DISSERTAÇÕES 2019

**Título:**

Estudo do genoma mitocondrial de Rhodnius prolixus Stal, 1859.

**Autor:**

THAYANY FERREIRA DA COSTA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

COSTA, T. F.

**Data da Defesa:**

29/08/2019

**Resumo:**

A doença de Chagas é uma enfermidade causada pelo protozoário flagelado Trypanosoma cruzi. Insetos hemípteros da subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros, são os grandes responsáveis pela transmissão do parasita à humanos e outros animais. Dentre esses organismos, Rhodnius prolixus (Stal, 1859) se destaca como um dos vetores mais importantes de Chagas na América Latina e Central. O objetivo principal objetivo deste estudo foi obter mais conhecimento acerca desse inseto, através da montagem e análise do seu genoma mitocondrial. O genoma mitocondrial de R. prolixus colônia UFRJ foi completamente montado usando bibliotecas de cDNA do inseto e o mitogenoma de R. prolixus colônia NIH como molde. Para a montagem foram usados três abordagens diferentes, que envolveram o uso dos programas Trinity, SPAdes, Blast e Bowtie2, dentre outros. O mitogenoma de R. prolixus apresenta 37 genes codificantes para 13 proteínas, 2 rRNA e 22 para tRNA’s. Com a montagem do mitogenoma UFRJ foi realizado uma árvore filogenética com as proteínas mitocondriais concatenadas de Rhodnius prolixus junto com outras espécies de Reduviideos já sequenciados. Também foi feita a análise de expressão dos genes mitocondriais, usando o programa Salmon e Expander. A infecção pelo patógeno e a hematofagia parecem afetar a expressão dos genes mitocondriais. Como genomas mitocondriais são amplamente utilizados em estudos de taxonomia e biogeografia, e R. prolixus e R. robustus são espécies filogeneticamente muito proximas foi realizada uma comparação entre a sequência mitocondrial de Rhodnius prolixus UFRJ e sequências disponíveis na literaturade de R. prolixus e R. robustus. Além disso, foi feito a busca por polimorfismos presentes no genoma mitocondrial da colônia UFRJ, que pudessem ser úteis nos estudos de genética populacional. A busca por variantes identificou 25 SNP’s e 2 Indels com potencial para serem usados como marcadores moleculares. Os resultados obtidos neste estudo produziram informações importantes acerca da biologia desse vetor, assim como para a filogenia do grupo que esse organismo está inserido.

**Palavras-chave:**

palavras-chave

**Abstract:**

Chagas disease is caused by Trypanosoma cruzi, a protozoan parasite transmitted to the mammalian hosts through the feaces of blood-sucking triatomine bugs. Rhodnius prolixus is one of the most epidemiologically relevant vectors of Chagas disease in Latin and Central America. The aim of this study was to obtain more knowledge about this insect through the assembly of its mitochondrial genome. The UFRJ mitogenome was completely assembled using insect cDNA libraries and a NIH mitogenome to guide the assembly. For the assembly three different approaches were used, which involved the programs Trinity, SPAdes, Blast and Bowtie2, among others. The R. prolixus mitogenome has 37 genes coding for 13 proteins, 2 rRNAs and 22 for tRNAs. With the assembly of the UFRJ mitogenome, a phylogenetic tree was made with the concatenated mitochondrial proteins of Rhodnius prolixus along with other sequenced Reduviid species. Mitochondrial gene expression analysis was also performed using the Salmon and Expander program. Pathogen infection and haematophagy appear to affect mitochondrial gene expression. As mitochondrial genomes are widely used in taxonomy and biogeography studies, and R. prolixus and R. robustus are very closely related phylogenetically species, a comparison was made between the mitochondrial sequence of Rhodnius prolixus UFRJ and sequences available in the R. prolixus and R. robustus. In addition, a search was made for polymorphisms present in the mitochondrial genome of the UFRJ colony that could be useful in population genetic studies. The search for variants identified 25 SNPs and 2 Indels with potential to be used as molecular markers. The results obtained in this study produced important information about the biology of this vector, as well as for the phylogeny of the group that this organism is inserted.

**Keywords:**

keywords

**Título:**

ESTUDO DO METABOLISMO DE DITERPENOS EM JATROPHA CURCAS L. EMPREGANDO MÉTODOS PROTEÔMICOS ALVO-DIRECIONADOS.

**Autor:**

NATALIA PINTO DE ALMEIDA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

ALMEIDA, N. P.

**Data da Defesa:**

25/07/2019

**Resumo:**

Jatropha curcas L. é uma espécie da família das Euphobiaceas com grande valor biotecnológico uma vez que o óleo acumulado na semente pode ser utilizado como fonte alternativa para produção de biodiesel. Entretanto, este tecido também acumula toxinas como o éster de forbol (EF). Atualmente existe pouca informação sobre sua via de síntese, mas sabe-se que a casbeno sintase (CS) é uma enzima chave desta via. O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos proteômicos alvo direcionados para investigação da presença e abundância de enzimas específicas da via de síntese do EF, além de enzimas envolvidas no metabolismo de diterpenos em J. curcas. Peptídeos sintéticos isotopicamente marcado (PSIM) correspondentes aos peptídeos proteotípicos das enzimas alvo foram sintetizados para otimização do método, identificação e quantificação relativa dos peptídeos endógenos alvo. Amostras de raiz, endosperma, folha de dois genótipos de J. curcas, uma contendo alto teor de éster de forbol (ATEF) e outra contendo teores mais baixos (BTEF) foram analisadas. Para o preparo das amostras, o extrato proteico desses tecidos foi reduzido com DTT, alquilado com iodoacetamida e digerido com tripsina. A análise foi realizada no sistema EASYII-nLC (Proxeon) ou EASY1000-nLC (Thermo Scientific) acoplado ao nESI-TSQ Quantiva (SRM) ou nESI-QExactive Plus (PRM) (Thermo Scientific). Os dados obtidos foram analisados com os softwares Xcalibur v. 2.2 e Skyline v. 4.2. A análise mostrou que grande parte das enzimas alvo foram identificadas em raiz, mostrando a importância deste tecido na síntese de diterpenos tetracíclicos e giberelinas. Apenas uma isoforma de CS aumenta sua abundância no genótipo ATEF. Além disso, observou-se uma maior abundâncias das enzimas da via de síntese de giberelinas no genótipo BTEF. Em folha, foram identificadas uma isoforma de giberelina 20 oxidase e uma candidata a álcool desidrogenase. Entretanto, nenhum dos alvos monitorados neste trabalho foram identificados em endosperma. Os resultados reforçam a hipótese de que a síntese de EF ocorre em raiz e que metabólitos intermediários desta via ou até mesmo o EF são transportados para outros tecidos da planta como, por exemplo as sementes.

**Palavras-chave:**

Jatropha curcas L;Diterpenos;Éster de forbol;Casbeno sintase;Proteômica alvo-direcionada

**Abstract:**

Jatropha curcas L. is a species of the Euphobiaceae family that has great biotechnological value since the oil accumulated in the seed can be used as an alternative source for biodiesel production. However, this tissue also accumulates toxins such as phorbol ester (PE). Currently there are only a few informations about PE synthesis pathway, but it is known that casbene synthase (CS) is a key enzyme. The aim of this project was to develop targeted proteomic methods to investigate the presence and abundance of specific enzymes of the PE synthesis pathway, besides enzymes involved in the metabolism of diterpenes in J. curcas. Isotopically labeled synthetic peptides (ILSP) corresponding to the proteotypic peptides of the target enzymes were synthesized for method optimization, identification and relative quantification of the target endogenous peptides. Root, endosperm, leaf samples from two genotypes of J. curcas, one containing high levels of phorbol ester (HLPE) and one containing lower contents (LLPE) were analyzed. For sample preparation, the protein extract of these tissues was reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and digested with trypsin. The analysis was performed on the EASYII-nLC (Proxeon) or EASY1000-nLC system (Thermo Scientific) coupled to Quantiva nESI-TSQ (SRM) or nESI-QExactive Plus (PRM) (Thermo Scientific). The data obtained were analyzed using the softwares Xcalibur v. 2.2 and Skyline v. 4.2. The analysis showed that a large part of the target enzymes were identified in the roots, showing the importance of this tissue in the synthesis of tetracyclic diterpenes and gibberellins. Only one CS isoform increases its abundance in the HLPE genotype. In addition, a greater abundancy of enzymes from the gibberellin synthesis pathway in the LLPE genotype were observed. An isoform of gibberellin 20 oxidase and an alcohol dehydrogenase candidate was identified in leaf. However, none of the targets monitored in this study were identified in endosperm. The results support the hypothesis that PE synthesis occurs at the root and that intermediary metabolites of this pathway or even PE are transported to other tissues, such as seeds.

**Keywords:**

Jatropha curcas L;Diterpenoids;Phorbol ester;Casbenoe synthase;Targeted proteomics

**Título:**

Expressão e purificação do domínio 2 dos receptores 1 e 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial: estudos de interação com o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF por RMN.

**Autor:**

BIANCA RIZO VENTURA GUSMAO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

GUSMÃO, B.R.V.

**Data da Defesa:**

03/05/2019

**Resumo:**

A interação entre os fatores de crescimento vascular e endotelial (VEGF) e seus receptores (VEGFR) ocorrem de forma específica gerando propriedades biológicas distintas, dentre elas a angiogênese fisiológica e patológica. Os VEGFRs são formados por sete domínios extracelulares do tipo Imunoglobulina, uma região transmembrana e intracelular contendo o domínio tirosina quinase. Os domínios 1, 2 e 3 são importantes para a interação com os VEGFs, especialmente o domínio 2 (D2), sendo este o alvo no desenvolvimento de fármacos. As terapias anti-angiogênicas disponíveis focam na neutralização da interação entre o VEGF e seus receptores ou nas vias ativadas por eles, entretanto, o desafio tem sido evitar a resistência observada aos fármacos já disponíveis. Neste contexto, estudos têm focado no desenho de pequenas moléculas inibitórias para regiões específicas dos receptores. Estudos identificaram o peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF como específico para a interação com o VEGFR3- D2, entretanto, ensaios biológicos mostraram que este tem a capacidade de evitar a neovascularização e retinopatias na presença dos três tipos de VEGFRs, sugerindo que os receptores possuem um sítio de ligação comum. Desta forma, estudos estruturais visando a interação dos VEGFRs e este peptídeo podem ser essenciais para o entendimento da via de sinalização dos VEGFs, bem como, para o desenvolvimento de novas drogas. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a estrutura do domínios 2 dos VEGFR1 (VEGFR1-D2) e VEGFR3 (VEGFR3-D2) e a interação dos mesmos com o peptídeo (DGA)PCAIWF por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). As construções contendo os genes que codificam os VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2 foram cedidas pelo Prof. Ricardo Giordano, colaborador deste trabalho, assim como o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF. Para o VEGFR3-D2 foram realizados testes de expressão em diferentes condições. A expressão ótima deste receptor em meio LB e M9 foi alcançada em cepas de E. coli BL21(DE3) a 37ºC com indução em D.O600nm 0,7 com 0,2 mM de IPTG por 4 h. A lise celular mostrou a produção de VEGFR3-D2 na fração solúvel e insolúvel. Inicialmente realizamos a purificação da proteína presente na fração solúvel através de cromatografia de afinidade à níquel. Entretanto, estudos realizados através de espectros de 1D-1H RMN mostraram que a proteína não estava enovelada. Assim, o VEGFR3- D2 presente na fração insolúvel foi purificado e diversos protocolos de refolding foram testados para a obtenção da proteína de interesse. Entretanto, os espectros 1D-1H RMN das amostras obtidas mostraram que não foi possível obter o VEGFR3-D2 enovelado, impossibilitando os estudos de interação com o peptídeo para este receptor. O VEGFR1-D2 foi expresso na fração insolúvel, re-enovelado e purificado segundo protocolos descritos anteriormente com pequenas alterações. A melhor condição de expressão foi obtida em cepas de E. coli BL21(DE3) a 37°C e indução em D.O600nm 0.7 com 1 mM de IPTG por 4 h. Após duas cromatografias de afinidade à níquel, diversos protocolos de refolding e uma cromatografia de exclusão molecular foi possível obter o VEGFR1-D2 enovelado para os estudos estruturais. Os espectros 1H-15N-HSQC da proteína foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance 800 MHz em pHs 5,7 e 7,3. e o assinalamento foi realizado através da comparação de dados gerados anteriormente para este receptor (Starovasnik et al., 1999). Para o assinalamento do peptídeo (DGA)PCAIWF foram realizados experimentos de TOCSY e NOESY em um espectrômetro Bruker Advance 800 MHz nos pHs 5,7 e em espectrômetro Bruker Advance em pH 7,3. Os estudos de interação por RMN do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo foram realizados através da análise da perturbação do deslocamento químico (CSP) utilizando os espectros de 1H-15N HSQC. Estes resultados indicaram que a interação ocorreu apenas em pH 7,3 e os resíduos que mostraram o maior CSP foram E150, I202, G203, G213, H214, L215 e I229. Os estudos de interação VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo na presença do gadolínio (Gd) mostraram que houve alteração da intensidade do sinal para os resíduos Val 136, Glu 137, Met 138, Glu 144, Cys 158, Ser 162, Ile 165, Thr 166, Leu 174, Asp 175, Lys 182, Ile 194, Arg 196, Lys 200, Cys 207, His 214, Leu 215, Ile 229. Estes dados sugerem que estes resíduos podem estar ligados direta ou indiretamente ao VEGFR1-D2. A análise dos dados de interação obtidos nos dois ensaios mostram que os resíduos, H214, L215 e I229 são monitorados sugerindo que estes três resíduos estejam envolvidos diretamente na interação entre o domínio 2 do VEGFR1 e o peptídeo (DGA)PCAIWF. É interessante notar que a região monitorada no domínio 2 deste receptor não está envolvida na ligação direta ao VEGF podendo ser este o domínio comum de ligação dos diferentes VEGFRs. Este resultado pode levar a novos estudos para o desenvolvimento de novos peptidomiméticos anti-VEGFs.

**Palavras-chave:**

Estrutura de proteínas;Fatores de crescimento vascular e endotelial;Peptídeos;Câncer;Ressonância Magnética Nuclear;Phage Display;Angiogênese.

**Abstract:**

The binding affinity between vascular endotelial growth factors (VEGF) and its receptors (VEGFR) is quite specific, leading to distinguish biological properties, as physiological and pathological angiogenesis. VEGFRs consists of seven extracellular immunoglulin-like domains, a transmembrane region and a intracllular region, wich contain tyrosine-kinase domain. Domains 1, 2 and 3 are key factors for VEGF binding, particularly domain 2 (D2), main target in drug development. Available anti-angiogenic therapies are foccused on neutralizing interaction between VEGF and its receptors or paths activated by them, however, overcome drug resistance already observed in currently available drugs is the major concern in this field. In this sense, researches foccused on design of small inihibtory molecules that could target specific receptor sites. A previous work has identified a anti-angiogenic peptide (DGA)PCAIWF as specific for interaction with VEGFR-3, however, biological experiments revelead that this sintetic peptide coul inhibit neovascularization and retinopathy, targeting all three VEGFRs, suggesting that the receptors share a common binding site. Thus, structural studies directed to VEGFR and this peptide could provide essecial information to understand VEGFs signaling pathway, as for new dugs development. Therefore the goal of this work is study the structure of VEGFR1 (VEGFR1-D2) and VEGFR3 (VEGFR3- D2) domains 2 and its binding interactions with (DGA)PCAIWF peptide by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Constructs containing the genes encoding VEGFR1-D2 and VEGFR3-D2 were sent by Prof. Ricardo Giordano, collaborator of this work, as well as the anti-VEGF peptide (DGA) PCAIWF. VEGFR3-D2 expression tests were performed under different conditions. Optimum expression of this receptor in LB and M9 medium was achieved in E. coli BL21 (DE3) strains at 37 °C with induction at DO0.600nm 0.7 using 0.2 mM IPTG and 4 h of cell growth. Cell lysis showed soluble and insoluble production of VEGFR3-D2. First we performed soluble fraction purification through nickel affinity chromatography. Still, studies carried out using 1D-1 H NMR spectra revealed that the protein was not enveloped. Thus, VEGFR3-D2 insoluble fraction was purified and several refolding protocols were tested for protein sample production. However, obtained samples 1D-1H NMR spectra showed refolded VEGFR3-D2 could not be obtained, so interaction studies with the peptide was not possible for this receptor. VEGFR1-D2 was expressed in insoluble fraction, refolded and purified according previously described protocols with a few changes. The best expression condition was obtained E. coli BL21 (DE3) strains at 37 ° C and induction at DO0.600nm 0.7 with 1 mM IPTG and 4 h cell growth. After two nickel affinity chromatographies, various refolding protocols, and molecular exclusion chromatography, the refolded VEGFR1-D2 could be obtained for structural studies. Protein 1H-15N-HSQC spectra were acquired on a Bruker Avance 800 MHz spectrometer at pH 5.7 and 7.3 and asignment was achived trought comparison with previously data obtained for this receptor. TOCSY and NOESY experiments were performed on a Bruker Advance 800 MHz spectrometer at pHs 5.7 and Bruker Advance 600 MHz at pH 7.3 for (DGA)PCAIWF peptide. NMR interaction studies of VEGFR1- D2 and VEGFR1-D2 binding to peptide were performed by chemical shift perturbation (CSP) analysis using the 1H-15N HSQC spectra. These results indicate that interaction occurred only at pH 7.3 and residues with highest CSP were, E150, I202, G203, G213, H214, L215 and I229. Other interaction studies carried in the presence of gadolinium (Gd) of free and bound to peptide VEGFR1-D2 showed changes in signal intensity for residues Val 136, Glu 137, Met 138, Glu 144, Cys 158, Ser 162, Ile 165 , Thr 166, Leu 174, Asp 175, Lys 182, Ile 194, Arg 196, Lys 200, Cys 207, His 214, Leu 215, Ile 229. These data suggests that these residues migh be involved, directly or indirectly, to VEGFR1-D2 binding. Analysis of the interaction data obtained in the two assays shows that residues H214, L215 and I229 are monitored suggesting that these three residues are directly involved in the interaction between domain 2 of VEGFR1 and the peptide (DGA)PCAIWF. Interaction da analisys, obtained in the two assays, shows H214, L215 and I229 as the residues directly involved in binding interaction between VEGFR1 and the peptide (DGA)PCAIWF domain. Interestingly the region monitored in domain 2 of this receptor is not directly involved in VEGF binding and this might be the common binding domain of distinct VEGFRs. This result might lead to further studies for new anti-VEGF peptidomimetics development.

**Keywords:**

Estrutura de proteínas;Fatores de crescimento vascular e endotelial;Peptídeos;Câncer;Ressonância Magnética Nuclear;Phage Display;Angiogênese.

**Título:**

PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E POSTERIOR ASSOCIAÇÃO AO TRATAMENTO ÁCIDO OU HIDROTÉRMICO PARA A OBTENÇÃO DE GLICOSE.

**Autor:**

BRUNO CESAR DA SILVA COELHO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

COELHO, B.C.S.

**Data da Defesa:**

22/03/2019

**Resumo:**

As principais etapas para a produção de etanol de segunda geração são: pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, fermentação dos açúcares a etanol e destilação. O pré-tratamento tem como objetivo aumentar a disponibilidade e a digestibilidade enzimática da celulose, acarretando em uma maior obtenção de glicose. Sua efetividade pode ser analisada através da alteração da composição química da biomassa pré-tratada e do aumento da concentração de glicose obtida durante a hidrólise enzimática. Os pré-tratamentos ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH), já utilizados industrialmente, têm como finalidade hidrolisar e solubilizar a fração hemicelulósica, enquanto o pré-tratamento biológico (PTB) tem como objetivo remover a lignina da biomassa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o PTA, PTH e PTB da palha de cana-de-açúcar para posterior associação entre os mesmo. A associação tem como finalidade promover a remoção combinada da hemicelulose e lignina, aumentando a disponibilidade da celulose na amostra pré-tratada. Nas condições realizadas no presente trabalho, foi observado que entre o PTA e o PTH, o PTH foi mais eficiente em aumentar a digestibilidade enzimática da celulose. Ao avaliarmos amostras de palha corta e moída, resultados comparativos foram obtidos, tanto em relação à composição química das amostras pré-tratadas, quanto em relação à digestibilidade enzimática. Com isso, todos os experimentos posteriores foram realizados com a palha cortada e o PTH foi selecionado para associação com o PTB. Em seguida, sete linhagens fúngicas foram avaliadas para a promoção do PTB, através da quantificação da perda mássica proporcionada por cada fungo, uma vez que a perda mássica pode ser relacionada à remoção de componentes estruturais da parede celular. Dentre os fungos avaliados, as linhagens Gloeophyllum trabeum, Phanerochaete chrysosporium, e Pleurotus ostretus foram selecionados por terem proporcionado perda mássica de 26%; 24,8% e 13,3%, respectivamente. Durante o PTB, P. chrysosporium e G. trabeum apresentaram maior seletividade para remoção dos polissacarídeos do que para a lignina, enquanto que P. ostreatus apresentou elevada seletividade para remoção da lignina, em relação à celulose. Além disso, a amostra tratada com P. ostreatus resultou em maior rendimento de glicose na hidrólise enzimática. Análises de microscopia confocal de fluorescência corroboraram os resultados obtidos, pois foi possível observar o aumento dos poros e a maior disponibilidade de celulose nas amostras tratadas com P. ostreatus. Sendo assim, P. ostreatus foi selecionado a ser associado ao PTH (PTBH). Ao realizar a associação do PTB seguido do PTH (170°C por 40 min), foi observado que a remoção da hemicelulose foi potencializada após a remoção da lignina proporcionada pelo PTB. Após constatar o benefício da associação, um conjunto de experimentos foi avaliado para determinar se, através da associação PTBH, seria possível diminuir a severidade da etapa de PTH, através do uso de condições mais brandas de tempo e temperatura. Com isso, ao realizar o PTH a 160 °C por 40 min, após a realização do PTB, foi possível obter um rendimento em glicose equivalente a 78%, sendo superior aos rendimentos obtidos com o PTH realizado isoladamente por 40 min a 170°C e 160°C, que resultaram em rendimento de 68,3% e 65,7%, respectivamente. Assim, realizar a associação do PTB seguido do PTH se mostrou uma alternativa para a redução da severidade do PTH e para aumentar o rendimento de conversão de celulose em glicose.

**Palavras-chave:**

Biomassa lignocelulósica;Pré-tratamento biológico;Palha de cana-de-açúcar

**Abstract:**

The main steps for the production of second generation ethanol are: pretreatment of lignocellulosic biomass, enzymatic hydrolysis of pretreated biomass, fermentation of sugars to ethanol and distillation. The pretreatment aims to increase the availability and enzymatic digestibility of the cellulose, leading to higher glucose yields. Its effectiveness can be analyzed by modifications on the chemical composition of the pretreated biomass and the increase on glucose yields in the enzymatic hydrolysis. The acid (APT) and hydrothermal (HPT) treatments, already industrially used, aim to hydrolyze and solubilize the hemicellulosic fraction, while the biological pretreatment (BPT) goal is to remove the lignin from the biomass. The present work had as objective to evaluate the APT, HPT and BPT of the sugarcane straw for their subsequent association. The association aims to promote the combined removal of hemicellulose and lignin, increasing the availability of cellulose in the pretreated sample. Under the conditions performed in the present work, between APT and HPT, the HPT was more efficient in increasing the enzymatic digestibility of cellulose. When evaluating samples of straw cut and milled, comparative results were obtained for the chemical composition and enzymatic digestibility of the pretreated samples. Thus, all subsequent experiments were performed with cut samples and HPT was selected for association with the BPT. Then, seven fungal strains were evaluated for the promotion of BPT by quantifying the mass loss provided by each fungus, as this parameter can be related to the removal of structural components of the cell wall. Among the evaluated fungi, the strains Gloeophyllum trabeum, Phanerochaete chrysosporium, and Pleurotus ostretus were selected because they provided a mass loss of 26%; 24.8% and 13.3%, respectively. During the BPT, P. chrysosporium and G. trabeum showed higher selectivity for the removal of polysaccharides than for lignin, while P. ostreatus showed high selectivity for lignin removal, in comparison to cellulose. In addition, the sample treated with P. ostreatus resulted in a higher glucose yield in the enzymatic hydrolysis. Analysis of confocal fluorescence microscopy corroborated the results obtained, as it was possible to observe an increase of the pores and the greater availability of cellulose in samples treated with P. ostreatus. Thus, P. ostreatus was selected to be associated with PTH (BHPT). When performing the association of BPT followed by HPT (170 °C for 40 min), the removal of hemicellulose was potentiated after removal of the lignin provided by BPT. After establishing the benefit of the association, a set of experiments was conducted to evaluated if, through the association BHPT, it would be possible to decrease the severity of the HPT, through the use of milder conditions of time and temperature. Thus, when HPT was performed at 160 °C for 40 min after BPT, a glucose yield equivalent to 78% was obtained, being higher than the yields obtained with HPT carried out alone for 40 min at 170 °C and 160 °C, which resulted in yield of 68.3% and 65.7%, respectively. Thus, the association of BPT followed by HPT was shown to be an alternative for the reduction of PTH severity and to increase the yield of cellulose to glucose conversion.

**Keywords:**

Lignocellulosic biomass;Biological pretreatment;Sugarcane straw

**Título:**

DIVERSIDADE MICROBIANA NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE UM CAMPO DE EXPLORAÇÃO PETROLÍFERA.

**Autor:**

ARACELI DE SOUSA PIRES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

PIRES, A. S.

**Data da Defesa:**

14/03/2019

**Resumo:**

Um grave problema de saúde e segurança no trabalho, dentro de uma plataforma de petróleo, é decorrente da comunidade microbiana (microbioma) que cresce em tanques de armazenamento e tubulações. Este microbioma tende a formar biofilmes altamente corrosivos, que obstruem tubulações e possuem resistência a antimicrobianos, além de abrigar muitas espécies produtoras de sulfeto. Portanto, é de extrema importância para a indústria compreender a diversidade filogenética deste microbioma para que medidas de controle e intervenção específicas possam ser devidamente planejadas. Um dos principais genes usados para identificação taxonômica de bactérias e archaeas é o gene do rRNA 16S. O objetivo deste trabalho é caracterizar e comparar as regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S da comunidade microbiana existente na água de produção de um tanque de armazenamento da plataforma P-37 da PETROBRAS, a fim de conhecer a sua diversidade. O DNA genômico foi extraído de uma amostra de água e submetido à amplificação pela PCR, com primers customizados para amplificar diferentes regiões do gene. Os produtos amplificados foram sequenciados por dois tipos de sequenciadores Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) e HiSeq 2500 (Illumina). Como os protocolos para análise deste tipo de resultado estão em constante evolução, precisou-se fazer uma análise de qual fluxo de tratamento de dados seria mais apropriado para o caso em questão. Avaliou-se o programa a ser utilizado, a métrica para criação de unidades taxonômicas operacionais e o banco de dados para a atribuição da taxonomia. Foram gerados um total de 265.392 reads pela plataforma Ion torrent e 139.930 reads médios pelo Illumina. O número de OTU’s criadas variou conforme o método escolhido. Dentre eles, o de referência aberta usando o Greengenes como banco de dados apresentou 1.781 e 1.082 OTU’s pelo Ion Torrent e Illumina, respectivamente. Quando comparados os bancos de dados, pelo SILVA há uma diferença de quase 15% a mais de OTU’s do que pelo Greengenes. Há uma predominância de Proteobactérias que chegam a cerca de 40% do total analisado, cujos gêneros mais abundantes são Desulfovibrio,18,36%, Desulfoplanes, 14,19%, e Pelobacter, 11,28%, todas bactérias redutoras de sulfato. A última análise realizada foi com relação ao perfil funcional do microbioma. Em torno de 1.5% dos genes previstos estão relacionados à degradação de xenobióticos, incluindo os derivados do petróleo. Com base nesses dados, é possível montar o perfil do microbioma encontrado, buscar entender sua dinâmica populacional e, por fim, desenvolver estratégias adequadas ao controle dessa população.

**Palavras-chave:**

Microbiologia do Petróleo;Sequenciamento;rRNA 16S;NGS;Microrganismos Redutores de Sulfato;Corrosão

**Abstract:**

A serious health and safety problem at work, within an oil platform, is due to the microbial community (microbiome) that grows in storage tanks and pipelines. This microbiome tends to form highly corrosive biofilms, which block pipes and have resistance to antimicrobials, in addition to harboring many species producing sulfide. It is therefore of utmost importance for the industry to understand the phylogenetic diversity of this microbiome so that specific control and intervention measures can be properly planned. One of the main genes used for taxonomic identification of bacteria and archaeas is the 16S rRNA gene. The objective of this work is to characterize and compare the hypervariable regions of the 16S rRNA gene of the microbial community existing in the production water of a storage tank of the P-37 platform of PETROBRAS, in order to know its diversity. Genomic DNA was extracted from a water sample and subjected to PCR amplification, with primers customized to amplify different regions of the gene. The amplified products were sequenced by two types of Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) and HiSeq 2500 (Illumina) sequencers. As the protocols for analysis of this type of result are constantly evolving, it was necessary to make an analysis of which flow of data treatment would be more appropriate for the case in question. It was evaluated the program to be used, the metric for the creation of operational taxonomic units and the database for the attribution of the taxonomy. A total of 265,392 reads were generated by the Ion torrent platform and 139,930 average reads by the Illumina. The number of OTUs created varied according to the method chosen. Among them, the open reference using Greengenes as database had 1,781 and 1,082 OTUs by Ion Torrent and Illumina, respectively. When comparing the databases, by SILVA there is a difference of almost 15% more of OTU's than by Greengenes. There is a predominance of Proteobacteria that reach about 40% of the total analyzed, whose most abundant genera are Desulfovibrio, 18,36%, Desulfoplanes, 14,19%, and Pelobacter, 11,28%, all reducing bacteria of sulfate. The last analysis was performed with respect to the functional profile of the microbiome. About 1.5% of predicted genes are related to the degradation of xenobiotics, including petroleum derivatives. Based on these data, it is possible to assemble the profile of the microbiome found, seek to understand its population dynamics and, finally, to develop adequate strategies to control this population.

**Keywords:**

Microbiology;Oil;Sequencing;16S rRNA;NGS;Reducing Sulphate Microorganisms;Corrosion

**Título:**

PRODUÇÃO DE PEPTIDASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA APLICAÇÃO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS DE USO HOSPITALAR

**Autor:**

TAISSA FERREIRA DE OLIVEIRA SOUZA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

SOUZA, T. F. O.

**Data da Defesa:**

14/03/2019

**Resumo:**

As peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Essas enzimas têm como principal aplicação o setor de detergentes e dentro desse setor encontram-se os detergentes enzimáticos, que são utilizados na limpeza em ambiente hospitalar e de instrumentos cirúrgicos. O Brasil importa 86% das enzimas que utiliza. A implantação e o estudo de processos de produção de enzimas são essenciais para que o país diminua essa demanda de importação de enzimas. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES), é uma importante ferramenta, considerando o grande potencial agroindustrial do Brasil, já que essa técnica permite o uso de resíduos agroindustriais como substrato para o crescimento de microrganismos e produção de enzimas. O objetivo deste trabalho foi produzir peptidases por FES com o fungo filamentoso Aspergillus oryzae usando resíduos da indústria de dendê como meio de cultivo e avaliar o potencial dessas enzimas para uma futura aplicação na formulação de detergentes enzimáticos de uso hospitalar. A FES foi realizada em reator do tipo bandeja contendo torta de dendê e fibra (70:30) por 72h a 30ºC. A extração das peptidases foi otimizada, por planejamento experimental DCCR, com o uso de biossurfactante (ramnolipídeos) como agente coadjuvante no processo de extração. A concentração de 0,8% p/v de ramnolipídeos, em pH 5,8, na temperatura de 29ºC resultou em uma atividade proteolítica de 46,1 U/mL (aumento de 300% em relação ao processo não otimizado). As peptidases produzidas por A. oryzae foram identificadas como sendo da classe serina e metalopeptidases. A estabilidade deste das peptidases foi avaliada nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60ºC por 2 horas. Nas temperaturas de 50 e 60ºC, estas peptidases perderam atividade, sendo o tempo de meia-vida calculado de 42 minutos para 50ºC. A estabilidade térmica destas enzimas na concentração de 10% v/v em dois detergentes enzimáticos comerciais, 3M multienzimático e Lapzyme 4, também foi avaliada nas temperaturas de 40 e 50ºC durante 2 horas. Nas duas formulações, a atividade proteolítica diminuiu na temperatura de 50ºC, sendo o tempo de meia-vida obtido de 53 e 70 minutos para os detergentes 3M e Lapzyme 4, respectivamente. Estas peptidases foram mais estáveis, em temperatura ambiente, ao longo de 45 dias de estocagem, quando adicionadas a formulação do detergente enzimático comercial Lapzyme 4. Por fim, em um teste de lavagem de tecido de algodão o extrato enzimático foi mais eficiente na remoção de sangue do tecido do que os detergentes enzimáticos comerciais, 3M multienzimático e Lapzyme 4, indicando, assim, o potencial das peptidases produzidas por FES para o uso na formulação de detergentes enzimáticos para limpeza hospitalar.

**Palavras-chave:**

Peptidase;Fermentação em estado sólido;Aspergillus oryzae;Dendê;Resíduo agroindustrial;Detergente enzimático;Limpeza hospitalar

**Abstract:**

Peptidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds. These enzymes have as main application the detergent sector and within this sector are the enzymatic detergents, which are used in hospital cleaning and surgical instruments. Brazil imports 86% of the enzymes it uses. The implementation and study of enzyme production processes are essential for the country to reduce this demand for the importation of enzymes. In this context, solid state fermentation (SSF) is an important tool considering the great agroindustrial potential of Brazil, since this technique allows the use of agroindustrial waste as a substrate for the growth of microorganisms and the production of enzymes. The objective of this work was to produce peptidases by FES with the filamentous fungus Aspergillus oryzae using residues from the palm oil industry as a culture medium and to evaluate the potential of these enzymes for a future application in the formulation of enzymatic detergents for hospital use. The SSF was performed in a tray type reactor containing palm and fiber pie (70:30) for 72h at 30ºC. The extraction of the peptidases was optimized by DCCR experimental design with the use of biosurfactant (rhamnolipids) as a coadjuvant agent in the extraction process. The concentration of 0.8% w/v rhamnolipids at pH 5.8 at 29°C resulted in a proteolytic activity of 46.1 U/mL (300% increase over the non-optimized process). The peptidases produced by A. oryzae were identified as serine and metallopeptidases. The stability of this peptidase was evaluated at temperatures of 30, 40, 50 and 60°C for 2 hours. At temperatures of 50 and 60 °C, these peptidases lost activity, with the calculated half-life of 42 minutes at 50 °C. The thermal stability of these enzymes at 10% v/v concentration in two commercial enzymatic detergents, 3M multienzimático and Lapzyme 4, was also evaluated at temperatures of 40 and 50°C for 2 hours. In both formulations, the proteolytic activity decreased at 50°C, with the half-life obtained at 53 and 70 minutes for detergents 3M and Lapzyme 4, respectively. These peptidases were more stable at room temperature over 45 days of storage when the commercial enzyme detergent formulation Lapzyme 4 was added. Finally, in a cotton cloth wash test the enzyme extract was more efficient at removing tissue blood than commercial enzyme, 3M multienzimático and Lapzyme 4 detergents, thus indicating the potential of the peptidases produced by SSF for use in the enzyme detergent formulation for hospital cleaning.

**Keywords:**

Peptidase;Solid state fermentation;Palm;Agroindustrial waste;Enzymatic detergent;Hospital cleaning

**Título:**

Análise genômica e construção de mapa metabólico de cepa com interesse biotecnológico da bactéria Paenibacillus polymyxa.

**Autor:**

PRISCILA ESTEVES DE FARIA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

FARIA, P. E.

**Data da Defesa:**

25/02/2019

**Resumo:**

A bactéria Paenibacillus polymyxa foi um dos microrganismos utilizados pioneiramente na produção do 2,3-butanodiol (2,3-BDO), álcool que possui vasta aplicação industrial. Apesar do 2,3-BDO ser um conhecido produto do metabolismo microbiano, sua função biológica e quais condições levam a sua produção ainda não são bem elucidadas. Atualmente, a rota biotecnológica de geração do 2,3-BDO vem sendo amplamente estudada, a fim de substituir rotas derivadas de combustíveis fósseis. Dentro desse contexto, é também importante conhecer as características metabólicas deste microrganismo. Com isto, o presente trabalho visa elaborar um mapa metabólico da cepa PM3605 de P. polymyxa baseado em dados computacionais e em seus perfis de crescimento e geração de produtos em diferentes fontes de carbono (glicose, xilose e glicerol); e compreender a diversidade enzimática envolvida na geração do 2,3-BDO em diferentes bactérias. A cepa de P. polymyxa apresentou diferentes perfis de crescimento em cada uma das fontes de carbono. As análises de HPLC indicaram, ainda, que a maior geração de produtos fermentativos aconteceu em glicose (85% do rendimento teórico) e a produção do 2,3-BDO foi considerável também em xilose, mas não em glicerol. Quanto ao mapeamento metabólico, foi encontrada mais de uma forma de assimilação das fontes de carbono em P. polymyxa . Por outro lado, oito enzimas não foram encontradas, sugerindo a carência da via de reposição de glutationa reduzida, e de vias fermentativas de etanol, acetato, succinato, D-lactato e 1,3-propanodiol, além de uma via de catabolismo de acetoína na cepa PM3605. Por fim, a análise da diversidade enzimática envolvida na produção do 2,3-BDO em diferentes bactérias apontou características estruturais e funcionais determinantes para o reconhecimento diferencial do substrato por duas butanodiol desidrogenases com mesma estereoespecificidade. Como conclusão, os dados destacam PM3605, uma cepa segura, como equiparável a outras cepas utilizadas na produção microbiológica do 2,3-BDO e ressaltam enzimas essenciais para esse bioprocesso.

**Palavras-chave:**

Paenibacillus polymyxa;2,3-butanodiol;bioinformática

**Abstract:**

The bacterium Paenibacillus polymyxa was one of the first microorganisms used for the production of 2,3-butanediol (2,3-BDO), which has a wide range of industrial applications. Nowadays, biotechnological 2,3-BDO has great significance as an alternative for the replacement of fossil fuel derived routes. However, even though 2,3-BDO is a known product of the microorganism’s metabolism, its biological function or which metabolic conditions lead to its production are still not well understood. Within this, this work aims to elaborate a metabolic model of the P. polymyxa strain PM3605 based on a computacional forecasting and growth and fermentative products with three carbon sources (glucose, xylose and glycerol); and to elucidate the enzyme diversity implicated in 2,3-BDO production in different bacteria. The strains showed different growth profiles in each carbon source. HPLC analysis indicated a major fermentative production in glucose (85% of the maximum theoretical yield), and also in xylose, but not in glycerol. The metabolic mapping showed the presence of two routes for the assimilation of each carbon source in P. polymyxa . On the other hand, eight enzymes were not found, suggesting the absence of ethanol, acetate, succinate, D-lactate e 1,3-propanediol fermentations, acetoin catabolism and reduced glutathione reposition in PM3605 strain. The enzyme diversity implicated in 2,3-BDO production in different bacteria analysis presented imperatives structural and functional features for the differential recognition of substrates by two butanediol dehydrogenases with the same stereospecificity. In conclusion, these data showed that PM3605 is a non-pathogenic organism comparable to other strains involved in the microbial production of 2,3-BDO and highlighted essential enzymes for this bioprocess.

**Keywords:**

Paenibacillus polymyxa;2,3-butanediol;bioinformatics

**Título:**

A predição gênica do genoma de Triatoma infestans Klug, 1835

**Autor:**

ELOY DA SILVA SEABRA JUNIOR

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

JUNIOR, E. S. S.

**Data da Defesa:**

22/02/2019

**Resumo:**

Triatoma infestans é historicamente o mais importante vetor da doença de chagas, principalmente por causa da sua grande antropofilia. O objetivo deste trabalho é produzir modelos confiáveis de genes de proteínas para o já sequenciado genoma de Triatoma infestans. Predizer genes em um genoma de eucariotos é uma tarefa difícil, e modelos estatísticos específicos são necessários para cada espécie. A produção destes modelos é geralmente chamada de treinamento e depende de um conjunto de genes anotados manualmente e de boa qualidade. Este trabalho utilizou uma metodologia previamente desenvolvida neste grupo de pesquisa para encontrar genes cópia única e de alta qualidade de anotação a partir de sequências de CDS utilizando o software SIM4. A metodologia desenvolvida identifica os genes que codificam cada CDS, alinha o CDS com o genoma e classifica os alinhamentos em categorias relevantes (completos, 5’ truncados, 3’ truncados, fragmentados ou repetitivos) para o treinamento de programas de predição gênica. Esse procedimento resultou em 1147 alinhamentos completos de CDS que foram utilizados para o treinamento de softwares de predição. Três programas de predição gênica foram testados, MAKER, GENEID e Augustus. Os resultados foram comparados utilizando o programa BUSCO e demonstraram que o procedimento padrão do Augustus teve a melhor performance. Então este software foi selecionado para passos subsequentes de otimização como uma otimização estatística, do próprio pacote Augustus, e implementação de dados públicos de sequenciamento de cDNA. A predição final resultou em 24489 produtos gênicos que compreendem 93.9% dos genes universalmente conservados e cópia única de endopterigotos. Os resultados são próximos dos obtidos para as predições mais recentes de genoma de hemípteros, com 91.4% para Cimex lectularius e 95.9% para Halyomorpha halys. 1. Genômica. 2. Bioinformática. 3. Triatoma infestans . 4. Predição Gênica.

**Palavras-chave:**

Genômica;Bioinformática;Triatoma infestans;Predição Gênica

**Abstract:**

Triatoma infestans is historically the most important vector of Chagas’ disease mainly due to it’s great antrophily. Our goal in this work is to produce reliable protein gene models for the already sequenced genome of this vector. Predicting genes in eukaryotes’ genome is a difficult task, and specific statistical models are needed for each species. The production of such statistical models are usually called “training” and relies on a set of manually-annotated good-quality genes. We used a pipeline previously developed by us to find high quality single copy genes from putative full-length coding sequences (CDS) from transcriptomic data using the SIM4 software. The developed pipeline identifies the gene(s) coding each CDS, classifies them in relevant categories (full-length, 5'-truncated, 3'-truncated, fragmented and repetitive) for training prediction software. This procedure resulted in a set of 1147 full-length CDS-genome alignments used for the training procedure. We tried three gene prediction approaches, Maker (Cantarel et al., 2008), GENEID (Guigó et al., 1992) and Augustus (Stanke et Waack, 2003). The results were benchmarked using the BUSCO software (Simão et al., 2015) showing that Augustus standard pipeline performed better. Then, this protocol was selected, following to improvement steps with Augustus statistics optimization pipeline and also with the implementation of RNAseq evidence data from public sources. The final prediction resulted in 24489 gene products whose comprise 93.9% of BUSCO endopterygota universally conserved single copy genes. The results were close to the most recent Hymenoptera’s genome predictions as 91.4% BUSCOS found for Cimex lectularius and 95.9 % BUSCOS found for Halyomorpha halys.

**Keywords:**

Genomic;Bioinformatics;Triatoma infestans;Genic Prediction