suas características e à reutilização da mesma amostra inúmeras vezes, em um dado processo industrial. Desse modo, a Bbl1 foi imobilizada em diferentes suportes, com interações hidrofóbicas (octyl, phenyl, butyl, sepabeads C-18), iônicas (DEAE, MANAE, PEI) e covalentes (CNBr). Quando se trata de suportes, dois componentes são essenciais e que participam na aderência da enzima; a molécula funcional, que exerce a função de interagir diretamente com a enzima, por exemplo octyl (grupo alifático de 8 carbonos com ligação éster na matriz), e a matriz, que corresponde a base na qual os grupos funcionais estão ligados; a celulose e a agarose são as mais utilizadas. Desse modo, não apenas o grupo funcional, mas a matriz também interage com a enzima por meio de suas propriedades químicas (DATTA et al.,

2013). A imobilização não é apenas a interação da enzima com um dado suporte, mas também a alteração conformacional da proteína, resultado em propriedades catalíticas e estabilidade diferentes (SECUNDO, 2013; TELLO et al., 2016). De fato, o arranjo tridimensional final em uma imobilização dita as forças fracas que mantém a estabilidade da enzima, podendo aumentar a rigidez da cadeia polipeptídica, compactação da enzima ou redução da entropia de desenovelamento. Isso por outro lado pode facilitar o acesso do substrato na enzima e alterar a afinidade com inibidores. Tudo isso dependerá de como o grupo funcional e a matriz de cada suporte interage com a enzima.

Para Bbl1, todos os suportes, com exceção do phenyl-sepharose e a agarose não-ativada, foram capazes reter a lipase da solução aquosa após 24h. O phenyl-sepharose contém grupos com pouca rotatividade e anéis volumosos com orientações planares que provavelmente saturam rapidamente de Bbl1, impedindo a aderência de mais enzimas. Por outro lado, apenas a Octyl-sepharose possibilitou o aumento da atividade enzimática, hiperativando-a em 22%, aproximadamente, para esse período. A agarose não-ativada teve por finalidade apenas assegurar que a perda da atividade não ocorreria devido às condições de temperatura e pH do experimento.

Quando se analisa a cinética de imobilização pode-se observar, entretanto, que phenyl, butyl e PEI são capazes de hiperativar Bbl1 nos períodos iniciais de imobilização, entretanto ocorre uma queda gradual da atividade em instantes mais tardios. A imobilização acima de tudo também é uma reação química, no qual existe em equilíbrio enzimas livres e aderidas. Sendo assim, provavelmente, nesses três suportes ocorre a aderência de Bbl1 na sua conformação aberta, entretanto, a medida que mais enzimas se aderem, maior a obstrução, impedindo a passagem do substrato *p*NPP. Outra explicação pode estar relacionada a estabilidade da Bbl1 nesses suportes; conforme mencionado anteriormente, a estrutura final pode apresentar baixa energia de desnaturação em relação a enzima livre, facilitando o desenovelamento. Essa segunda hipótese é considerada mais válida visto que a matriz Sepharose e agarose são polímeros o que reduziria o bloqueio da enzima por seus arredores (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). O suporte de Sepabeads C-18, por outro lado, é composto de macroporos cilíndricos com superfícies convexas (MATEO et al., 2002). Essas superfícies poderiam oferecer maior congruência entre as enzimas ao longo da imobilização, explicando a queda de atividade na imobilização.

O interessante é comparar os perfis de imobilização de Bbl1 em MANAE e DEAE. Ambos os suportes são carregados positivamente no pH do experimento. Entretanto pode-se observar que a imobilização em DEAE atingiu uma saturação parcial mesmo que toda Bbl1 foi retirada do sobrenadante. Esse perfil se manteve estável até 24h. Ao contrário em MANAE, ocorreu perda da atividade gradualmente. As únicas diferenças entre esses dois suportes são a existência de ramificações alifáticas do dietilaminoetil e os grupos polares no polímero de celulose. Essas diferenças podem promover a estabilidade de Bbl1 quando imobilizada, mas com o custo de dificultar o acesso do substrato ao sítio catalítico.

Em geral, as enzimas ganham um grau de estabilidade quando imobilizadas. Para Bbl1, a imobilização promoveu um ganho na estabilidade térmica em 30 °C, 40°C, 50°C e 60°C, pois nessas temperaturas o t<sub>50</sub> foi maior que 48h. Entretanto, Bbl1 imobilizada perdeu capacidade de manter-se estável em 70°C; temperatura a qual mantinha até 30% da atividade inicial quando livre. SOUZA et al. (2017) demonstraram um efeito semelhante de imobilização de lipase de Moniliella spathulata. A imobilização em suportes iônicos reduziu significativamente a termoestabilidade apesar de proporcionar maior afinidade pelo óleo de sardinha. Por outro lado, os autores observaram que Octyl-Sepharose causou ganho em estabilidade além de hiperativação. TURATI et al. (2017) realizaram os mesmos experimentos com lipase de Penicillium sp. e puderam observar que Octyl e CNBr proporcionaram ganho na termoestabilidade a 40°C e 50°C, porém houve perda da mesma quando incubados nos pH 9 e 10. Frente a diferentes pH, os derivados de Octyl e CNBr proporcionaram maior estabilidade à Bbl1. A exceção, para ambos, foi no pH 10 em que prevaleceu desnaturação logo no começo do experimento. Desse modo, comparando-se com essa lipase livre, a imobilização promoveu acréscimo da estabilidade nos valores mais baixos e intermediários de pH e temperatura, todavia, nos seus respectivos valores mais altos há perda brusca de atividade inicial.

Decidiu-se estudar a otimização de experimentos em três derivados: DEAE, CNBr e Octyl. A escolha somente destes baseou-se em: maior estabilidade em pH e temperatura e cada um representar um tipo diferente de interação com a enzima. A otimização de experimentos da hidrólise de *p*NPP revelou algumas características peculiares. Bbl1 em Octyl apresentou valores de temperatura e pH muito próximos da enzima livre em solução, apesar de possibilitar um ganho de atividade enzimática. Entretanto, em DEAE observou-se um acréscimo do pH ótimo, enquanto que em CNBr houve um aumento da temperatura ótimo e redução do pH ideal para hidrólise. Tais alterações são reflexos do resultado da interação da Bbl1 com esses suportes. A modificação do pH ótimo pode indicar mudança na distribuição de cargas ao redor do sítio catalítico ou na superfície da enzima, necessitando potenciais hidrogeniônicos diferentes para permitir a interação com o substrato (MOHAMAD et al., 2015; YANG et al., 2017). Já o aumento da temperatura ótima pode ser justificado pelo ganho de rigidez da enzima, ou do sítio catalítico, quando covalentemente ligada ao CNBr; de fato RADESTOCK e GOHLKE (2011) indicaram haver uma certa relação proporcional entre rigidez da uma enzima com sua temperatura ótima em adaptações termofílicas, apesar de que essa relação nem sempre é regra (KARSHIKOFF et al., 2015; CHOY et al., 2017). KAMAL et al. (2012) produziram um mutante de lipase de *Bacillus subtilis* altamente termoestável e com elevado potencial catalítico, mas que apresenta rigidez no sítio catalítico. ZHANG et al. (2016) com mutantes da lipase 1 de *C. rugosa* puderam verificar que o aumento da rigidez do sítio catalítico provocou ganho na estabilidade sem alterar a hidrolítica da enzima. Desse modo a relação entre dinâmica da enzima e suas propriedades de catálise e estabilidade ainda permanecem obscuros. Visto que a melhor atividade específica foi obtida com derivado em Octyl, decidiu-se dar continuidade a caracterização apenas deste composto.

A imobilização em octyl também alterou as propriedades cinéticas e termodinâmicas da hidrólise de *p*NPP por Bbl1. Houve um aumento de 2,39 vezes da  $V_{máx}$  e redução de K<sub>0,5</sub> em 2,70 vezes em relação a essa enzima livre. Segundo a literatura, o suporte Octyl-Sepharose imobiliza a "tampa" da lipase proporcionando sua conformação aberta e expondo o sítio catalítico da enzima (MANOEL et al., 2015). Provavelmente isso facilita o fluxo de reagentes e produtos pela enzima, ou na orientação da interação enzima-substrato, mesmo em baixas concentrações de substrato (menor K<sub>0,5</sub>). SOUZA et al. (2017) realizaram o mesmo esquema de experimento com a lipase de *M. spathulata*, imobilizando-a em Octyl-Sepharose, DEAE-agarose e CNBr, a partir da hidrólise de *p*NPP. Seus resultados indicaram alteração nos parâmetros cinéticos  $V_{máx}$  e K<sub>M</sub> aparente (correspondente ao K<sub>0,5</sub>) com redução em ambos no derivado de Octyl, em relação à enzima livre. Segundo os autores isso indica que a imobilização deve alterar a eficiência do mecanismo catalítico, provavelmente pela mudança na posição dos resíduos da tríade, mesmo que o acesso do substrato seja maior.

Observa-se ainda que a relação velocidade de catálise e concentração de substrato apresentou um coeficiente de hill igual a 1, ou seja, uma relação hiperbólica. De fato, a manutenção da conformação aberta por Octyl indica a ativação interfacial completa da enzima.

A energia de ativação da hidrólise de *p*NPP foi de aproximadamente 13 kJ.mol<sup>-1</sup>, uma redução de 3,7 vezes em relação a mesma com Bbl1 livre. Essa redução indica que os valores de  $k_{cat}$  da enzima pouco variam em função da temperatura, ou seja, tanto em uma temperatura mais baixa quanto mais alta a eficiência catalítica é pouco variável e, portanto, menos dependente da temperatura, sempre comparando-se a enzima livre. Quando se pensa em temperatura e reações químicas, segundo Arrhenius, a temperatura aumenta a energia cinética das moléculas em solução e os choques entre elas (PELEG et al., 2012). Entretanto, para uma reação ocorrer com sucesso, além dos choques é necessária a orientação correta para ativação

do mecanismo reacional. É sensato pensar que o suporte de Octyl permeia essa orientação e o "encontro" entre o sítio catalítico de Bbl1 e pNPP, o que explica essa redução na energia de ativação. Até agora não foram encontrados trabalhos que denotem o papel da imobilização de lipases, ou enzimas em geral, sobre a alteração da energia de ativação das reações catalisadas pelos mesmos, apesar de ser conhecida a modificação na eficiência catalítica. Entretanto, não é regra que aumento ou diminuição nesta, obrigatoriamente promove alteração na energia de ativação.

O padrão de inibição pelos ácidos oleico e linoleico sofreu alteração pela imobilização em Octyl. Da mesma forma que a imobilização facilita o acesso de *p*NPP ao síto catalítico, o mesmo efeito provavelmente é observado com os ácidos graxos. Como o Octyl desloca a "tampa" de lipases, a interação dos resíduos catalíticos com os ácidos graxos deve ocorrer com mais espontaneidade. Em baixas concentrações desses inibidores, o tipo de inibição apresenta-se como competitiva; nesse caso, interagem diretamente com os resíduos catalíticos da enzima. Se o dito for verdade, explica-se por que a inibição, provocada por esses mesmos ácidos graxos, é não-competitiva nessa mesma enzima livre. Nessa situação, a tampa provavelmente impede o contato entre ácidos graxos e os resíduos catalíticos e age como um "filtro" para selecionar as ligações ésteres dos substratos. A medida que a concentração do inibidor aumenta, além da interação com o sítio, pode haver congruência de moléculas de ácidos graxos na superfície da enzima ou no "túnel" apresentado anteriormente, reduzindo o fluxo de substrato e produtos na lipase, o que explica o comportamento de inibição mista observado nos resultados.

Apesar que o intuito do presente trabalho foi adquirir uma vertente para produção de lipases, surgiu-se uma ânsia em utilizá-lo em prol da oncologia. Para tal, a Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose (cuja condição apresentou melhor atividade enzimática e estabilidade) foi utilizada na hidrólise de dois óleos: o açaí (*Euterpe oleracea*) e buriti (*Mauritia flexuosa*). Esses óleos foram escolhidos devido a existência de poucos trabalhos na área e da controversa sobre o uso destas substâncias no tratamento de câncer. Além disso, utilizaram-se óleos brasileiros com o intuito de valorizar a flora do Brasil, buscando promover suas produções e alavancar o valor econômico destes insumos.

O estudo oncológico baseou-se na aplicação de fases polar e apolar providos da hidrólise dos óleos de açaí e buriti sobre as células de glioblastoma LN-18 e fibroblasto CCD-1072Sk. As células de LN-18 possuem um mecanismo de resistência ao medicamento telozolomida, um dos mais comercialmente utilizado no tratamento de gliomas. A resistência se deve a uma enzima, O<sup>6</sup>-metilguanidina-metiltransferase, capaz de substituir as guanidinas metiladas pela ação da droga telozolomida (LEE, 2016). Em geral, pacientes diagnosticados com esta linhagem, ou outros gliomas que apresentam mecanismos de resistência a telozolomida (por exemplo, excisão de bases metiladas ou por DNA-glicosilase), possuem qualidade de vida reduzida, justificando a necessidade de tratamentos alternativos para essa doença. As células de fibroblasto foram utilizadas como controle de citotoxicidade em células normais frente aos hidrolisados, devido a sensibilidade destas células a medicamentos nos estudos oncológicos (KRETOWSKI et al., 2017).

A separação das duas fases serviu para facilitar o manuseio dos produtos de hidrólise. Como é desconhecida a composição química destes óleos, presumiu-se que componentes de diferentes polaridades pudessem ser separados durante a hidrólise. Tais componentes poder-seiam apresentam efeito sobre as células tumorais e, portanto, não desejou descartá-las durante o estudo, justificando a combinação entre as duas fases.

A faixa de concentração dos hidrolisados utilizada nos cultivos celulares foi elaborada buscando-se respeitar um consumo diário de 8 g de ácidos graxos totais, segundo referências mundiais (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO *and Nutrition Paper*, 91 - 2010). Para tal, assumiram-se algumas considerações: (1) todo ácido graxo consumido é uniformemente distribuído no corpo humano e (2) o volume médio do corpo humano é, aproximadamente, 71 L (SENDROY; COLLISON, 1966; CLAUSER et al., 1969). A partir destas considerações, espera-se que a concentração dos ácidos graxos consumidos no corpo humano seja de 0,11 mg.mL<sup>-1.</sup> Valores de concentração acima e abaixo de 0,11 mg.mL<sup>-1</sup> foram adotados, buscando abranger uma possível diversidade de características físicas, metabólicas e nutricionais existentes na população brasileira, o que justifica a faixa de concentração de 0,025 até 0,20 mg.mL<sup>-1</sup> de ácidos graxos utilizada no estudo. Essa faixa também possibilitou verificar se o efeito dos hidrolisados seria dose-dependente.

Os controles permitiram verificar se os óleos de buriti e açaí não-hidrolisados e o solvente DMSO afetariam ou não a viabilidade das células utilizadas no experimento.

Quanto aos resultados, observou-se que as células de glioblastoma tiveram redução na viabilidade celular perante tratamento com a fase apolar e combinado do hidrolisado do óleo de buriti. Presume-se que esse efeito foi decorrente de diacilglicerídeos presentes na fase apolar, conforme evidenciados por TLC, pois o cultivo controle (com óleo de buriti não-hidrolisado) não reduziu a viabilidade celular. A justificativa deste resultado pode estar vinculada a proteína diacilglicerol cinase  $\alpha$  (DGK $\alpha$ ), que tem participação na manutenção da sobrevivência e proliferação tumoral (DOMINGUEZ et al., 2014; PUROW, 2015). Essa proteína converte moléculas de 1,2-DAG em ácido fosfatídico (PA) que, por sua vez, é responsável pela ativação de vias oncogênicas por mTOR (*mammalian target of rapamycin*), HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible*)

*fator 1a*) e Akt (Proteína cinase B). Inibidores dessa proteína já revelaram serem eficazes na diminuição da viabilidade destas células tumorais, diminuindo a expressão de RNAm envolvidos nestas vias e promovendo morte celular por apoptose sem alterar a viabilidade das células normais.

Pensando numa possível explicação para a redução da viabilidade de LN-18 na presença da fase apolar do hidrolisado de buriti, pode-se assumir um efeito inibitório de DGK pelos componentes 1,2- ou 1,3-DAG. Todavia, não foram encontrados trabalhos específicos de inibição de DGK $\alpha$  com DAGs que pudessem corroborar com essa hipótese. Por outro lado, LUNG et al. (2009), e SHULGA et al. (2011) demonstraram que uma isoforma desta proteína, a DGK $\epsilon$ , apresenta especificidade e inibição por diferentes tipos de DAGs. Alguns trabalhos (ALBUQUERQUE et al., 2005; RODRIGUES et al., 2010; DARNET et al., 2011) apontam que a composição de cadeias acil no óleo de buriti varia desde ácidos dodecanóico, palmítico, oleico, linoleico,  $\alpha$ -linoleico, araquidônico e, deste modo, uma enorme variedade de DAGs pode existir na fase apolar do hidrolisado de buriti, podendo inibir a atividade tumoral da proteína DGK.

A fase apolar do hidrolisado de buriti não reduziu a viabilidade das células de glioblastoma em 120h. Isso pode indicar que tais células apresentam mecanismos de resiliência às substâncias presentes na fase apolar; os DAGs, por exemplo, podem ser metabolizados e convertidos em PA mesmo que a taxa dessa reação seja baixa, como mencionado anteriormente. Todavia, a perda de viabilidade nestas células permaneceu na mistura entre as fases polar e apolar, indicando um possível efeito sinérgico ou de coparticipação entre seus componentes na ativação de vias apoptóticas. A fase polar possui ácidos graxos (AG) em sua composição; no óleo de buriti, as cadeias acil mais constituintes dos triacilglicerídeos são os derivados de ácido oleico (octadec-9-enóico - 18:1), palmítico (hexadecanóico) e linoleico (cis,cis-9,12octadecadienoico). Há estudos da ação do ácido oleico na ativação de vias apoptóticas em diferentes linhagens de células cancerígenas. Um deles é sobre a supressão de HER-2 (human epidermal growth fator receptor 2), um oncogene envolvido na viabilidade e metástase de diferentes linhagens de câncer (MENENDEZ et al., 2005). JIANG et al. (2017) mostraram que o ácido oleico é responsável por induzir apoptose em carcinoma epidermóide de língua, induzindo arraste da fase G0/G1, diminuição de ciclinas e aumento de expressão de p53 e caspase-3. HARDY et al. (2003) demonstraram que o ácido palmítico é responsável por induzir apoptose em células do câncer mamário.

A fase polar, além de interagir sinergicamente com a fase apolar do hidrolisado de buriti, foi responsável em promover aumento de viabilidade celular em fibroblastos em 120 horas. Uma explicação é que as células de fibroblasto possam utilizar os ácidos graxos no metabolismo energético ( $\beta$ -oxidação), na síntese de precursores de hormônios de crescimento ou elementos estruturais de membrana. Em geral, os hidrolisados do buriti não provocaram perda de viabilidade celular dos fibroblastos, o que indica baixa toxicidade dos produtos de hidrólise do óleo de buriti sobre células normais.

Analisando o efeito dos hidrolisados do açaí, a primeira diferença é o efeito citotóxico da fase apolar sobre os fibroblastos. O TLC revelou que a concentração dos produtos de hidrólise foi muito maior no açaí do que no buriti, o que poderia justificar a perda de viabilidade nas células normais.

Quanto a linhagem LN-18 na presença dos hidrolisados de açaí, houve perda de viabilidade em 24h, porém não foi mantida em 120h, mesmo na presença da mistura entre as fases polar e apolar. Isso representa uma diferença da ação antitumoral entre os hidrolisados do óleo de açaí e buriti. Uma provável explicação dessa diferença pode estar na composição de tocoferóis presentes no óleo de buriti (RODRIGUES et al., 2010; DARNET et al., 2011). Os tocoferóis, conhecidos como vitamina E, apresentam propriedade antioxidante e essas substâncias são capazes de induzir morte celular em células tumorais pela ativação de caspases e supressão de p27 (BJORKBLOM et al., 2016; GUPTA; SUH, 2016). Essas substâncias quando combinadas com os produtos de hidrólise do óleo de buriti podem ter intensificada sua atividade antitumoral.

Todavia, existem questionamentos a serem discutidos que não puderam ser alcançados definitivamente no trabalho: qual seria a relevância deste tratamento sobre outras linhagens de glioblastoma? Quais são as vias moleculares e de sinalização ativadas pelos produtos da hidrólise do óleo de buriti as quais convergem na redução da viabilidade celular em LN-18? Da mesma forma, será que os hidrolisados do óleo de açaí podem promover redução de viabilidade em outros tipos de linhagens tumorais? De qualquer forma, existe uma potencial aplicação do hidrolisado de óleo de buriti no tratamento de células de glioblastoma LN-18. Essa, por sua vez, foi possível devido às propriedades da Bbl1 imobilizada, incrementando valor sobre a pesquisa realizada.

## CONCLUSÕES

#### CONCLUSÕES

A expressão de uma lipase em *A. nidulans* por meio do vetor pExpyr foi de grande sucesso. Quando inoculado em meio contendo xarope de milho, a produção de atividade de Bbl1 pela cepa transformante foi de 35 U.mL<sup>-1</sup>, cerca de 4 vezes maior em relação à cepa selvagem, *B. bassiana*. Não foi observado o efeito negativo de escalonamento, visto que a produção de lipase se manteve proporcional ao volume do meio de cultura, atingindo aproximadamente 34.000 U de atividade de lipase em biorreatores.

A lipase Bbl1 apresentou estabilidade em uma faixa ampla de temperatura e pH, tanto em solução quanto imobilizada em diferentes suportes, especialmente em Octyl-Sepharose Ainda, observou-se que as propriedades bioquímicas desta enzima sofreram modificações posteriormente à imobilização; as quais dependem, inclusive, do tipo de suporte empregado. Em comparação a um modelo de lipase comercial, a Bbl1 demonstrou-se promissora quanto sua eficiência catalítica e, portanto, pode-se tornar um forte candidato à produção em escala industrial, visto que o fator enzima e micro-organismo (neste caso, quanto à capacidade do transformante em produzir a lipase) contribuem para esse resultado.

O tratamento de linhagens de glioblastoma com hidrolisados de óleos brasileiros, açaí e buriti, foi uma premissa para fixar um novo patamar na utilização de lipases como um bem social, bem diferente das aplicações comuns encontradas na literatura. Os resultados demonstraram que tanto os hidrolisados de açaí e buriti apresentaram-se aplicáveis e promissores no combate da linhagem LN-18, considerada extremamente resistente e resiliente aos medicamentos convencionais. Isso, se conduzido a entender quais compostos estão presentes nos hidrolisados, ou de qual maneira a especificidade da enzima é responsável por tudo isso, espera-se que em um futuro promissor crie-se um bem à sociedade brasileira, cujos efeitos serão observados tanto na valorização da flora e de seus produtores, quanto na medicina e no desenvolvimento de novos fármacos acessíveis à população.

# REFERÊNCIAS

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADNAN, M.; ZHENG, W.; ISLAM, W.; ARIF, M.; ABUBAKAR, Y. S.; WANG, Z.; LU, G. Carbon catabolite repression in filamentous fungi. Int. J. Mol. Sci., Vol. 19, p. 48, 2018.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng. Bugs., Vol. 1, p. 116-131, 2010.

AHMAD, M. N.; HOLLAND, C. R. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. J. Food Eng., Vol. 26, p. 443-452, 1994.

AKOH, C. C.; LEE, G. C.; LIAW, Y. C.; HUANG, T. H; SHAW J. F. GDSL family of serine esterases/lipases. Prog. Lipid Res., Vol. 43, p. 534–552, 2004.

ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; ALCANTARA, Jr. P.; MOREIRA, S. G. C.; NETO, N. M. B.; CORREA, D. S.; ZILIO, S. C. Characterization of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emisson spectroscopies. J. Braz. Chem Soc., Vol. 16, p. 1113-1117, 2005.

ALNOCH, R. C.; STEFANELLO, A. A.; MARTINI, V. P.; RICHTER, J. L.; MATEO, C.; DE SOUZA, E. M.; MITCHELL, D. A.; MULLER-SANTOS, M.; KRIEGER N. Co-expression, purification and characterization of the lipase and foldase of *Burkholderia contaminans* LTEB11. Intern. J. Biol. Macromol., Vol. 116, p. 1222-1231, 2018.

ANDERSSON, M.M.; BRECCIA, J.D.; HATTI-KAUL, R. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. Biotechnol. Appl. Biochem. 2000, 32, 145–153.

ANDERSSON, M.M.; HATTI-KAUL, R. Protein stabilizing effect of polyethyleneimine. J. Biotechnol. 1999, 72, 21–31.

BARTON, J. S. Denaturation at the optimum temperature. Biochem. Edu., Vol. 7, p. 13-14, 1979.

BERKA, R. M.; BARNETT, C. C. The development of gene expression systems for filamentous fungi. Biotech. Adv., Vol. 7, p. 127-154, 1989.

BISSWANGER, H. Multi-substrate reactions In. Bisswanger H. Enzyme kinetics: principles and methods. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.

BJORKBLOM, B.; WIBOM, C.; JONSSON, P.; MOREN, L.; ANDERSSON, U.; JOHANNESES, T. B.; LANGSETH, H.; ANTTI, H.; MELIN, B. Metabolomic screening of

pre-diagnostic serum samples identifies association between  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols and glioblastoma risk. Oncotarget, Vol. 7, p. 37043-37053, 2016.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. Fems Microbiol. Rev., Vol. 26, p. 73-81, 2002.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. Nature, Vol. 343, p 767–770, 1990.

BRECCIA, J.D.; ANDERSSON, M.M.; HATTI-KAUL, R. The role of poly(ethyleneimine) in stabilization against metal-catalyzed oxidation of proteins: A case study with lactate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2002, 1570, 165–173.

BYE, J. W.; FALCONER, R. J. Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: A reappraisal of the relationship between the Hofmeister series and protein stability. Prot. Sci., Vol. 22, p. 1563-1570, 2013.

CAO, X. M.; TIAN, Y.; WANG, Z. Y.; LIU, Y. W.; WANG, C. X. Effects of protein and phosphate buffer concentration on thermal denaturation of lysozyme analyzed by isoconversional method. Bioeng., Vol. 7, p. 235-240, 2016.

CARLSSON, R. A.; BROTHERS, S. P.; WAHLESTEDT, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. EMBO Mol. Med., Vol. 6, p. 1359-1370, 2014.

CER, R. Z.; MUDUNURI, U.; STEPHENS, R.; LEBEDA, F. J.  $IC_{50}$ -to- $K_i$ : a web-based tool for converting  $IC_{50}$  to  $K_i$  values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. Nucleic Acids Res., publicado online: doi<u>10.1093/nar/gkp253</u>, 2009.

CERNIA, E.; DELFINI, M.; DI COCCO, E.; PALOCCI, C.; SORO, S. Investigation of lipasecatalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use of NMR spectroscopy methods to study substrate-enzyme interaction. Bioorg. Chem., Vol. 30, p. 276-284, 2002.

CHAPLIN, M.; BUCKE, C. Enzyme technology. Publicado online em: <u>http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/index.html</u>, baseado no livro CHAPLIN, M.; BUCKE, C. Enzyme technology. Cambridge University Press, 1990.

CHEW, Y. H.; CHUA, L. S.; CHENG, K. K.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. A.; LEE, C. T. Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. Biochem Eng J., Vol. 39, p. 516–520, 2008.

CHI, M. H.; CRAVEN, K. D. Oxygen and an extracellular phase transition independently control central regulatory genes and conidiogenesis in *Aspegillus fumigatus*. pLOS ONE, publicado online: doi:10.1371/journal.pone.0074805, 2013.

CHIANG, Y. M.; OAKLEY, C. E.; AHUJA. M.; ENTWISTLE, R.; SCHULTZ, A.; CHANG, S. L.; WANG, C. C.; OAKLEY, B. R. An efficient system from heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. Am. Chem. Soc., Vol. 135, p. 7720-7731, 2013.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; DELORME, P.; WILLEMOT, R. M. Kinetic-Study of Esterification by Immobilized Lipase in N-Hexane. FEBS Lett., Vol. 276, p. 181–184, 1999.

CLARK, D. S. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? Trends in Biotechnol., Vol. 12, p. 439-443, 1994.

CLARK, D. S.; BAILEY J. E. Structure-function relationships in immobilized chymotrypsin catalysis. Biotechnol. Bioengineer., Vol. 25, p. 1027-1047, 1983.

CLAUSER, C. E.; MCCONVILLE, J. T.; YOUNG J. W. Weight, volume and center of mass of segments of human body. Aerospace Medical Research Laboratory, NASA, OHIO, 1969.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQI, A. N.; GUPTA A. K. A structural basis for the chiral preferences of lipases. J. Am. Chem. Soc., Vol. 116, p. 3180–3186, 1994.

CYGLER, M.; SCHRAG J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. Method Enzymol., Vol. 284, p. 3-27, 1997.

D'ELISEO, D.; VELOTTI, F. Omega-3 fatty acids and cancer cell cytotoxicity: implication for multi-targeted cancer therapy. J. Clin. Med., publicado online: doi10.3390/jcm5020015, 2016.

DARNET, S. H.; DA SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. C.; LINS, R. T. Nutritional composition, fatty acid and tocoferol contentes of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the amazona region. Ciênc. Tecnol. Aliment., Vol. 31, p. 488-491, 2011.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S., Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech., Vol. 3, p. 1-9, 2013.

DE QUEIROZ, R. M.; TAKIYA, C. M.; GUIMARÃES, L. P. T. P.; ROCHA, G. G.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ALVIANO, C. S.; GATTASS, C. R. Apoptosis-inducing effects of *Melissa officinalis* L. essential oil in glioblastoma multiforme cells. Cancer Invest., publicado online: doi10.3109/07357907.2014.905587, 2014.

DEWEY, D. C.; STRULSON, C. A.; CACACE, D. N.; BEVILACQUE, P. C.; KEATING, C. D. Bioreactor droplets from liposome-stabilized all-aqueous emulsions. Nature Comm., publicado online: DOI: 10.1038/ncomms5670, 2014.

DIANO, A.; DYNESEN, J. Ø.; NIELSEN J. Physiology of *Aspergillus niger* under oxygen limitation. Publicado online pela Universidade da Dinamarca, 2007.

DOMINGUEZ, C. L.; FLOYD, D. H.; XIAO, A.; MULLINS, G. R.; KEFAS, B. A.; XIN, W.; YACUR, M. N.; ABOUNADER, R.; LEE, J. K.; WILSON, G. M.; HARRIS, T. E.; PUROW, B. W. Diacylglycerol kinase alpha is a critical signaling node and novel therapeutic target in glioblastoma and other cancers. Cancer Discov., Vol. 3, p. 782-797, 2013.

DUKEMA, C.; KESTER, H. C. M.; VISSER, J. <sup>13</sup>C NMR studies of carbon metabolism in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 14-18, 1985.

EISENTHAL, R.; DANSON, M. J.; HOUGH, D. W. Catalytic efficiency and  $k_{cat}/K_M$ : a useful comparator? Opinion em TRENDS in Biotechnol., Vol. 25, 2007.

FABER K. Biotransformation in organic chemistry. A textbook. 5<sup>a</sup> edição. New York: Springer, p. 454, 2004.

FANCELLI, M.; DIAS, A. B.; DELALIBERA, I. J.; DE JESUS, S. C.; DO NASCIMENTO, A. S.; SILVA, S. O.; CALDAS, R. C.; LEDO C. A. S. *Beauveria bassiana* strains for biological control of cosmopolites sordius (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae) in Plantain. BioMed Res. Intern., publicado online: dx.doi.org/10.1155/2013/184756, 2013.

FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. FAO Food and Nutrition Paper, 91, Rome, 2010.

FERNANDES, E. G.; VALÉRIO, H. M.; FELTRIN, T.; SAND, S. T. V. D. Variability in the production of extracellular enzymes by entomepathogenic fungi grown on different substrates. Braz. J. Microbiol., Vol. 43, p. 827-833, 2012.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. Process Biochem., Vol. 43, p. 1061-1067, 2008.

FOJAN, P.; JONSON, P. H.; PETERSEN, M. T. N.; PETERSEN, S. B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. Biochimie., Vol. 82, p. 1033-1041, 2000.

FRAGOSO, M. F.; ROMUALDO, G. R.; RIBEIRO. D. A.; BARBISAN, L. F. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuated dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Food Chem. Toxicol., Vol. 58, p. 68-76, 2013.

GANZLIN, M.; RINAS, U. In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promotor performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques. J. Biotechnol., Vol. 135, p. 266-271, 2008.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Biotechnol. Adv., Vol. 27, p. 153-176, 2009.

GHORI, M. I.; IQBAL, M. J.; HAMEED, A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. Isolated from tannery wastes. Braz. J. Microbiol., Vol. 42, p. 22-29, 2011.

GIRALDO, L. J. L.; LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. Enzyme and microbial technology, Vol. 41, p. 721-726, 2007.

GONZALEZ-NAVARRO, H.; BANO, M. C.; ABAD, C. The closed/open model for lipase activation. Addressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments. Biochemistry, Vol. 40, p. 3174-3183, 2001.

GRAHL, N.; SHEPARDSON, K. M.; CHUNG, D.; CRAMER, R. A. Hypoxia and fungal pathogenesis: To air or not to air? Eukar. Cell, Vol. 11, p. 560-570, 2012.

GROCHULSKI, P; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Two conformational states of Candida rugosa lipase. Protein science: a publication of the Protein Society, Vol. 3, p. 82-91, 1994.

GROCHULSKI, P.; BOUTHILLIER, F.; KAZLAUSKAS, R. J.; SERREQI, A. N.; SCHRAG, J. D.; ZIOMEK, E.; CYGLER, M. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. Biochem., Vol. 33, p 3494-3500, 1994.

GUERRA, N. P.; PERNAS, M.; PASTRANA, L.; TORRADO, A.; MÍGUEZ, M.; FUCIÑOS, C.; ESTÉVEZ, N.; SOBROSA, C.; GONZÁLEZ, R.; FUCIÑOS, P.; RÚA, M. L. Modelling the enzymatic activity of two lpiases isoenzymes commonly used in the food industry. CyTA J. Food, Vol. 9, p. 307-313, 2011.

GUPTA, S. D.; SUH N. Tocopherols in cancer: an update. Mol. Nutr. Food Res., Vol. 60, p. 1354-1363, 2016.

Han D., Walde P., Luisi P. L. Dependence of lipase activity on water content and enzyme concentration in reverse micelles. Biocatal. Vol. 4, p. 153-161, 1990.

Hardy S., El-Assaad W., Przybytkowski E., Joly E., Prentki M., Langelier Y. Saturated fatty acid-induced apoptosis MDA-MB-231 breast cancer cells. J. Biol. Chem., Vol. 278, p. 31861-31870, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnol. Adv., Vol. 27, p. 782-798, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and microbial technology, Vol. 39, p. 235-251, 2006.

HERMANSYAH, H.; WIJANARKO, A.; DIANURSANTI; GOZAN, M.; WULAN, P. P. D. K.; ARBIANTI, R.; SOEMANTOJO, W.; UTAMI, T. S.; YULIUSMAN; KUBO, M.; SHIBASAKI-KITAKAWA, N.; YONEMOTO, T. Kinetic model for triglyceride hydrolysis using lipase: review. Makara Technol., Vol 11, p. 30–35, 2007.

HOBBS, L. Chapter 21 – Sweeteners from starch: production, properties and uses. "BEMILLER, J.; WHISTLER, R. Starch: Chemitry and Technology. 3<sup>a</sup> edição, Academic Press", p. 797-832, 2009.

HOEGH, I.; PATKAR, S.; HALKIER, T.; HANSEN, M. T. Two lipases from *Candida Antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. Can. J. Bot., Vol. 73, p. 869-875, 1995.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from acai. Food Chem., Vol. 118, p. 208-214, 2010.

HOLMQUIST, M. Insights into the molecular basis for fatty acyl specificities of lipase from *Geotrichum candidum* and *Candida rugosa*. Chem. Phys. Lip., Vol. 93, p. 57–65, 1998.

HOLWERDA, K.; VERKADE, P. E.; DE WILLIGEN, A. H. A. Comparative research on the saponification rate of some monoacid triglycerides under the influence of pancreas extracts. Recl. Trav. Chim. Pay-B., Vol. 55, p. 43-57, 1936.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol., Vol. 53, p. 315–351, 1999.

JALOULI, R.; PARSIEGLA, G.; CARRIÈRE, F.; GARGOURI, Y.; BEZZINE, S. Efficient heterologous expression. Of *Fusarium solani* lipase, FSL2, in *Pichia pastoris*, functional characterization of the recombinant enzyme and molecular modeling. Internat. J. Biol. Macromol., publicado online: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.030</u>, 2017.

JANSSEN, A. E. M.; SJURSNES, B. J.; VAKUROV, A. V.; HALLING, P. J. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media model and solvent effects on parameters. Enz. and Microbial Technol., Vol. 24, p. 463–470, 1999.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. Prog. Biophys. Mol. Bio., Vol. 132, p. 23-34, 2018.

JIANG, L.; WANG, W.; HE, Q.; WU, Y.; LU, Z.; SUN, J.; LIU, Z.; SHAO, Y.; WANG, A. Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of tongue squamous cell carcinomas. Nature Sci. Reports, publicado online: doi10.1038/s41598-017-11842-5, 2017.

KAMAL, M. Z.; MOHAMMAD, T. A. S.; KRISHNAMOORTHY, G.; RAO, N. M. Role of active site rigidity in activity: MD simulation and fluorescence study on a lipase mutant. PLoS ONE, publicado online: doi10.1371/journal.pone.0035188, 2012.

KARSHIKOFF, A.; NILSSON, L.; LADENSTEIN, R. Rigidity versus flexibility: the dilemma of unsertanding protein thermal stability. FEBS J., Vol. 282, p. 3899-3917, 2015.

KATO, N.; MURAKOSHI, Y.; KATO, M.; KOBAYASHI, T.; TSUKAGOSHI N. Isomaltose formed by α-glucosidases triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet., Vol. 42, p. 43-50, 2002.

KAUR, G.; SINGH, A.; SHARMA, R.; SHARMA, V.; VERMA, S.; SHARMA, P. K. Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacilus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India. 3 Biotech., Vol. 6, p. 49, 2016.

KHAN, F. I.; LAN, D.; DURRANI, R.; HUAN, W.; ZHAO, Z.; WANG Y. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. Front. Bioeng. Biotechnol., publicado online: doi10.3389/fbioe.2017.00016, 2017.

KIM, H. J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of protein concentration and order of addition on thermal stability of beta-lactoglobulin stabilized n-hexadecane oil-in-water emulsions at neutral pH. Langmuir., Vol. 21, p. 134-139, 2005.

KIM, S.; JING, K.; SHIN, S.; JEONG, S.; HAN, S.H.; OH, H.; YOO, Y. S.; HAN, J.; JEON, Y. J.; HEO, J. Y.; KWEON, G. R.; PARK, S. K.; PARK, J. I.; WU, T.; LIM, K.  $\omega$ 3-polyunsaturated fatty acids induce cell death through apoptosis and autophagy in glioblastoma cells: *in vitro* and *in vivo*. Oncol. Reports, Vol. 39, p. 239-246, 2018.

KING B. C., WAXMAN K. D., NENNI N. V., WALKER L. P., BERGSTROM G. C., GIBSON D. M. ARSENAL of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. Biotechnol. Biofuels, Vol. 4, publicado online: doi: <u>10.1186/1754-6834-4-</u> <u>4</u>, 2011.

KRETOWSKI R., KUSACZUK M., NAUMOWICZ M., KOTYNSKA J., SZYNAKA B., CECHOWSKA-PASKO M. The effects of silica nanoparticles on apoptosis and autophagy of glioblastoma cell lines. Nanomaterials (Basel), Vol. 7, p. 230, 2017.

KROLL K., PAHTZ V., HILLMANN F., VAKNIN Y., SCHMIDT-HECK W., ROTH M., JACOBSEN I. D., OSHEROV N., BRAKHAGE A. A., KNIEMEYER O. Identification of hypoxia-inducible target genes of *Aspergillus fumigatus* by transcriptome analysis reveals cellular respiration as an important contributor to hypoxic survival. Eukar. Cell, Vol. 13, p. 1241-1253, 2014.

KRUGENER, S.; ZELENA, K.; ZORN, H.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G. Heterologous expression of an extra-cellular lipase from basidiomycete *Pleurotus sapidus*. J. Mol. Catalys., Vol. 57, p. 16-21, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Vol. 227, p. 680-685, 1970.

LAGUERRE, M.; MPUTU, M. N.; BRRYS, B.; LOPEZ, M.; VILLENEUVE, P.; DUBREUCQ, E. Regioselectivity and fatty acids specificity of crude lipase extracts from *Pseudozyma tsukubaensis*, *Geotrichum candidum* and *Candida rugosa*. Eur. J. Lipid. Sci. Technol., Vol. 119, p. 1 – 10, 2017.

LASZLO, J. A.; EVANS, K. O. Influence of self-assembled monolayer surface chemistry on *Candida antarctica* lipase B adsorption and specific activity. J. Mol. Catal. B-Enzym., Vol. 48, p. 84-89, 2007.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. Genes & Diseases, Vol. 3, p. 198-210, 2016.

LEGER, R. J. S. T.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. J. Invert. Pathol. Vol. 48, p. 85-95, 1986.

LEI, Y. Development of new *Aspergillus* fungal cell factories for organic acid production. Aalborg Universitesforlag. Ph.d.-serien for Det Teknisk-Naturvidenskabelige Fakultet, Aalborg Universitet. Disponível online: doi10.5278/vbn.phd.engsci.00144, 2016.

LI, J.; LIU, X. Identification and Characterization of a Novel Thermophilic, Organic Solvent Stable Lipase of *Bacillus* from a hot spring. Lipids, publicado online: DOI 10.1007/s11745-017-4265-y, 2017.

LIM, K.; HAN, C.; DAI, Y.; SHEN, M., WU, T. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking beta-catenin and cyclooxygenase-2. Mol. Cancer Ther., Vol. 8, p. 3046-3055, 2009.

LIOU, Y. C.; MARANGONI, A. G.; YADA, R. Y. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. Food Res. Inter., Vol. 31, p. 243-248, 1998.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. and editors. 2007. Industrial enzyme: structure, function and applications. Springer, p. 263–281, 2007.

LOUWRIER, A.; DRTINA, G. J.; KLIBANOV, A. M. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. Biotechnology and bioengineering, Vol. 50, p. 1-5, 1996.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. Biotech. Adv., Vol. 27, p. 53-75, 2009.

LUNG, M.; SHULGA, Y. V.; IVANOVA, P. T.; MYERS, D. S.; MILNE, S. B.; BROWN, H. A.; TOPHAM, M. K.; EPAND R. M. Diacylglycerol kinase ε is a selective for both acyl chains of phosphatidic acid or diacylglycerol. J. Biol. Chem., Vol. 284, p. 31062-31073, 2009.

MAIANGWA, J.; ALI, M. S. M.; SALLEH, A.; ABD RAHMAN, R. N. Z. R.; NORMI, Y. M.; SHARIFF, F. M.; LEOW, T. C. Lid opening and conformational stability of T1 Lipase is mediated by increasing chain length polar solvents. Peerj. 5:e3341, 2017.

MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. Understanding structural features of microbial lipases – An overview. Anal. Chem. Insights, Vol. 3, p. 9–19, 2008.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. Enzyme Micro. Technol., publicado online: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001</u>, 2015.

MARTIN-MCGILL, K. J.; MARSON, A. G.; SMITH, C. T.; JENKINSON, M. D. Ketogenic diets as an adjuvant therapy in glioblastoma (the KEATING trial): study protocol for a randomised pilot study. Pilot and Feasibility Studies, publicado online: doi10.1186/s40814-017-0209-9, 2017.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M.; TAM, A.; DAMINATI, M. Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. Biotechnol. Prog., Vol. 18, p. 629-634, 2002.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme Micro. Technol., Vol. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATHESH, M.; LUAN, B.; AKANBI, T. O.; WEBER, J. K.; LIU, J.; BARROW, C. J.; ZHOU, R.; YANG, W. Opening lids: modulation of lipase immobilization by graphene

MÉNDEZ, J. J.; RAMON, C.; MERCÈ, T. Kinetic study of palmitic acid esterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* resting cells. Acta Biol. Colomb., Vol. 14, p. 161–172, 2009.

MENENDEZ, J. A.; VELLON, L.; COLOMER, R.; LUPU, R. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. Ann. Oncol., Vol. 16, p. 359-371, 2005.

MERENDINO, N.; COSTANTINI, L.; MANZI, L.; MOLINARI, R.; D'ELISEO, D.; VELOTTI, F. Dietary ω-3 polyunsaturated fatty acid DHA: a potential adjuvant in the treatment of cancer. Hindawi, publicado online: http://dx.doi.org/10.1155/2013/310186, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem., Vol. 31, p. 426-428, 1959.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior Superintendência da Zona Franca de Manaus SUFRAMA. Projeto potencialidades regionais - estudo de viabilidade econômica – Açaí. Fundação Getúlio Vargas, ISAE, 2003.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. Biotechnol. Biotechnol. Equip., Vol. 29, p. 205-220, 2015

MONDAI, S.; BAKSI, S.; KORIS, A.; VATAI, G. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. Pac. Sci. Rev., Vol. 18, p. 85-99, 2016.

MORONI, L.; GELLINI, C.; SALVI, P. R. Thermal denaturation of protein and chemical equilibrium. W. J. Chem. Edu., Vol. 3, p. 59-63, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger princípios de Bioquímica. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIELSEN, M. T.; KLEJNSTRUP, M. L.; ROHLFS, M.; ANYAOGU, D. C.; NIELSEN, J. B.; GOTFREDSEN, C. H.; ANDERSEN, M. R.; HANSEN, B. G.; MORTENSEN, U. H.; LARSEN, T. O. *Aspergillus nidulans* synthesize insect juvenile hormones upon expression of a heterologous regulatory protein and in response to grazing by *Drosophila melanogaster* larvae. pLOS ONE, publicado online: <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073369</u>, 2013.

NOORMOHAMADI, R.; TABANDEH, F.; SHARIATI, P.; OTADI, M. Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas* sp. Iran J. Microbiol., Vol. 5, p. 422-427, 2013.

NORIN, M.; HAEFFNER, F.; ACHOUR, A.; NORIN, T.; HULT, K. Computer modeling of substrate binding to lipases from Rhizomucor miehei, Humicola lanuginosa and Candida rugosa. Prot. Sci., Vol. 3, p. 1493–1503, 1994.

OSTROM, Q. T.; GITTLEMAN, H.; LIAO, P. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. Neuro. Oncol., publicado online: doi10.1093/neuonc/nou223, 2014.

OZDURAL, A. R.; TANYOLAÇ, D.; BOYACI, I. H.; MUTLU, M.; WEBB, C. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. Biochem. Engneer. J., Vol. 14, p. 27-36, 2003.

PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PERNAS, M.; RUA, M. L.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacilus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. Biotechnol. Prog., Vol. 20, p. 630-635, 2004.

PEKRUL, S.; GRULA, E. A. Mode of Infection of the Corn Earworm (Heliothis zea) by *Beauveria bassiana* as Revealed by Scanning Electron Microscopy. J. Invert. Pathol., Vol. 34, p. 238-247, 1979.

PELEG, M.; NORMAND, M. D.; CORRADINI, M. G. The Arrhenius equation revisited. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Vol. 52, p. 830-851, 2012.

PEREIRA, M. G.; VELASCO-LOZANO, S.; MORENO-PEREZ, S.; POLIZELI, A. M.; HEINEN, P. R.; FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; CEREIA, M.; PESSELA, B. C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Different covalent immobilizations modulate lipase activities of *Hypocrea pseudokoningii*. Molecules, publicado online: doi 10.3390/molecules22091448, 2017.

PÉREZ, M. M.; SPIROPULOS, E. C. G.; VICI, A. C.; SALGADO, J. C. S.; POLIZELI. *Fungal Lipases – Versatile Tools for White Biotechnology*. In: YADAV, A. N.; MISHRA, S.; SINGH, S.; GUPTA, A. *Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi*. Springer, 2018, no prelo.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, Vol. 8, p. 785-786, 2011.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for nonaqueous synthesis. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, Vol. 39, p. 83-90, 2006.

PINTO, G. F.; DE MENEZES, R. R. Cinética enzimática. E-papers Serviços editoriais Ltda., 2009.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. Chem. Phys. Lip., Vol. 93, p. 67 – 80, 1998.

PRAJAPATI, V.; PATEL, H.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. Kinetic and thermodynamics characterization of lipase produced by *Cellulomonas flavigena* UNP3. J. Microbiol., Vol. 54, p. 976-983, 2014.

PUROW, B. Molecular pathways: Targeting diacylglycerol kinase alpha in cancer. Clin. Cancer. Res., Vol. 21, p. 5008-5012, 2015.

PUTRI, A. M.; SUMARYADA, T.; WAHYUDI, S. T. Conformation analysis of T1 lipase on alcohols solvent using molecular dynamics simulation. ICES, publicado online: doi10.1088/1742-6596/877/1/012007, 2016.

QIN, L. N.; CAI, F. R.; DONG, X. R.; HUANG, Z. B.; TAO, Y.; HUANG, J. Z.; DONG, Z. Y. Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene. Biores. Technol., Vol. 2012, p. 116-122, 2012.

RADESTOCK, S.; GOHLKE, H. Protein rigidity and thermophilic adaptation. Proteins, Vol. 79, p. 1089-1108, 2011.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem., Vol. 116, p. 53-64, 1981.

REHM, S.; TRODLER, P.; PLEISS, J. Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. Prot. Sci., Vol. 19, p. 2122-2130, 2010.

RIES, L. N. A.; BEATTIE, S. R.; ESPESO, E. A.; CRAMER, R. A.; GOLDMAN, G. H. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. Genetics, Vol. 203, p. 335-352, 2016.

RODRIGUES, A. M. C.; DARNET, S.; DA SILVA, L. H. M. Fatty acid profiles and tocoferol contentes of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum* 

*vulgare*), mari (*Poraqueiba paraenses*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 21, p. 2000-2004, 2010.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. Chem. Soc. Rev., Vol. 42, p. 6290-6307, 2013.

RUSSO, R.; CORASANITI, M. T.; BAGETTA, G.; MORRONE, L. A. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. Hindawi, publicado online: http://dx.doi.org/10.1155/2015/397821, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual. 3<sup>a</sup> edição, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTINI, S.; CROWET, J. M.; THOMAS, A.; PAQUOT, M.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J. P.; BLECKER, C.; LOGNAY, G.; BRASSEUR, R.; LINS, S.; CHARLOTEAUX, B. Study of *Themomyces lanuginosa* lipase in the presence of tributyryglycerol and water. Biophys. J., Vol. 96, p. 4814-4825, 2009.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreátique sur les ésteres em emulsion. Biochimica et biophysica acta, Vol. 30, p. 513-521, 1958.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; RANI, K.Y.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. Biotechnol Prog, Vol 34, p. 5-28, 2018.

SCHMITT, J.; BROCCA, S.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Blocking the tunnel: engineering of Candida rugosa lipase mutants with short chain length specificity. Prot. Eng, Vol. 15, p, 595–601, 2002.

SCHON, A.; CLARKSON, B. R.; JAIME, M.; FREIRE, E. Temperature stability of protein: analysis of irreversible denaturation using isothermal calorimetry. Proteins, publicado online: doi <u>10.1002/prot.25354</u>, 2017.

SCHONHEYDER, F.; VOLQVARTZ, K. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. Acta Physiol. Scand., Vol. 9, p. 57-67, 1945.

SCHWARTZ, K. A.; NOEL, M.; NIKOLAI, M.; CHANG, H. T. Investigating the ketogenic diet as treatment for primary aggressive brain cancer: challenges and lessons learned. Front. Nutr., publicado online: https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00011, 2018.

SECUNDO, F., Conformational changes of enzyme upon immobilization. Chem. Soc. Rev., Vol. 42, p. 6250, 2013.

SEGATO, F.; DAMÁSIO, A. R. L.; GONÇALVES, T. A.; DE LUCAS, R. C.; SQUINA, F. M.; DECKER, S. R.; PRADE R. A. High-yield secretion of multiple client protein in *Aspergillus*. Enzymes Microb. Technol., Vol. 51, p. 100-106, 2012.

SENDROY, J. JR.; COLLISON, H. A. Determination of human body volume from height and weight. J. Appl. Physiol., Vol. 21, p. 167-172, 1966.

SHULGA, Y. V.; TOPHAM, M. K.; EPAND, R. M. Substrate specificity of diacylglycerol kinase-epsilon and the phosphatidylinositol cycle. FEBS Lett., Vol. 585, p. 4025-4028, 2011.

SILBER, J. R.; BOBOLA, M. S.; BLANK, A.; CHAMBERLAIN, M. C. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: premise and problems. Biochem. Biophys Acta, Vol. 1826, p. 71-82, 2012.

SILVA, F. S.; VIDAL, F. C. B.; SANTOS, D.; COSTA, M. C. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; DE MOURA, R. S. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. In malignant cell lines. BMC, Complement. Alternat. Med., publicado online: http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/175, 2014.

SILVEIRA, E. A.; MORENO-PEREZ, S.; BASSO, A.; SERBAN, S.; MAMEDE, R. P.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S.; ROCHA-MARTIN, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, S. M. Modulation of the regioselectivity of Thermomyces lanuginosus lipase via biocatalyst engineering for the ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. BMC Biotechnol., Vol. 17, p. 88, 2017.

SILVEIRA, E. A.; MORENO-PEREZ, S.; BASSO, A.; SERBAN, S.; MAMEDE, R. P.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S.; ROCHA-MARTIN, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, S. M. Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. BMC Biotechnol., Vol. 17, p. 88, 2017. SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 166, p. 486-520, 2012.

SKJOLD-JORGENSEN, J.; VIND, J.; SWENDSEN, A.; BJERRUM, M. J. Lipases that activates at high solvent polarities. Biochem., Vol. 55, p. 146-156, 2016.

SNIJDER, H. J.; VAN EERDE, J. H.; KINGMA, R. L.; KALK, K. H.; DEKKER, N.; EGMOND, M. R.; DIJKSTRA, B. W. Structural investigation of the active-site mutant Asn156Ala of outer membrane phospholipase A: Function of the Asn-His interaction in the catalytic triad. Protein Sci., Vol. 10, p. 1962-1969, 2001.

SONG, K. S.; JING, K.; KIM, J. S.; YUN, E. J.; SHIN, S.; SEO, K. S.; PARK, J. H.; HEO, J. Y.; KANG, J. X.; SUH. K. S. Omega-3-polyunsaturated fatty acids suppress pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo via downregulation of Wnt/Beta-catenin signaling. Pancreatology, Vol. 11, p. 574-584, 2011.

SONGSERM, P.; KARNCHANATAT, A.; TRITIPRASERT, S.; TANASUPAWAT, S.; ASSABUMRUNGRAT, S.; YANG, S. T., Thongchul N. Metabolic responses of *Aspergillus terreus* under low dissolved oxygen and pH levels. Ann. Microbiol., publicado online: <u>https://doi.org/10.1007/s13213-018-1330-6</u>, 2018.

SOUZA, L. T. A.; MORENO-PEREZ, S.; LORENTE, G. F.; CIPOLATTI, E. P.; DE OLIVEIRA, D.; RESENDE, R. R.; PESSELA, B. C. Immobilization of *Moniliella spathulata* R25L270 lipase on ionic, hydrophobic and covalente supports: Functional properties and hydrolysis of sardine oil. Molecules, publicado online: doi10.3390/molecules22101508, 2017.

SPIROPULOS, E. C. G. Cronobiologia e fotobiologia de *Beauveria bassiana*: paradigmas no crescimento, secreção e síntese de lipases com potencial de produção de biodiesel. Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Ribeirão Preto, 2015.

SRIVASTAVA, V. C.; MISHRA, I.; SUNDARAMURTHY, S. Oxygen mass transfer in bioreactors. Em "Murray M.Y. Comprehensive biotechnology". 2<sup>a</sup> edição, Vol. 2, p. 947-956, 2011.

STAUCH, B.; FISHER, S. J.; CIANCI, M. Open and closed states of *Candida Antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. J. Lipid Res., Vol. 56, p. 2348-2358, 2015.

SYAL, P.; GUPTA, R. Heterologous expression of lipases YLIP4, YLIP5, YLIP7, YLIP13, and YLIP15 from *Yarrowia lipolytica* MSR80 in *Escherichia coli*: substrate specificity, kinetic comparison, and enantioselectivity. Biotechnol. Appl. Biochem., publicado online: doi 10.1002/bab.1542, 2016.

TAKÓ, M.; KOTOGÁN, A.; PAPP, T.; KADAIKUNNAN, S.; ALHARBI, N. S.; VÁGVOLGYI, C. Purification and properties of extracellular lipases with transesterification activity and 1,3-regioselectivity from *Rhizomucor miehei* and *Rhizopus oryzae*. J. Microbiol. Biotechnol., Vol. 27, p. 277-288, 2017.

TAMANO, K. Enhancing microbial metabolite and enzyme production: current strategies and challenges. Front. Microbiol., Vol. 5, p. 718, 2014.

TANAKA, K.; LOUIS, D. N.; CURRY, W. T.; BATCHELOR, T. T.; DIETRICH, J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? Nat. Rev. Clin. Oncol., Vol. 10, p. 14-26, 2013.

TELLO, A.; CAO, R.; MARCHANT, M. J.; GOMEZ, H. Conformational changes of enzymes and aptamers immobilized on electrodes. Bioconjugate Chem., Vol. 27, p. 2581-2591, 2016.

TRODLER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. BMC Struct. Biol., publicado online: doi10.1186/1472-6807-9-38, 2009.

TSAI, S. W.; CHIANG, C. L. Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipasecatalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. Biotechnol., Bioeng., Vol. 38, p. 206-211, 1991.

TSUKAGOSHI, N.; KOBAYASHI, T.; KATO, M. Regulation of the amylolytic and (hemi-) cellulolytic genes in aspergilli. J. Gen. Appl. Micrbiol., Vol. 47, p. 1-19, 2001.

TURATI, D. F. M.; JÚNIOR, W. G. M.; TERRASAN, C. R. F.; MORENO-PEREZ, S.; PESSELA, B. C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; CARMONA, E. C. Immobilization of lipase from *Penicillium* sp. Section *Gracilenta* (CBMAI 1583) on different hydrophobic supports: Modulation of functional properties. Molecules, publicado online: doi10.3390/molecules2202033, 2017.

VAN VELUW, G. J.; TEERTSTRA, W. R.; DE BEKKER, C.; VINCK, A.; VAN BEEK, N.; MULLER, W. H; ARENTSHORST, M.; VAN DER MEI, H. C.; RAM, A. F. J.; DIJKSTERHUIS, J.; WOSTEN, H. A. B. Heterogeneity in liquid shaken cultures of *Aspergillus niger* inoculated with melanised conidia or conidia of pigmentation mutants. Stud. Mycol., Vol. 74, p. 47-57, 2013.

VENKATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R. F. H. The purification and characterization of lipases from *Lasiodiplodia theobromae*, and their immobilization and use for biodiesel production from coconut oil. Appl. Biochem. Biotechnol., publicado online: <u>https://doi.org/10.1007/s12010-017-2670-6</u>, 2017.

VENY, H.; AROUA, M. K.; SULAIMAN, N. M. N. Kinetic study of lipase catalyzed transesterification of jatropha oil in circulated batch packed bed reactor. Chem. Eng. J., Vol. 237, p. 123–130, 2017.

VERNET, T.; TESSIER, D. C.; CHATELLIER, J.; PLOUFFE, C.; LEE, T. S.; THOMAS, D. Y.; STORER, A. C.; MÉNARD, R. Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. J. Biol. Chem., Vol. 270, p. 16645-16652, 1996.

VICI, A. C.; DA CRUZ, A. F.; FACCHINI, F. D.; DE CARVALHO, C. C.; PEREIRA, M. G.; FONSECA-MALDONADO, R.; WARD, R. J.; PESSELA, B. C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; TORRES, F. A. G.; JORGE, J. A.; POLIZELI M. L. T. M. *Beauveria bassiana* Lipase A expressed in Komagataella (Picha) pastoris with potential for biodiesel catalysis. Front. Microbiol., Vol. 6, p. 1083, 2015.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. J. Mol. Catal. B-Enzym., Vol. 9, p. 113-148, 2000.

VONGSANGNAK, W.; SALAZAR, M.; HANSEN, K.; NIELSEN, J. Genome-wide analysis of maltose utilization and regulation in aspergilli. Microbiol., Vol. 155, p. 3893-3902, 2009.

WANG, Y.; LIU, F.; WANG, L.; WANG, Q.; SELVARAJ, J. N.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; XING, F.; LIU, Y. The pH signaling transcription factor AopacC regulates ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. J. Agric. Food Chem., publicado online: doi: 10.1021/acs.jafc.8b00790, 2018.

WIEMANN, P.; SOUKUP, A. A.; FOLZ, J. S.; WANG, P. M.; NOACK, A.; KELLER, N. P. CoIN: co-inducible nitrate expression system for secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. Fungal. Biol. Biotechnol., publicado online: <u>https://doi.org/10.1186/s40694-018-0049-2</u>, 2018.

WINTER, S. F.; LOEBEL, F.; DIETRICH, J. Role of ketogenic metabolic therapy in malignant glioma: a systematic review. Crit. Rev. Oncol. Hematol., Vol. 112, p. 41-58, 2017.

WONG, M. R. Evaluation of oxygen mass transfer in fungal fermentation using airlift/bubble column bioreactors. A thesis submitted to the graduate division of the university of Hawai'I at Mãnoa in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in molecular biosciences and bioengineering, 2013.

XIAO, G.; YING, S. H.; ZHENG, P.; WANG, Z. L.; ZHANG, S.; XIE, X. Q.; SHANG, Y.; LEGER, R. J. T.; ZHAO, G. P.; WANG, C.; FENG, M. G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Nature Sci. Reports, publicado online: doi 10.1038/srep00483, 2012.

XU, L.; WEATHERS, P. J.; XIONG, X. R.; LIU, C. Z. Microalgal bioreactor: Challenges and opportunities. Eng. Life Sci., Vol. 9, p. 178-189, 2009.

YANG, Q.; WANG, B.; ZHANG, Z.; LOU, D.; TAN, J.; ZHU, L. The effects of macromolecular crowding and surface charge on the properties of an immobilized enzyme: activity, thermal stability, catalytic efficiency and reusability. RSC Adv., publicado online: doi10.1039/C7RA06544B, 2017.

YIN, X.; SHIN, H. D.; LI, J.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. P*gas*, a low-pH induced promoter, as a tool for dynamic control of gene expression for metabolic engineering of *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol., publicado online: https://doi.org/10.1128/AEM.03222-16, 2017.

ZHANG, C.; DONG, X.; GUO, Z.; SUN, Y. Remarkably enhanced activity and substrate affinity of lipase covalently bonded on zwitterionic polymer-grafted silica nanoparticles. J. Colloid Interface Sci., Vol. 519, p. 145-153, 2018.

ZHANG, X. F.; YANG, G. Y.; ZHAN, Y.; XIE, Y.; WITHERS, S. G.; FENG, Y. A general and efficient strategy for generating the stable enzymes. Nature Sci. Reports, publicado online: doi10.1038/srep33797, 2016.

ZHANG, Y.; ROCHEFORT, D. Activity, conformation and thermal stability of laccase and glucose oxidase in poly(ethyleneimine) microcapsules for immobilization in paper. Process. Biochem. 2011, 46, 993–1000.

ZHOU, Y.; HAN, L. R.; HE, H. W.; SANG, B.; YU, D. L.; FENG, J. T.; ZHANG, X. Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by

*Streptomyces kanasenisi* ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. Molecules, Vol. 23, p. 125, 2018.

ZIBAEE, A.; SADEGHI-SEFIDMAZGI, A.; FAZELI-DINAN, M. Properties of a lipase produced by *Beauveria bassiana*: purification and biochemical studies. Biocont. Sci. Technol., Vol. 21, 317-331, 2011.



#### ANEXOS

### ANEXO A – Sequência de gene possivelmente codificador de lipase de *Beauveria bassiana* Lipase 1 (Bbl1) obtida no NCBI.

> (gi 400594426) NW\_007930875.1:141950-143508 *Beauveria bassiana* ARSEF 2860 unplaced genomic scaffold BBA\_S00040, whole genome shotgun sequence

TGGCTCTTGAATTAAACAGCACGCCCGGCTCATCATGAAGTTCCTATCCCTTGTTGCCGCG GTCCTTCCGCTGGTGTCTGCTCTCACCATTCCTGAGCAGAGCATCACCACTCCCGCCAACG ACCCCTCGTCTGTACCCCCGTCTGGCCTTGAATTGGCCGAGGACGCGTCTGCTCTCACTGT TCCGGAGAAGCGCATCACCACTCCTGCCAATGATCCCTTCTATGTGCCCCCCTCTGGCTTC GAGTCGGCCAAGCCCGGTACTGTGCTGCGTGAGCGCCCCATCGTGGCTTCGTTTTCGGTC TCATCCCCGCTCCCATTGATTCTCGTCAGCTGCTCTATCGCACCACGGCCATTGACGGCTC TGCCATTGCCACCGTCGTCACCATCTTCAAGCCGCTCTTTGCCAAGCGCGACCGCTTCATC TCCTTCAACACGGCCTACGACTCGTCGGCTTCCATCTGCAACCCCAGCTACAACTACCGCT TGGGTGCACTCCAAACAGACGTCATCTCGTCGGCCGAGTTTCTCATCATCAAGCCTACCT GCTCTCTGGCTACACCGTCGCTTCCGCCGACTACGAGGGTCCTGACGTGGCCTTTTCCGTC GGCCGTCTCTCGGGCATGGGCGTTCTTGACGGCATTCGCGCCGTAGTCAACTATGGCCCC AAAATTGGCCTCGACAAGAACCCCTGGTTGTCAATGCTGGTTACTCTGGCGGTGCCATTG CTAGCGGTTGGGCGGCTTCCCTCCATCCCACCTACGCTCCCGACCTAAACCTCAAGGGCTT CATCGCCGGCGGTACACCTGCAAACCTTACCGAGGTTCTTCTTTACGTCGATGGCACCTTA TTCGCGGGTTTCGTCCCAGGTGCCCTTGCAGGCCAAATTATGCCCTCTGCCTACGGTGCAC GCCTCAAGCCCGTCCTGGACAAGGTCATCGGTCCCCGCGGCAAAGAAGCTCTGGCTCTCG GAACCAGCCAGTGCGCGCCGGTCAATCTCATTGCCTTTGCGGGCAAGTCCATCTTCGACA CTAGCTTCCAGACCCTCGGCAAGGACCTACTCTACGATAAGGATGTTGCGTGGGTCCTCG CCGAGAGCACCCTGGGTCTCAAGAAGAACGAAACGCCCACGGTACCCGTCATGCTCTATC ACTCTCCAGACGATGAGGTTATCCCTTTTGCTGGCGCTGATGGCCTCCGCAAGCGCTGGT GCGACAACGGTGCCAATGTGCGCTTTGTCAACTACGCTGCCGGCGGCCACGTCACCGCCG AGGTGGTTGCTGTGATTGATGCCATCAAATTTGCCGGCGATGCCTTTAGCGGCTCCGTCCC TGGTGGCTGTGCCAGCAGGACGGTTCTCGACGACAAGCTGAACCCACTGGCTCTTGGCCT CTCTCTCGAACCCGTCCTTGCCGGGCTTGTGAATATTCTGCTGACGTTGGGTAAGAAGGAT GCCAATTTCGTCAGTGGCCTGTCTCAGGGCAAGCATATATAA

ANEXO B - Sequência do gene bbl1 inserido em pExpyr com método ABI Prism BigDye.

CGGCTCGTCTGCACAGGGTTGGCAAATGTGATTTCCAAGCGCGGCCGCCTAACCA TTCCTGAGCAGAGCATCACCACTCCCGCCAATGATCCCTTCTATGTGCCCCCCTCT GGCTTCGAGTCGGCCAAGCCCGGTACTGTGCTGCGTGAGCGCCCCATCGTGGCCT CGTTTTTCGGTCTCATCCCCGCTCCCATTGATTCTCGTCAGCTGCTCTATCGCACC ACGGCCATTGACGGCTCTGCCATTGCCACCGTCGTCACCATCTTCAAGCCGCTCTT TGCCAAGCGTGACCGCTTCATCTCCTTCAACACGGCCTACGACTCGTCGGCTTCCA TCTGCAACCCCAGCTACAACTACCGCCTGGGTGCCCTCCAAACAGACGTCATCTC GTCGGCCGAGTTTCTCATCATCAAGCCTACCTGCTCTCTGGCTACACTGTCGCTT CCGCCGACTACGAGGGTCCTGACGTGGCCTTTTCAGTCGGCCGTCTCTCGGGCAT GGGCGTTCTTGACGGCATTCGCGCCGTGGTCAACTATGGCCCCAAAATTGGCCTC GACAAGAACCCCATGGTTGTCAATGCTGGTTACTCTGGCGGTGCCATTGCTAGCG GTTGGGCGGCTTCCCTCCATCCCACCTACGCTCCCGACCTAAACCTCAAGGGCTTC ATCGCCGGCGGTACCCCTGCCAACCTTACCGAGGTTCTTCTTTACGTCGATGGCAC CTTATTCGCGGGCTTCGTACCAGGTGCCCTTGCTGGCCAAATTATGCCCTCTGCCT ACGGTGCGCGCCTCAAGCCGGTCCTGGACAAGGTCATCGCTCCCCGCGGCAAGG AAGCTCTGGCTCTCGGAACCAGCCAATGCGCGCCGGTCAATCTCATTGCCTTTGC GGGCAAGTCCATCTTCGACACTAGCTTCCAGACCCTCGGCAAGGACCTACTCTAC GATAAGGATGTTGCGTGGGTCCTCGCCGAGAGCACCCTGGGTCTAAAGAGACGC GAAACGCCCAACGGTACCGTGATGCTCTATCACTCTCAGACGAATGAAGTATCCC TTTGCCTTGGCGCGTCGATGCTCCGCAGCGCTGGTTGCGACAAATTGGCCAATGT GCGCTTTGTCAACTACGCTGCCGGCGGCGACGTCACCGCCGAGGTGGTTGCTGTG ATTGATGCCATCAAATTTGCCGGCGATGCCTTTAGCGGCTCCGTCCCTGGTGGCTG TGCCAGCAGGACGGTTCTCGACGACAAGCTGAACCCACTGGCTCTTGGCCTCTCT CTCGAACCCGTCCTTGCCGGGCTTGTGAATATTCTGCTGACGTTGGGTAAGAAGG ATGCCAATTTCGTCAGTGGCCTGTCTCAGGGCAAGCATATA

ANEXO C – Alinhamento das sequências do gene clonado em pExpyr com a respectiva sequência obtida no NCBI.

<i>bbl1</i> gi 400594426	ATGTCTTTGTCGTCGCCCCAGATCAACAGGCTTCACGCCCGGCTCATCATGAAGTTC
<i>bb11</i> gi 400594426	CTATCCCTTGTTGCCGCGGTCCTTCCGCTGGTGTCTGCTCTCACCATTCCTGAGCAGAGC
<i>bb11</i> gi 400594426	ATCACCACTCCCGCCAACGACCCCTCGTCTGTACCCCCGTCTGGCCTTGAATTGGCCGAG
<i>bb11</i> gi 400594426	ACCATTCCTGAGCAGAGCATCACCACTCCGCCAATGATCCCTTC GACGCGTCTGCTCTC <mark>ACTGTTCCCG</mark> GAG <mark>AAGCGC</mark> ATCACCACTCCTGCCAATGATCCCTTC ** **** *** ** *****************
<i>bb11</i> gi 400594426	TATGTGCCCCCTCTGGCTTCGAGTCGGCCAAGCCCGGTACTGTGCTGCGTGAGCGCCCC TATGTGCCCCCCTCTGGCTTCGAGTCGGCCAAGCCCGGTACTGTGCTGCGTGAGCGCCCC *****
<i>bb11</i> gi 400594426	ATCGTG <mark>GCC</mark> TCGTTTTTCGGTCTCATCCCCGCTCCCATTGATTCTCGTCAGCTGCTCTAT ATCGTG <mark>GCT</mark> TCGTTTTTCGGTCTCATCCCCGCTCCCATTGATTCTCGTCAGCTGCTCTAT *******
<i>bb11</i> gi 400594426	CGCACCACGGCCATTGACGGCTCTGCCATTGCCACCGTCGTCACCATCTTCAAGCCGCTC CGCACCACGGCCATTGACGGCTCTGCCATTGCCACCGTCGTCACCATCTTCAAGCCGCTC *****
<i>bb11</i> gi 400594426	TTTGCCAAG <mark>CGT</mark> GACCGCTTCATCTCCTTCAACACGGCCTACGACTCGTCGGCTTCCATC TTTGCCAAG <mark>CGC</mark> GACCGCTTCATCTCCTTCAACACGGCCTACGACTCGTCGGCTTCCATC *********
<i>bb11</i> gi 400594426	TGCAACCCCAGCTACAACTACCGC <mark>CTG</mark> GGT <mark>GCC</mark> CTCCAAACAGACGTCATCTCGTCGGCC TGCAACCCCAGCTACAACTACCGC <mark>TTG</mark> GGT <mark>GCA</mark> CTCCAAACAGACGTCATCTCGTCGGCC ****************************
<i>bb11</i> gi 400594426	GAGTTTCTCATCATTCAAGCCTACCTGCTCTCTGGCTAC <mark>ACT</mark> GTCGCTTCCGCCGACTAC GAGTTTCTCATCATTCAAGCCTACCTGCTCTCTGGCTAC <mark>ACC</mark> GTCGCTTCCGCCGACTAC **********************************
<i>bb11</i> gi 400594426	GAGGGTCCTGACGTGGCCTTTT <mark>TCA</mark> GTCGGCCGTCTCTCGGGCATGGGCGTTCTTGACGGC GAGGGTCCTGACGTGGCCTTT <mark>TCC</mark> GTCGGCCGTCTCTCGGGCATGGGCGTTCTTGACGGC ******
<i>bb11</i> gi 400594426	ATTCGCGCC <mark>BTG</mark> GTCAACTATGGCCCCAAAATTGGCCTCGACAAGAACCCCATGGTTGTC ATTCGCGCC <mark>BTA</mark> GTCAACTATGGCCCCCAAAATTGGCCTCGACAAGAACCCCATGGTTGTC **********
<i>bb11</i> gi 400594426	AATGCTGGTTACTCTGGCGGTGCCATTGCTAGCGGTTGGGCGGCTTCCCTCCATCCCACC AATGCTGGTTACTCTGGCGGTGCCATTGCTAGCGGTTGGGCGGCTTCCCTCCATCCCACC *****
<i>bb11</i> gi 400594426	TACGCTCCCGACCTAAACCTCAAGGGCTTCATCGCCGGCGGT <mark>ACC</mark> CCT <mark>GCC</mark> AACCTTACC TACGCTCCCGACCTAAACCTCAAGGGCTTCATCGCCGGCGGT <mark>ACA</mark> CCT <mark>GCA</mark> AACCTTACC ******************************
<i>bb11</i> gi 400594426	GAGGTTCTTCTTTACGTCGATGGCACCTTATTCGCG <mark>GGC</mark> TTC <mark>GTA</mark> CCAGGTGCCCTT <mark>GCT</mark> GAGGTTCTTCTTTACGTCGATGGCACCTTATTCGCG <mark>GGT</mark> TTC <mark>GTC</mark> CCAGGTGCCCTT <mark>GCA</mark> ************************************
<i>bb11</i> gi 400594426	GGCCAAATTATGCCCTCTGCCTACGGT <mark>GCG</mark> CGCCTCAAG <mark>CCG</mark> GTCCTGGACAAGGTCATC GGCCAAATTATGCCCTCTGCCTACGGT <mark>GCA</mark> CGCCTCAAG <mark>CCC</mark> GTCCTGGACAAGGTCATC **************************
<i>bb11</i> gi 400594426	CCTCCCCGCGGC <mark>AAG</mark> GAAGCTCTGGCTCTCGGAACCAGC <mark>CAA</mark> TGCGCGCCGGTCAATCTC CCCCCGCGGCAAAGAAGCTCTGGCTCTCGGAACCAGC <mark>CAG</mark> TGCGCGCCCGGTCAATCTC
<i>bb11</i> gi 400594426	ATTGCCTTTGCGGGCAAGTCCATCTTCGACACTAGCTTCCAGACCCTCGGCAAGGGACCT ATTGCCTTTGCGGGCAAGTCCATCTTCGACACTAGCTTCCAGACCCTCGGCAAGGGACCT ***********************************
-----------------------------	--
<i>bb11</i> gi 400594426	ACTCTACGATAAGGATGTTGCGTGGGTCCTCGCCGAGAGCACCCTGGG <mark>TCT<mark>AAAGAG</mark>ACG</mark> ACTCTACGATAAGGATGTTGCGTGGGTCCTCGCCGAGAGCACCCTGGGTCT <mark>CAAGAA</mark> GAA
<i>bbl1</i> gi 400594426	CGAAACGCC <mark>CAACGGTAC</mark> CGT <mark>GAT</mark> GCTCTATCACTC <mark>TCAGACGAA</mark> TGA <mark>AGTATCCCTTTG</mark> CGAAACGCC <mark>CACGGTACC</mark> CGT <mark>CAT</mark> GCTCTATCACTC <mark>TCCAGACGA</mark> TGA <mark>GGTTATCCCTTT</mark> **********
<i>bbl1</i> gi 400594426	CCTTGGCGCGTCGATGCTCCG <mark>CAGCGCTGGTTG</mark> CGACAA <mark>ATTGGC</mark> CAATGTGCGCTTTGT TGCTGGCGC <mark>TGATGGCCT</mark> CCG <mark>CAAGCGCTGGTG</mark> CGACAA <mark>CGGTGC</mark> CAATGTGCGCTTTGT ****** ***
<i>bbl1</i> gi 400594426	CAACTACGCTGCCGGCGGCCACGTCACCGCCGAGGTGGTTGCTGTGATTGAT
<i>bb11</i> gi 400594426	ATTTGCCGGCGATGCCTTTAGCGGCTCCGTCCCTGGTGGCTGTGCCAGCAGGACGGTTCT ATTTGCCGGCGATGCCTTTAGCGGCTCCGTCCCTGGTGGCCTGTGCCAGCAGGACGGTTCT ********************************
<i>bbl1</i> gi 400594426	CGACGACAAGCTGAACCCACTGGCTCTTGGCCTCTCTCTC
<i>bbl1</i> gi 400594426	TGTGAATATTCTGCTGACGTTGGGTAAGAAGGATGCCAATTTCGTCAGTGGCCTGTCTCA TGTGAATATTCTGCTGACGTTGGGTAAGAAGGATGCCAATTTCGTCAGTGGCCTGTCTCA **********************************
<i>bbl1</i> gi 400594426	GGGCAAGCAT GGGCAAGCATATATAA *******

- Alinhamento realizado pelo software ClustalOmega Multiple Sequence Alignment;
- Códons em verde são degenerados, em roxo codificam aminoácidos diferentes e em vermelho nucleotídeos não-pareados.

ANEXO D – Determinação da concentração de lipase a ser utilizada nos estudos cinéticos para Bbl1 (a) e lipase de Palatase<sup>®</sup> 20.000L (b) purificadas e livre. O estudo cinético baseou-se no modelo de estado estacionário (BiSSWANGER, 2002). Segundo esse modelo todas as enzimas da reação devem estar com seus sítios catalíticos ocupados na menor concentração de substrato a ser utilizada e, portanto, a relação entre concentração de enzima e velocidade de reação deve ser mantida linear. A hidrólise de 0,10 mM de pNPP foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional e 5 min de reação. As concentrações de substrato e enzima utilizados estão na figura. A conversão de substrato deve ser inferior a 5%. Por meio desse resultado, as concentrações de Bbl1 e lipase de Palatase livres ideais para estudo de cinética.





ANEXO E – Determinação do tempo de hidrólise a ser utilizada nos estudos cinéticos para Bbl1 (a) e lipase de Palatase<sup>®</sup> 20.000L (b) purificadas e livre. O estudo cinético baseou-se no modelo de estado estacionário (BISSWANGER, 2002). Segundo esse modelo a formação de produto é de ordem zero em função do tempo e, portanto, a relação entre concentração de produtos e tempo decorrido de reação deve ser linear. A hidrólise de 0,10 mM de *p*NPP foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional utilizando. As concentrações de substrato e enzima utilizados estão de acordo com ANEXO D. O tempo de reação de 5 minutos foi ideal para o estudo de cinética em ambas as enzimas.



Temperatura (°C)	V <sub>máx</sub> (U.mg <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5</sub> (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	hill
45	$2489 \pm 66$	$0{,}50\pm0{,}03$	$2026\pm53$	$1,\!68 \pm 0,\!19$
50	$3123\pm60$	$0{,}61\pm0{,}02$	$2542\pm49$	$2,\!29\pm0,\!26$
55	$4680\pm207$	$1,\!09\pm0,\!10$	$3809 \pm 169$	$1,40\pm0,12$
60	$5367 \pm 188$	$0,\!92\pm0,\!04$	$4367\pm233$	1,83 ± 0,19
65	$4326\pm188$	$1,35 \pm 0,06$	$3521 \pm 153$	$2{,}58\pm0{,}27$
70	$2607\pm250$	$1,\!19\pm0,\!06$	$2121\pm204$	$2,\!87\pm0,\!37$
75	$2188\pm90$	$1,33 \pm 0,05$	$1781\pm70$	$1,83 \pm 0,24$

ANEXO F– Parâmetros cinéticos de hidrólise de *p*NPP por Bbl1 livre em diferentes temperaturas. A hidrólise foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional e 5 minutos de reação. A concentração de Bbl1 foi de  $9 \times 10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>.

ANEXO G – Parâmetros cinéticos de hidrólise de pNPP por lipase de Palatase<sup>®</sup> 20.000L purificada e livre em diferentes temperaturas. A hidrólise foi em tampão McIlvaine pH 6,0 com 0,5 mL de volume reacional e 5 minutos de reação. A concentração de lipase foi de 2,5 x  $10^{-2}$  mg.mL<sup>-1</sup>. Em todas as temperaturas a constante de hill foi 1.

Temperatura (°C)	V <sub>máx</sub> (U.mg <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5</sub> (mM)	$\mathbf{k}_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
40	$431\pm 66$	$\textbf{2,78} \pm \textbf{0,18}$	$209\pm54$
45	$849 \pm 130{,}2$	$1,34 \pm 0,26$	412 ±106
50	$2097\pm 66$	$3,30 \pm 0,13$	$1020\pm53$
55	$685\pm93$	$6{,}92\pm0{,}29$	$333\pm75$
60	$136 \pm 10$	$1,84 \pm 0,39$	$66 \pm 8$
65	$83\pm10$	$1,\!61\pm0,\!50$	$40\pm 8$
70	$47 \pm 4$	$1,\!06\pm0,\!25$	$23 \pm 3$
75	$34 \pm 4$	$0,7 \pm 0,3$	$16 \pm 3$

**ANEXO H** – **Determinação da concentração de derivado Bbl1 em Octyl-Sepharose a ser utilizada nos estudos cinéticos.** O estudo cinético baseou-se no modelo de estado estacionário (BISSWANGER, 2002). Segundo esse modelo todas as enzimas da reação devem estar com seus sítios catalíticos ocupados na menor concentração de substrato a ser utilizada e, portanto, a relação entre concentração de enzima e velocidade de reação deve ser mantida linear. A hidrólise de 0,10 mM de *p*NPP foi em tampão McIlvaine pH 5,8 com 0,5 mL de volume reacional, 5 min de reação e a 57°C. A conversão de substrato deve ser inferior a 5%. A concentração de 5 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup> respeita estas condições de estudo.



ANEXO I – Determinação do tempo de hidrólise a ser utilizada nos estudos cinéticos para derivado de Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose. O estudo cinético baseou-se no modelo de estado estacionário (Bisswanger 2002). Segundo esse modelo a formação de produto é de ordem zero em função do tempo e, portanto, a relação entre concentração de produtos e tempo decorrido de reação deve ser linear. A hidrólise de 0,10 mM de *p*NPP foi em tampão McIlvaine pH 5,8, com 0,5 mL de volume reacional utilizando e a 57°C. O tempo de reação de 5 min foi ideal para o estudo de cinética em ambas as enzimas.



Temperatura (°C)	V <sub>máx</sub> (U.mg <sup>-1</sup> )	K <sub>0,5</sub> (mM)	$\mathbf{k}_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
45	$10264\pm429$	$0,\!68\pm0,\!10$	$8353\pm349$
50	$11042\pm483$	$0,\!34\pm0,\!04$	$8986 \pm 393$
55	$11777\pm239$	$0,\!41\pm0,\!04$	9585 ± 195
60	$12813\pm371$	$0,\!34\pm0,\!04$	$10428\pm302$
65	$12701\pm318$	$0,\!44\pm0,\!04$	$10336\pm259$
70	$11839\pm364$	$0,\!49\pm0,\!06$	$9635\pm296$
75	$8386 \pm 453$	$0,54 \pm 0,12$	$6825\pm369$

ANEXO J – Parâmetros cinéticos de hidrólise de *p*NPP por Bbl1 imobilizada em Octyl-Sepharose, em diferentes temperaturas. A hidrólise foi em tampão McIlvaine pH 5,8, com 0,5 mL de volume reacional e 5 min de reação. A concentração de Bbl1 foi de 5 x  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>.