TESES 2018

**Título:**

MAPEAMENTO MOLECULAR DO COMPLEXO BJ46a - JARARAGINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

**Autor:**

VIVIANE DE ALMEIDA BASTOS

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

BASTOS, VIVIANE

**Data da Defesa:**

21/12/2018

**Resumo:**

Os acidentes ofídicos são um problema crescente de saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. A administração intravenosa do soro antiofídico é o único tratamento disponível, e os danos locais são apenas parcialmente neutralizados. Uma vertente da pesquisa de novas terapias antiofídicas dedica-se ao estudo de inibidores naturais e sintéticos que possam ser utilizados logo após o acidente, para minimizar os extensos danos locais que são frequentemente observados nas vítimas. O inibidor BJ46a é uma glicoproteína isolada do plasma da serpente Bothrops jararaca que inibe a ação catalítica de metaloendopeptidases de venenos de serpentes por meio da formação de um complexo estável, de alta afinidade, e mantido por forças de natureza não-covalente. Entretanto, os requisitos estruturais que regem esta interação não são conhecidos. Neste trabalho, aplicamos as técnicas de cross-linking (XL-MS) e troca isotópica hidrogênio-deutério monitoradas por espectrometria de massas (HDX-MS) com o objetivo de analisar as regiões de interação entre BJ46a e a metaloendopeptidase de veneno de serpente jararagina. As restrições espaciais geradas pelos experimentos de XL-MS foram exploradas para guiar a modelagem molecular de BJ46a e jararagina, bem como as simulações de docking proteína-proteína. Os dados de HDX-MS indicaram regiões de proteção/desproteção na interface do complexo entre BJ46a e jararagina. Em jararagina, regiões importantes para a coordenação do átomo de zinco catalítico tiveram seus perfis de incorporação isotópica alterados quando em complexo; para BJ46a, a região N-terminal é significativamente protegida da troca isotópica. O entendimento do mecanismo de inibição de metaloendopeptidases por BJ46a pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos efetivos para a prevenção do dano tecidual local nos acidentes ofídicos, bem como para outras doenças associadas a um desequilíbrio na atividade catalítica e/ou expressão de metaloendopeptidases.

**Palavras-chave:**

resistência natural;inibidor de metaloendopeptidases;modelagem molecular

**Abstract:**

Snakebite envenoming is a growing public health problem, affecting millions of people worldwide. The intravenous administration of antivenom is the only available treatment and several studies have shown that local effects are only partially neutralized. A current trend in antivenom research is the study of natural and synthetic inhibitors that could be used soon after the envenomation event to restrain local tissue degradation. The inhibitor BJ46a is a glycoprotein isolated from Bothrops jararaca serum that inhibits the catalytic activity of snake venom metalloendopeptidases (SVMPs) through the formation of a stable high-affinity non-covalent complex with the toxin. However, the structural features that govern this interaction are largely unknown. In this work, the regions of interaction between BJ46a and the SVMP jararhagin have been analyzed using the techniques of cross-linking-mass spectrometry (XL-MS) and hydrogen-deuterium exchange-MS (HDX-MS). We explored the distance restraints generated from XL-MS experiments to guide the modeling of BJ46a and jararhagin, as well as the protein-protein docking simulations. HDX-MS data pinpointed regions of protection/deprotection in the interface of BJ46a-jararhagin complex. In jararhagin, key structural features in the coordination of the catalytic zinc ion had their deuteration profiles altered when in complex, whereas for BJ46a the N-terminal region is significantly protected from the isotopic exchange. The understanding of BJ46a inhibitory mechanism may lead to the development of new effective targeted therapeutics to prevent local tissue damage in ophidic accidents, and for other diseases associated with an imbalance in the catalytic activity and/or expression of metalloendopeptidases.

**Keywords:**

natural resistance;metalloendopeptidase inhibitor;molecular modeling

**Título:**

Caracterização funcional de candidatos a receptores olfativos no vetor da doença de Chagas, Rhodnius prolixus

**Autor:**

THIAGO ANDRADE FRANCO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

FRANCO, T.A.

**Data da Defesa:**

06/11/2018

**Resumo:**

O Rhodnius prolixus é um dos vetores da doença de Chagas, que é endêmica na América Latina. Estima-se que há aproximadamente 7,5 milhões de portadores da doença. A transmissão por inseto vetor é estimada em 29.925/ano. O contato triatomíneo/hospedeiro ocorre através da detecção de semioquímicos (odores) pelas sensilas das antenas no processo da olfação. A olfação envolve diferentes proteínas com destaque para os receptores olfativos (ORs). ORs são proteínas do tipo GPCRs (G-protein-coupled receptors), ancoradas a membrana dos neurônios sensoriais olfativos representando, a porta de entrada dos estímulos olfativos. Nos insetos para que um OR se torne funcional é necessária a co-expressão do correceptor olfativo, ORCO. O comportamento de um inseto, portanto, dependerá da interpretação dos odores presentes no meio ambiente. Assim, bloquear a detecção de odores emanados pelo ser humano pode contribuir para evitar a transmissão do Trypanosoma cruzi. Este estudo teve como principais objetivos (1) deorfanizar ORs de R. prolixus e (2) identificar semioquímicos fisiologicamente ativos. Através de bioinformática foram selecionados 28 candidatos a ORs dentre os 116 descritos no genoma. A seleção foi baseada na homologia das sequências de ORs descritos como funcionais em outros insetos. RNAs para os ORs candidatos foram encontrados exclusivamente nas antenas. Estes transcritos foram quantificados por técnica de PCR quantitativo e 4 receptores foram selecionados para clonagem no vetor pGEMHE, e expressão em ovócitos de Xenopus laevis. Os pares dos 4 ORx/ORCO expressos em ovócitos foram testados, por técnica de eletrofisiologia (patch clamp), usando 109 semioquímicos, individualmente e em diferentes concentrações. Destes, os compostos 2-heptanona, γ-octalactona, acetofenona e 4 metilciclohexanol foram capazes de produzir a despolarização da membrana do ovócito que expressava o complexo OR80-ORCO. Os bioensaios mostraram que todos os quatro compostos fisiologicamente-ativos no patch clamp promoviam, em diferentes concentrações, ação repelente nos insetos. O álcool 4-metilciclohexanol apresentou a melhor performance na ação repelente. Para confirmar a hipótese de que o OR80 estava envolvido na detecção do 4-metilciclohexanol, os insetos foram silenciados por RNA de interferência. Os insetos tratados com dsOR80 apresentaram uma redução de 77% nos níveis de transcritos, esta redução promoveu a perdar da capacidade de detecção do 4-metilciclohexanol revertendo completamente a ação repelente deste composto. Este resultado confirmou a participação do OR80 na detecção do 4 metilciclohexanol. Este trabalho apresentou a prospecção de 4 semioquímicos capazes de repelir o R. prolixus, e a participação do OR80 na detecção de um deles. Em um futuro próximo, estes semioquímicos poderão vir a ser empregados individualmente ou em conjunto como repelentes para triatomíneos.

**Palavras-chave:**

Rhodnius prolixus;receptor olfativo;repelente;RNAi;deorfanização

**Abstract:**

Rhodnius prolixus is one of the vectors of Chagas disease, which is endemic in Latin America. It is estimated that there are approximately 7.5 million people with the disease. Transmission by insect vector is estimated at 29,925 / year. The triatomine / host contact occurs through the detection of odors (semiochemical) by the sensilla in the antennas in the olfaction process. Olfaction involves different proteins with prominence for odorant receptors (ORs). ORs are GPCRs (G-protein-coupled receptors), anchored to the membrane of olfactory sensory neurons representing the entrance port of olfactory stimuli. In the insects for an OR to become functional, co-expression of the olfactory coreceptor, ORCO, is required. The behavior of an insect, therefore, will depend on the interpretation of the odors present in the environment. Thus, blocking the detection of odor emanating from humans may contribute to avoiding the transmission of Trypanosoma cruzi. The main objectives of this study were to (1) deorphinate ORs from R. prolixus and (2) to identify physiologically active semiochemicals. Through bioinformatics, 28 candidates for ORs were selected from among the 116 described in the genome. Selection was based on the homology of sequences of ORs described as functional in other insects. RNAs for ORs candidates were found exclusively in the antennas. These transcripts were quantified by quantitative PCR technique and four receptors were selected for cloning in the pGEMHE vector, and expression in oocytes of Xenopus laevis. The 4 pairs of the ORx/ ORCO expressed in oocytes were tested by electrophysiology (patch clamp), using 109 semiochemicals, individually and in different concentrations. Of these, the compounds 2-heptanone, γ-octalactone, acetophenone and 4-methylcyclohexanol were able to produce depolarization of the oocyte membrane expressing the OR80-ORCO complex. The bioassays showed that all four physiologically active compounds in the patch clamp promoted, in different concentrations, insect repellent action. The alcohol 4-methylcyclohexanol presented the best performance in the repellent action. To confirm the hypothesis that OR80 was involved in the detection of 4-methylcyclohexanol, the insects were silenced by RNA of interference. The insects treated with dsOR80 showed a 77% reduction in transcript levels, this reduction promoted the loss of the ability to detect 4-methylcyclohexanol by completely reversing the repellent action of this compound. This result confirmed the participation of OR80 in the detection of 4-methylcyclohexanol. This work presented the prospection of 4 semiochemicals capable of repelling R. prolixus, and the participation of OR80 in the detection of one of them. In the near future, these semiochemicals may be used individually or together as triatomine repellents. Keywords: , , ,

**Keywords:**

Rhodnius prolixus;odorant receptor;repellent;RNAi;deorphanization

**Título:**

Clonagem e Expressão do Gene ASP3 de Saccharomyces cerevisiae em Escherichia coli

**Autor:**

WAGNER LOPES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

LOPES, W.

**Data da Defesa:**

05/11/2018

**Resumo:**

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia maligna do sistema hematopoiético caracterizada pela alteração do crescimento e proliferação das células linfoblásticas na medula óssea com consequente acúmulo de células jovens indiferenciadas. A enzima L-asparaginase é usada como agente antineoplásico na quimioterapia da LLA e possui grande interesse para a medicina e para a comunidade científica. As enzimas utilizadas no tratamento da LLA são obtidas através das bactérias Escherichia coli e Erwinia chrysanthemi. No entanto, ambas as formas nativas causam hipersensibilidade clínica e reações alérgicas agudas. Este medicamento é considerado estratégico para o Sistema Único de Saúde (SUS), sem produção de biossimilares no País e para aplicações clínicas depende de importação. Por esses motivos, a busca de novas fontes de asparaginase e a construção de genes para o aumento da expressão de forma recombinante são notavelmente atrativas. Neste trabalho, o gene ASP3 que codifica a asparaginase II em de S. cerevisiae foi clonado em E. coli utilizando os vetores pET28a (expressão intracelular) e pET22b (expressão extracelular). A confirmação do gene foi realizada por sequenciamento de DNA e a proteína recombinante foi confirmada por espectrometria de massas. A expressão da asparaginase, em frascos agitados, para a construção com pET28a-ASPII foi maior, quando se considera a atividade total obtida (atividade extracelular somada à atividade no pellet), apresentando 240,15 UI/g de célula, enquanto que para pET22b-ASPII, foi obtido o valor total de 209,5 UI/g de célula. Em experimentos preliminares de purificação, a enzima extracelular obtida com a construção pET22b-ASPII não apresentou atividade enzimática. No entanto, a asparaginase II intracelular solúvel obtida através da construção pET28a-ASPII foi purificada por afinidade e apresentou a atividade específica de 7,85 UI/mg de proteína . O fato de a proteína ter sido purificada com atividade enzimática sugere que a glicosilação não desempenha papel essencial na atividade da asparaginase II de S. cerevisiae. A massa molar da subunidade da enzima em gel desnaturante foi de aproximadamente 38 kDa, enquanto a forma nativa, estimada por cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200, foi de 178 kDa, sugerindo uma estrutura tetramérica para a proteína, como ocorre para as enzimas de E. coli e E. chrisanthemi. Esse valor difere do obtido para a asparaginase II recombinante expressa em P. pastoris, que foi de 136 kDa. O ponto isoelétrico (pI) estimado foi de 4,3, próximo ao pI da proteína expressa em P. pastoris e da proteína nativa de E. coli, 4,5. A enzima recombinante apresentou baixa atividade glutaminásica, o que possibilita a sua utilização como medicamento por apresentar menor risco de efeitos tóxicos durante a terapia contra o câncer. Também apresentou atividade antitumoral dose-dependente em testes com as linhagens celulares leucêmicas K562 e Jurkat, com IC50 de 3,63 e 1,77 UI/mL, respectivamente. O conjunto dos resultados indica a asparaginase II de S. cerevisiae recombinante expressa em E. coli como um potencial medicamento a ser desenvolvido para o tratamento da LLA.

**Palavras-chave:**

Leucemia linfoblástica aguda (LLA);Asparaginase II;Saccharomyces cerevisiae;Gene ASP3;Escherichia coli

**Abstract:**

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant neoplasia of the hematopoietic system characterized by altered growth and proliferation of lymphoblastic cells in the bone marrow, with consequent accumulation of undifferentiated young cells. The enzyme L-asparaginase is used as an antineoplastic agent in the chemotherapy of ALL and is of great interest to medicine and the scientific community. The enzymes used in the treatment of ALL are obtained by Escherichia coli and Erwinia chrysanthemi. However, both native forms cause clinical hypersensitivity and acute allergic reactions. This enzyme is a product considered strategic in prospective studies in the area of Public Health in Brazil, without production of biosimilars in the country and for clinical applications depends on importation. For these reasons, the search for new sources of asparaginase and the construction of genes to increase expression in a recombinant way are remarkably attractive. In this work, the ASP3 gene that natively expresses asparaginase II in small concentrations by S. cerevisiae was cloned in E. coli using the vectors pET28a (intracellular expression) and pET22b (extracellular expression). Gene confirmation was performed by DNA sequencing and the recombinant protein sequence was confirmed by Mass Spectrometry. The expression of asparaginase in stirred flasks for the construction with pET28a-ASPII was higher when considering the total activity obtained by ammonium dosing (extracellular activity added to pellet activity). For the pET28a-ASPII construct, this value was 240.15 IU/g cell, while for pET22b-ASPII, the total value was 209.5 IU/g cell. In preliminary purification experiments, the extracellular enzyme obtained with the pET22b-ASPII construct showed no enzymatic activity. However, the soluble intracellular asparaginase II obtained through the pET28a-ASPII construct was affinity purified and presented a specific activity of 7.85 IU mg-1 of protein. The fact that the protein has been purified with enzymatic activity indicates that glycosylation does not appear to play an essential role in asparaginase II activity, which makes E. coli to be used as a recombinant asparaginase II expression system. The molar mass of the subunit in denaturing gel enzyme was approximately 38 kDa, while the native form, estimated by exclusion chromatography on Superdex 200, was 178 kDa, suggesting a tetrameric structure, such as those of E. coli and E. chrysanthemi. This molecular mass differs from the recombinant asparaginase II expressed in P. pastoris which was 136 kDa. The estimated isoelectric point (pI) was 4.3, approximate to the pI of the asparaginase II expressed in P. pastoris and native E. coli protein, 4.5. The recombinant enzyme showed low glutaminase activity, which makes it possible to use it as a drug because it presents a lower risk of toxic effects during cancer therapy. It also showed antitumor activity against the K562 and Jurkat cell lines in a dose-dependent manner with IC50 of 3.63 and 1.77 IU/mL, respectively. Therefore, due to these results the recombinant asparaginase II expressed in E. coli has promising characteristics for use as a medicament for the treatment of ALL.

**Keywords:**

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL);Asparaginase II;Saccharomyces cerevisiae;ASP3 gene;Escherichia coli

**Título:**

Estratégia molecular da alta performance para sorotipagem do vírus da dengue em ovos de mosquitos: prospecção da transmissão transovariana do vírus em Aedes aegypti

**Autor:**

TIAGO SOUZA SALLES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

SALLES, T.S.

**Data da Defesa:**

30/10/2018

**Resumo:**

Atualmente, a dengue é a arbovirose que acomete mais de um terço da população mundial em países tropicais e subtropicais, sendo responsável por cerca de 100 milhões de casos anuais. De 2011 a 2017 nas Américas foram confirmados mais de 9 milhões de casos de dengue. A dengue é uma doença causada por um vírus da família Flaviviridae, do gênero Flavivírus, que inclui 4 diferentes sorotipos (DENV-1-4), transmitida por mosquitos do gênero Aedes. Devido a ausência de vacinas e de agentes antivirais eficazes que possam prevenir e controlar a infecção da dengue, a estratégia de controle do vetor tem sido a melhor medida na profilaxia da doença. A detecção rápida do vírus dentro do mosquito, em uma área, sinaliza a necessidade imediata de combate ao vetor nesta região. Outro fato importante é que o reservatório natural do vírus da dengue ainda não foi identificado. A comprovação da transmissão transovariana no mosquito justificaria a existência de grandes epidemias, sem tráfego de pessoas infectadas, uma vez que os mosquitos já nasceriam infectados. O objetivo deste trabalho foi verificar a transmissão transovariana do vírus da dengue no mosquito Aedes aegypti, tanto em ovos coletados no campo como em ovos de mosquitos infectados com o DENV-3 no laboratório. Também foi verificada a capacidade do vírus isolado de mosquito coletado no campo de infectar novas células hospedeiras. Inicialmente foram desenhados primers de oligonucleotídeos específicos para sorotipagem do vírus da dengue, baseando-se nos relatos da literatura. Além disso, foi confeccionado um par de primers que abrange todos os sorotipos do vírus. Foram também desenhados novos primers de oligonucleotídeos diferentes dos descritos na literatura. Para validação dos primers foram preparadas amostras virais dos sorotipos padrões DENV-1-4, o mRNA foi extraído e confeccionado o cDNA para usar na reação de PCR convencional. Para quantificação absoluta foram construídos a partir de clonagem em pGEM-T easy, plasmídeos contendo o fragmento alvo dos DENV-1-4 a ser utilizado como padrão. Para quantificação dos sorotipos de DENV-1-4 foi estabelecido uma curva padrão utilizando os plasmídeos virias como template no ensaio de PCR quantitativo por SYBR Green, as taxas de eficiência dos primers foram avaliadas, foi correlacionado o valor de CT (CycleThreshold) com o número de cópias de RNA viral para quantificação (curva padrão). Os primers foram validados por PCR convencional e o PCR quantitativo. Com as construções dos plasmídeos virais em pGEM-T easy, foi possível produzir quatro curvas padrões e correlacionar os valores de CTs com o número de cópias de vírus. Os testes de eficiência dos primers para quantificação dos sorotipos na reação qPCR foram acima de 90% quando utilizados os novos conjuntos de primers, ou seja, mais eficiente do que os primers descritos na literatura. Nos ensaios de RT-PCR foram detectados o DENV-4, em 3 dos 4 grupos de ovos da geração F2 cepa Aedes-RIO. Este fragmento foi amplificado, clonado e vetor pGem-T easy, que foi transformado em células de bactéria e encaminhado para o sequenciamento. Com a sequência obtida foi feita uma análise utilizando o programa Blastn, e o fragmento sequenciado apresentou alta similaridade com o DENV-4 no NCBI, confirmando a presença do DENV-4. Além da cepa Aedes-RIO proveniente do campo, foram testados ovos de outras localidades da cidade do Rio de Janeiro, como: bairro da Urca, Paquetá, Vila Kennedy, Bangu, Ilha do Fundão e do Município de Volta Redonda. Onde foram detectados por técnica de RT-PCR a presença do DENV-1 nos ovos da Urca, Vila Kennedy, Ilha do Fundão e Volta Redonda. A presença de DENV-2 na localidade da Urca, Vila Kennedy e Volta Redonda. No cDNA das fêmeas infectadas em laboratório foi identificado um fragmento de 146pb correspondente a identificação de uma região comum a todos os sorotipos do DENV. Esse fragmento genômico do vírus isolado do mosquito foi amplificado, purificado e sequenciado. A sequência obtida foi utilizada como sequência molde na busca de sequencias depositadas no NCBI utilizando o programa Blastn. O fragmento sequenciado apresentou alta similaridade com o DENV-3, confirmando o sucesso da infecção do mosquito em laboratório. Em seguida, foi feito o RT-PCR dos ovos das fêmeas alimentadas com o vírus em laboratório e confirmado a presença DENV-3. A descoberta do vírus da dengue em ovos postos, por mosquito, justificaria a ocorrência de grandes epidemias de dengue observadas, após períodos de chuvas, em locais aonde não existia a doença. Esta descoberta também abre a possibilidade de identificação de vírus a partir de ovos, inovando o monitoramento de controle epidemiológico da dengue.

**Palavras-chave:**

dengue;epidemiologia;Aedes aegypti;diagnóstico;transmissão vertical

**Abstract:**

Currently, dengue is arboviruses that affect more than a third of the world population in tropical and subtropical countries, accounting for about 100 million cases annually. From 2011 to 2017 in the Americas more than 9 million cases of dengue have been confirmed. Dengue is a disease caused by a virus of the Flaviviridae family, of the genus Flavivirus, which includes 4 different serotypes (DENV-1-4), transmitted by mosquitoes of the genus Aedes. Due to the absence of effective vaccines and antiviral agents that can prevent and control dengue infection, the vector control strategy has been the best measure in the prophylaxis of the disease. The rapid detection of the virus within the mosquito in an area signals the immediate need to combat the virus in this region. Another important fact is that the natural reservoir of the dengue virus has not yet been identified. Evidence of the mosquito transovarian transmission would justify the existence of major epidemics, without traffic of infected persons, since the mosquitoes would already be infected. The objective of this work was to verify the transovarian transmission of the dengue virus in the Aedes aegypti mosquito, both in the eggs collected in the field and in eggs of mosquitoes infected with DENV-3 in the laboratory. The ability of the isolated mosquito virus collected in the field to infect new host cells was also checked. Initially, specific oligonucleotide primers were designed for serotyping of the dengue virus, based on reports in the literature. In addition, a pair of primers covering all serotypes of the virus was made. New oligonucleotide primers other than those described in the literature were also designed. For validation of the primers, viral samples of the standard serotypes DENV-1-4 were prepared, the mRNA was extracted, and the cDNA prepared for use in the conventional PCR reaction. For absolute quantification were constructed from cloning into pGEM-T easy, plasmids containing the target fragment of DENV-1-4 to be used as standard. For quantification of the DENV-1-4 serotypes a standard curve was established using the plasmids as a template in the quantitative PCR assay by SYBR Green, the efficiency rates of the primers were evaluated, the CT value (CycleThreshold) was correlated with the number of viral RNA copies for quantification (standard curve). Primers were validated by standard PCR and quantitative PCR. With the constructs of the viral plasmids in pGEM-T easy, it was possible to produce four standard curves and to correlate the CT values with the number of virus copies. The efficiency tests of the primers for serotypes quantification in the qPCR reaction were above 90% when using the new primer sets, that is, more efficient than the primers described in the literature. In the RT-PCR assays DENV-4 was detected in 3 of the 4 egg groups of the Aedes-RIO strain F2 generation. This fragment was amplified, cloned and pGem-T easy vector, which was transformed into bacterial cells and routed for sequencing. The sequence obtained was analyzed using the Blastn program, and the sequenced fragment showed high similarity with DENV-4 in NCBI, confirming the DENV-4 presence. In addition to the field Aedes-RIO strain eggs were tested from other locations in the city of Rio de Janeiro, such as Urca, Paquetá, Vila Kennedy, Bangu, Ilha do Fundão and Volta Redonda cities. Where the presence of DENV-1 in the eggs of Urca, Vila Kennedy, Ilha do Fundão and Volta Redonda were detected by RT-PCR technique. The presence of DENV-2 in the locality of Urca, Vila Kennedy and Volta Redonda. In the cDNA of infected females in the laboratory a 146pb fragment corresponding to the identification of a region common to all the serotypes of the DENV was identified. This genomic fragment of virus isolated from the mosquito was amplified, purified and sequenced. The sequence obtained was used as template sequence in the search for sequences deposited in the NCBI using the Blastn program. The sequenced fragment showed high similarity with DENV-3, confirming the success of mosquito infection in the laboratory. Then, RT-PCR of the eggs of the females fed with the virus was done in the laboratory and the presence of DENV-3 was confirmed. The discovery of the dengue virus in laying eggs, by mosquito, would justify the occurrence of large epidemics of dengue observed after periods of rainfall in places where the disease did not exist. This discovery also opens the possibility of virus identification from eggs, innovating the monitoring of epidemiological control of dengue.

**Keywords:**

dengue;epidemiology;Aedes aegypti;diagnosis;vertical transmission

**Título:**

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE ODOR (OBPs) DE Rhodnius prolixus

**Autor:**

DANIELE SILVA DE OLIVEIRA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

OLIVEIRA, D.S.

**Data da Defesa:**

05/10/2018

**Resumo:**

Rhodnius prolixus é um dos principais vetores da doença de Chagas. Estímulos químicos desencadeiam comportamentos essenciais para sua sobrevivência. O estudo de proteínas envolvidas na quimiorecepção como as proteínas ligadoras de odor (OBPs), pode auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas de controle deste vetor. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a caracterização funcional de OBPs de Rhodnius, utilizando ferramentas de biologia molecular e de proteômica. A primeira etapa deste estudo envolveu a análise do perfil de expressão de 17 OBPs em diferentes tecidos de insetos adultos através de PCR convencional. O PCR revelou que 11 OBPs eram expressos em todos os tecidos, e apenas 6 mostraram-se específicos de antenas. A análise por qPCR mostrou que os genes OBP6 e OBP13 estavam expressos em grandes quantidades nas antenas de insetos machos e fêmeas, sugerindo que as OBPs transportem semioquímicos que induzem comportamentos comuns a ambos os sexos, como a busca do hospedeiro para alimentação sanguínea. Transcritos para os genes OBP17 e OBP21 foram encontrados em maiores quantidades nas antenas de insetos fêmeas, indicando que as proteínas podem estar envolvidas na detecção de feromônios de oviposição. Em contrapartida, os genes OBP26 e OBP27, foram significativamente expressos nas antenas de insetos machos, assinalando que as proteínas estejam envolvidas na detecção de feromônios sexuais. Para testar essa hipótese, o OBP27 foi silenciado usando RNA de interferência e os efeitos fenotípicos deste silenciamento foram avaliados por bioensaios. Os insetos machos tratados com dsOBP27 apresentaram mudança no comportamento de busca e identificação dos insetos fêmeas. A análise de docking mostrou que a OBP27 se liga aos feromônios sexuais putativos produzidos pelas glândulas metasternais das fêmeas. Portanto, associando os dados de comportamento com a análise de docking concluímos que OBP27 é a proteína responsável pela identificação dos feromônios. Paralelamente, foi realizada a análise do perfil de fosfoproteínas e a identificação de vias de sinalização olfativa em Rhodnius. Em gel 2-DE observou-se que OBPs e outras proteínas das antenas tratadas com fosfatase migravam para áreas mais básicas em SDS-PAGE, significando mudanças nos pIs. As proteínas foram extraídas dos géis e tripsinizadas. Os peptídeos foram analisados por nano LC-MS/MS e identificados no programa Mascot. Cinco OBPs e 1 CSP apresentaram possíveis peptídeos fosforilados. Oito proteínas fosforiladas envolvidas nas vias de transdução de sinal olfativa de insetos também foram identificadas. Com estes dados foi possível propor um modelo do mecanismo ativo de ligação e de transporte de odores pelas OBPs através de fosforilação e defosforilação. Assim, a associação de diferentes técnicas permitiu obter conclusões consistentes sobre como ocorre o processo de olfação em Rhodnius. Além disso, a alteração da capacidade de identificação dos insetos fêmeas pelos machos, após silenciamento do OBP27, indica que podemos prospectar produtos para evitar o acasalamento e diminuir a densidade populacional deste vetor.

**Palavras-chave:**

Rodnius prolixus;Proteínas ligadoras de odor;OBPs;RNAi;Fosfoproteômica

**Abstract:**

Rhodnius prolixus is one of the main vectors of Chagas disease. Chemical stimuli trigger essential behaviors to their survival. The study of proteins involved in chemoreception as odorant binding proteins (OBPs), may help in the development of new vector control techniques. Thus, this work aimed at the functional characterization of Rhodnius OBPs, using molecular biology and proteomics. The first step of this study involved the analysis of 17 OBPs expression profile in different tissues of adult insects through conventional PCR. PCR revealed that 11 OBPs were expressed in all tissues, and only 6 were antenna specific. The analysis by qPCR showed that OBP6 and OBP13 genes were expressed in large amounts in male and female insect antennae, suggesting that OBPs transport semiochemicals that induce behaviors common to both sexes, such as the host seeking for a blood feed. Transcripts for OBP17 and OBP21 genes were found in larger amounts in female insect antennae, indicating that the proteins may be involved in the detection of oviposition pheromones. In contrast, OBP26 and OBP27 genes were significantly expressed in male insect antennae, indicating that the proteins are involved in the detection of sex pheromones. To test this hypothesis, OBP27 was silenced using RNA interference and the phenotypic effects of this silencing were evaluated by bioassays. Male insects treated with dsOBP27 showed a change in search and identification behavior of female insects. The docking analysis showed that OBP27 binds to the putative sex pheromones produced by the female’s metasternal glands. Therefore, associating the behavior data with the docking analysis we conclude that OBP27 is the protein responsible for the identification of pheromones. In parallel, the analysis of the phosphoprotein profile and the identification of olfactory signaling pathways in Rhodnius were carried out. In 2-DE gel it was observed that OBPs and other proteins from the antennae treated with phosphatase migrated to more basic areas on SDS-PAGE, meaning changes in the pIs. Proteins were extracted from the gels and trypsinized. The peptides were analyzed by nano LC-MS/MS and identified in the Mascot program. Five OBPs and 1 CSP showed possible phosphorylated peptides. Eight phosphorylated proteins involved in insect’s olfactory signal transduction pathways were also identified. With these data it was possible to propose a model of the active OBPs mechanism of binding and transport of odors through phosphorylation and dephosphorylation. Thus, the association of different techniques allowed obtaining consistent conclusions on how the process of Rhodnius olfaction occurs. In addition, the alteration of the female identification capacity by the males, after OBP27 silencing, indicates that we can prospect products to avoid mating and decrease the population density of this vector.

**Keywords:**

Rodnius prolixus;Odorant binding proteins;OBPs;RNAi;Phosphoproteome

**Título:**

ESTUDO DA PROTEÍNA SOD1 HUMANA COM MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAL E SUA RELAÇÃO COM A DEFESA EM CÉLULAS SOB DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO.

**Autor:**

RAYNE STFHANY SILVA MAGALHAES

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

MAGALHAES, R. S. S.

**Data da Defesa:**

04/10/2018

**Resumo:**

Esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva dos neurônios motores, o que leva a atrofia, rigidez e fraqueza muscular. É uma doença fatal e de rápido desenvolvimento, tendo uma expectativa de vida de aproximadamente 5 meses após o surgimento dos sintomas. 20 % dos casos da forma familial de ELA (ELAf) estão relacionados com mutações no gene SOD1 que codifica a enzima antioxidante Cu/Zn Superóxido dismutase 1. Já foram identificadas mais de 100 mutações neste gene e relacionadas diretamente com a doença. Porém apesar de já serem mais de duas décadas estudando mutações em SOD1, ainda não se sabe ao certo a relação destas com o desenvolvimento de ELA. Portanto, o objetivo do trabalho foi identificar como a presença das mutações A4V, L38V, G93A e G93C em SOD1 podem influenciar na sua função antioxidante, assim como na formação de aglomerados. Primeiramente, usando células H4 (neuroglioma) transfectadas com SOD1 wild-type (WT) ou mutantes, acopladas ao sistema BiFC (do inglês Bimolecular fluorescence complementation), observamos que as mutações A4V, L38V, G93A e G93C formam aglomerados sob condições normais de crescimento, além de induzirem uma queda na localização nuclear de aproximadamente 50 %, quando comparadas a WT. Os resultados também mostraram que a presença das mutações aumentam o dano ao DNA, os níveis intracelulares de EROS (espécies reativas de oxigênio), assim como a carbonilação da proteína SOD1, indicando um dano ao sistema de proteção antioxidante. Apesar de ser um modelo mais próximo para o estudo da doença, células H4 possuem SOD1 endógena, o que pode influenciar nos resultados observados em células que expressam as mutantes na proteína. Além disto, células humanas crescem constantemente sob metabolismo oxidativo, de forma que não se pode estudar como as células humanas se comportam frente indução de estresse oxidativo. Para contornar este problema, o outro modelo experimental usado foi a levedura Saccharomyces cerevisiae, o qual é um modelo que vem sendo bastante empregado na literatura para o estudo de doenças humanas. Células de S.cerevisiae deletadas em sod1 de levedura (Δsod1), expressando SOD1 humana WT e as respectivas mutantes, em fase exponencial (28ºC, sem nenhum tipo de estresse), foram tratadas com agente oxidante menadiona, a fim de induzir um estresse oxidativo. Neste modelo observamos que apesar da atividade enzimática nas cepas com a mutação A4V ser igual a atividade da SOD1 WT, esta mutação apresentou uma queda na proteção celular contra os danos oxidativos. Foi observado um aumento na peroxidação lipídica, nos níveis de proteína carbonilada total, e uma queda na viabilidade celular frente a diferentes concentrações de menadiona. Em contrapartida, a mutação G93A apresentou níveis de atividade enzimática inferiores aos níveis observados na WT e um aumento na oxidação intracelular pós estresse oxidativo, indicando que esta mutação apresenta uma deficiência no controle do equilíbrio redox intracelular. Sob estresse oxidativo, a mutação A4V apresentou uma maior propensão em formar aglomerados, quando comparados com a mutação G93A. Desta forma o presente trabalho mostra que o desenvolvimento da doença não está diretamente ligado a perda de atividade enzimática. Tem forte ligação com formação de aglomerados e a perda da capacidade de proteção antioxidante da célula, tanto num metabolismo respiratório, quanto num metabolismo oxidativo induzido por menadiona. Além disto, os resultados indicam que as mutações A4V e G93A são mais prejudiciais as células.

**Palavras-chave:**

SOD1;Esclerose Lateral Amiotrófica familial;neurodegenração;neuroglioma;Saccharomyces cerevisiae;estresse oxidativo

**Abstract:**

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by progressive loss of motor neurons, which leads to muscle atrophy, stiffness and weakness. It is a fatal and rapidly developing disease, with a life expectancy of approximately 5 months after the onset of symptoms. 20% of cases of the familial form of ALS (fALS) are related to mutations in the SOD1 gene encoding the antioxidant enzyme Cu / Zn Superoxide dismutase 1. More than 100 mutations in this gene have been identified and are directly related to the disease. However, despite the fact that they have been studying mutations in SOD1 for more than two decades, their relationship with the development of ALS is still uncertain. Therefore, the objective of this work was to identify how the presence of A4V, L38V, G93A and G93C mutations in SOD1 may influence its antioxidant function, as well as the formation of agglomerates. First, using human H4 cells (neuroglioma) transfected with SOD1 wild-type (WT) or mutants, coupled to the Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system, we observe that the mutations A4V, L38V, G93A and G93C form agglomerates under normal growth conditions , in addition to inducing a drop in nuclear localization of approximately 50% when compared to WT. The results also showed that the presence of mutations increased DNA damage, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), as well as carbonylation of SOD1 protein, indicating an impairment to the antioxidant protection system. Despite being a model closer to the study of the disease, H4 cells have endogenous SOD1, which may influence the results observed in cells expressing the mutants in the protein. In addition, human cells grow under oxidative metabolism, making it difficult to study how human cells behave under induction of oxidative stress. To overcome this problem, the other model used was the yeast Saccharomyces cerevisiae, which is a model that has been widely used in the literature for the study of human diseases. Cells of S.cerevisiae deleted in yeast sod1 (Δsod1), expressing human SOD1 WT and the respective mutants, in exponential phase (28 ° C, without any type of stress), were treated with the oxidizing agent menadione, in order to induce an oxidative stress. In this model we observed that although the enzymatic activity in the strains with the A4V mutation was equal to the SOD1 WT activity, this mutation showed a decrease in the cellular protection against oxidative damage. An increase in lipid peroxidation, total carbonylated protein levels, and a decrease in cell viability against different concentrations of menadione were observed. In contrast, the G93A mutation had levels of enzymatic activity lower than the levels observed in WT and an increase in intracellular oxidation after oxidative stress, indicating that this mutation has a deficiency in the control of intracellular redox balance. Under oxidative stress, the A4V mutation is more likely to form agglomerates when compared to the G93A mutation. Thus, the present work shows that the development of the disease is not directly related to loss of enzymatic activity. It has strong link with agglomerates formation and the impairment of the antioxidant protection, both in respiratory metabolism and in oxidative metabolism induced by menadione. In addition, the results indicate that A4V and G93A mutations are more damaging to cells.

**Keywords:**

SOD1;familial Amyotrophic Lateral Sclerosis;neurodegeneration;human neuroglioma;Saccharomyces cerevisiae;oxidative stress

**Título:**

Potencial antifúngico de compostos de coordenação à prata, manganês e cobre contra espécies fungica multirresistentes pertencentes ao complexo Candida haemulonii: ensaios in vitro e in vivo.

**Autor:**

RAFAEL MESSIAS GANDRA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

GANDRA, R.M.

**Data da Defesa:**

20/09/2018

**Resumo:**

As espécies que formam o complexo Candida haemulonii (C. haemulonii, C. haemulonii var. vulnera e C. duobushaemulonii) são patógenos emergentes que apresentam múltipla resistência às drogas antifúngicas comumente utilizadas no tratamento das fungemias. Compostos de coordenação contendo 1,10-fenantrolina como ligante, apresentam uma potente atividade anti-Candida, sendo portanto possíveis alternativas para o tratamento de fungemias causadas por tais espécies multirresistentes. Além disso, larvas de Galleria mellonella vêm sendo cada vez mais utilizadas em ensaios de virulência e em testes de eficácia de compostos, uma vez que seu sistema imune inato apresenta similaridades com o de mamíferos, apresentando uma boa correlação com dados obtidos em modelos murinos. Sendo assim, no presente estudo, 19 compostos de coordenação contendo cobre(II) (n=7), manganês(II) (n=7) e prata(I) (n=5) foram avaliados quanto a seu potencial antifúngico contra as espécies do complexo C. haemulonii. Além disso, os efeitos dos compostos em um sistema in vivo e sua aplicabilidade no tratamento de fungemia foram investigados utilizando-se larvas de Galleria mellonella como modelo. Três isolados de cada espécie do complexo foram utilizados e o efeito dos compostos de coordenação na viabilidade de células planctônicas foi avaliado utilizando-se o protocolo publicado pelo CLSI (documento M27-A3) e utilizando-se XTT em células crescendo em biofilme. A toxicidade dos compostos para células epiteliais pulmonares da linhagem A549 foi avaliada utilizando-se MTT. Os resultados iniciais evidenciaram que a maior parte dos compostos foi capaz de inibir a proliferação das células planctônicas, sendo os compostos de coordenação à prata(I) os mais eficazes (média geométrica geral da concentração inibitória mínima (MG-CIM) variou entre 0,26 e 2,16 μM), seguidos respectivamente pelos compostos de manganês(II) (MG-CIM entre 0,87 e 10,71 μM) e cobre(II) (MG-CIM geral entre 3,37 e >72 μM). Os compostos de manganês(II) apresentaram as menores taxas de toxicidade às células A549, seguidos pelos compostos de prata(I) e cobre(II), respectivamente. Os compostos foram menos ativos quando testados em biofilme maduro, apresentando valores de CIM entre 2 e 33× maiores quando comparadas às CIMs obtidas com as células plactônicas. A cepa LIPCh4 foi então selecionada para os ensaios subsequentes, bem como os compostos de maganês(II) e prata(I). Os ensaios utilizando-se G. mellonella revelaram que C. haemulonii possui uma virulência reduzida quando comparada à C. albicans e tal virulência foi maior a 30°C quando comparada a 37°C. A infecção fúngica foi capaz de induzir uma resposta imune nas larvas de forma inóculo-dependente, que foi corroborada pela flutuação no número de hemócitos presentes na hemolinfa dos animais e pelo processo de melanização. De forma similiar, uma resposta imune dose-dependente frente à exposição aos compostos de coordenação também foi observada, resultando em aumento ou redução dos hemócitos circulantes de acordo com o composto testado, bem como impactando na expressão de peptídeos antimicrobianos relacionados ao sistema imune (transferrina, inibidor de metaloproteinase de inseto (IMPI), galiomicina e gallerimicina) detectados por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Nenhum dos compostos de coordenação apresentou toxicidade capaz de induzir mortalidade em concentrações até 10 μg/larva, porém diferentes níveis de toxicidade foram observados em concentrações entre 15 e 100 μg/larva. Finalmente, alguns compostos foram capazes de afetar a carga fúngica de larvas infectadas. Nesse sentido, o tratamento das larvas com os compostos de manganês Mn2(oda)(phen)4(H2O)2][Mn2(oda)(phen)4(oda)2]4H2O (13) e {[Mn(3,6,9-tdda)(phen)2].3H2O.EtOH}n (14) reduziu a carga fúngica, ao passo que os compostos [Mn(ph)(phen)(H2O)2] (8) e [Mn(tereph)(phen)2].5H2O (12) aumentaram a mesma. O prétratamento com concentrações subinibitórias dos compostos também foi capaz de reduzir de forma dose-dependente a virulência de C. haemulonii em G. mellonella. Os compostos de coordenação à cobre(II), manganês(II) e prata(I) são relativamente baratos e fáceis de serem sintetizados bem como apresentam atividade antifúngica significante contra as espécies pertencentes ao complexo C. haemulonii. Além disso, alguns compostos como 13 e 14 apresentaram baixa toxicidade para célula A549, induziram uma resposta imune protetora na larva, refletindo em uma redução na carga fúngica, bem como reduziram a virulência fúngica após exposição das leveduras a concentrações sub-inibitórias, indicando que tais compostos de coordenação podem se tornar potencias agentes terapêuticos para o tratamento de infecções fúngicas causadas por tais agentes etiológicos.

**Palavras-chave:**

Complexo Candida haemulonii;compostos de coordenação;virulência;Galleria mellonella

**Abstract:**

The species forming the Candida haemulonii complex (C. haemuloniii, C. haemulonii var. vulnera and C. duobushaemulonii) are emergent pathogens that are resistant to the most commonly used antifungal drugs in fungemia treatment. Coordination compounds containing copper(II), manganese(II) and silver(I) have a potent anti-Candida activity, being possible alternatives for the treatment of fungemia caused by such multidrug-resistant species. Besides that, Galleria mellonella larvae are becoming more commonly used in fungal virulence and infection treatment assays since its inate immune system possesses several similarities to mammals and the data obtained in such studies demonstrates a good correlation with data obtained in murine models. Therefore, 19 coordination compounds containing copper(II) (n=7), manganese(II) (n=7) and silver(I) (n=5) were assessed for their antifungal potential against the species belonging to the C. haemulonii complex. Besides that, the compounds effect over an in vivo system and their applicability in treatment of fungemia were investigated using G. mellonella larvae as model. Three isolates of each species of this fungal complex were used, and the effect of coordination compounds over planktonic cells viability was evaluated by the CLSI M27-A3 protocol and by using XTT over biofilm-growing cells. The cytotoxicity of the test compounds on lung epithelial cells (A549 lineage) was evaluated by MTT assay. Most of the coordination compounds were able to inhibit the planktonic cells’ proliferation, with silver(I) complexes being the most efficient (overall geometric mean of the minimum inhibitory concentration (GM-MIC) ranging from 0.26 to 2.16 μM), followed by the manganese (overall GM-MIC ranging from 0.87 to 10.71 μM) and copper (overall GM-MIC ranging from 3.37 to >72 μM) respectively. The manganese(II) compounds had the least toxicity towards A549 cells, followed by silver(I) and copper(II) compounds. When tested against a mature biofilm, the coordination compounds were less active, with increased MIC values ranging between 2- and 33-fold when compared whit the planktonic results. The strain LIPCh4 was selected for the further assays together both manganese(II) and silver(I) compounds. The experiments using G. mellonella revealed that C. haemulonii possesses reduced virulence when compared with C. albicans, and such virulence is higher at 30°C. The infection is capable of inducing an immune response in a typical inoculum-dependent manner in the larvae, reflected by fluctuations in the number of hemocytes present in the hemolymph and by the melanization process. Similarly, a dose-dependent immune response after exposition to the compounds was observed, which induced an increase or decrease in the number of hemocytes as well as impacting over the expression of antimicrobial peptides related to the immune system (transferrin, insect metalloproteinase inhibitor (IMPI), galiomycin and gallerimycin) detected by real-time polymerase chain reaction. None of the coordination compounds had toxicity capable of inducing mortality up to a concentration of 10 μg/larvae, while different toxicity levels were observed with concentrations ranging between 15 and 100 μg/larvae. Finally, the compounds were capable of affectin the fungal burden of infected G. mellonella. In this sense, larvae treated with the manganese compounds, Mn2(oda)(phen)4(H2O)2][Mn2(oda)(phen)4(oda)2]4H2O (13) and {[Mn(3,6,9-tdda)(phen)2].3H2O.EtOH}n (14), reduced the fungal burde, while compounds [Mn(ph)(phen)(H2O)2] (8) and [Mn(tereph)(phen)2].5H2O (12) increased it. Pre-treatment with sub-inhibitory concentrations of the compounds was also capable of reducing, in a dosedependent manner, the C. haeumlonii virulence on G. mellonella. Copper(II), manganese(II) and silver(I) coordination compounds are relatively cheap and easy to synthetize and possesses significant antifungal activity. Besides that, some of the compounds, such as 13 and 14 possesses low toxicity, induces an immune system response and are capable of reducing the fungal burden in G. mellonella infected by C. haemulinii, also reducing C. haemulonii virulence after yeast exposition to sub-inhibitory concentrations, indicating that such compounds are potential therapeutic agents in the treatment of fungal infections caused by such etiologic agent. Keywords: , , ,

**Keywords:**

Candida haemulonii;metal complexes;virulence;Galleria mellonella

**Título:**

Avaliação da função metabólica da oncoproteína NSD3s de humano e da Pdp3 de levedura.

**Autor:**

GERMANA BREVES RONA

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

RONA, G.B.

**Data da Defesa:**

18/09/2018

**Resumo:**

O câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento celular desordenado. Atualmente, é conhecida a existência de diferentes tipos de câncer, sendo o de mama o mais incidente entre as mulheres. A amplificação da região 11-12 do braço curto do cromossomo 8 consiste em uma das principais modificações genômicas ocorridas no câncer de mama, estando presente em aproximadamente 15% dos casos. Dentre os genes que formam esta região, o gene WHSC1L1/NSD3, que codifica uma histona metil-transferase, destaca-se como principal candidato a oncogene líder. NSD3s, a isoforma curta de NSD3, contendo apenas o domínio PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) amino-terminal, apresenta elevada capacidade transformante. O domínio PWWP de NSD3s apresenta semelhança estrutural com o domínio PWWP da proteína Pdp3 de Saccharomyces cerevisiae. A superexpressão de NSD3s ou de Pdp3 induz alterações metabólicas similares na levedura, como o aumento da taxa de crescimento, aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo e diminuição do consumo de oxigênio. Além disso, o domínio PWWP de NSD3s é capaz de substituir funcionalmente o domínio PWWP de Pdp3. Utilizando a metabolômica por RMN 1H, analisamos a as alterações no metaboloma da levedura em resposta à superexpressão de NS3s ou Pdp3. Foi possível observar um aumento nos níveis de aspartato e alanina, juntamente com uma diminuição nos níveis de arginina, em função da superexpressão de NSD3s ou Pdp3, sugerindo um aumento na taxa de glutaminólise. Além disso, certos metabólitos, como glutamato, valina e fosfocolina, foram específicos para NSD3s ou Pdp3, indicando que vias metabólicas adicionais são adaptadas de maneira dependente da proteína. A observação de que certas vias metabólicas são reguladas diferencialmente por NSD3s e Pdp3 sugere que, apesar da similaridade estrutural entre seus domínios PWWP, as duas proteínas atuam por mecanismos únicos e podem recrutar diferentes complexos de sinalização. Este trabalho estabelece, pela primeira vez, um elo funcional entre a oncoproteína humana NSD3s e a reprogramação metabólica no câncer.

**Palavras-chave:**

NSD3s;Pdp3;Saccharomyces cerevisiae;PWWP;Efeito Warburg;RMN;Metabolômica

**Abstract:**

Cancer is defined as a set of diseases characterized by disordered cell growth. Currently, different types of cancer are known, being breast cancer the most frequent among women. Amplification of the 11-12 region of the short arm of chromosome 8 consists in one of the major genomic changes occurred in breast cancer, being present in approximately 15% of the cases. Among the genes forming this region, WHSC1L1/NSD3 gene, which encodes a histone methyl-transferase, stands out as the main candidate for leading oncogene. NSD3s, the short isoform of NSD3, containing only an amino-terminal PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) domain displays high transformation properties. The PWWP domain of NSD3s shows structural similarity to that of the Saccharomyces cerevisiae protein, Pdp3. Overexpression of NSD3s or Pdp3 induces similar metabolic changes in yeast, such as increased growth rate, increased sensitivity to oxidative stress, and decreased oxygen consumption. In addition, NSD3s PWWP domain functionally substitutes that of Pdp3. Using 1H NMR metabolomics, we analyzed the changes in yeast metabolome in response NS3s or Pdp3 overexpression. We observed an increase in aspartate and alanine levels, together with a decrease in arginine levels, upon overexpression of NSD3s or Pdp3, suggesting an increase in the rate of glutaminolysis. Moreover, certain metabolites, including glutamate, valine and phosphocholine, were specific for NSD3s or Pdp3, indicating that additional metabolic pathways are adapted in a protein-dependent manner. The observation that certain metabolic pathways are differentially regulated by NSD3s and Pdp3 suggests that, despite the structural similarity between their PWWP domains, the two proteins act by single mechanisms and can recruit different downstream signaling complexes. This work establishes, for the first time, a functional link between the human oncoprotein NSD3s cancer metabolic reprogramming.

**Keywords:**

NSD3s;Pdp3;Saccharomyces cerevisiae;PWWP;Warburg effect;NMR;Metabolomics

**Título:**

Caracterização do conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson.

**Autor:**

LETICIA CARLOS GIACOMIN

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

GIACOMIN, L. C.

**Data da Defesa:**

11/09/2018

**Resumo:**

A doença de Parkinson é o segundo tipo de doença neurodegenerativa mais comum caracterizada clinicamente por bradicinesia, tremor em repouso, rigidez muscular e instabilidade postural. Apesar de ainda não existir, no sangue, um biomarcador de diagnóstico, molecularmente a doença é caracterizada pela formação de agregados, chamados corpos de Lewy, onde ocorre o acúmulo da proteína α-sinucleína na região da substância negra pars compacta. Porém, sabe-se que outras áreas não dopaminérgicas, também estão envolvidas. Estudos recentes indicam o papel dos exossomos na comunicação célula-célula e na progressão da doença. Os exossomos são nanovesículas envoltas por bicamada lipídica, que podem conter ácidos nucléicos, metabólitos e proteínas específicas. Dentre os ácidos nucléicos presentes nos exossomos, estão os RNAs longos não-codificantes (RNAlnc). O estudo envolveu a coorte de descoberta com 18 pacientes e 18 doadores saudáveis. Os pacientes foram classificados segundo a escala de estadiamento Hoehn & Yahr em leve (55,56%), moderado (33,33%) e avançado (11,11%). Além dsso, uma segunda coorte foi estudada, a coorte de cofirmação, que incluiu 64 pacientes, sendo 46,87% leve, 39,06% moderado, 14,06% avançado, além de 36 doadores saudáveis. A quantidade de α-sinucleína plasmática, quantificada através do ensaio ELISA, foi estatísticamente igual entre pacientes e controles. Porém foi estatísticamente maior nos exossomos dos pacientes. Além disso, os exossomos plasmáticos foram adicionadas à culturas celulares de HEK293 e H4 e observou-se uma tedência na oligomerização e agregação da α-sinucleína in vivo pelos ensaio BiFC e pelo modelo de co-transfecção de SynT e Sph1, respectivamente. Para avaliação da metabolômica plasmática e exossomal, a etapa de pré-tratamento da amostra, extração líquido-líquido, foi otimizada. O método de detecção dos metabólitos, por cromatografia líquida acoplada a espectometria de massas de ultra performance, foi validado previamente às análises. Observou-se que a via do metabolismo do ácido araquidônico pode estar diretamente relacionada ao desenvolvimento da doença, no plasma, onde foi encontrada alterada para todos os grupos em ambas as coortes. Além disso, o metabolismo de retinol apareceu alterado nas amostras de exossomos plasmáticos dos pacientes quando comparados com amostras de doadores saudáveis. Por último, foram realizadas análise de RNAlnc por RT-qPCR para as coortes, em amostras de exossomos plasmáticos. Observou-se que os RNAlnc Alpha250, Anti-NOS2A, AntiPeg11, E2F4antisense, Evf1andEVF2, HOTAIR, lincRNA-RoR, lincRNA-SFMBT2, lincRNA-VLDLR, SAF, SNHG1, WT1-AS e Xist podem estar relacionados ao desenvolvimento da patologia.

**Palavras-chave:**

Doença de Parkinson;Exossomos;BiFC;α-sinucleína;metabolômica;RNA longo não-codificante

**Abstract:**

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease clinically characterized by bradykinesia, tremor, muscle stiffness and postural instability. Although there is no diagnostic biomarker in the blood, molecularly the disease is characterized by the formation of aggregates, called Lewy bodies, where α-synuclein accumulation occurs in the region of the substantia nigra pars compacta. However, it is known that other non-dopaminergic areas are also involved. Recent studies indicate the role of exosomes in cell-cell communication and disease progression. The exosomes are nanovesicles enveloped by lipid bilayer, which may contain nucleic acids, metabolites and specific proteins. Among the nucleic acids present in the exosomes are the long non-coding RNAs (lncRNA). The study involved a discovery cohort with 18 patients and 18 healthy donors. Patients were classified according to the Hoehn & Yahr staging scale in early (55.56%), moderate (33.33%) and advanced (11.11%). In addition, a second cohort was studied, the validation cohort, which included 64 patients, being 46.87% early, 39.06% moderate, 14.06% advanced, and 36 healthy donors. The amount of plasmatic α-synuclein, quantified by ELISA assay, was statistically equal between patients and controls. However, it was statistically higher in patients' exosomes. In addition, plasmatic exosomes were added to the HEK293 and H4 cell cultures and a tendency was observed in the oligomerization and aggregation of α-synuclein in vivo by the BiFC assay and by the SynT and Sph1 co-transfection model, respectively. For the evaluation of plasmatic and exosomal metabolomics, the sample pretreatment step, liquid-liquid extraction, was optimized. The detection of the metabolites methodology, by liquid chromatography coupled to ultra-performance mass spectrometry, was validated prior to the analysis. It was observed that the arachidonic acid metabolism pathway may be directly related to the development of the disease, in the plasma, where it was found to be altered for all groups in both cohorts. In addition, retinol metabolism appeared altered in patients' plasmatic exosomes samples when compared to samples from healthy donors. Finally, lncRNA analysis was performed by RT-qPCR for the cohorts, in samples of plasmatic exosomes. It has been found that the lncRNA Alpha250, Anti-NOS2A, AntiPeg11, E2F4antisense, Evf1andEVF2, HOTAIR, lincRNA-RoR, lincRNA-SFMBT2, lincRNA-VLDLR, SAF, SNHG1, WT1-AS and Xist may be related to the development of the pathology.

**Keywords:**

Parkinson's disease;Exosomes;BiFC;α-synuclein;Metabolomics;Long non-coding RNA

**Título:**

Produção de raminolipídeos por Pseudomonas aeruginosa-estA, suas características físico-químicas, toxicidade e simulação em vazamentos de petróleo.

**Autor:**

LETICIA DOBLER

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

DOBLER, L.

**Data da Defesa:**

14/08/2018

**Resumo:**

Os ramnolipídeos são biossurfactantes com enorme potencial de aplicação devido à sua alta capacidade de diminuir a tensão interfacial. Diversas estratégias são adotadas com o objetivo de reduzir os custos de produção destas moléculas, mas raramente essas estratégias são utilizadas no mesmo processo ou trabalho científico. Nesta tese foram reunidas várias dessas estratégias, como o uso de uma cepa geneticamente modicada, o uso de um co-produto industrial como fonte de carbono, o uso de um meio de baixo custo e um processo simples de downstream. O bioprocesso utilizando glicerina P.A. e inóculo celular 1,28 g/L de célula seca, resultou em uma concentração final de 18,1 g/L de RML, um dos maiores títulos já reportado por uma cepa modicada. As maiores taxas de produção se deram em razão C/N = 83,2. Entre seis fontes de carbono, a glicerina P.A. apresentou maior produção e produtividade. O processo manteve alta produtividade, mesmo quando substituído por glicerina bruta, oriunda da indústria de biodiesel. O uso do sobrenadante livre de células (SLC) não se mostrou tóxico quando testados sobre Artemia salina e algumas linhagens de células animais, dando indicações de que ele pode ser aplicado diretamente no meio ambiente sem a necessidade de etapas de purificação custosas. Além disso, foi mostrado que o SLC apresenta excelente papel dispersivo, emulsificante e tensoativo. Em uma simulação de derrame de petróleo em água do mar, o SLC foi capaz de diminuir a tensão interfacial mesmo nas diferentes condições de salinidade e pressão (coluna d’água). Já a temperatura, se mostrou como significativa para petróleos de API alto. Os resultados sugerem que o RML produzido neste trabalho pode ser aplicadas em remediação de petróleo em águas brasileiras. Pseudomonas

**Palavras-chave:**

Pseudomonas;Biosurfactante;Ramnolipídeos

**Abstract:**

Rhamnolipids are biosurfactants with enormous application potential due to their high ability to reduce interfacial tension. Several strategies are adopted with the objective of reducing the production costs of these molecules, but rarely are these strategies used in the same process or scientic work. In this thesis were gathered several of these strategies, such as the use of a genetically modied strain, the use of an industrial co-product as carbon source, the use of a low-cost medium and a simple downstream process. The bioprocess using P. aeruginosa, glycerin and 1.28 g/L of dry cell to inoculum resulted in a nal concentration of 18.1 g/L RML, one of the highest titers ever reported by a modied strain. The highest production rates were found at C/N = 83.2. Among six carbon sources, 95 % glycerin presented higher yield and productivity. The process maintained high productivity, even when replaced by crude glycerin, co-product from the biodiesel industry. The use of the cell free supernatant (SLC) did not prove to be toxic when tested on Artemia salina and some animal cell lines, indicating that it can be applied directly into the environment without the need for costly purication steps. In addition, it has been shown that SLC exhibits excellent dispersive, emulsifying and surfactant ole. In a simulation of oil spill in seawater, the SLC was able to decrease interfacial tension even under dierent conditions of salinity, temperature and pressure (depth of water column) to medium density petroleum. In other hand, were seen linear signicant interference for low density (hight API grade) petroleum. The results suggest that the RML produced in this work can be applied in oil remediation in Brazilian waters.

**Keywords:**

Pseudomonas;Biosurfactant;Rhamnolipids

**Título:**

Produção de ácido perílico a partir de limoneno utilizando a levedura Yarrowia lipolytica: otimização e aplicação do processo para a bioconversão do óleo essencial de laranja.

**Autor:**

FELIPE MOURA KNOPP

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

KNOPP, F.M.

**Data da Defesa:**

19/07/2018

**Resumo:**

O monoterpeno R-(+)-limoneno é o principal constituinte do óleo essencial de laranja, um subproduto da indústria de cítricos, produzido em grandes quantidades no Brasil. O ácido perílico, que é um derivado mono-oxigenado do limoneno com elevado valor de mercado e com potencial ação anticâncer, pode ser obtido por bioconversão do limoneno. Os processos de bioconversão oferecem, em relação à rotas químicas, vantagens técnicas, econômicas e ambientais como formação de produtos químio-, régio- e enantiosseletivos, uso de condições brandas de reação, baixo consumo de energia e geração de resíduos de baixo risco ambiental. A levedura Yarrowia lipolytica pode ser usada no processo de bioconversão do limoneno em ácido perílico porque é capaz de oxifuncionalizar exclusivamente o grupo metil exocíclico do limoneno. Entretanto, o baixo rendimento do processo, atribuído à toxicidade e volatilidade do limoneno, têm desencorajado estudos de aumento de escala. O presente trabalho estudou o processo de bioconversão do limoneno e do óleo de laranja em ácido perílico utilizando a levedura Y. lipolytica, tendo sido avaliadas as etapas de produção da levedura e o seu uso no processo de bioconversão. Visando aumentar a produção da levedura o meio de crescimento foi otimizado usando planejamento experimental. O meio apresentando 22,9 g/L de glicose, 7,7 g/L de peptona, 4,1 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L de extrato de malte permitiu um aumento da produtividade do processo, conduzido à 28ºC, de 0,13 para 0,18 g de célula/L.h-1. O meio otimizado foi utilizado para cultivo da Y. lipolytica em batelada alimentada em biorreator de 2L chegando-se a à concentração celular de 18,0 g (ps) /L com 33 h de cultivo a 28 0C. Células da levedura colhidas a partir do final da fase exponencial de crescimento até a fase estacionária mostraram-se igualmente competentes. A otimização da bioconversão, estudado inicialmente em frascos agitados resultou na produção de 512,7 mg/L de ácido perílico (32,19% de rendimento molar teórico) em 24 h a 25 0C, para uma concentração de limoneno e de levedura de 0,16% (v/v) e 27,1 g (ps)/L, respectivamente. A técnica de engenharia evolutiva foi empregada para aumentar à tolerância da levedura à toxicidade do limoneno. Após 30 passagens foi obtida uma linhagem de Y. lipolytica mais resistente e capaz de crescer no meio de cultivo contendo 0,12% (v/v) de limoneno. Esta linhagem, crescida em ausência de limoneno e, portanto, sem indução, resultou, na etapa de bioconversão, em que 0,16% (v/v) de limoneno foi adicionado no início do processo e também após 24 h, na formação de 902,6 mg/L ácido perílico em 48 horas. Quando esta linhagem foi crescida em presença do limoneno, e, portanto, induzida durante o crescimento, foi observada na etapa de bioconversão a formação de 1308,7 mg/L de ácido perílico, ficando clara a importância da indução na linhagem adaptada. Esta linhagem foi estocada a -80 ºC durante 10 meses sendo observada a manutenção de 80% na sua capacidade de produção de ácido perílico. A etapa de bioconversão, utilizando-se a linhagem nativa de Y. lipolytica foi estudada em biorreatores. Observou-se que a aeração de superfície (realizada a partir do topo do vaso reacional), foi mais eficiente em relação à aeração convencional (alimentação do ar a partir da base do reator). A aeração de superfície e a alimentação do substrato em duas etapas, conforme acima descrito, resultou na formação de 839,6 mg/L de ácido perílico em 48 h. O biorreator com aeração de superfície foi também usado para a bioconversão do óleo essencial de laranja, um substrato industrial, em condições comparativas. Foram obtidos 806,4 mg/L de ácido perílico em 48 h, mostrando a robustez da levedura Y. lipolytica para o uso deste substrato industrial.

**Palavras-chave:**

ácido perílico;biotransformação;Yarrowia lipolytica;biorreator;óleoessencial de laranja

**Abstract:**

The monoterpene R-(+)-limonene is the main constituent of orange essential oil, a by-product of the citrus industry produced in large scale in Brazil. Perillic acid, which is a mono-oxygen derivative of limonene with a high market value and potential anticancer activity, can be obtained by bioconversion of limonene. Bioconversion processes offer technical, economic and environmental advantages over chemical routes, such as the formation of products with chemo-, regio- and enantioselectivity, application of mild reaction conditions, low energy consumption and the generation of low-risk environmental residues. Yarrowia lipolytica can be used for the bioconversion of limonene as this yeast can exclusively oxidize the exocyclic methyl group of limonene resulting in the formation of perillic acid. However, the low yields, attributed to the substrate toxicity and volatility, have been hindering the process scale up. The present work studied the bioconversion of purified limonene and of the orange oil in perillic acid using Y. lipolytic regarding the production of the yeast cells and its use in the bioconversion process. To increase the production of the yeast cells the growth medium composition was optimized using experimental design. The medium presenting 22.9 g / L glucose, 7.7 g / L peptone, 4.1 g / L yeast extract and 1.0 g / L malt extract allowed a productivity of 0.18 g cell / Lh-1 in comparison to 0.13 g cell / Lh-1 for the non-optimized medium, in experiments carried out at 280C. The optimized medium was used for the yeast fed batch cultivation in a 2L bioreactor and resulted in a peak cell concentration of 18.0 g (dw) / L within 33 hours at 250C. Yeast cells harvested from the late exponential growth to the stationary phases were equally competent for the bioconversion process. The optimization of the bioconversion process, initially done in shaken flasks, resulted in the production of 512,7 mg / L of perillic acid (32.19% theoretical molar yield) in 24 h, at 250C, using a limonene concentration and cell mass of 0.16% (v / v) and 27.1 g (dw) /L, respectively. Evolutionary engineering was employed to increase the yeast tolerance to limonene toxicity. After 30 passages it was obtained a higher resistant Y. lipolytica strain that was able to grow in the culture medium added of 0.12% (v / v) limonene. This strain, when grown in the absence of limonene, and therefore not induced, was able to produce, within 48 hours, 902.6 mg/L of perillic acid upon the addition of 0.16% (v / v) limonene at the onset and after 24 hours of the bioconversion process. When this lineage was subjected to limonene induction during growth it was observed in the bioconversion step, done under comparative conditions, the accumulation of 1308.7 mg / L of perilic acid, showing the importance of the induction step. After the adapted yeast strain was stored at -80 ° C for 10 months it retained 80% of the bioconversion capacity. The bioconversion process was also studied in bioreactor using the native Y. lipolytica strain. It was observed that aeration performed from the top of the reaction vessel, known as surface aeration, was more efficient than conventional aeration when the air is fed from the base of the reactor vessel. The surface aeration and the addition of the substrate in two steps, as above described, resulted in the formation of 839.6 mg/L of perillic acid within 48 h. The bioreactor surface aeration and the two steps feed strategy were successfully applied to the bioconversion of the orange essential oil. It was observed the production of 806.4 mg/L of perillic acid in 48 h, showing the robustness of yeast Y. lipolytica for the use of this industrial substrate.

**Keywords:**

Perillic acid;biotransformation;Yarrowia lipolytica;bioreactor;orange essential oil

**Título:**

Produção de um novo biolubrificante por hidroesterificação enzimática a partir do óleo de mamona.

**Autor:**

JAQUELINE GRECO DUARTE

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

DUARTE, J. G.

**Data da Defesa:**

12/07/2018

**Resumo:**

Lubrificantes possuem um grande mercado consumidor e produtor. No entanto, não são biodegradáveis e cada 1 L de lubrificante pode contaminar 1.000.000 L de água potável. Assim, torna-se necessária a busca por soluções que permitam o desenvolvimento de óleos ambientalmente compatíveis, como ésteres orgânicos biodegradáveis (biolubrificantes). O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de novos biolubrificantes, por hidroesterificação enzimática (catalisado por lipases), utilizando como matéria-prima o óleo de mamona (OM). Foram utilizadas sementes de mamoneira como biocatalisador da hidrólise do OM produzindo 97,8% de ácidos graxos livres de mamona (AGLM), ricos em ácido ricinoléico (AR), após 1 h de reação. As lipases de C. rugosa (CRL) foram empregadas para catalisar as reações de esterificação dos AGLM com diferentes poliálcoois: neopentilglicol (NPG), trimetilolpropano (TMP), pentaeritritol (PE). A CRL reduziu a acidez em 80% com NPG e TMP e 70% com PE, após 96 h. Na ausência de poliálcool a CRL foi capaz de produzir polímeros de AGLM (estolídeos). Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) confirmaram a preferência da CRL pela formação dos estolídeos utilizando o ácido ricinoléico em detrimento dos outros substratos. A análise do teor de AR (% m/m), por cromatrografia gasosa, permitiu conhecer o seu perfil de consumo durante a reação de síntese de estolídeos e propor uma correlação com a diminuição da acidez total no meio reacional (% m/m). O estudo do teor de água na reação de formação de estolídeo revelou que o teor de 15% m/m produziu uma redução de 70% da acidez em 14 h com consumo total do AR livre e grau de polimerização de 6/7. Análises de cromatografia de exclusão por tamanho (GPC ou SEC) e de RMN, objetivando calcular o número de estolídeo (NE), foram realizadas para os estolídeos livres. Elas mostraram que entre 8 e 14 h de reação, houve aumento do grau de polimerização e da quantidade das diferentes frações de estolídeos [dímeros, trimeros, tetrâmeros e pentâmeros(+)]; de 14 à 24 h, apesar do perfil não alterar significativamente, o NE aumenta conforme o tempo reacional o que corresponde ao aumento do índice de viscosidade e da estabilidade oxidativa e na diminuição do ponto de fluidez e índice de acidez total. Foi realizada também a otimização da reação por planejamento experimental (DCCR) que permitiu diminuir o tempo de consumo total do AR para 5 h, utilizando temperatura de 45 °C, 14,4% m/m de água e 1,61% m/m de CRL. A etapa de otimização levou a um aumento de produtividade (2,8 vezes) e diminuição da concentração de enzima (2,5 vezes) com a obtenção de um estolídeo com propriedades similares ao obtido em 14 h: índice de viscosidade, 142; estabilidade oxidativa, 48 min; e ponto de fluidez, -42°C. Estudos preliminares da produção de estolídeos acabados por esterificação com etanol (EtOH) e 2-etil-1-hexanol (2EH) foram realizados. A enzima Novozymes 435 foi um bom catalisador atingindo 2,3 % (EtOH) e 1,8% m/m da acidez total do meio (2EH) em 6 e 24 h, respectivamente. Neste trabalho foi possível gerar biolubrificantes que se inserem no contexto das tecnologias verdes, e que poderão ser utilizados como biolubrificantes acabados, óleos básicos e aditivos.

**Palavras-chave:**

biolubrificante;ácido ricinoléico;óleo de mamona;CRL;estolídeos

**Abstract:**

Lubricants have a large consumer and producer market. However, they are not biodegradable and 1 L of lubricant can contaminate 1,000,000 L of potable water. Thus, it is necessary to search for solutions that allow the development of environmental friendly oils, such as biodegradable organic esters (biolubricants). The objective of this work was to study the production of new biolubricants by enzymatic hydrolysis (catalyzed by lipases) using castor oil (CO) as the raw material. Castor seeds were used as a biocatalyst for CO hydrolysis, producing 97.8% of castor oil free fatty acids (COFFA), rich in ricinoleic acid (RA), after 1 h of reaction. C. rugosa lipases (CRL) were used to catalyze the esterification reactions of the AGLM with different polyols: neopentylglycol (NPG), trimethylolpropane (TMP), pentaerythritol (PE). The CRL reduced acidity by 80% with NPG and TMP, and 70% with PE after 96 h. In the absence of polyol the CRL was able to produce AGLM polymers (estolides). Nuclear magnetic resonance (NMR) analyzes confirmed the preference of CRL for the formation of estolides using ricinoleic acid over other substrates. The analysis of the RA content (% w/w), by gas chromatography, revealed its consumption profile during the reaction of estolide synthesis and to propose a correlation with the decrease of the total acidity in the reaction medium (% w/w). The study of the water content in the estolide formation reaction revealed that a content of 15% m/m produced a 70% reduction in acidity in 14 h with total free RA consumption and degree of polymerization of 6/7. Gel permeation chromatography (GPC) and NMR analyzes aiming for estolide number (EN) were performed showing an increase in the polymerization degree and in the amount of different estolide fractions [dimers, trimeros, tetramers and pentamers (+)] from 8h to 14 h of reaction. From 14 h to 24 h of reaction, although the profile does not change significantly, the EN increases according to the reaction time, resulting in an increase in the viscosity index and oxidative stability and a decrease of the pour point and total acidity index. The optimization of the reaction by experimental design (DCCR) was also carried out, which reduced the time of total RA consumption to 5 h, using a 45 °C temperature, 14.4% w/w water and 1.61% w/w CRL. The optimization step led to an increase in productivity (2.8 times) and a reduction in enzyme concentration (2.5 times) with an estolide whose properties are similar to that obtained with 14 h: 142 of viscosity index; 48 min of oxidative stability; and -42 °C pour point. Preliminary studies on the production of ethanol-esterified (EtOH) and 2-ethyl-1- hexanol (2EH) esterified stolides were performed. The enzyme Novozymes 435 was a good catalyst, reaching 2.3% (EtOH) and 1.8% w/w of the total acidity of the medium (2EH) in 6 and 24 h, respectively. In this work, it was possible to generate biolubricants that are inserted in the green technologies context, and that can be used as finished biolubricants, basic oils and additives. Key words: , , , , .

**Keywords:**

biolubricant;ricinoleic acid;castor oil;CRL;estolides

**Título:**

Produção de Hidrogênio por Digestão Anaeróbia Utilizando o Hidrolisado da Semente de Açaí.

**Autor:**

GILBERTO CORREA DOS SANTOS LEITAO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

LEITÃO, GCS

**Data da Defesa:**

04/04/2018

**Resumo:**

O açaí, fruto da palmeira Euterpe oleracea, contém entre 5% e 20% de parte comestível, sendo o restante de sua massa correspondente à semente, que não é aproveitada na indústria alimentícia. Somente no Pará são geradas anualmente cerca de 1,3 milhões de toneladas de sementes de açaí, não havendo uma destinação apropriada para este resíduo. Contudo, os açúcares presentes na semente de açaí são substratos potenciais para a produção de hidrogênio (H2) via digestão anaeróbia utilizando culturas mistas de microrganismos presentes no lodo anaeróbio como inóculo da fermentação. A utilização de H2 como vetor energético apresenta diversas vantagens, uma vez que sua combustão libera uma grande quantidade de energia e produz apenas água como produto de reação. Contudo, nem todo substrato é utilizado na produção de H2, sendo gerado um efluente líquido da produção de hidrogênio (HPLW – do inglês Hydrogen Producing Liquid Waste) que pode ser posteriormente convertido a CH4. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de H2 e CH4 por digestão anaeróbia utilizando os carboidratos presentes na semente de açaí obtidos após hidrólise ácida deste material. Inicialmente, foi realizada uma hidrólise da semente de açaí para obtenção de um hidrolisado rico em monossacarídeos simples, principalmente manose. De forma a reduzir a quantidade de microrganismos consumidores de H2 presentes no lodo, foi realizado um pré-tratamento térmico (65 °C; 30 min) ou ácido (pH 2,0; 1 h). Ambos os pré-tratamentos testados resultaram em rendimentos de 1,87 molH2/molcarboidrato em 24 h de fermentação; porém, após o pré-tratamento ácido, houve a necessidade de aclimatação do lodo por 20 h a 35 oC, enquanto o lodo submetido ao tratamento térmico pôde ser utilizado diretamente, sendo, por isso, selecionado para os demais experimentos. Posteriormente, foi avaliada a influência de diferentes razões entre a demanda química de oxigênio do substrato sintético (DQOsubstrato) e a concentração de sólidos suspensos voláteis do inóculo (SSVinóculo). A relação 0,25 com 21,33 g.L-1 de SSVinóculo resultou no melhor rendimento, de 2,01 molH2/molcarboidrato. Utilizando esta melhor relação, foi realizada uma cinética de produção com hidrolisado de semente de açaí, tendo sido obtido um rendimento de 2,04 molH2/molcarboidrato e uma produtividade de 0,14 molH2/molcarboidrato/h em 15 horas. O resíduo líquido desse processo foi usado para a produção de metano, alcançando-se 942,5 mL/L de metano em 6 dias de produção com uma redução de DQO de 3366 mg/L.

**Palavras-chave:**

Hidrogênio;Fermentação anaeróbia;Clostridium;Manose;Euterpe;Açaí

**Abstract:**

The açaí, fruit of the palm Euterpe oleracea, contains between 5% and 20% of edible part, the rest of its mass corresponding to the seed, which is not used in the food industry. Only in Pará, about 1.3 million tons of açaí seeds are generated annually, and there is no appropriate destination for this residue. However, the sugars present in the açaí seed are potential substrates for the production of hydrogen (H2) via anaerobic digestion using mixed cultures of microorganisms present in the anaerobic sludge as inoculum of the fermentation. The use of H2 as an energy vector has several advantages, since its combustion releases a large amount of energy and produces only water as a reaction product. However, not all substrate is used in the production of H2, with an effluent being generated during the production of H2, called Hydrogen Production Liquid Waste (HPLW), that can be later converted to CH4. Therefore, this work aimed to evaluate the production of H2 and CH4 by anaerobic digestion using the carbohydrates present in the açaí seed obtained after the acid hydrolysis of this material. Initially, the açaí seed was hydrolyzed to obtain a hydrolysate rich in simple monosaccharides, mainly mannose. To reduce the amount of H2-consuming microorganisms present in the sludge, a thermal pretreatment (65 °C; 30 min) or an acid pretreatment (pH 2.0; 1 h) was performed. Both pre-treatments tested resulted in yields of 1.87 molH2/molcarbohydrate in 24 h of fermentation; however, after the acid pretreatment, there was a need to acclimate the sludge for 20 h at 35 °C, while the sludge submitted to the heat treatment could be used directly and was, therefore, selected for the other experiments. Subsequently, the evaluation of different ratios between the chemical oxygen demand of the synthetic substrate (CODsubstrate) and the concentration of volatile suspended solids of the inoculum (SSVinoculum) was carried out. The 0.25 ratio with 21.33 g.L-1 of SSVinoculum resulted in the best yield, of 2.01 molH2/molcarbohydrate. Using this best ratio, a production kinetics was performed with the açaí seed hydrolysate, achieving a yield of 2.04 molH2/molcarbohydrate and a productivity of 0.14 molH2/molcarbohydrate .h in 15 hours. The liquid stream obtained in this process was used for methane generation, and 942.5 mL/L of methane were produced after 6 days with a COD reduction of 3366 mg/L.

**Keywords:**

Hydrogen;Dark fermentation;Clostridium;Mannose;Euterpe oleracea;Açaí

cant interference for low density (hight API grade) petroleum. The results suggest that the RML produced in this work can be applied in oil remediation in Brazilian waters.

**Keywords:**

Pseudomonas;Biosurfactant;Rhamnolipids