**Dissertações 2020**

**Título:**

Prospecção do RNAi como ferramenta de controle da lagarta Helicoverpa armigera.

**Autor:**

VICTOR GUIMARAES RIBEIRO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

RIBEIRO, V. G.

**Data da Defesa:**

29/09/2020

**Resumo:**

A lagarta Helicoverpa armigera (Hübner) é uma espécie conhecida por sua característica de polifagia, o inseto é capaz de se alimentar de aproximadamente 200 espécies de plantas hospedeiras, sendo incriminada nas grandes perdas no plantio de cana-de-açúcar, milho, algodão e principalmente soja. Os prejuízos anuais associados a esta espécie estimam-se na ordem de 5 bilhões de dólares em todo o mundo. O uso de inseticidas químicos é o principal método de controle da lagarta. Existem poucos inseticidas químicos ativos, disponíveis no mercado, pois as populações do inseto encontram-se resistentes em função da pressão seletiva e de aplicações inadequadas dos produtos, dificultando o manejo de praga nas culturas. Neste contexto, a técnica de RNA de interferência (RNAi) apresenta-se como uma alternativa para o controle de diversos insetos-praga, sendo uma técnica com alta especificidade, permitindo o silenciamento em regiões gênicas específicas, dificultando o desenvolvimento de resistência. O desafio para utilização de RNAi como pesticidas é a identificação de genes alvos apropriados. A quitina, polímero de N-acetilglicosamina, é abundante em estruturas importantes que garantem a sobrevivência do inseto. Assim, os genes envolvidos na via de biossíntese de quitina, como a enzima quitina sintase (CHS), constituem-se bons alvos para o RNAi, permitindo o controle seletivo de insetos. Uma região no gene CHSA e duas no CHSB de H. armigera foram selecionadas para produção de dsRNA A, dsRNA B e dsRNAB, respectivamente. O perfil de expressão dos genes CHSA e CHSB foram determinados ao longo do desenvolvimento do inseto por PCRq. A administração de dsRNA A e B, nas doses 1 e 10 μg, por alimentação, promoveu uma mortalidade significativa entre 60-80%, em relação ao controle. Os dsRNA A, dsRNA B e dsRNAB administrados, nas doses 1 e 10 μg, por via tópica, promoveram a taxa de mortalidade de 80-90%, sem diferenças significativas entre as construções, mas diferente do grupo controle. No fenótipo, os insetos tratados com as diferentes contruções, foi observado um notável atraso no crescimento, extravasamento de conteúdo interno na altura da cabeça, escurecimento e deformação na cutícula de larvas e pupas. Também um fenótipo de interrupção no desenvolvimento, com a estagnação do inseto entre os estágios de lagarta e pupa. Após o tratamento tópico com os dsRNAs na dose de 10,0 μg para silenciamento de CHSA e CHSB foi obseravdo que as três construções reduziram o peso das lagartas na ordem de 30-38% quando comparado com o grupo controle. Na pupa também ocorreu a perda de peso na ordem de 37 e 28% para os tratamentos com dsRNA A e dsRNA B, respectivamente. O CHSA foi comprovadamente silenciado no 3º dia após o tratamento com dsRNA A, como mostrado por PCRq, o que justifica a redução no peso e os fenótipos encontrados. As contruções de dsRNA B e dsRNA AB gerou uma super expressão do CHSA que precisa ser melhor investigada. No CHSB, o silenciamento com dsRNA B não foi comprovado, no 3º dia após o tratamento, entretanto, observou-se uma significativa redução dos pesos e os fenótipos, tanto em larva quanto em pupa, sugerindo que o silenciamento possa ter sido efetivo em algum período após o tratamento. O dsRNA A não alterou a expressão do CHSB. No grupo tratado com dsRNA AB foi observada uma super expressão do CHSB, no 3º dia após o tratamento. Esse grupo apresentou fenótipo semelhante aos demais e teve a menor perda de peso quando comparado com o grupo controle (dsRNA GFP), sugerindo que esta super expressão possa ter contribuído para a diminuição da intensidade do fenótipo, perda de peso. O presente estudo é uma prova de conceito substanciada de que o RNAi tendo como alvo as CHSs de H. armigera pode ser utilizado no controle da lagarta.

**Palavras-chave:**

Helicoverpa armigera;RNA de interferência;Controle de praga agrícola;Pesticida;Tecnologia de controle

**Abstract:**

The Helicoverpa armigera (Hübner) caterpillar is a species known for its polyphagic characteristic, the insect is capable to feed on approximately 200 species of host plants, being incriminated in the great losses in the crop of sugar cane, corn, cotton and mainly soy. The annual losses associated with this species are estimated at around 5 billion dollars worldwide. The use of chemical insecticides is the main method control. There are few active chemical insecticides available, because the insect populations are resistant due to the selective pressure and inadequate product applications, making difficult pest management in crops. In this context, RNA interference technique (RNAi) presents as an alternative strategy to control several pest insects, being a technique with high specificity, allowing gene silencing in specific gene regions, hindering the development of resistance. The key challenge for RNAi application as pesticides is to identify appropriate target genes. Chitin, a N-acetylglucosamine polymer is abundant in important structures that guarantee insect survival. The genes involved with chitin biosynthesis pathway, such as chitin synthase enzymes (CHS) are good target genes for RNAi, allowing selective insect controlling. One CHSA gene region and two CHSB gene region of H. armigera were selected to produce dsRNA A, dsRNA B and dsRNAB, respectively. The gene expression profile of CHSA and CHSB genes were determined throughout the insect development by PCRq. The administration of dsRNA A and dsRNA B, 1 and 10 μg doses, by oral feeding has led to a significant mortality between 60-80% compared to the control group. The dsRNA A, dsRNA B and dsRNA AB administering, 1 and 10 μg doses, topically, have led to a mortality rate of 80-90%, without significant differences between the constructions, but different from the control group. About phenotype, in insects group treated with dsRNA constructions, was observed growth reduction, internal content leakage near head, larvae and pupae cuticle darkening and deformation. A phenotype of development interruption, which the insect develop stagnation was observed between the caterpillar and pupa stages. After dsRNA topical treatment with 10 μg dose for silencing CHSA and CHSB, was observed that the all constructions reduced the weight of the caterpillars around 30-38% when compared to the control group. The pupae stage also lost weight around 37 and 28% after dsRNA A and dsRNA B treatments, respectively. The CHSA gene was silenced on the 3rd day after dsRNA A treatment as shown by PCRq, which justifies the weight reduction and the phenotypes found. The dsRNA B and dsRNA AB constructions generated an overexpression of CHSA gene which needs to be further investigated. For CHSB gene the dsRNA B silencing was not effective, on the 3rd day after treatment, although larvae and pupae have showed weight reduction and phenotypes, suggesting that the gene silencing might have been effective in some period after treatment. The dsRNA A treatment did not change CHSB gene expression, but weight loss and insect deformation phenotypes were observed. In addition, dsRNA AB treated group have occurred a CHSB gene overexpression on the 3rd day after treatment. This group had the less weight loss when compared to the control group (dsRNA GFP), suggesting that this overexpression may have contributed to the reduction of weight loss phenotype intensity. The present study is a substantiated proof of concept that RNAi targeting an H. armigera CHS can be used to control the caterpillar.

**Keywords:**

Helicoverpa armigera;RNA interference;Agricultural pest control;Pesticide;Control technology

**Título:**

PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.

**Autor:**

MARINA CRISTINA TOMASINI

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

TOMASINI, M. C.

**Data da Defesa:**

21/08/2020

**Resumo:**

A economia brasileira está muito pautada na agroindústria e a cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de enorme importância para o setor, no qual o país se posiciona como o maior produtor mundial. Parte dos resíduos gerados na colheita e no processamento da cana-de-açúcar - o bagaço e a palha – é reutilizado pela indústria sucroalcooleira, sendo o bagaço e parte da palha destinados para a produção de etanol 2G e cogeração de energia. Estas abordagens propiciam um aproveitamento parcial do potencial energético destes resíduos. A palha de cana é um resíduo lignocelulósico composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose é majoritariamente composta de pentoses, também chamada de fração C5, podendo ser disponibilizada para o meio através de pré-tratamento ácido ou térmico. A fração C5 vem sendo explorada como matéria-prima em diferentes bioprocessos. Neste trabalho, o hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido foi utilizado na digestão anaeróbia e, através da segregação das fases fermentativa e metanogênica, foi possível produzir biologicamente gases como o hidrogênio e o metano de maneira sequencial. Três concentrações iniciais de carboidratos (9, 30 e 48 mmol/L) foram avaliadas na produção de H2 durante 54 h de fermentação em 35 °C. O maior rendimento foi 1,75 mol H2/mol carboidratos (2,04 mol H2/mol pentoses) em 36 h com concentração inicial 30 mmol/L e eficiência de 61% no processo de conversão de pentoses a H2, sendo a condição escolhida para a produção sequencial de metano. O sistema com concentração inicial de 9 mmol/L apresentou o rendimento máximo em 18 h de processo (1,28 mol H2/ mol carboidratos) e o meio com 48 mmol/L de carboidratos em 48 h de fermentação (1,48 mol H2/mol carboidratos). Adicionalmente, foi avaliada uma fermentação em condição termofílica (50 °C) com concentração inicial de 9 mmol/L de carboidratos utilizando lodo in natura, que apresentou aumento de aproximadamente 25% no rendimento comparado à produção mesofílica em 24 h com lodo pré-tratado, resultando em 1,51 mol H2/ mol carboidratos. A produção de metano via digestão anaeróbia em único estágio apresentou rendimento de 209,8 mL CH4/g DQO, produzindo 6,45 kJ/gDQO de energia e redução de 88% da DQO. Enquanto a produção sequencial apresentou 110,6 mLCH4/gDQO com adicionais 117,3 mLH2/gDQO e 6,62 kJ/gDQO de energia produzida. A redução da DQO deste sistema foi de 91%. Ensaios comparativos com um meio mimetizado demonstraram que compostos provenientes da hidrólise da biomassa, como HMF e furfural nas concentrações estudadas, não foram os responsáveis pela diminuição do rendimento na produção de H2, no entanto, exerce influência negativa na fase adaptativa das arqueia metanogênicas. Sendo assim, a utilização da fração C5 para produção sequencial é promissora, visto que dois gases energéticos são gerados, com recuperação energética da fase fermentativa e maior redução da matéria orgânica do sistema comparado à produção em um único estágio, e por apresentar alternativas de maior aproveitamento desta biomassa, assim como na integração desta fração hemicelulósica no contexto da biorrefinaria.

**Palavras-chave:**

hidrogênio;metano;hemicelulose;palha de cana-de-açúcar;digestão anaeróbia

**Abstract:**

The Brazilian economy is largely based on agro-industry, and the country is the largest world producer of sugarcane. Residues generated after the harvest and processing of this crop, such as bagasse and straw, are partially reused by the sugar and alcohol industry, where it can be destined to 2G ethanol production and energy cogeneration. However, these approaches provide partial use of the energy potential of these wastes. Sugarcane straw is a lignocellulosic biomass composed mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Hemicellulose is mostly composed of pentoses, also known as C5 fraction, and may be released to the medium through acid or thermal pretreatment. C5 fraction has been exploited as a raw material in different bioprocesses. In this study, hemicellulosic hydrolyzate generated from the acid pretreatment was used in anaerobic digestion and, through the segregation of the fermentative and methanogenic phases. Hydrogen and methane were sequentially produced. Three initial carbohydrates concentrations (9, 30 and 48 mmol / L) were evaluated for H2 production during 54 h of fermentation at 35 °C. The highest yield was 1.75 molH2/molcarbohydrates (2.04 molH2/molpentoses) at 36 h with an initial concentration of 30 mmol/L. The efficiency in conversion process of pentoses to H2 was 61%, and it was chosen as the best condition for sequential methane production. System with an initial concentration of 9 mmol/L showed the maximum yield at 18 h (1.28 molH2/molcarbohydrates) and the initial carbohydrates concentration of 48 mmol/L lead to the highest yield at 48 h of fermentation (1.48 molH2/molcarbohydrates). Furthermore, a fermentation at thermophilic condition (50 °C) using an initial carbohydrate concentration of 9 mmol/L using in natura sludge was evaluated , which showed 25% of yield improvement when compared to mesophilic production in 24 h using pretreated sludge, resulting in 1.51 mol H2/molcarbohydrates. The methane production via anaerobic digestion in a single-stage showed a yield of 209.8 mLCH4/gCOD, producing 6.45 kJ/gDQO of energy and 88% of COD reduction. Sequential production showed 110.6 mLCH4 / gDQO of yield with additional 117.3 mLH2/gDQO and 6.62 kJ/gDQO of energy produced. The COD reduction in this system was 91%. Comparative essays with a standard medium, composed of only sugars, showed that HMF and furfural stemming from the hydrolysis of biomass were not responsible for the decrease of H2 production, however but these compounds have a negative influence on the adaptive phase of methanogenic archeas. Therefore, the use of C5 fraction for the sequential generation of H2 and CH4 is promising, since two energy gases are generated, with energy recovery from the fermentative phase, greater reduction of organic matter compared to single-stage anaerobic digestion, representing an alternative of a better use of this biomass, as well as in the integration of this hemicellulosic fraction in the biorefinery context.

**Keywords:**

hydrogen;methane;hemicellulose;sugarcane straw;anaerobic digestion

**Título:**

Quantificação de peptídeos e proteínas por análise de aminoácidos por injeção em fluxo acoplada a espectrometria de massas de alta resolução.

**Autor:**

GABRIEL REIS ALVES CARNEIRO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

CARNEIRO, G. R. A.

**Data da Defesa:**

18/08/2020

**Resumo:**

Quantificações precisas de proteínas e aminoácidos são de importância fundamental para várias áreas como as bioquímicas, nutricionais, clínicas e proteômicas. A literatura é rica em técnicas para quantificar proteínas diretamente em uma determinada amostra, entretanto elas carecem de robustez, precisão e geralmente demandam muito tempo nas análises. No presente trabalho, desenvolvemos um método preciso e rápido usando a injeção por fluxo - espectrometria de massa de alta resolução (FI-HRMS) para quantificar as proteínas e peptídeos. Para isso utilizamos a hidrolise com HCl-fenol de amostras proteicas simples (BSA) e complexas (soro de rato, folha de Jatropha curcas e Saccharomyces cerevisiae) e submetemos a analise por FI-HRMS com base nos teores de seus aminoácidos após a hidrólise com HClfenol, usando uma mistura de 17 aminoácidos isotopicamente marcados como padrão interno. A fase móvel da injeção em fluxo foi otimizada para natureza química, concentração e pH. Das análises realizadas com os métodos targeted (Target-SIM) e untargeted (Full-Scan), o primeiro mostrou os melhores resultados. O método foi validado e apresentou coeficiente de variância (CV), linearidade, precisão e intra- e inter-reprodutibilidade adequados para o uso. Além disso, comparamos esses resultados com as principais métodologias de quantificação de peptídeos e proteínas da atualidade: cromatografia de troca-iônica (AAA), ácido bicinchoninico, absorção a 280 nm, Bradford e Qubit. E observamos resultados semelhantes ao método clássica de análise de aminoácidos por cromatografia de troca-iônica (AAA). Neste trabalho, um novo método rápido e preciso para quantificação de peptídeos e proteínas foi desenvolvido sem a necessidade de separação cromatográfica ou derivatização química pré ou pós-coluna de aminoácidos. Esta estratégia pode ser diretamente incorporada em pipelines proteômicas.

**Palavras-chave:**

Aminoácidos;Espectrometria de massa;Quantificação;Proteínas;Proteômica;Metabolômica

**Abstract:**

Precise protein and amino acid quantifications are of key importance for several biochemical, nutritional, clinical, and proteomics analyses. Many methods to directly quantify the total protein amount in a given sample have been described. However, they lack robustness, precision or they take a lot of time in the analysis. In the present work, we aim to develop a precise and fast analytical time using flow injection - highresolution mass spectrometry (FI-HRMS) to quantify the proteins and peptides. Simple protein sample (BSA) and complex protein samples (rat serum, Jatropha curcas leaf, and Saccharomyces cerevisiae) were quantified by FI-HRMS based on their amino acids contents after HCl-phenol hydrolysis and using an isotopically labeled standard mixture of 17 amino acids as an internal standard. The flow injection mobile phase was optimized for chemical nature, concentration, and pH. The analyses were performed with targeted (Target-SIM) and untargeted (Full-Scan) methods, and target SIM showed better results than full scan approaches. Data for RSD, linearity, accuracy, and intra- and inter-reproducibility were used for validation. Results were compared with other methods of peptide and protein quantification, namely: Moore and Stein classical ion-exchange chromatography (AAA), bicinchoninic acid (BCA), absorption at 280 nm, Bradford and Qubit. Samples of different matrixes and varying complexity were quantified. The results were compared to the golden standard method of amino acid analysis (AAA). In this work, we describe a new precise, and fast method for peptide and protein quantification without the need for chromatographic separation of chemically pre- or post-column amino acids derivatization. This straightforward strategy can be incorporated directly in proteomics pipelines.

**Keywords:**

Amino acids;Mass spectrometry;Quantification;Protein;Proteomics;Metabolomics

**Título:**

Análise do perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com Doença de Parkinson

**Autor:**

BRUNA LUISA FRANCO FADEL

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

FADEL, B.

**Data da Defesa:**

14/08/2020

**Resumo:**

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afetando milhões de pessoas em todo mundo. Até o momento não existe nenhum biomarcador, no sangue, para identificação da doença e o diagnóstico é exclusivamente clínico. A DP é caracterizada clinicamente por quatro sintomas principais: bradicinesia, tremor em repouso, instabilidade postural e rigidez, sendo caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta e formação de agregados de alfa-sinucleína, denominados corpos de Lewy. Com relação a progressão, a DP pode ser classificada de acordo com a escala de estadiamento de Hoehn e Yahr onde os pacientes são classificados em grau leve, moderado ou avançado de acordo com o comprometimento motor relacionado a doença. Estudos sobre exossomos indicam uma mediação na comunicação intercelular através de contato direto célula-célula ou a partir da transferência de moléculas secretadas. Os exossomos são nanovesículas (40-120nm) envoltas por uma bicamada lipídica que podem conter ácidos nucleicos, metabólitos, proteínas específicas, dentre outros em seu interior. Apesar de muitos esforços serem feitos para revelar os mecanismos envolvidos na patogênese da DP, ainda há muito a ser descoberto principalmente com relação a biomarcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico. O objetivo geral deste trabalho foi a análise do perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com doença de Parkinson. Para isso, foram coletadas amostras em colaboração com o departamento de neurologia do Hospital Universitário da UFRJ. Foram utilizadas uma coorte de 32 amostras de plasma de controles saudáveis e 97 amostras ao todo de pacientes com DP classificados clinicamente como leve (n=44), moderado (n=41) e avançado (n=12). Foram montados 4 pools os quais tiveram os exossomos enriquecidos com uso do Kit ExoQuick®. A partir desses exossomos foi feita a extração de proteínas e posterior análise proteômica shotgun; LC-MS/MS (Q-Exactive plus, EASY-nLCII, Thermo Fisher Scientific) dessas amostras e os resultados foram analisados por bioinformática. Foram identificadas de forma redundante um total de 671 proteínas no somatório das amostras de pacientes com DP e 229 proteínas no grupo controle saudável. Foram identificadas 8, 9, 7, 9 proteínas exclusivamente presentes nos grupos leve, moderado, avançado e controle respectivamente. Do total de proteínas não redundantes, 234 atenderam aos critérios do software PERSEUS e seguiram para as análises quantitativas. Na comparação do grupo leve versus controle, foram identificadas um total de 42 proteínas diferencialmente expressas; na comparação do grupo moderado versus controle foram identificadas um total de 33 proteínas diferencialmente expressas; e na comparação do grupo avançado versus controle foram identificados um total de 16 proteínas diferencialmente expressas. Foram identificadas vias relacionadas a ativação plaquetária, ativação do sistema complemento e sua cascata e vias do sistema imune inato. Além disso, foram identificados níveis significativamente aumentados de hidroperóxido nos exossomos do grupo com classificação clínica leve em relação ao grupo controle e ao grupo com classificação clínica moderado. O nível antioxidante foi mensurado e foi observado uma depleção significativa em todos os grupos clínicos quando comparados com o grupo controle. O índice de estresse oxidativo apresentou nível significativamente elevado nos grupos com classificação clínica leve e moderado em relação ao grupo controle.

**Palavras-chave:**

Proteômica;Doença de Parkinson;Exossomos;Espectrometria de Massas;Sangue

**Abstract:**

Parkinson’s disease (PD) is the second moste common neurodegenerative disease, affecting millions of people worldwide. So far, there is no biomarker in the blood to identify the disease and the diagnosis is exclusive clinical. PD is clinically characterized by four main symptoms: bradykinesia, tremor at rest, postural instability and stiffness, being characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and formation of alpha-synuclein aggregates, called Lewy bodies. Regarding progression, PD can be classified according to the Hoehn and Yahr staging scale where patients are classified as mild, moderate or advanced according to the disease-related motor impairment. Exosome studies indicate a mediation in tercellular communication through direct cell-cell contact or through the transfer of secreted molecules. Exosomes are nanovesicles (40-120 nm) surrounded by a Lipid bilayer that can contain nucleic acids, metabolites, specific proteins, among other insides. Although many efforts have been made to reveal the mechanisms involved in the pathogenesis of PD, there is still much to discovered, especially regarding diagnostic and prognostic molecular biomarkers. The general objective of this work was to analyse the proteomic profile of blood plasma enriched exosomes of patients with Parkinson’s disease. For this, blood samples were collected in collaboration with the neurology department of the UFRJ University Hospital. A cohort of 32 plasma samples from healthy controls and 97 samples from PD patients clinically classified as mild (n=44), moderate (n=41) and advanced (n=12) were used. Four pools were set up, which had the exosomes enriched using the ExoQuick® Kit. From these exosomes, protein extraction and subsequent shotgun proteomic analysis were performed; LC-MS/MS (Q-Exactive plus, EASY-nLCII, Thermo Fisher Scientific) of these samples and the results were analysed by bioinformatics. A total of 671 proteins were identified redundantly in the sum of samples from patients with PD and 229 proteins in the healthy control group. In a non-redundant way, a total os 260 proteins were identified in all groups in the presente study. 8, 9, 7, 9, proteins were identified exclusively present in the mild, moderate, advanced and control group, respectively. Of the total number of non-redundant proteins, 234 met the criteria of the PERSEUS software and went on to quantitative analysis. When comparing the mild versus control group, a total of 42 differentially expressed proteins were identified. When comparing the moderate versus control groups, a total of 33 differentially expressed proteins were identified. And in the comparison of the advaced versus control group, a total of 16 differentially expressed proteins were identified. Pathways related to platelet activation, activation of the complement system and its cascade and pathways of the innate immune system were identified. In addition, significantly increased levels of hydroperoxide were identified in the exosomes of the group with mild clinical classification in relation to the control group and the group with moderate clinical classification. The antioxidant level was measured and significant depletion was observed in all clinical groups when compared to the control group. The oxidative stress index showed a significantly high level in the groups with mild and moderate clinical classification in relation to the control group.

**Keywords:**

Proteomic;Parkinson Disease;Exosome;Mass Spectrometry;Blood

**Título:**

CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DA SEMENTE DE AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA) E SEU PROCESSAMENTO PARA OBTENÇÃO DE MANOSE

**Autor:**

INGRID SANTOS MIGUEZ

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

MIGUEZ, I. S.

**Data da Defesa:**

02/07/2020

**Resumo:**

A semente de açaí, que representa mais de 85% da massa total do fruto, sobra como resíduo do processo de produção da polpa comestível. Com base na produção crescente de açaí, estima-se que mais de um milhão de toneladas de sementes seja gerada anualmente, que, sem destinação adequada, se acumulam na zona produtora. Diante desse impacto ambiental, a primeira parte deste estudo teve como objetivo investigar a composição da semente de açaí e identificar os componentes que tenham potencial para aplicação industrial. Para isso, as sementes maduras foram fracionadas para avaliação de cada parte isoladamente. Foram avaliadas as frações: (i) semente inteira (fibras + interior maciço), (ii) fibras; (iii) interior maciço (tegumento + endosperma + embrião); (iv) fração do endosperma. A partir de estudos de caracterização do material, foi confirmado que a semente é constituída majoritariamente por carboidratos (57,2%), sendo 82% manana, um polissacarídeo insolúvel e recalcitrante formado de manose. Foi demonstrado que essa manana se acumula no endosperma a partir de um segundo estágio de desenvolvimento da semente. Como a manose é um monossacarídeo que apresenta potencial como ingrediente funcional de grande interesse para a indústria, a segunda etapa do trabalho buscou estabelecer métodos para converter esse alto teor de manana da semente em manose. Assim, primeiramente, as amostras foram hidrolisadas em um processo sequencial de hidrólise com H2SO4 diluído e mananases comerciais em diferentes condições reacionais, resultando em uma recuperação global de 96,8% do potencial teórico de manose a 146 g/L na condição mais adequada (3%, 60 min, 121 °C). No entanto, tendo em vista o desenvolvimento de processos mais brandos e compatíveis com a indústria, buscou-se a substituição por ácidos dicarboxílicos menos tóxicos e mais específicos para a hidrólise da manana. Dentre os ácidos dicarboxílicos, o ácido oxálico foi identificado como uma alternativa promissora. Ao utilizar ácido oxálico (4%, 40 min, 150 °C) foi possível uma recuperação de manose superior ao obtido com ácido sulfúrico, 33,4% e 23,4%, respectivamente. Além disso, buscando encontrar fontes de enzimas de baixo custo, foi identificada uma linhagem do fungo Aspergillus tamarii capaz de secretar mananases de eficiência similar à mananase comercial para a hidrólise da semente de açaí. Com base nos resultados obtidos, o estudo contribui para a formação de uma base de dados que abre perspectivas para o reaproveitamento sustentável da semente de açaí residual para produção de um bioproduto com alto valor agregado.

**Palavras-chave:**

semente de açaí;manana;hidrólise ácida;mananases

**Abstract:**

The açaí seed, which represents more than 85% of the total mass of the fruit, remains as a residue from the edible pulp production process. Based on the growing production of açaí, it is estimated that more than one million tons of seeds are generated annually, and, without proper destination, accumulate in the producing area. Given this environmental impact, the first part of this study aimed to investigate the composition of açaí seed and identify the components that have the potential for industrial application. For that, the mature seeds were fractionated to evaluate each part separately. The evaluated fractions were: (i) whole seed (fibers + core stone), (ii) fibers; (iii) core stone (tegument + endosperm + embryo); (iv) fraction of the endosperm. Based on the studies of biomass characterization, it was confirmed that the seed consists mainly of carbohydrates (57.2%), 82% of which is mannan, an insoluble and recalcitrant polysaccharide formed of mannose. It has been shown that this mannan accumulates in the endosperm from the second stage of seed development. As mannose is a monosaccharide that has potential as a functional ingredient of great interest to the industry, the second stage of the work sought to establish methods to convert this high mannan content of the seed into mannose. Thus, first, the samples were hydrolyzed in a sequential hydrolysis process with diluted H2SO4 and commercial mannanases in different reaction conditions, resulting in an overall recovery of 96.8% of the theoretical potential of mannose at 146 g/L in the most appropriate condition (3%, 60 min, 121 °C). However, given the development of milder processes and compatible with the industry, the substitution by less toxic and more specific dicarboxylic acids for the hydrolysis of mannan was sought. Among dicarboxylic acids, oxalic acid has been identified as a promising alternative. By using oxalic acid (4%, 40 min, 150 °C), the recovery of mannose was obtained in a concentration higher than that obtained with the sulfuric acid use, 33.4% and 23.4%, respectively. Besides, to find low-cost sources of enzymes, a strain of the fungus Aspergillus tamarii was identified as capable to produce mannanases of similar efficiency to commercial mannanase for the hydrolysis of açaí seed. Based on the results obtained, the study contributes to the formation of a database that opens perspectives for the sustainable reuse of residual açaí seed for the production of a bioproduct with high added value.

**Keywords:**

açaí seed;mannan;acid hydrolysis;mannanases

**Título:**

EFEITO INIBITÓRIO DA TREALOSE-6-FOSFATO SOBRE A HEXOQUINASE 2 DE LEVEDURA E HUMANA

**Autor:**

FERNANDA CIGAGNA BOECHAT

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

BOECHAT, F. C.

**Data da Defesa:**

02/04/2020

**Resumo:**

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo. Estudos realizados por Otto Warburg mostraram que as células tumorais apresentam como metabolismo majoritário para obtenção de energia a fermentação e não a respiração, como esperado, mesmo na presença de oxigênio. O efeito ficou conhecido como Efeito Warburg. Essa é uma das características mais marcantes de uma célula de câncer, onde as enzimas de regulação da via glicolítica estão superexpressas. A via é alvo de estudos com objetivo de obter novas terapias para o câncer. A hexoquinase é a enzima que catalisa a primeira reação da via glicolítica e é uma das enzimas supersexpressas no câncer, sendo a isoforma 2 (HK2) a que se destaca nesse cenário. Um efeito similar ao Efeito Warburg é observado na Saccharomyces cerevisiae, a repressão catabólica. Em certas condições, a levedura fermenta a glicose, mesmo em aerobiose, apresentando um metabolismo que mimetiza o de uma célula cancerosa. Similarmente, a Hexoquinase 2 (Hxk2) é a isoforma mais expressa quando a levedura fermenta. Estudos anteriores mostraram que trealose-6-fosfato (T6P) inibiu seletivamente a Hxk2, purificada de levedura, e indicou que o mesmo poderia ocorrer em organismos superiores. O objetivo do presente trabalho é estudar se T6P de fato inibe seletivamente a Hxk2 de levedura in vivo, e se o mesmo efeito seria observado na isoforma humana HK2. Além disso, avaliou-se o papel da Hxk2 na repressão da glicose sobre a respiração de levedura. Para isso foram construídas cepas de levedura que expressam apenas uma das isoformas de levedura, Hxk2 ou Glk1 e a cepa que não expressa nenhuma das isoformas, (Δhxk1Δhxk2Δglk1). Na cepa deficiente em todas as isoformas da levedura, foi introduzida a isoforma humana HK2. Foi possível observar que a cepa GLK1, que expressa apenas a isoforma Glk1, (Δhxk1 Δhxk2 GLK1) apresenta um comportamento diferente da cepa HXK2, que expressa apenas Hxk2 (Δhxk1 HXK2 Δglk1) e da cepa controle, WT, (que possui todas as isoformas), apresentando uma taxa de crescimento menor que as demais cepas e consumindo mais oxigênio e menos glicose, mesmo na presença de altas concentrações de glicose. Com esse resultado é possível observar que a ausência de Hxk2 reverte o fenótipo de repressão catabólica, fazendo que, mesmo em elevada concentração de glicose, a célula de levedura respire e não fermente. Verificou-se ainda que, de fato, T6P inibe Hxk2 de levedura, mas não Glk1. Foi possível observar que T6P também inibe a isoforma humana da hexoquinase 2. Em ambos os casos, inibição das isoformas hexoquinase 2 de levedura e humana, o mecanismo de inibição de T6P parece ser do tipo competitivo.

**Palavras-chave:**

HXK2;HK2;Câncer;T6P;Efeito Warburg;Repressão catabólica;Saccharmoyces cerevisiae

**Abstract:**

Cancer is the second leading cause of death in the world. Studies carried out by Otto Warburg showed that tumor cells present fermentation rather than respiration as the major metabolism for obtaining energy, as expected, even in the presence of oxygen. The effect became known as the Warburg Effect. This is one of the most striking features of a cancer cell, where enzymes that regulate the glycolytic pathway are overexpressed. This route has been targeted by studies aiming at obtaining new therapies for cancer. Hexokinase is the enzyme that catalyzes the first reaction of the glycolytic pathway and is one of the enzymes overexpressed in cancer, with isoform 2 (HK2) being the one that stands out in this scenario. A similar effect to Warburg Effect is observed in Saccharomyces cerevisiae, glucose repression. Under certain conditions, yeast ferments glucose, even aerobically, presenting a metabolism that mimics that of a cancer cell. Similarly, Hexokinase 2 (Hxk2) is the most expressed isoform during yeast fermentation. Previous studies have shown that trehalose-6-phosphate (T6P) selectively inhibited Hxk2, purified from yeast, and indicated that the same could occur in higher organisms. The aim of the present work is to study whether T6P in fact selectively inhibits yeast Hxk2 in vivo, and whether the same effect would be observed in the human HK2 isoform. In addition, the role of Hxk2 in the suppression of glucose on yeast respiration was studied. For this purpose, yeast strains were constructed that express only one the yeast isoforms, Hxk2 or Glk1 and the strain that does not express any of the isoforms, (Δhxk1Δhxk2Δglk1). The human isoform HK2 was then introduced in the strain deficient in all yeast isoforms. It was possible to observe that GLK1 strain, which expresses only the Glk1 isoform, (Δhxk1 Δhxk2 GLK1) presents a different behavior from that of HXK2 strain, which expresses only Hxk2 (Δhxk1 HXK2 Δglk1) and of the WT control strain, which has all the isoforms. The GLK1 strain presents a lower growth rate than the other strains and consumes more oxygen and less glucose, even in the presence of high glucose concentrations. With this results, it is possible to observe that the absence of Hxk2 reverses the glucose repression phenotype, in which cell will not ferment and will use cellular respiration to obtain energy. It was also noticed that, in fact, T6P inhibits yeast Hxk2, but not Glk1. It was observed that T6P also inhibits the human hexokinase 2 isoform 2. In both cases, inhibition of the yeast and human hexokinase 2 isoforms, T6P inhibition mechanism appears to be of the competitive type.

**Keywords:**

HXK2;HK2;Cancer;T6P;Warburg Effect;Catabolic repression;Saccharomyces cerevisiae

**Título:**

POTENCIAL DE LIQUEFAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS DURANTE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO COM ALTO TEOR DE SÓLIDOS

**Autor:**

ROBERTA PEREIRA ESPINHEIRA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

DISSERTAÇÃO

**Abreviatura:**

ESPINHEIRA, R. P.

**Data da Defesa:**

17/02/2020

**Resumo:**

A produção industrial de glicose a partir da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica requer a utilização de meios concentrados, ou seja, com conteúdo de sólidos superior a 15% (m/m), para ser economicamente viável. No entanto, nessas condições, a mistura reacional apresenta alta viscosidade, tornando-se um ambiente adverso para reações enzimáticas. Sendo assim, para que o processo seja viável, nas primeiras horas de hidrólise deve ocorrer uma rápida hidrólise parcial das fibras insolúveis, fenômeno chamado de liquefação. Neste contexto, este estudo objetivou investigar potenciais enzimas/proteínas acessórias responsáveis pela liquefação eficiente do bagaço de cana-de-açúcar durante hidrólise enzimática com 30% sólidos. Inicialmente, buscou-se selecionar coquetéis enzimáticos com potencial de liquefação. O bagaço pré-tratado hidrotermicamente foi hidrolisado utilizando os coquetéis enzimáticos (i) Cellic® CTec2 (CT2); (ii) Celluclast + Novozyme 188 (CEL188); e (iii) um coquetel preparado em laboratório com os sobrenadantes de Trichoderma reesei e Aspergillus awamori (TrAa). Os ensaios de hidrólise foram conduzidos com 30% de sólidos a 50 °C e 200 rpm por 24 h. TrAa promoveu uma maior liquefação do meio de hidrólise quando comparado com CT2 e CEL188. CT2 e TrAa promoveram uma maior liberação de glicose (116 e 115 g/L), enquanto CEL188 liberou 55 g/L. Considerando que a enzima CEL é proveniente de T. reesei, os resultados indicaram que o sobrenadante de A. awamori (Aa) era responsável pela melhoria na liquefação observada com TrAa. Sendo assim, outras duas misturas enzimáticas foram avaliadas: (iv) CT2+Aa e (v) CEL188+Aa. A adição de Aa em CT2 e CEL188 provocou uma diminuição na viscosidade e um aumento nas concentrações de glicose após 24 h de hidrólise, em ambos os ensaios. Devido ao desempenho de Aa, uma segunda etapa focada no estudo de Aa foi iniciada para avaliar a presença de endoglucanases, celulases reportadas como responsáveis pela liquefação. Sendo assim, o sobrenadante foi fracionado utilizando cromatografia de exclusão por tamanho. Foram medidas as atividades enzimáticas de β-glicosidase, CMCase e xilanase e os tubos de fracionamento foram reunidos em quatro frações principais de acordo com as atividades enzimáticas observadas. Em seguida, as quatro frações foram analisadas por espectrometria de massas, para identificação das proteínas. Dentre estas, a fração rica em endoglucanases foi testada para hidrólise enzimática com alto teor de sólidos em mistura com CT2 (CT2F3), em paralelo com CT2 e CT2Aa, para verificar se o mesmo padrão de liquefação iria ser observado com CT2F3 e CT2Aa. Como resultado, CT2F3 e CT2Aa apresentaram o mesmo perfil de liberação de glicose nas primeiras 6 h de hidrólise, indicando que a fração de A. awamori rica em endoglucanases foi responsável pela melhora da hidrólise enzimática observada em CT2Aa. Os meios de 6 h hidrólise contendo CT2Aa e CT2F3 apresentaram o mesmo perfil de viscosidade e uma pequena diminuição de viscosidade em relação ao meio com CT2. Desse modo, os achados desse estudo contribuem com o entendimento das enzimas envolvidas na liquefação eficiente do bagaço de cana-de-açúcar em meio com alto teor de sólidos, o que pode contribuir com a melhoria da economicidade das biorrefinarias da cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:**

Hidrólise enzimática em alto teor de sólidos;biomassa lignocelulósica;liquefação;celulases;endoglucanases;Aspergillus awamori

**Abstract:**

The industrial production of glucose by the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomasses requires the use of concentrated media, i.e., with solids content above 15% (w/w), to be economically feasible. However, under these conditions, the reaction medium has high viscosity, becoming an adverse environment for enzymatic reactions. Therefore, to increase the feasibility of the process, in the first hours of hydrolysis, a rapid partial hydrolysis of insoluble fibers must occur, a phenomenon called liquefaction. In this context, the aim of this study was to investigate potential enzymes/accessory proteins responsible for the efficient liquefaction of sugarcane bagasse during the enzymatic hydrolysis with 30% solids. Initially, the selection of enzymatic cocktails with liquefaction potential was carried out. The hydrothermally pretreated bagasse was hydrolyzed using three enzymatic cocktails: (i) Cellic® CTec 2 (CT2); (ii) Celluclast 1.5 L + Novozyme 188 (CEL188); and (iii) an lab-made enzymatic cocktail of the supernatants of Trichoderma reesei and Aspergillus awamori (TrAa). The hydrolysis assays were conducted with 30% of solids at 50 ºC, 200 rpm for 24 h. TrAa promoted the most pronounced liquefaction effect when compared to CT2 and CEL188. CT2 and TrAa promoted the highest glucose release (116 and 115 g/L respectively), while CEL188 produced 55 g/L. Considering that CEL is a T. reesei enzymatic pool, the results indicated that the supernatant of A. awamori was responsible for the liquefaction effect observed in TrAa. To verify this hypothesis, new enzymatic mixtures were tested: (iv) CT2 + Aa (CT2Aa) and CEL188 + Aa (CEL188Aa). The supplementation of commercial cocktails with the supernatant of A. awamori caused a decrease in the viscosity of the media and an increase in glucose concentration after 24 h of hydrolysis in both enzymatic conditions. Due to the performance of Aa, a study focused on the identification of Aa proteins was initiated to assess the presence of endoglucanases, cellulases reported as responsible for liquefaction. Thus, the supernatant was fractionated using size exclusion chromatography. The enzymatic activities of β-glycosidase, CMCase and xylanase were measured and the fractionation tubes were grouped into four main fractions according to the observed enzymatic activities and further analyzed by mass spectrometry to identify proteins. Among these, the fraction rich in endoglucanases was tested during high solids enzymatic hydrolysis in a mixture with CT2 (CT2F3), in parallel with CT2 and CT2Aa, to verify whether the same liquefaction pattern would be observed in CT2F3 and CT2Aa. As a result, CT2F3 and CT2Aa showed the same glucose releasing profile in the first 6 h of hydrolysis, indicating that fraction rich in endoglucanases was responsible for the improvement of the enzymatic hydrolysis observed with CT2Aa. The 6 h hydrolysis medium containing CT2Aa and CT2F3 showed the same viscosity profile and a small decrease in viscosity when compared to the medium with CT2. Thus, the findings of this study provide further understanding of the enzymes involved in the efficient liquefaction of sugarcane bagasse in a medium with a high solids content, which can contribute to improving the economics of sugarcane biorefineries.

**Keywords:**

High solids enzymatic hydrolysis;lignocellulosic biomass;liquefaction;cellulases;endoglucanases;Aspergillus awamori