DISSERTAÇÕES 2017

**Título:**

Expressão heteróloga e purificação de uma L-asparaginase de Zymomonas mobilis

**Autor:**

JULIANA CHRISTINA CASTANHEIRA VICENTE PEREIRA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

PEREIRA, J. C. C. V.

**Data da Defesa:**

04/12/2017

**Resumo:**

A L-asparaginase é uma enzima utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda e alguns outros tipos de câncer. O presente trabalho visou promover a expressão heteróloga da L-asparaginase da bactéria Zymomonas mobilis na levedura Pichia pastoris de forma constitutiva e na bactéria Escherichia coli de forma indutiva. Para os ensaios em P. pastoris, a transformação foi feita a partir da integração do plasmídeo pGAPZαZmA ao genoma da cepa da linhagem X-33, e os transformantes foram cultivados em frascos agitados contendo meio de expressão BMGY; todavia, não foi detectada atividade enzimática nas amostras recolhidas. Para os ensaios em E. coli, foram utilizadas cepas da linhagem BL21(DE3) e JM109(DE3) contendo os plasmídeos pET26b/ans e pET28b/ans para expressão periplasmática e intracelular, respectivamente. A expressão foi realizada em frascos agitados contendo meio LB, utilizando lactose 10 g/L como indutor. A análise do meio de cultivo revelou atividades enzimáticas entre 0,070 e 0,128 UI/mL, resultados estes inferiores em relação aos encontrados anteriormente pelo grupo (1,3 UI/mL). Os ensaios de análise de atividade intracelular revelaram atividades de até 22,2 UI/mL (3684 UI/g de células) e 11,9 UI/mL (2221 UI/g de células) para as cepas de expressão periplasmática e intracelular, respectivamente. Com objetivo de purificação, a fração solúvel do conteúdo intracelular foi submetido a cromatografia de afinidade, obtendo-se um rendimento de 35,6% e fator de purificação igual a 24. As alíquotas que apresentaram atividade enzimática foram armazenadas a 4 e -20 °C e submetidas a análises de estabilidade da atividade ao longo do tempo, revelando total decaimento da atividade enzimática em 7 dias de armazenamento a -20 °C, e decaimento de até 82,4 % em 63 dias de armazenamento a 4 °C. Foi analisada a interferência que íons metálicos e outros compostos poderiam ter sobre a atividade da enzima, através do contato com os compostos estudados durante 10 minutos antes da adição do substrato para dosagem de atividade. Dentre os possíveis interferentes estudados, o que promoveu o maior decaimento da atividade, de forma a extinguir a mesma, foi o Zn2+, enquanto que, na presença de EDTA, a atividade enzimática se manteve.

**Palavras-chave:**

asparaginase;expressão heteróloga;Escherichia coli;Pichia pastoris;Purificação

**Abstract:**

leukemia and some other types of cancer. The present work aimed to promote the heterologous expression of L-asparaginase from bacteria Zymomonas mobilis constitutively in the yeast Pichia pastoris and lactose-induced in bacteria Escherichia coli. For assays with P. pastoris, transformation was performed with the integration of plasmid pGAPZαZmA into an X-33 lineage strain’s genome, and clones were grown in shaken flasks with BMGY medium; nevertheless, no enzyme activity was detected in the taken samples. For assays with E. coli, strains from lineages BL21(DE3) and JM109(DE3) were used, carrying the plasmids pET26b/ans and pET28b/ans, for periplasmatic and intracellular expression, respectively. Expression was performed in shaken flasks with LB medium, using lactose 10 g/L for induction. Analysis of medium revealed enzyme activity between 0,070 and 0,128 UI/mL, which were lower than the results previously achieved by the group (1,3 UI/mL). Intracellular activity analysis assays revealed enzyme activities up to 22,2 UI/mL (3684 UI/g of dry mass) and 11,9 UI/mL (2221 UI/g of dry mass) for periplasmatic and intracellular expression strains, respectively. For purification, the soluble fraction of intracellular content was submitted to affinity chromatography, obtaining final activity recovery of 35,6% and 24-fold purification. Aliquots that showed enzyme activity were stored at 4 and -20 °C and submitted to analysis of enzyme activity stability over time, revealing complete decay of activity in 7 days of storage at -20 °C, and decay up to 82,4 % in 63 days of storage at 4 °C. Analysis of interference of ions and other compounds over enzyme activity were performed, by means of the contact between enzyme and studied compounds throughout 10 minutes before addition of substrate for activity assay. Zinc promoted the biggest decay of activity among substances studied, whilst activity was maintained in presence of EDTA.

**Keywords:**

asparaginase;heterologous expression;Escherichia coli;Pichia pastoris;purification

**Título:**

Caracterização funcional do gene orfE264 que codifica uma possível proteína autotransportadora em Burkholderia thailandensis.

**Autor:**

GIULIA NARANJO ARANHA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

ARANHA, G. N.

**Data da Defesa:**

29/08/2017

**Resumo:**

Burkholderia thailandensis, uma espécie não infecciosa, comumente isolada do solo e da água, tem sido utilizada como modelo para o estudo de muitas características de suas contrapartes patogênicas em Burkholderia spp. B. thailandensis produz biossurfactantes do tipo raminolipídeo que parece estar diretamente envolvido no comportamento multicelular. Além da vantagem de obter uma maneira sustentável, a partir de fontes renováveis, são altamente biodegradáveis, não tóxicos e sensíveis a condições extremas de temperatura, pH e salinidade. O estudo das vias biossintéticas dos raminolipídeos em Pseudomonas aeruginosa revelou uma proteína autotransportadora chamada EstA, que influencia muito a produção de raminolipídeos, a formação de biofilmes aderentes e a motilidade celular. EstA, uma proteína autotransportadora, é caracterizado por um barril β na região C-terminal que ancora uma lipase na membrana externa. Para investigar a presença e a funcionalidade de proteínas autotransportadoras similares à EstA, bem como o papel que elas desempenham na produção de raminolipídeos em B. thailandensis, foram utilizadas ferramentas bioinformáticas para prospecção de autotransportadoras dentro do genoma de B. thailandensis E264. As análises de bioinformática revelaram um potencial gene similar ao estA (aqui designado como orfE264). orfE264 foi sintetizado e clonado no plasmídeo pBluescript II SK em que uma deleção foi construída, seguida pela inserção de um gene de resistência ao cloranfenicol de modo a obter-se uma cepa nocauteada por recombinação homóloga, usando recombinases de fago Lambda. A caracterização da cepa mutante ΔorfE264::Cm resultante revelou uma diminuição significativa da formação do biofilme e da motilidade celular, em comparação com a cepa selvagem, mostrando que esse produto gênico está de alguma forma envolvido nesses fenótipos. A complementação cruzada do mutante ΔorfE264::Cm com estA restaurou os fenótipos. Os resultados obtidos indicam uma possível proteína autotransportadora, o primeiro membro desta família de secreção de proteínas a ser descrita nesta espécie. Estudos adicionais encontram-se em andamento, que deverão revelar informações relevantes sobre o papel dessa proteína em mecanismos de virulência deste modelo. Além disso, o emprego industrial de B. thailandensis para a produção de raminolipídeos são de grande interesse em Biotecnologia, sendo que uma autotransportadora da família EstA será um alvo importante para a engenharia metabólica, visando o melhoramento da produção desses compostos.

**Palavras-chave:**

Burkholderia thailandensis;Engenharia genética;Autotransportadora;Biologia Molecular

**Abstract:**

Burkholderia thailandensis, a non-infectious species, commonly isolated from soil and water, has been used as a surrogate model for studying many characteristics of its pathogenic counterparts in Burkholderia spp. B. thailandensis produces rhamnolipid biosurfactants, which seems to be directly involved in multicellular behavior. Besides the advantage of obtaining a sustainable way, from renewable sources, they are highly biodegradable, non toxic and sensitive to extreme conditions of temperature, pH and salinity. The study of biosynthetic pathways of rhamnolipids in Pseudomonas aeruginosa revealed an autotransporter protein called EstA, which greatly influences the production of rhamnolipids, the formation of adherent biofilms and cellular motility. EstA is an autotransporter characterized by a β-barrel motif in the C-region that anchors a lipase in the outer membrane. In order to investigate the presence and functionality of autotransporter proteins similar to EstA, as well as their role in rhamnolipid production in B. thailandensis, bioinformatic tools were employed for prospecting autotransporters within the genome of B. thailandensis E264. The bioinformatics analyses revealed a potential estA-like gene (herein designated orfE264). orfE264 was synthesized and cloned in the plasmid pBluescript II SK in which a deletion was constructed, followed by the insertion of a chloramphenicol resistance gene in order to obtain a knockout strain by homologous recombination, using Lambda phages recombinases. Characterization of the resulting ΔorfE264-mutant strain revealed significantly decreased biofilm formation and cellular motility, when compared to the wild type strain, showing that this genic product is somehow involved in those phenotypes. Cross complementation of the orfE264-mutant with a full-length estA restored the phenotypes. These results indicate a putative autotransporter protein, the first member of this protein secretion family to be described in this species. Additional studies that are on demand might reveal relevant informations about the role of this protein in virulence mechanism of this model. Beyond that, the industrial applicability of B. thailandensis in rhamnolipid production are of great interest in Biotechnology since a novel EstA family autotransporter is an important target for metabolic engineering aiming the enhancement in those compounds production.

**Keywords:**

Burkholderia thailandensis;Genetic Engineering;Autotransporter;Molecular Biology

**Título:**

Caracterização do promotor PvSR2 de Phaseolus vulgaris no desenvolvimento de um biossensor de Saccharomyces cerevisiae sensível ao cádmio.

**Autor:**

VINICIUS SIMAS GRILO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

GRILO, V. S.

**Data da Defesa:**

25/08/2017

**Resumo:**

A contaminação por metal pesado é um problema ambiental grave ocorrente em diversos países. Dentre os metais pesados, o cádmio é o mais preocupante pois é extremamente nocivo mesmo em baixas concentrações, sendo considerado carcinogênico de Grupo I pela Agência Internacional de Pesquisa contra o Câncer (do inglês, IARC). O monitoramento de cádmio no ambiente se faz necessário, a fim de mapear regiões contaminadas e evitar exposição. Os biossensores microbianos podem ser aplicados como uma ferramenta analítica alternativa aos métodos tradicionalmente empregados neste tipo de monitoramento. Usando Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae), o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial biossensor da cepa BY-PvSR2 construída a partir da transformação da cepa BY4741 com o plasmídeo pSF-PvSR2-BetaGal-URA3, contendo o promotor PvSR2 de Phaseolus vulgaris fusionado ao gene repórter lacZ. Além disso, buscou-se compreender como se dá a regulação do sistema PvSR2-lacZ em S. cerevisiae. Foi verificado que a cepa BY-PvSR2 tem potencial biossensor, uma vez que esta apresentou atividade crescente mediante a concentrações de Cd2+ entre 0 e 50 M. Para valores superiores, foi observado que o efeito tóxico se sobrepõe ao efeito indutivo deste metal. Esta cepa não é responsiva às concentrações de 1 até 50 M de íons Hg2+, mas teve atividade -galactosidase induzida por íons de Zn2+ e Cu2+. Dentre todos os cátions testados, esta cepa se mostrou sensível ao Cd2+, mesmo em presença de Zn2+ e Cu2+. Deleções no promotor PvSR2 influenciaram negativamente a atividade, possivelmente pela remoção de sítios de ligação de fatores de transcrição (FT). Para investigação da regulação transcricional envolvida, esse sistema foi estudado em diversas cepas deletadas em um FT. Dos 12 FTs investigados, 10 influenciaram o sistema PvSR2-lacZ e desses, 9 regulam positivamente a transcrição do gene repórter em algum grau. Ainda, foi tentada uma mutagênese aleatória no promotor buscando melhoria na performace do biossensor. No entanto, a mutação obtida foi em um sítio importante para o início processo de transcrição, não tendo nenhuma relação com os FTs selecionados. Tal mutação culminou na redução de em 72% de atividade -galactosidase. Esses resultados revelam possíveis reguladores para o promotor PvSR2 e apontam caminhos para a otimização deste visando o desenvolvimento de um biossensor microbiano como ferramenta biotecnológica.

**Palavras-chave:**

S. cerevisiae;cádmio;biossensor microbiano;PvSR2;lacZ;regulação transcricional

**Abstract:**

Heavy metal (HM) pollution is a major environment problem worldwide. From all HMs cadmium is the most concerning, since it is ubiquitous and extremely dangerous even at low concentrations, being considered as Group I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer – IARC. Thus, cadmium monitoring is necessary and very important to map contaminated areas and avoid exposure. Microbial biosensors can be applied as an alternate analytical tool to the conventional techniques for monitoring HM. Using Saccharomyces cerevisiae (S.cerevisiae) as model, the objective of this work was evaluate the biosensor potencial of the strain BY-PvSR2 built from the transformation of the strain BY4741 with the plasmid pSF-PvSR2-BetaGal-URA3, which contains the promoter PvSR2 from Phaseolus vulgaris fused with the reporter gene lacZ. Moreover, the transcriptional factors possibly involved in the regulation of the system PvSR2-lacZ was investigated. The strain BY-PvSR2 has biosensor potencial, since it responded to increasing concentrations of Cd2+, from 0 to 50 M. In higher concentrations of Cd2+, the toxicity of this metal overcome its inductive effect over S. cerevisiae promoter. This strain did not respond to the concentrations from 1 to 50 M of Hg2+, but was responsive to Zn2+ and Cu2+. From all tested cations, this strain was more sensible to Cd2+, even in presence of Cu2+ and Zn2+. Deletions in the promoter influenced negatively the - galactosidase activity, possibly because sites of interactions with transcription factors (TFs) were removed. To investigate the transcriptional regulation involved, the system PvSR2-lacZ was introduced in 12 strains lacking one TF. From the 12 TFs, 10 influenced the system PvSR2-lacZ in which 9 are thought to positively regulate the transcription of the reporter gene. Furthermore, random mutagenesis was attempted in order to improve the biosensor’s performance. However, the mutation occurred in a general site important to the inicial step of the transcription, having no relations with the chosen TFs. This mutation resulted in a loss of 72% of the -galactosidase activity. These results reveal possible regulators of the promoter PvSR2 and suggest ways to the optimization of this promoter in order to develop a microbial biosensor as a biotechnological tool.

**Keywords:**

S. cerevisiae;cadmium;microbial biosensor;PvSR2;lacZ;transcriptional regulation

**Título:**

Investigação do Papel da Via de Sinalização Retrógrada (RTG) de Saccharomyces cerevisiae na Reprogramação Metabólica Celular e sua Analogia com Transformações Tumorais de Células Humanas.

**Autor:**

DIEGO SEIXAS GOMES DE ALMEIDA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

Diego S.G. Almeida

**Data da Defesa:**

14/08/2017

**Resumo:**

Usando a levedura Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudo, foi investigado o papel desempenhado por Rtg2p, um ativador da via de sinalização retrógrada (RTG), sobre o perfil metabólico celular e a expressão de genes homólogos ou relacionados àqueles que desempenham um papel durante a transformação tumoral de células humanas. Os resultados obtidos sugerem que Rtg2p desempenha um papel no balanço bioenergético celular, na regulação da quantidade e qualidade mitocondrial e na modulação da expressão de ACO1, POR1, CRD1, RAS1, RAS2 e SCH9. Foi investigado o papel desempenhado por Rtg2p sobre a expressão de RAS e SCH9, relacionados aos oncogenes humanos RAS e AKT, respectivamente, frequentemente encontrados alterados ou mutados em células de câncer. Utilizando as cepas selvagem e rtg2Δ, investigou-se o papel de Rtg2p sobre a remodelação do padrão de expressão gênica após progressiva adaptação celular à condição de disfunção mitocondrial, ocasionada pela inibição respiratória sustentada mantida por antimicina, O objetivo principal era induzir um resposta adaptativa celular à disfunção respiratória. Os dados obtidos indicam que Rtg2p e, portanto, a via RTG, é essencial para a modulação irreversível (aumento de expressão) dos genes RAS1 e RAS2 em Saccharomyces cerevisiae após adaptação à disfunção mitocondrial. O aumento da expressão de SCH9 após adaptação à disfunção mitocondrial ocorre de modo independente de Rtg2p, e possivelmente envolve outras vias. De modo geral, este estudo sugere que a remodelação de expressão dos genes RAS e SCH9 em levedura é um fenômeno à jusante da adaptação celular à disfunção mitocondrial. Tal observação levanta o questionamento se o mesmo ocorre durante a transformação celular que leva ao desenvolvimento do câncer. Neste caso, este estudo fornece evidências de que o câncer pode ser encarado como uma doença metabólica mitocondrial.

**Palavras-chave:**

Rtg2p;Metabolismo;Saccharomyces cerevisiae;Câncer;Mitocôndria

**Abstract:**

Using Saccharomyces cerevisiae as a model organism, we investigated the role of Rtg2p, an activator of the retrograde (RTG) pathway in yeast, over the metabolic profile of the cell and the expression of a set of genes that are homologous or correlated to those important during the tumoral transformation of the human cell. Together, our data suggest that Rtg2p plays a role in balancing the bioenergetic profile of the cell, regulating mitochondrial quantity and quality and modulating the expression of ACO1, POR1, CRD1, RAS1, RAS2 and SCH9. We particularly focused on the role of the Rtg2p over the expression of RAS and SCH9 genes, which are related to the human oncogenes RAS and AKT respectively, frequently found altered or mutated in tumours. Using a wild-type and rtg2Δ strain, we investigated the role of Rtg2p over cell gene expression. remodelation after a progressive adaptation to mitochondrial dysfunction, caused by a sustained respiratory inhibition with antimycin. We aimed to induce an adaptive response of the cell to mitochondrial dysfunction in order to study the dynamics of cell transformation. We found that Rtg2p, thus the RTG pathway, is essential for the irreversible modulation (increased expression) of RAS1 and RAS2 genes in Saccharomyces cerevisiae after adaptation to mitochondrial dysfunction. SCH9 increased expression after adaptation to mitochondrial dysfunction was not dependent on Rtg2p, but rather an event that may involve multiple pathways. Overall, our data suggest that the remodelation of RAS and SCH9 gene expression in yeast is a downstream phenomenon of cellular adaptation to mitochondrial dysfunction. This raises the question if the same may occur during human cell transformation that leads to cancer development. In such case, these data provide evidence that cancer can be viewed as a mitochondrial metabolic disease.

**Keywords:**

Rtg2p;Metabolism;Saccharomyces cerevisiae;Cancer;Mitochondria

**Título:**

Purificação e avaliação do padrão de glicosilação de um anticorpo monoclonal produzido por células CHO.

**Autor:**

JUVISSAN MEDALITH AGUEDO ARIZA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

ARIZA, J. M. A.

**Data da Defesa:**

25/07/2017

**Resumo:**

Os anticorpos monoclonais (mAbs) representam a classe mais importante entre as proteínas terapêuticas. Os biofármacos baseados em mAbs incluem também conjugados mAb-droga e proteínas de fusão-com a porção constante (Fc) de um anticorpo. O padrão de glicosilação de mAbs pode influenciar a estrutura, função, farmacocinética, farmacodinâmica e imunogenicidade da molécula. Assim, a glicosilação pode ter impacto na segurança e eficácia do produto e é considerada um atributo de qualidade crítico (CQA) pela indústria e agências reguladoras de medicamentos. No presente trabalho, foi investigado o padrão de glicosilação de um mAb da classe IgG1, humanizado e produzido por células da linhagem CHO nos modos de batelada e perfusão, utilizando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC-HPLC) e espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF. O mAb foi purificado a partir do sobrenadante de cultivo celular utilizando cromatografia de afinidade com Proteína A e tratado com PNGase F para liberar os glicanos. Para a análise HILIC-HPLC, os glicanos foram marcados com 2-aminobenzamida, separados utilizando uma coluna TSKgel Amida-80, e foram propostas estruturas glicosiladas com base na base de dados Glycobase 3.2.4. A análise repetida das amostras após tratamento com diferentes exoglicosidases ajudou a elucidar a estrutura das cadeias de oligossacarídeos. O método HILIC-HPLC proporcionou uma quantificação relativa de glicanos do anticorpo por meio de uma única análise. Verificou-se que o grau de fucosilação era de 99%, enquanto que os graus de manosilação e sialilação eram de 0,6% e 0,4%, respectivamente. A glicoforma predominante foi G0F (48,6%), seguida por G1F (43,3%), G2F (6,4%) e G2S1 (0,4%). Os glicanos híbridos representaram 0,7% das glicoformas. A análise MALDI-TOF/TOF confirmou esta distribuição de glicoformas e mostrou que as massas dos glicanos principais eram as esperadas (1485,6 Da para G0F, 1647,6 Da para G1F e 1809,7 Da para G2F). As técnicas utilizadas neste trabalho permitiram avaliar comparativamente a composição do perfil de N-glicosilação do mAb estudado, podendo, portanto, ser consideradas como métodos de rotina para a detecção e quantificação de micro-heterogeneidades de N-glicosilação em amostras de anticorpos monoclonais.

**Palavras-chave:**

Células CHO;Anticorpo monoclonal;Purificação;N-glicosilação;HILIC-HPLC;MALDI-TOF/TOF

**Abstract:**

Monoclonal antibodies (mAbs) represent the most important class among therapeutic proteins. Biopharmaceuticals based on mAbs also include mAb-drug conjugates and fusion proteins-with the constant (Fc) portion of an antibody. The glycosylation pattern of mAbs can influence the structure, function, pharmacokinetics, pharmacodynamics and immunogenicity of the molecule. Thus, glycosylation can have an impact on the safety and efficacy of the product and is considered a critical quality attribute (CQA) by industry and drug regulatory agencies. In the present work, was investigated the glycosylation pattern of a humanized mAb of the IgG1 class and produced by CHO cells line in the batch and perfusion modes using hydrophilic interaction chromatography (HILIC-HPLC) and MALDI-TOF/TOF. The mAb was purified from the cell culture supernatant using Protein A affinity chromatography and treated with PNGase F to release the glycans. For HILIC-HPLC analysis, the glycans were labeled with 2-aminobenzamide, separated using a TSKgel Amide-80 column, and glycosylated structures were proposed based on the Glycobase 3.2.4 database. Repeated analysis of the samples after treatment with different exoglycosidases helped elucidate the structure of the oligosaccharide chains. The HILIC-HPLC method provided a relative quantification of glycans of the antibody by a single analysis. The degree of fucosylation was found to be 99%, while the degrees of mannosylation and sialylation were 0.6% and 0.4%, respectively. The predominant glycoform was G0F (48.6%), followed by G1F (43.3%), G2F (6.4%) and G2S1 (0.4%). Hybrid glycans represented 0.7% of glycoforms. The MALDI-TOF/TOF analysis confirmed this glycoform distribution and showed that the masses of the major glycans were as expected (1485.6 Da for G0F, 1647.6 Da for G1F and 1809.7 Da for G2F). The techniques used in this work allowed comparing the composition of the N-glycosylation pattern of the studied mAb and could therefore be considered as routine methods for the detection and quantification of N-glycosylation micro-heterogeneities in samples of monoclonal antibodies.

**Keywords:**

CHO Cells;Monoclonal Antibody;Purification;N-glycosylation;HILIC-HPLC;MALDI-TOF/TOF

**ítulo:**

Efeitos Da Serotonina na Tumorigênese: Implicações na Glicólise e Sinalização Celular.

**Autor:**

JAMILLE MANSUR ALBANESE

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

ALBANESE, J. M.

**Data da Defesa:**

31/03/2017

**Resumo:**

O termo tumor ou neoplasia caracteriza-se por uma massa anormal de tecido com altas taxas proliferativas e fluxo glicolítico rápido. A eficiência glicolítica em tumores é conhecida como glicólise aeróbica ou Efeito Warburg. A ação hormonal da serotonina (5-HT) tem implicações em muitos processos fisiológicos e patológicos. Uma das propriedades mais intrigantes é a capacidade de regular processos mitogênicos; Já foi mostrado que a 5-HT aumenta a viabilidade de células de câncer de mama, mas sem nenhum estudo mecanístico, sendo este o objetivo do nosso trabalho. Neste trabalho, mostramos que a 5-HT promove um aumento do fluxo glicolítico, em células MCF-7, através do controle das três principais enzimas da glicólise, hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK). Esta modulação positiva ocorre devido à ligação do hormônio ao seu receptor acoplado à proteína G, ativando a fosfolipase C (PLC), que vai recrutar a proteína quinase C (PKC) e a calmodulina, com consequente ativação da calmodulina cinase II (CaMKII). Por outro lado, esta sinalização também envolve a ativação de tirosinas quinases (TK) e da piruvato quinase A (PKA). Observamos também que o estímulo serotonérgico vai interferir negativamente na sinalização insulinêmica, através da fosforilação do substrato do receptor de insulina. Nossos resultados também mostraram que a 5-HT promove um estresse energético para a célula, resultado do baixo conteúdo de ATP, ativando AMPK. Com isso, sugerimos que a 5-HT é capaz de regular o fluxo glicolítico e ativar vias de sinalização relacionadas com proliferação e sobrevivência celular.

**Palavras-chave:**

Câncer de mama;serotonina;sinalização celular

**Abstract:**

The term tumor or neoplasia is characterized by an abnormal tissue bulk with high proliferative rates and rapid glycolytic flux. The glycolytic flux on tumors is known as aerobic glycolysis or Warburg Effect. Serotonin (5-HT) hormonal activity is implicated in many physiological and pathological processes. One of the most intriguing property is the capability of regulating mitogenic processes. It has been shown that 5- HT increases breast tumor cells viability, but with no mechanistic study, being this the aim of our study. On this study, we have shown that 5-HT promotes an increase on glycolytic flux on MCF-7 cells, by the control of three main glycolytic enzymes, hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK). This positive modulation occurs due to the hormone binding to the receptor attached to G protein, activating phospholipase C (PLC), recruiting protein kinase C (PKC) and calmodulin, with following activation of calmodulin kinase II (CaMKII). On the other hand, this signalization also involves the activation of tyrosine kinases (TK) and of pyruvate kinase A (PKA). We also have observed that the serotonergic stimulus is going to interfere negatively on insulinemic signalization by the phosphorylation of the insulin receptor substrate. Our results also showed that 5-HT promotes an energetic stress to cell as a result of the low ATP content activating AMPK. So, we suggest that 5-HT is capable to regulate the glycolytic and flux and activate signaling pathways related to cell proliferation and survival.

**Keywords:**

Breast cancer;serotonin;cell signaling

**Título:**

Produção Biológica de Hidrogênio e Metano Via Fermentação Anaeróbia Utilizando Hidrolisado de Pome Obtido Com o Preparado Enzimático de Ricinus Communis.

**Autor:**

ALESSANDRO DO NASCIMENTO GARRITANO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

GARRITANO, A. N.

**Data da Defesa:**

31/03/2017

**Resumo:**

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de H2 e CH4 via fermentação anaeróbia tem sido considerada bastante promissora por seu potencial energético, econômico e ambiental. O Efluente da Indústria do Óleo de Palma (POME – do inglês Palm Oil Mill Effluent), rico em triglicerídeos (TAGs), é produzido ao longo do processo de extração do óleo de palma, cuja indústria se encontra em forte crescimento, tanto no cenário brasileiro quanto mundial. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a produção biológica de H2 e CH4 a partir do POME. Inicialmente, realizou-se a produção de H2 biológico a partir de três diferentes estratégias de condução do processo: fermentação de POME bruto, hidrólise simultânea à fermentação e hidrólise do POME seguida de fermentação. O efluente gerado durante a produção de H2, efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW – do inglês Hydrogen Producing Liquid Waste), foi então utilizado como matéria-prima para a produção de CH4. O preparado enzimático vegetal (PEV) utilizado, rico em hidrolases, foi extraído de sementes de mamona. A estratégia de hidrólise do POME seguida por fermentação anaeróbia (duas etapas) gerou os melhores resultados em termos de rendimento (2,56 mmol H2/ g DQO) e produtividade (0,174 mmol H2/ g DQO.h) em H2, além de permitir a redução da fase adaptativa de crescimento em 12 h. O processo de produção de CH4 sequencial à produção de H2 proporcionou a geração de 9,13 mmol CH4/g DQO, indicando o grande potencial de aproveitamento do efluente da produção de H2, o HPLW.

**Palavras-chave:**

palavra chave

**Abstract:**

The use of agroindustrial residues for the H2 and CH4 production via anaerobic fermentation has been considered very promising for its energy, economic and environmental potential. Palm Oil Mill Efluent (POME), rich in triglycerides (TAGs), is produced throughout the process of extracting palm oil, whose industry is in strong growth, both in the Brazilian and worldwide scenario. In this sense, the objective of this work was the biological production of H2 and CH4 from POME. Initially, the production of H2 biological was carried out from three different strategies of process conduction: fermentation of crude POME, simultaneous hydrolysis to the fermentation and hydrolysis of POME followed by fermentation. The effluent generated during H2 production, Hydrogen Producing Liquid Waste (HPLW), was then used as raw material for the production of CH4. The plant enzyme preparation (PEV) used, rich in hydrolases, was extracted from castor bean seeds. The POME hydrolysis strategy followed by anaerobic fermentation (two stages) generated the best yield results (2.56 mmol H2 / g DQO) and yield (0.174 mmol H2 / g DQO.h) in H2, in addition to allowing the reduction of the adaptive phase of growth in 12 h. The process of production of sequential CH4 to the production of H2 provided the generation of 9.13 mmol CH4/ g DQO, indicating the great potential of use of the H2 production effluent, the HPLW.

**Keywords:**

keywords

**Título:**

Avaliação da Atividade Antioxidante de Compostos de Coordenação de Fe3+ em Saccharomyces cerevisiae.

**Autor:**

DANIELA DIAS QUEIROZ

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

QUEIROZ, D. D.

**Data da Defesa:**

23/02/2017

**Resumo:**

O uso do oxigênio pelos organismos aeróbios é de grande relevância para diversas funções biológicas. No entanto, esta molécula pode ser o ponto de partida para a formação de outras espécies com maior reatividade. Em geral, o aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) juntamente com a incapacidade do sistema antioxidante das células em eliminar tais moléculas reativas podem levar ao acúmulo de danos oxidativos em lipídios, proteínas e DNA. Neste cenário, o estresse oxidativo tem sido amplamente relacionado com a gênese e/ou progressão de diversas patologias, tais como diabetes, doenças cardíacas e neurodegenerativas, bem como o câncer. Desta forma, com o objetivo de eliminar as EROs, bem como atenuar os efeitos nocivos do estresse oxidativo, diversos grupos de pesquisa estão a investigar o papel de compostos naturais e/ou sintéticos com propriedades antioxidantes. Neste contexto, uma alternativa que vem recebendo grande atenção é o desenvolvimento de compostos de coordenação com atividade redox. Tais compostos são sintetizados para atuarem de forma mimética a catalase (Cat) e superóxido dismutase (Sod), enzimas envolvidas na eliminação do peróxido de hidrogênio (H2O2) e do radical superóxido (O2.-), respectivamente. Neste trabalho, investigamos a capacidade antioxidante in vitro e in vivo mimética a Sod e Cat de 7 compostos de coordenação (C1 - C7) contendo o metal de transição ferro (Fe3+) como centro de coordenação. Além disso, neste estudo também foi possível avaliar a capacidade dos compostos em induzir uma resposta celular de Saccharomyces cerevisiae. Ao avaliar a capacidade antioxidante in vitro, mimética a Sod e Cat, observamos que, enquanto todos os compostos foram capazes de eliminar o radical O2.-, nenhum dos compostos foi capaz de decompor o H2O2. Diante deste resultado, empregando S. cerevisiae como modelo de estudo, investigamos a capacidade antioxidante dos compostos somente no estresse oxidativo causado pela menadiona, um fonte geradora do O2.-. Embora todos os compostos tenham resgatado integralmente a sobrevivência ao estresse oxidativo e reduzido a disfunção mitocondrial da cepa selvagem de S. cerevisiae, apenas 3 compostos (C3, C5 e C7) foram capazes de aumentar em cerca de 70% a sobrevivência de uma cepa de S. cerevisiae deficiente na síntese da enzima Sod1. Com relação a capacidade destes 3 compostos em induzir uma resposta celular, foi através da avaliação da sobrevivência da mutante Yap1 (fator de transcrição requerido na resposta contra o estresse oxidativo), da expressão da proteína Hsp104 e da determinação das atividades das enzimas endógenas de S. cerevisiae, Sod e Cat, que foi possível observar a capacidade de C3, C5 e C7 induzirem uma resposta celular contra o estresse oxidativo. Para entender se estes compostos estavam sendo absorvidos, avaliamos por ICP-MS a presença do metal ferro no interior das células. O que seria um indicativo de absorção dos compostos, foi comprovado pelo aumento significativo da concentração do metal ferro no ambiente intraceluar. Diante dos resultados apresentados podemos concluir que, apesar de todos os compostos (C1 – C7) terem apresentado atividade antioxidante, somente C3, C5 e C7 podem ser considerados bons compostos Sod miméticos. No entanto, a capacidade de indução da resposta celular é um outro mecanismo pelo qual tais compostos podem promover proteção as células.

**Palavras-chave:**

Saccharomyces cerevisiae;Compostos de coordenação;Atividade antioxidante mimética;Superóxido dismutase;Catalase;Estresse oxidativo

**Abstract:**

The use of oxygen by aerobic organisms is of great relevance for several biological functions. However, this molecule may be the starting point for the formation of other species with higher reactivity. In general, increasing the formation of reactive oxygen species (ROS) together with the inability of the cell's antioxidant system to eliminate such reactive molecules can lead to the accumulation of oxidative damage in lipids, proteins and DNA. In this scenario, oxidative stress has been extensively related to the genesis and/or progression of various pathologies, such as diabetes, heart and neurodegenerative diseases, as well as cancer. Thus, with the aim of eliminating ROS, as well as attenuating the harmful effects of oxidative stress, several research groups are investigating the role of natural and/or synthetic compounds with antioxidant properties. In this context, an alternative that has received great attention is the development of coordination compounds with redox activity. Such compounds are synthesized to mimic catalase (Cat) and superoxide dismutase (Sod), enzymes involved in the elimination of hydrogen peroxide (H2O2) and superoxide radical (O2.-), respectively. In this work, we investigated the in vitro and in vivo antioxidant capacity of Sod and Cat of 7 coordination compounds (C1 - C7) containing the transition metal iron (Fe3+) as the coordination center. Furthermore, in this study it was also possible to evaluate the ability of the compounds to induce a cellular response of Saccharomyces cerevisiae. Assessing the in vitro, mimetic antioxidant capacity of Sod and Cat, we observed that, while all compounds were able to eliminate the O2.- radical, none of the compounds was able to decompose H2O2. Considering this result, using S. cerevisiae as a study model, we investigated the antioxidant capacity of the compounds only in the oxidative stress caused by menadione, a source that generates O2.-. Although all compounds have fully recovered oxidative stress survival and reduced mitochondrial dysfunction of S. cerevisiae wild type strain, only 3 compounds (C3, C5, and C7) were able to increase survival by about 70% of a strain of S. cerevisiae deficient in the synthesis of the enzyme Sod1. Regarding the ability of these 3 compounds to induce a cellular response, it was through the evaluation of the survival of the mutant Yap1 (transcription factor required in the response against oxidative stress), the expression of the Hsp104 protein and the determination of the activities of the endogenous enzymes of S. cerevisiae, Sod and Cat, which observed the ability of C3, C5 and C7 to induce a cellular response against oxidative stress. To understand if these compounds were being absorbed, we evaluated the presence of iron metal inside the cells by ICP-MS. What would be an indication of absorption of the compounds, it was evidenced by the significant increase of the iron metal concentration inside the cells. In view of the presented results we can conclude that, although all the compounds (C1 - C7) have presented antioxidant activity, only C3, C5 and C7 can be considered good Sod mimics. However, the ability to induce a cellular response, it points to an another mechanism by which such compounds can promote protection of cells. Keywords: ; ; ; ; ; ;

**Keywords:**

Saccharomyces cerevisiae;Mimetic activity;Superoxide dismutase;Catalase;Oxidative stress;Coordination compounds

**Título:**

Análise Funcional e Caracterização Estrutural in silico da Xilose Isomerase (XYL A) de Burkholderia cenocepacia.

**Autor:**

IGOR PATRICK VASCONCELOS VIEIRA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

VIEIRA, I.

**Data da Defesa:**

14/02/2017

**Resumo:**

Com a crescente preocupação com as mudanças climáticas, há um esforço global para o desenvolvimento de novas tecnologias de produção energética a partir de matrizes renováveis. Neste cenário, a produção de etanol utilizando biomassa lignocelulósica ganha grande atenção. Um dos problemas associados à aplicação direta desta tecnologia está na incapacidade da levedura Saccharomyces cerevisiae em produzir etanol utilizando xilose. Isto se deve ao desbalanço redox nas duas primeiras etapas da via de catabolismo deste açúcar, criado pelas enzimas xilose redutase (XR) e xilose desidrogenase (XDH) que utlizam NAD+ e NAD(P)H como cofatores. Na tentativa de compensar este efeito, a enzima xilose isomerase (XI) de Burkholderia cenocepacia foi clonada em S. cerevisiae, pois catalisa a conversão direta de D-xilose a D-xilulose utilizando Mg2+ como cofator. A expressão desta enzima recombinante aumenta a taxa de consumo de xilose durante a fermentação, assim como a produtividade de etanol, com o melhor resultado reportado até o momento. No entanto, pouco se sabe sobre o funcionamento desta enzima. A fim de melhor compreender os resultados obtidos, foi feita a expressão desta proteína fusionada a cauda His em E. coli e em seguida sua purificação. A análise funcional mostrou alta atividade específica a 37°C em pH 7,2, indicando que esta proteína consegue manter sua atividade em diversas condições. Os valores de Km e Vmax para D-xilose foram determinados. O Km se mostrou 3 vezes menor que os melhores resultados reportados até o momento, consequentemente influenciando no fluxo metabólico para a produção de etanol durante a fermentação. Sendo assim, estes dados foram utilizados para a construção de um modelo teórico da proteína gerado por modelagem comparativa, onde foram feitas análises de estrutura global, predição dos sítios de ligação à íons metálicos, modo de ligação do substrato e geometria do sítio ativo. O refinamento dos complexos proteína-substrato foram feitos em simulações de dinâmica semelhantes às condições de bancada e revelaram grande estabilidade da estrutura global e estruturas secundárias, assim como da ligação da xilose ao sítio ativo. No entanto, percebe-se que regiões expostas ao solvente possuem um grau de flexibilidade maior em relação ao sítio ativo. Análises de superfície eletrostática revelaram que mutações próximas ao sítio ativo podem ser responsáveis pela mudança de carga na entrada deste motivo, que influencia na capacidade de interação da proteína com o substrato.

**Palavras-chave:**

Etanol;Bioquímica;Xilose Isomerase;Biomassa;Fermentação

**Abstract:**

The growing concern about climate change has created a global effort to develop new energy production technologies from renewable sources. In this scenario, the production of lignocellulosic ethanol receives great attention. One of the problems associated with the direct application of this technology lies in the inability of the yeast Saccharomyces cerevisiae to produce ethanol using xylose as sole carbon source. This is due to the redox imbalance in the first two steps of this sugar catabolism pathway, created by NAD+-dependent xylose reductase (XR) and NAD(P)H-dependent xylose dehydrogenase (XDH). In order to bypass the native route the recombinant xylose isomerase (XI) from Burkholderia cenocepacia was cloned into the yeast S. cerevisiae, as it catalyzes the direct reaction of D-xylose to D-xylulose using the ion Mg2+ as a cofactor. The expression of this enzyme was proven to increase the rate of xylose consumption as well as ethanol productivity, with no xylitol accumulation during fermentation. However, little is known about the functioning of this enzyme. In order to better understand the results obtained, the His-tagged recombinant XI was expressed in E. coli and further purified. Functional analysis showed high activity at 37ºC and pH 7.2, indicating that this protein is active in a wide range of environments. Vmax and Km parameters were determined. The apparent Km for xylose has shown to be 2-3 fold smaller than the best results published to date, and could be responsible for altering the metabolic flux towards ethanol production during fermentation. Thus, the in vitro assay conditions were used to build theoretical models by comparative modelling. The overall structure, metal binding sites, xylose binding sites and active site geometry were investigated and have shown to be highly conserved among species. Energy minimization and molecular dynamics simulation were performed in order to refine the models in conditions similar to the enzymatic assays. Data have shown that regions exposed to solvent are likely to be more flexible than regions closer to the active site. Furthermore, secondary and overall structure showed great stability as well as xylose conformation at the active site. Electrostatic surface analysis have shown that mutations close to the active site entrance might be responsible for altering the interaction between protein and substrate, thus interfering with enzyme activity.

**Keywords:**

Ethanol;Biochemistry;Xylose Isomerase;Biomass;Fermentation;Comparative Modelling

**Título:**

Produção de lipase por fermentação no estado sólido e aplicação em biocatálise utilizando um único reator de leito fixo

**Autor:**

SABRINI NATALI DA SILVA AVILA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

AVILA, S. N. S.

**Data da Defesa:**

07/02/2017

**Resumo:**

Lipases constituem um grupo de enzimas capazes de catalisar a reação de hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis de cadeia média e longa, bem como reações de esterificação e de transesterificação. Estas enzimas comercialmente disponíveis apresentam um preço muito elevado e por isso a busca de novos biocatalisadores, obtidos por tecnologia de baixo custo, como a fermentação em estado sólido (FES), se faz necessária. A torta, subproduto da extração de óleos vegetais, pode ser utilizada como matéria-prima de baixo custo para a produção de lipase por FES. O presente trabalho tem como objetivo realizar a produção de lipase por FES utilizando biorreator de leito fixo e em sequência, neste mesmo sistema, realizar reações de síntese (one-pot). O trabalho se divide em duas etapas: a primeira consiste em estudar a produção da lipase com capacidade de esterificação por FES em biorreator de leito fixo e, a segunda, realizar a reação de esterificação no mesmo biorreator, sem manipular o sólido fermentado contendo a lipase, tendo este como leito. A produção de lipases foi realizada empregando torta de babaçu como substrato e o fungo Rhizomucor miehei na FES, e a capacidade de síntese foi acompanhada por meio da reação padrão de esterificação em reator agitado, utilizando como biocatalisador a amostra fermentada seca. O melhor resultado foi obtido nas condições de fermentação de 35ºC, umidade inicial da torta de 65%, vazão de ar de 0,3 L/min e tempo de fermentação de 48h. Para a secagem da torta fermentada por meio da aeração forçada, foram selecionados a vazão de ar igual a 1,0 L/min e o tempo de secagem de 48h. A reação na coluna foi realizada com o sólido fermentado seco (one-pot), empregando como substratos ácido oleico e etanol, a 40ºC, com reciclo do meio reacional. Foi obtido 18,2 % de conversão em 6h de reação e 65,1% em 28h. Paralelamente à reação conduzida no sistema one-pot (biorreator de leito fixo), foram conduzidas duas reações controle empregando o mesmo meio reacional: uma em reator agitado e outra no reator de leito fixo com o biocatalisador fragmentado. O valor obtido em 6h de reação no sistema one-pot ficou abaixo do controle feito em reator agitado (71,4%), embora em 24h de reação o resultado tenha sido aproximado nos dois tipos de reatores (75,4%). Resultado do controle com o biocatalisador fragmentado foi de 43,4% em 6h, porém, em 8h de reação foi obtido 63,3% de conversão, e 77,7% em 24h de reação. O pior desempenho da reação no sistema one-pot pode ter sido causado pela retração do leito fermentado durante a etapa de secagem, com conseqüente formação de caminho preferencial prejudicando a reação de esterificação. Para avaliar essa hipótese, foram conduzidas novas fermentações com fibra de polpa de dendê misturada à torta de babaçu com a finalidade de manter a estrutura do meio fermentado durante a etapa de secagem do material e diminuir a formação de caminhos preferencias da reação. Foi observado que a mistura contendo 40% de fibra de dendê foi eficiente para manter o diâmetro inicial do leito. A reação de esterificação em sistema one-pot com a nova fermentação realizada com fibra de dendê e torta de babaçu (1:1) foi realizada, e, após secagem do leito obteve-se 71,1% de conversão em 26h de reação no mesmo sistema reacional. O produto obtido nesta primeira reação foi colocado em uma segunda reação, na qual foi empregado um novo biorreator de leito fixo composto de um novo material fermentado e seco (biocatalisador), por mais 24h, atingindo a 89,2% de conversão à ésteres etílicos. O presente trabalho mostrou que foi possível obter um biocatalisador com alto potencial de síntese por FES em biorreator de leito fixo, que consiste em uma metodologia de baixo custo, e que tal biocatalisador pode ser aplicado em sistema one-pot para síntese de biodiesel.

**Palavras-chave:**

Lipase;Fermentação em Estado Sólido;Rhizomucor miehei;Biorreator de leito fixo;Biocatálise;Sistema one-pot

**Abstract:**

Lipases are a group of enzymes capable of catalyzing reaction of hydrolysis of ester linkages medium- and long-chain triacylglycerol as well reactions of esterification and transesterification. These commercially enzymes have high cost and so the search for new biocatalysts, obtained by low cost technology such as solid state fermentation (SSF), is necessary. Cake, a byproduct of vegetable oil extraction, Can be used as raw material of low cost for production of lipase by SSF. The aim of present work is to perform the lipase production by SSF using fixed bed bioreactor and, in this same system, synthetic reactions (one-pot). The work is divided into two stages: the first is to study the production of lipase with esterification capacity by SSF in a fixed bed bioreactor and the second to perform reaction of esterification in the same bioreactor without manipulating the fermented solid containing the lipase, having this as bed. Lipase production was performed using babassu cake as substrate and Rhizomucor miehei by SSF, and the capacity synthesis was evaluated by standard reaction esterification in a stirred reactor using the dry fermented sample as the biocatalyst. The best result was obtained in the fermentation conditions of 35ºC, initial moisture of cake of 65%, air flow of 0,3 L/min and fermentation time of 48h. For the drying of the fermented cake by forced aeration, the air flow rate was 1,0 L/min and the drying time was 48 h. The reaction in column was performed with the dried fermented solid (one-pot), using as substrates oleic acid and ethanol, at 40ºC, with recycle of reactional medium. It was obtained 18,2% conversion in 6 h of reaction and 65,1% in 28h. In order the reaction in one-pot system, two control reactions were conducted using the same reactional medium: in stirred reactor and in fixed bed reactor with solid fragmented as biocatalyst. The value obtained in 6h of reaction in one-pot system was below the control made in a stirred reactor (71,4%), although in the 24h reaction the result was approximated in both types of reactors (75,4%). Results of the control with the solid fragmented as biocatalyst were 43,4% in 6h, but in 8h of reaction 63,3% of conversion was obtained, and 77,7% in 24h of reaction. The poor performance in one-pot system may have been caused by the retraction of fermented bed during the drying step, with consequent preference path formation impairing the reaction of esterification. In order to evaluate this hypothesis, new fermentations were carried out with palm pulp fiber mixed with babassu cake to maintain the structure of the fermented medium during the drying phase of the material and to reduce the formation of reaction preference paths. It was observed that the blend containing 40% palm fiber was efficient to maintain the initial bed diameter. The reaction of esterification in a one-pot system with the new fermentation made with palm fiber and babassu cake (1: 1) was performed, and after drying the bed, 71,1% of conversion was obtained in 26 h of reaction same system reaction. The product obtained in this first reaction was placed in a second reaction, in which a new fixed bed bioreactor composed of a new material fermented and dry (biocatalyst) was used, for a further 24 h, obtained 89,2% of conversion to ethyl esters . The present work showed that it was possible to obtain a biocatalyst with high potential of synthesis by SSF in a fixed bed bioreactor, which consists of a low cost methodology, and that such a biocatalyst can be applied in a one-pot system for biodiesel synthesis.

**Keywords:**

Lipase;Solid State Fermentation;Rhizomucor miehei;Fixed bed bioreactor;Biocatalysis;One-pot system

**Título:**

Dessimetrização enantiosseletiva de derivados pró-quirais catalisada por lipases

**Autor:**

MARCELA FRANCA PENNA RIBEIRO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

RIBEIRO, M. F. P.

**Data da Defesa:**

01/02/2017

**Resumo:**

Lipases são vastamente utilizadas em processos de biotransformação industrial e se destacam, dentre inúmeros fatores, pela estabilidade em solventes orgânicos, não exigência de cofatores e pela capacidade de discriminar entre grupos enantiotópicos e racematos de enantiômeros, revelando uma alta regio-, chemo- e estereosseletividade. Neste trabalho um derivado simétrico de mio-inositol foi utilizado como substrato em reações de dessimetrização catalisadas por lipases. Essas enzimas foram empregadas devido à capacidade de produção de um produto enantiopuro em apenas uma etapa, diferente da síntese química. O interesse na obtenção de derivados de mio-inositóis enantiomericamente puros deve-se à grande versatilidade em síntese química e na síntese de novos fármacos, e na importância destes na sinalização celular como segundos mensageiros. Os derivados de mioinositol são moléculas orgânicas polihidroxiladas envolvidas em diversas funções no organismo. Esses são amplamente utilizadas na área medicinal, como anticoagulantes, antibióticos e vacinas como o derivado 1-D-6-desóxi-6-flúor-mioinositol (6-FIns), que é um forte inibidor do crescimento do Trypanosoma cruzi, agente etiológico da Doença de Chagas. Entretanto, durante a síntese química desses compostos, diversos subprodutos podem ser formados, levando à redução do rendimento e da eficiência da síntese e aumento do tempo de reação, o que eleva os custos de síntese. O objetivo deste trabalho foi o estudo de novas rotas sintéticas para obtenção dos derivados de mio-inositol em rotas mais curtas. Inicialmente, realizouse uma seleção utilizando oito diferentes lipases comerciais (i.e., Lipozyme TL IM, Rhizomucor miehei, Lipozyme RM IM, Novozyme 435, PS Amano, PSC Amano II, PS-IM, AK Amano, AY-30 Amano, lipase G Amano, lipase D Amano, Lipomod 34P) com objetivo da dessimetrização do substrato 1,3-di-O-benzil-mio-inositol. Das lipases testadas, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram capazes de realizar a dessimetrização do substrato supracitado. Essas mostraram a mesma régio- e enantosseletividade, formando o produto (L)-1,3-di-O-benzil-4-acetil-mio-inositol, resultando em mais de 95% de conversão. Em contrapartida, Novozyme 435 e Lipomo 34P mostraram regiosseletividade diferente, formando o produto simétrico 1,3-di-Obenzil- 5-acetil-mio-inositol. Em seguida, foi realizada uma investigação do solvente e agente acilante utilizados na reação para os biocatalisadores Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM. O acetato de vinila mostrou ser o melhor agente acilante para ambos biocatalisadores e os melhores solventes foram o TBME e o acetato de etila, respectivamente. A taxa inicial da reação em TMBE e acetato de etila para a lipase de TL-IM foi de 1444,2 μmol.min-1.g-1 e 835,9 μmol.min-1.g-1. , respectivamente. O estudo do excesso enantimoérico mostrou que os solventes não alteram a enantosseletividade da enzima. O estudo cinético para esses biocatalisadores, nas condições otimizadas, mostrou que em seis horas foi possível obter um produto enantiomericamente puro utilizando a lipase RM-IM, e em duas horas obteve-se o mesmo produto utilizando TL-IM. A enzima TL-IM pode ser reutilizada 7 vezes na presença do acetato de etila como solvente. Entretanto, o reuso da reação em TBME não foi possível, uma vez que o suporte foi destruído. Dentre os fatores estudados, condição reacional escolhida com a mais vantajosa foi a que a Lipozyme TL-IM atua como biocatalisador, acetato de vinila como agente acilante, na presença de EtOAc como solvente.

**Palavras-chave:**

Biocatálise;myo-inositol;Lipase;Biorreator;Substâncias bioativas

**Abstract:**

Lipases are widely used in industrial biotransformation processes and stand out, among many factors, for their stability in organic solvents, non-requirement of cofactors and for it high regio- and stereoselectivity. At this work a symmetrical derivative of myoinositol was used as a substrate in lipase-catalyzed desimetrization reactions. These enzymes were employed due to their ability to produce, in one step, an enantiopure product. The interest in obtaining derivatives of enantiomerically pure myo-inositois is due to their great versatility in chemical synthesis, as well as in the synthesis of new drugs and their importance in cell signaling as second messengers. Myo-inositol derivatives are polyhydroxylated organic molecules involved in various functions on cell function. These are widely used in the medical field, such as anticoagulants, antibiotics and vaccines such as the 1-D-6-deoxy-6-fluoro-myo-inositol derivative (6- FIns), which is a strong inhibitor of the growth rate of the etiological agent of Chagas Disease, Trypanosoma cruzi. However, during the chemical synthesis of these compounds, several sub-products may be formed, reducing yield and efficiency of the synthesis, increasing reaction time and increasing synthesis costs. The objective of this work was the study of new synthetic strategies to obtain the myo-inositol derivatives in shorter enantio-pure routes. Initially, we made a selection using eight different commercial lipases (i.e. Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM, Novozyme 435, PS Amano, PSC Amano II, PS-IM, AK Amano, AY-30 Amano, Lipase G Amano, Xlipase D Amano, Lipomod 34P) for the dessimetrization of the inositol substrate, 1,3- di-O-benzyl-Iinositol (S1). Among the lipases tested, Lipozyme RM-IM and Lipozyme TL-IM were able to carry out the substrate dissimetrization described above. These showed the same regio- and enantioselectivity, forming the product (L) -1,3-di-Obenzyl- 4-acetyl-myo-inositol, resulting in more than 95% of conversion. In contrast, Novozyme 435 and Lipomo 34P showed different regioselectivity, forming the symmetrical product 1,3-di-O-benzyl-5-acetyl-myo-inositol. Then, we perform the optimization of the solvent and acyl donor for the biocatalysts Lipozyme RM-IM and Lipozyme TL-IM. For all the biocatalysts used, vinyl acetate showed to be the best acyl donor, while the best solvents were TBME and ethyl acetate (EtOAc), respectively. The initial velocity of the reaction with the solvent TMBE was 1444,2 μmol.min-1.g-1 and the reaction with the solvent EtOAc was 835,9 μmol.min-1.g-1. The study of the enantimeric excess showed that the solvents did not change the enantioselectivity of the enzyme. The kinetic study for these biocatalysts under the optimized conditions showed that at six hours it was possible to obtain an enantiomerically pure product using RM-IM lipase and at two hours the same product was obtained using TL-IM. It was possible to reuse the biocatalyst TL-IM at least seven times without detecting reduction in it activity. We studied the reuse of the biocatalyst under two different conditions using the solvents whose reactions showed higher initial velocities (TBME and EtOAc). The reuse in presence TBME was not possible, since the support was destroyed, while in the presence of EtOAc there was no decrease of the activity during the reuses. In a nutshell, among the studied features, the reactional condition that we found to be the best was the reaction catalyzed by TL-IM with Vinyl Acetate as acyl donor, in the presence of EtOAc as solvent.

**Keywords:**

Biocatalysis;myo-inositol;Lipase;Bioreactor;Bioactive substances