



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

FRANCISCO GERALDO MELLO DA ROCHA CARVALHO NETO

ISOLAMENTO E CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A LIPASE DO FUNGO
Endomelanconiopsis endophytica

MANAUS
2013

FRANCISCO GERALDO MELLO DA ROCHA CARVALHO NETO

ISOLAMENTO E CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A LIPASE DO FUNGO
Endomelanconiopsis endophytica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Tetsuo Yamane
Co-orientador: Prof. Dr. Adolfo José da Mota

MANAUS
2013

AGRADECIMENTOS

Meus pais, em especial a minha mãe Graça Sousa, pelo enorme apoio, confiança, carinho e amor incondicional. Amo você!

Ao meu amor, Danielle Rachel, pelo carinho, amor, amizade, palavras de incentivo, pela horas e horas no laboratório me ajudando, pela paciência em me aturar nos momentos em que pensei em desistir e principalmente por estar sempre ao meu lado. Obrigado por fazer parte de mim! Eu amo você!

Ao meu orientador, professor Dr. Tetsuo Yamane, pela amizade e por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar com pessoas tão competentes.

Ao meu co-orientador, Dr. Aldolfo Mota, pela amizade e por todo o empenho em me ensinar todas as ferramentas e técnicas utilizadas nesse trabalho, mesmo nos dias mais cansativos. Esse trabalho também é seu. Muito obrigado por tudo!

Ao professor Dr. André Willerding pela linha de pesquisa seguida nesse trabalho e amizade.

Ao meu amigo, Diego Bilby pela ajuda no laboratório e à minha grande amiga, Msc. Auri Matos, a quem agradeço de forma especial por tudo que vivemos no decorrer desses trabalhos.

À minha amiga Msc. Luciana Lima de Brito por todo o incentivo.

Ao professor Dr. Eduardo Brandit de Oliveira (FMRP/USP) por todo conhecimento transmitido, pelo interesse em ajudar e pela colaboração para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Dr. Álvaro Prieto (Butantan) e Dr. Gandhi Baptista (UFC/LaboMar) pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do Work Tox 4.

À FAPEAM pelo suporte financeiro.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia pela infraestrutura laboratorial.

Ao Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais.

À Universidade Federal do Amazonas, pelo sequenciamento das amostras.

A todos que participaram de alguma forma desse trabalho e me acompanharam durante esse percurso, o meu sincero carinho e agradecimento.

RESUMO

As descobertas científicas e os avanços tecnológicos no campo da biologia molecular de proteínas, principalmente no final do século XIX e início do século XX, contribuíram para o emprego de biocatalizadores pelas indústrias. Assim as enzimas passaram a ocupar um papel importante em atividades economicamente lucrativas. As lipases estão entre as enzimas hidrolíticas de grande interesse, são biocatalisadores versáteis, capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico com teor de água restrito. Apesar das lipases estarem amplamente distribuídas, pode-se dizer que estas enzimas são mais estudadas e exploradas quanto a sua expressão e produção por fungos. Nos microrganismos, as lipases podem apresentar atividade fosfolipídica, sendo utilizadas como mecanismo de defesa, visto que quando secretadas, proporcionam competição com a microflora; facilitam a digestão dos lipídeos e os ácidos graxos livres liberados auxiliam na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro. Neste trabalho isolamos o gene da lipase do fungo *Endomelanconiopsis endophytica* através de diversas ferramentas de biologia molecular, como a extração do mRNA e síntese de cDNA dupla fita.

Palavras-chave:

Lipase - fungo - cDNA

ABSTRACT

Scientific discoveries and technological advances in the field of molecular biology of proteins, especially in the late 19th and early 20th century, contributed to the employment of biocatalysts by industries. This way, enzymes started to occupy an important role in economically profitable activities. Lipases are among the hydrolytic enzymes of great interest, because they are versatile biocatalysts, capable to catalyze various reactions, both in aqueous and organic medium with water content restricted. Although lipase are widely distributed, it can be said that these enzymes are the most studied and exploited for its expression and production by fungi. In microorganisms, lipases are able to show phospholipid activity, being used as a defense mechanism, since when secreted, they provide competition with the microflora; facilitate the digestion of lipids and fatty acids released assist in tissue adhesion, cell-cell and cell-host. In this work, we isolated the lipase gene of the fungus *Endomelanconiopsis endophytica* through several molecular biology tools, such as the extraction of mRNA and synthesis of double stranded cDNA.

Key-words:

Lipase - fungal - cDNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo estrutural de α/β hidrolases	15
Figura 2: Superposição do Motivo folha- β - Serina - α -hélices	16
Figura 3: Mecanismo de hidrólise das fosfolipases.....	19
Figura 4: Funções catalíticas das lipases	20
Figura 5: Catálise por lipases não específica (A) e 1,3 específica (B).....	21
Figura 6: Síntese da reação de hidrólise do <i>p</i> -NPP	27
Figura 7: Marcadores de massa molecular	31
Figura 8: Vetor pCR 2.1TOPO TA Cloning for Sequencing	37
Figura 9: Fluxograma da construção da biblioteca de cDNA SMARTer	42
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico.....	47
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% região ITS	48
Figura 12: Sequencia da Cepa CBA 309	48
Figura 13: Alinhamento através do BLASTN	49
Figura 14: Dendograma UPGMA	53
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% da especificidade por PCR:	56
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão com EcoR1.....	57
Figura 17: Sequência do plasmídeo com inserto	57
Figura 18: Alinhamento através do BLASX.....	58
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1% dos iniciadores específicos.....	59
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose DEPEC 1% do RNA.....	60
Figura 21: Alinhamento através do BLASTX.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores ITS	30
Tabela 2: Iniciadores degenerados para lipase	34
Tabela 3: Iniciadores pCR 2.1	38
Tabela 4: Iniciadores específicos para lipase	40
Tabela 5: Reta Padrão p-NPP	46
Tabela 6: Classificação da cepa CBA 309	50
Tabela 7: Lipase 3	50
Tabela 8: Lipase 2	51
Tabela 9: Carboxilesterase	51
Tabela 10: Lipase secretada (LIP)	51
Tabela 11: Lipase	52
Tabela 12: Regiões conservados de lipases de microrganismos.	54

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1. ENZIMAS	12
1.2. LIPASES	13
1.3. ASPECTOS ESTRUTURAIS DAS LIPASES	15
1.4. ASPECTOS FUNCIONAIS DAS LIPASES	18
1.5. APLICAÇÕES DAS LIPASES	22
1.6. FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. CULTIVO	26
3.1.1. Reativação	26
3.2. INDUÇÃO ENZIMÁTICA	26
3.2.1. Determinação da atividade enzimática	27
3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	28
3.3.1. Extração do DNA	28
3.3.2. Amplificação	29
3.3.3. Sequenciamento	31
3.4. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS LIPASES DE FUNGOS	32
3.4.1. Alinhamento	32
3.4.2. Montagem do Dendograma	33
3.5. ISOLAMENTO DO GENE	33
3.5.1. Construção dos iniciadores degenerados	33
3.5.2. Confirmação da especificidade dos iniciadores por PCR	34
3.5.3. Variações da reação padrão para melhorar a qualidade	35
3.5.4. Purificação do produto de PCR por Eletroeluição	35
3.5.5. Preparação da célula quimicamente competente	36
3.5.6. Clonagem, transformação, coleta dos recombinantes	36
3.5.6.1. Minipreparação do DNA plasmidial.....	37
3.5.6.2. Triagem dos recombinantes por PCR.....	38

3.5.7. Digestão do DNA plasmidial com enzima de restrição	39
3.5.8. Sequenciamento	39
3.5.9. Desenho dos iniciadores específicos	39
3.6. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	40
3.6.1. Eletroforese do RNA isolado	41
3.7. SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR DUPLA FITA	41
3.7.1. Amplificação parcial do gene da lipase	43
3.7.2. Purificação do DNA complementar dupla fita	43
3.7.3. Adição de uma base desemparelhada nas extremidade 3'	43
3.7.4. Quantificação do DNA complementar dupla fita	44
3.7.5. Clonagem do DNA complementar total e identificação do gene	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	47
4.2.1. Extração do DNA, Amplificação e Sequenciamento	47
4.3. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS LIPASES DE FUNGOS	50
4.4. ISOLAMENTO DO GENE	55
4.4.1. Construção dos iniciadores e confirmação da especificidade	55
4.4.2. Clonagem	56
4.4.2.1. Digestão com EcoRI	56
4.4.3. Sequenciamento e análises das sequencias	57
4.4.4. Construção dos iniciadores específicos	58
4.5. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	59
4.6. SÍNTESE E SEQUENCIAMENTO DO DNA COMPLEMENTAR	60
CONCLUSÃO	62
PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

INTRODUÇÃO

As descobertas científicas e os avanços tecnológicos no campo da biologia molecular de proteínas, principalmente no final do século XIX e início do século XX, contribuíram para o emprego de biocatalizadores pelas indústrias. Assim as enzimas passaram a ocupar um papel importante em atividades economicamente lucrativas, principalmente em cadeias produtivas de larga escala, favorecendo um melhor quociente custo/benefício tanto em produtos quanto em processos industriais. (CABRAL et al., 2003). A versatilidade das enzimas possibilita seu uso em diversas aplicações, incluindo processos de catálise de polímeros naturais, tais como lipídeos, amido, celulose e proteínas (LORENZ & ECK, 2005; CABRAL et al., 2003).

O uso comercial das enzimas vem evoluindo com o passar dos anos devido a identificação correta das mais diversas reações orgânicas realizadas por elas, bem como a identificação de novas enzimas com propriedades importantes para indústria como:

- Síntese rápida;
- Eficiência;
- Econômicas;
- Ecologicamente aceitáveis

Encontrar um biocatalisador adequado depende tanto de estratégias de triagem sensíveis e eficientes em nível analítico quanto da busca pelo maior número possível de genes codificadores nos diferentes organismos em nível preditivo (LORENZ et al., 2002).

O comércio global da produção de enzimas foi estimado em 2,3 bilhões de dólares em 2003, cujo principal montante foi dividido em detergentes (US\$ 789 milhões), aplicações alimentícias (US\$ 634 milhões), agricultura (US\$ 237 milhões) e outras, incluindo enzimas para produção de tecidos e produtos químicos (US\$ 222 milhões) (LORENZ et al., 2002; LORENZ & ECK, 2005).

As pesquisas, motivadas pelo crescimento da produção e utilização de enzimas nos últimos anos, levaram a uma maior e melhor compreensão do comportamento catalítico das enzimas e em conjunto com a engenharia molecular favoreceram a aplicação industrial de várias enzimas, como por exemplo lipases, esterases, amilases, proteases, glicosidases, celulasas, (LORENZ et al., 2002; CABRAL et al., 2003; KOURIST et al., 2010).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. ENZIMAS

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico. São constituídas por cadeias lineares de aminoácidos que se dobras em estruturas tridimensionais bem definidas e únicas (LEHNINGER et al, 2002; ARNOLD, 1996).

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular. Além disto, participam dos processos de quebra de nutrientes complexos em substâncias mais simples.

A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais (CASTRO et al.,2004):

- ✓ Oxidoredutases: enzimas deste grupo catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenação, como $C-H \longrightarrow C-OH$, ou remoção de hidrogênio como $CH(OH) \rightleftharpoons C=O$ e $CH-C \rightleftharpoons C=C$.
 - Subclasses: hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.
- ✓ Transferases: enzimas que mediam a transferência de grupos acil, açúcares, fosforil e grupos aldeídos ou cetonas, de uma molécula para outra.
 - Subclases: transaldolases, transcetolases, etc.
- ✓ Hidrolases: enzimas que catalisam reações de hidrólise e formação de glicosídeos, anidridos e ésteres, bem como amidas, peptídeos e outras funções contendo a ligação C-N.
 - Subclasses: estearases, lipases, peptidases, fosfatases, etc
- ✓ Isomerasas: podem efetuar várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização.
 - Subclasses: racemases, epimerases, oxirredutases, mutases, etc.
- ✓ Liases: essas enzimas catalisam reações de adição, usualmente de HX, a duplas ligações como C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos.
 - Subclasses: descarboxilases, cetoácidoliasas, hidrolases

- ✓ Ligases: são também chamadas sintetases e mediam a formação ou clivagem de ligações C-C, C-O, C-S, C-N e ésteres de fosfato.

Cada uma destas classes admite três níveis de subclasses, de modo que o nome sistemático de uma enzima é uma sequência de quatro dígitos. Por exemplo, o nome formal da lipase é EC 3.1.1.3, indicando que se trata de uma hidrolase (3) que quebra ligações do tipo éster (1) originando ácidos carboxílicos (1) ao agir sobre triacilgliceróis na interface água/óleo (3) (SAAD, 2005).

1.2. LIPASES

Dentre as enzimas hidrolíticas de grande interesse estão as lipases, que são biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico com teor de água restrito (CARVALHO et al., 2005). Estas enzimas hidrolíticas tem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis a ácidos graxos correspondentes e glicerol em seu ambiente natural (COSTA & PERALTA, 1999). As lipases são amplamente encontradas na natureza, estando presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias (BALCÃO et al., 1997; COSTA & PERALTA, 1999).

Apesar das lipases estarem amplamente distribuídas, pode-se dizer que estas enzimas possuem maior associação com fungos, visto que, estes microrganismos são responsáveis pela produção de várias famílias de enzimas lipolíticas, incluído Lipases “verdadeiras”, Carboxilesterases, Lipases secretadas, além de diversos tipos de Fosfolipases. A sequência consenso característica dessa família é descrita como sendo [LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-{YAG}-G-[GSTAC]. Essa sequência consenso possui maior incidência em fungos (CHAPUS et al., 1988; PERSSON et al., 1989; BLOW, 1990; MCLEAN et al., 1986; BAKER, 1988).

Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases microbianas são amplamente pesquisadas devido seu potencial de produção em larga escala e pela abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. Vários gêneros de microrganismos podem ser empregados para produção de lipases, tais como os fungos dos gêneros *Trichosporon*, *Botrytis*, *Pichia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, leveduras como gênero *Tulopsis*, e *Candida*, e bactérias do gênero *Streptomyces*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (PASTORE et al., 2003; BARON, 2008). Além disso,

segundo Hasan et al. (2006), as enzimas microbianas são mais úteis e estáveis do que as enzimas de plantas e animais e sua produção é mais conveniente e segura, pois possuem uma grande variedade de atividades catalíticas, possibilidade de rendimentos elevados, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular do produto devido à ausência de sazonalidade e flutuações e crescimento microbiano rápido e barato utilizando meios de cultura.

No aspecto industrial, os fungos são especialmente valorizados porque várias enzimas por eles produzidas são secretadas, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (WOLSKI, 2008). Além disso, os bioprocessos industriais com fungos filamentosos abrangem a produção da maioria dos produtos comercialmente importante da biotecnologia, no sentido de quantidade bem como da diversidade dos metabólitos, estes são principalmente os processos de culturas submersas, onde uma relação dinâmica existe entre circunstâncias ambientais e o padrão de crescimento desses microrganismos (ZNIDARSIC & PAVKO, 2011).

A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa entre 30 e 40°C, e embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função da origem, as enzimas de origem microbiana são, em geral, as mais estáveis, sendo ativas em uma ampla faixa de pH, apresentando uma alta atividade na faixa de pH entre 5 e 9, com um máximo situado entre 6 e 8 (BEVILAQUA, 2005). Ainda, dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa. Como as lipases fúngicas são geralmente glicosiladas, alguns autores sugerem que a alta massa molar seja decorrente da porção carboidrato ligada a enzima. O ponto isoelétrico (pI) comumente determinado para lipases fúngicas e de leveduras está entre 4 e 6, com algumas exceções com valores entre 7 e 9 (BORNSCHEUER, 2002; FERNANDES, 2007).

As lipases microbianas por serem amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas, especificidade por substrato e habilidade de catalisar não apenas a hidrólise, mas também a síntese de ácidos graxos, tornaram-se atrativa para aplicações comerciais (GUPTA et al., 2004). Em virtude disso, a elucidação das estruturas tridimensionais de algumas lipases por cristalografia de raio X possibilitou uma maior compreensão a respeito do mecanismo de ação destas enzimas (JAEGER & REETZ, 1998).

1.3. ASPECTOS ESTRUTURAIS DAS LIPASES

Diversas lipases tem seqüências de nucleotídeos e aminoácidos determinadas e depositadas nos diversos bancos de dados, entre eles o NCBI (The National Center Biotechnology Information), UNIPROT (The Universal Protein Resource), EBI (The European Bioinformatics Institute), dentre outros. Em alguns casos, estruturas tridimensionais também já estão disponíveis (REN-BAO et al., 2010).

Para determinar a estrutura de uma proteína é necessário entender sua função. O mecanismo de catálise e a natureza biológica com a ativação da enzima só foram entendidos após a determinação da estrutura tridimensional da lipase. As primeiras lipases cristalizadas pertenciam aos fungos *Aspergillus niger* (FUKUMOTO et al., 1963) e *Geotrichum candidum* (TSUJISAKA et al., 1973). Os cristais eram instáveis e de baixa qualidade, provavelmente resultado da heterogeneidade e da preparação da enzima. Desde então, diversas lipases foram cristalizadas da forma adequada e com alta resolução em estudos de difração de raio-X.

Trabalhos com cristalografia de raio X mostraram que a estrutura tridimensional das lipases de eucariotos e procariotos apresenta um padrão conformacional comum, denominado de conformação α/β hidrolase, composto por uma sequência de α -hélices e folhas- β pregueadas (BORNSCHEUER, 2002). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por estrutura folha- β paralelas rodeado por porções em α -hélice conforme mostrado na Fig.1 (SCHRAG et al., 1997).

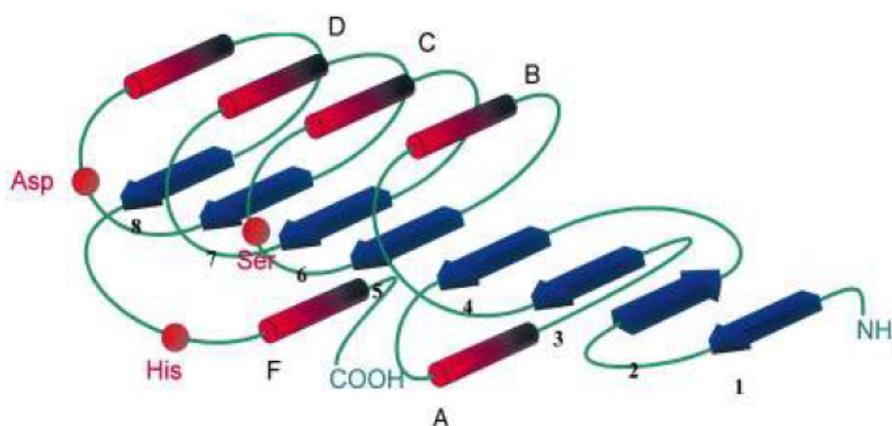


Figura 1: Modelo estrutural de α/β hidrolases (BORNSCHEUER, 2002)

A atividade da lipase depende da tríade catalítica do sítio ativo (**Serina – Aspartato – Histidina ou Glutamina**), respectivamente nessa ordem. O motivo estrutural conservado é composto por uma estrutura em folha β -pregueada central, contendo um resíduo de aminoácido de serina ativo, posicionado em uma volta β chamada de cotovelo catalítico e circundada por estruturas em α -hélices. Em função desse motivo estrutural, essas enzimas são classificadas como pertencentes à superfamília estrutural α - β hidrolases. O resíduo de serina do sítio ativo dessas enzimas, geralmente é encontrado em um pentapeptídeo conservado, composto pelos resíduos glicina e serina intercalados com qualquer resíduo de aminoácido (G-X-S-X-G). O sítio ativo serina é incorporado a elementos da estrutura secundária formando uma estrutura: **folha- β - giro - α -hélice** (BORNSCHEUER, 2002; CASTRO et al., 2004; DEREWENDA & DEREWENDA, 1991).

Os dois resíduos de glicina do motivo G-X-S-X-G são de extrema importância, pois eles mantêm a conformação entre as estruturas folha- β e α -hélice. São resíduos conservados e com uma distância curta entre os átomos de Carbonos- α conforme mostrado por Cygler et al. (1992), que comparou os genes da lipase de *Geotrichum candidum* e *Rhizomucor miehei*, mostrando a região conservada e a distancia curta entre as glicinas (Fig. 2). Apesar da glicina ser altamente conservada, em alguns casos pode-se encontrar um resíduo de alanina no lugar da glicina sem haver nenhuma alteração na conformação da molécula. Esse motivo conservado é encontrado em todas as 66 famílias da superfamília estrutural α - β hidrolases.

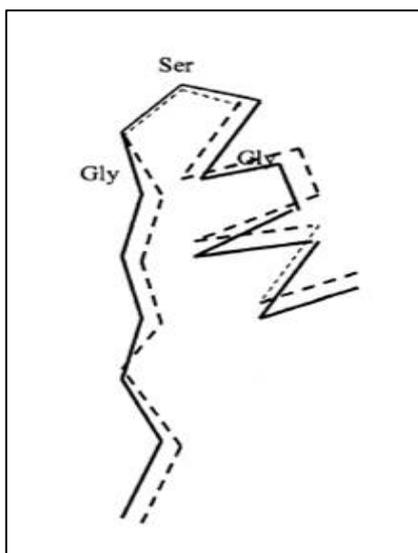


Figura 2: Superposição do Motivo folha- β - Serina - α -hélices (CYGLER et al., 1992)

Embora o arranjo tridimensional e a estrutura do sítio ativo das lipases tenham características em comum, a acessibilidade ao sítio ativo bem como os resíduos em torno do motivo são diferentes em cada tipo de lipase. Por exemplo, na lipase de *Rhizomucor miehei* o sítio ativo está coberto por uma região curta (*alça*) de aproximadamente 10 Angstrons da superfície da proteína. Uma estrutura similar foi encontrada na lipase humana, porém com uma *alça* maior, com uma área de aproximadamente 14 Angstrons da superfície protéica (TERZYAN et al., 2000).

Dentro de algumas famílias de lipase, o sítio ativo e os resíduos de aminoácidos estão arranjados de maneira diferente. Dentro da família de lipases secretadas, encontram-se somente dois resíduos do sítio catalítico, e não três resíduos. Enzimas como lipases, proteases, esterases e peroxidase são membros da superfamília α - β -hidrolases. Dentre os membros com atividade lipásica em fungos podemos destacar as famílias:

- 1) **Carboxilesterase:** possuem alta diversificação e estão presentes em eucariotos superiores, atuam sobre ésteres carboxílicos. A sequência consenso característica dessa família é F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G, o sítio catalítico envolve os três resíduos de aminoácidos já descritos anteriormente como S-D-H (MYERS et al., 1988; CYGLER et al., 1993);
- 2) **Lipase Secretada (LIP):** é secretada e expressada durante o ciclo de infecção de patógenos, em particular *C. albicans*, contribui para persistência da virulência em humanos (HUBE et al., 2000);
- 3) **Lipase:** são lipases, atuam sob a forma de lipídeos complexos (triglicerídeos, fosfolípidos, lipoproteínas, esteróis e ceras), estão ligadas a membrana e difusas no lúmen (protoplasma), são muito próxima a família de lipase classe 3. São amplamente distribuídas em animais, plantas e procariotos. A sequência consenso característica dessa família é a mesma sequência da classe de lipase 3 [LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-{YAG}-G-[GSTAC]. São enzimas lipolíticas que hidrolisam a ligação éster dos triglicerídeos, nos vertebrados superiores existem pelo menos três isoformas específicas de tecidos, a hepática, pancreática e gástrica, que são relacionadas umas com as outras (CHAPUS et al., 1988; PERSSON et al., 1989; BLOW, 1990; McLEAN et al., 1986; BAKER, 1988).

- 4) **Lipase_2**: São triacilglicerol lipases ou acilhidrolase que hidrolisam a ligação éster de triacilgliceróis formando diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livre. É uma lipase extracelular de *Bacillus subtilis* (DARTOIS et al., 1992).
- 5) **Lipase_3**: são lipases que hidrolisam a ligação éster de triacilgliceróis.

1.4. ASPECTOS FUNCIONAIS DAS LIPASES

As lipases podem ser classificadas como lipases “verdadeiras”, esterases e fosfolipases dependendo do seu modo de ação e tipos de substrato sobre os quais atua (CORREIA, 2010; COSTA & PERALTA, 1999).

As lipases representam um grupo de biocatalisadores flexíveis quanto a sua especificidade, sendo que a diferença mais importante entre as lipases “verdadeiras” e outras hidrolases, como as esterases, são as interações físico-químicas com seus substratos. Além disso, apesar do modo de ação das lipases “verdadeiras” ser semelhante ao das esterases, sua atividade é muito aumentada quando situada na interface polar-apolar e apresentam maior afinidade por óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes (COSTA & PERALTA, 1999; SALAMEH & WIEGEL, 2007). Já as esterases (E.C. 3.1.1.1), hidrolisam as ligações de acil-ésteres de cadeia curta ou ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (KOURIST et al., 2010; BIER, 1955).

As fosfolipases são específicas para fosfoglicerídeos, hidrolisando o grupo acila dos mesmos (Fig. 3). São classificadas como fosfolipase A, B, C e D dependendo do seu modo de ação. A fosfolipase A pode hidrolisar qualquer uma das duas cadeias acil, sendo classificada como fosfolipase 1 (hidrolize da cadeia acil 1) ou fosfolipase 2 (hidrolize da cadeia acil 2). A fosfolipase B hidroliza os dois grupos acil, resultando na acumulação de lisofosfolipídeos. As fosfolipases A e B tem atividade de lisofosfolipase, removendo assim a porção acil restante dos lisofosfolipídeos. A cabeça polar é removida com o rompimento das ligações fosfodiéster pelas fosfolipases C e D (KOHLENER et al, 2006).

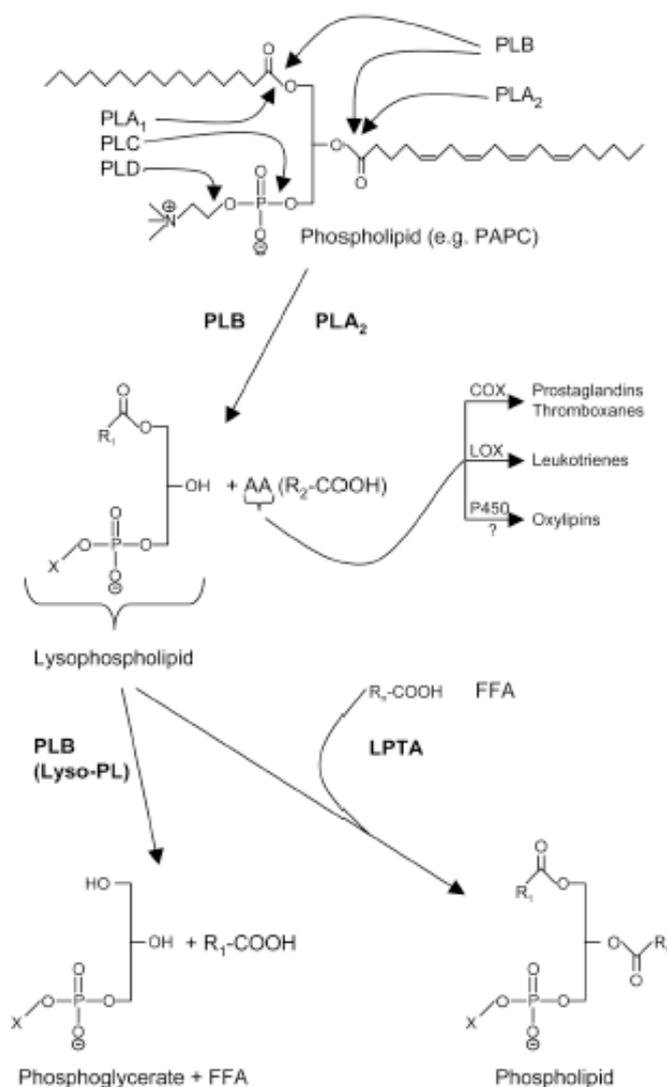


Figura 3: Mecanismo de hidrólise das fosfolipases

As lipases são frequentemente chamadas de triacilglicerol hidrolases, pois, em seu ambiente natural, possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (GHANEM, 2007; COSTA & PERALTA, 1999). Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (Figura 4), sendo que a quantidade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (FALCONE, 2009).

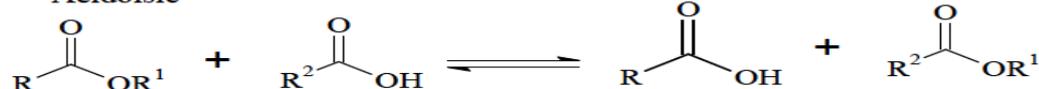
Hidrólise**Esterificação****Interesterificação****Transesterificação****Alcólise****Acidólise****Aminólise****Lactonização**

Figura 4: Funções catalíticas das lipases

Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER et al., 1999). Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação, de substrato ou por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (CASTRO et al., 2004; COSTA & AMORIM, 1999; SOARES, 2000; PAQUES & MACEDO, 2006; BURKERT, 2003). Há vários tipos de especificidade:

- **Quanto ao substrato:** velocidades de hidrólise variável entre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis catalisadas por uma mesma enzima ou enzimas purificadas de uma mesma fonte;

- **Lipase não específica ou hidrólise não específica:** onde há a liberação de ácidos graxos das três posições, produzidas, por exemplo, por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, entre outras (Fig. 5 A):
- **Regiosseletividade:** hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxo primários, secundários, terciários (Fig. 5 B). São produzidas por *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, etc.;
- **Quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato ou tipo-seletividade:** preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações. O exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*;
- **Estereoespecificidade:** discriminação entre enantiômeros, no caso de substratos racêmicos.

Pode-se observar também a combinação dos tipos citados ou a ausência de especificidade (PAQUES & MACEDO, 2006; CASTRO et. al, 2004).

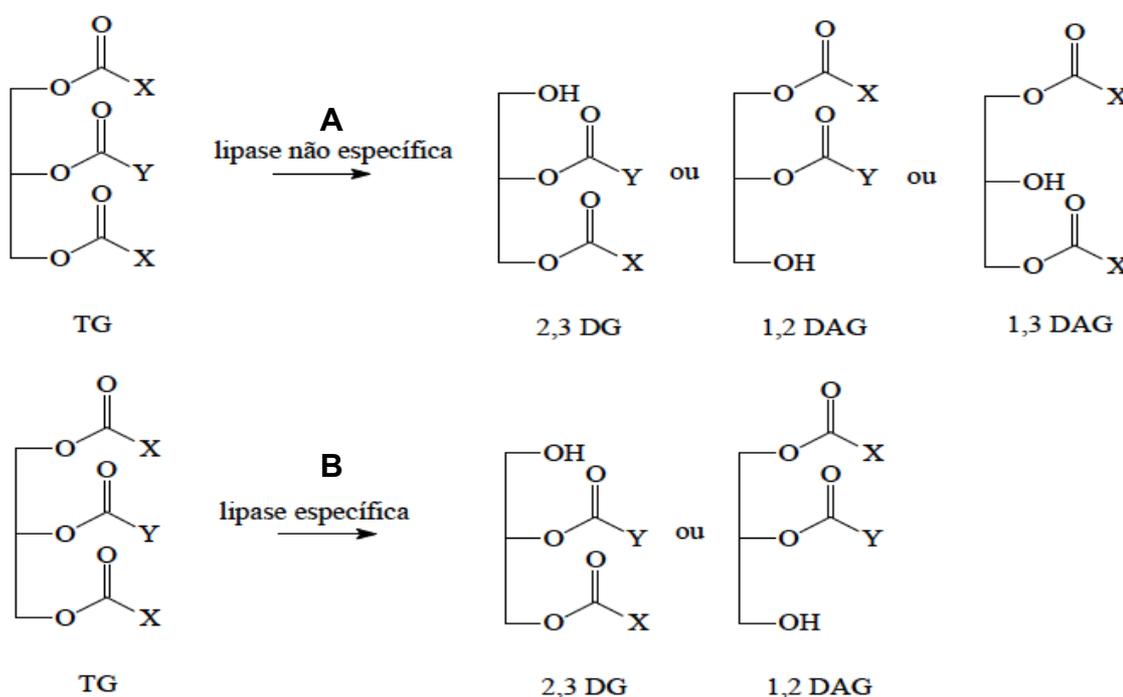


Figura 5: Catálise por lipases não específica (A) e 1,3 específica (B). Adaptado de Paques & Macedo (2006).

A grande flexibilidade desta enzima, aliada a diferentes possibilidades de especificidade de substratos existentes entre as diferentes lipases, confere a esta família de enzimas um potencial enorme de aplicações (GANDHI, 1997).

1.5. APLICAÇÕES DAS LIPASES

A biotecnologia, buscando novos biocatalizadores, está possibilitando o desenvolvimento de novas técnicas e abordagens experimentais na localização e identificação de novos genes que codificam produtos com potencial de mercado, em especial aplicação do campo da “energia verde” (BARON, 2008),

A indústria de enzimas, como existe hoje, é o resultado do rápido desenvolvimento das últimas quatro décadas, graças à evolução das técnicas de Biologia Molecular. O desenvolvimento dos processos de fermentação, durante o final do século XX, propiciou a produção de enzimas em escala industrial, através do uso de cepas selecionadas e tornou possível a obtenção de enzimas purificadas e bem caracterizadas (GANDHI, 1997; KRISHNA, 2002; FERNANDES, 2007).

Inúmeras são as aplicações potenciais das lipases, muitas delas já desenvolvidas em escala industrial. As lipases tem sido frequentemente utilizadas na indústria farmacêutica em resolução de misturas racêmicas; na formulação de detergentes e síntese de biossurfactantes; no tratamento de efluentes; na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras) para produção de biodiesel; na indústria agroquímica; na manufatura de couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (GANDHI, 1997; FERNANDES, 2007).

Uma aplicação que tem merecido destaque, é a utilização de lipases na obtenção de fármacos ou insumos farmacêutico sem suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois essas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. Quiralidade é um fator chave na eficácia de muitos medicamentos e dessa maneira a produção de drogas, tornando-se cada vez mais importante na indústria farmacêutica. É reportado na literatura, que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica, e que a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente um dos isômeros (R ou S) apresenta atividade biológica, o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico. Um exemplo desse potencial é o Baclofen, que é quimicamente (RS)-beta-(aminometil)-4-clorobenzeno propanóico. Esse medicamento é utilizado no tratamento da dor e como um relaxante muscular, ele produz dois isômeros. A lipase de *C. cylindracea*

tem sido usado como um catalisador para a resolução dessa mistura racêmica (HASAN et al., 2006).

As indústrias farmacêuticas e químicas estão aumentando a procura por lipases e esterases. Esse aumento se dá devido à demanda exponencial para descoberta de novas enzimas lipolíticas para aplicações biotecnológicas, utilizando recursos apropriados, como a clonagem gênica (BORNSCHEUER, 2002).

1.6. FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS

A partir da década de 70, novas tecnologias foram desenvolvidas, permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos, em um processo chamado de clonagem gênica. Anterior à década de 70, o DNA era o componente celular mais difícil de ser analisado, pois sua sequência de nucleotídeo era enorme e não havia tecnologia suficiente de análise (ASTOLFI-FILHO et al., 2005; CORREIA, 2010).

A tecnologia do DNA recombinante (TDR), como se convencionou denominar esse conjunto de técnicas, tem uma ampla aplicação que vem permitindo o isolamento e o estudo da regulação da expressão gênica de centenas de organismos, na determinação da sequência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, vacinas e enzimas industriais em grandes quantidades. Sua aplicação comercial ou biotecnológica parece ter um potencial inesgotável. A TDR também é uma potente alternativa que permite o melhoramento de espécies e produtos de valor biotecnológicos (ASTOLFI-FILHO et al., 2005).

A técnica central da TDR é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. O processo é baseado em três enfoques experimentais principais (ASTOLFI-FILHO et al., 2005; BURNS & BOTTINO, 1991):

- 1) A produção de fragmentos de DNA de fontes diferentes que contenham as sequências gênicas de interesse;
- 2) A reunião dos fragmentos em uma molécula de DNA capaz de se replicar (vetor);
- 3) E a transformação de células bacterianas com a molécula recombinante de modo que elas se repliquem e então se expressem.

Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante. Como consequência do desenvolvimento dessa tecnologia, foi ampliada a possibilidade de se explorar um número de variantes enzimáticas geradas por “evolução” *in vitro* para uma determinada aplicação. O emprego de produtos e organismos modificados por engenharia genética tem permitido o desenvolvimento de tecnologias aplicadas em diversas áreas do conhecimento (ASTOLFI-FILHO et al., 2005; CORREIA, 2010; BURNS & BOTTINO, 1991) tais como biologia forense, testes de paternidade, biosensores, prospecção de drogas, produção de medicamentos, etc.

Segundo Krishna (2002), novas tecnologias como a TDR, recombinação gênica, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida propiciaram a obtenção de enzimas com características novas e mais específicas a substratos e condições de interesse industrial, promovendo a expansão de aplicação de enzimas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar o isolamento e clonagem da lipase do fungo *Endomelanconiopsis endophytica*

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Identificar e determinar a atividade enzimática da cepa
- b. Realizar um estudo comparativo e desenvolvimento de um sistema de classificação das lipases de fungos bem caracterizadas depositadas no banco de dados UNIPROT;
- c. Realizar os alinhamentos locais para verificação do grau de identidade e similaridade entre as sequencias de lipases do fungo *Endomelanconiopsis endophytica* depositadas no banco de dados UNIPROT;
- d. Realizar a extração do RNA, síntese do cDNA dupla fita;
- e. Realizar a clonagem e identificação do gene por sequenciamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CULTIVO

A cepa do fungo endofítico utilizada neste trabalho (CBA 309), foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia (LMB) do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). O microrganismo estava preservado em meio sólido de BDA (Batata; dextrose; ágar) em frasco de penicilina.

3.1.1. Reativação

A cepa foi reativada em placas contendo BDA e incubados à 30 °C, durante 7 dias. Para tanto foi preparado um infuso de batata. Brevemente, 200 g de batata orgânica descascada e cortada em cubos foram colocados em um béquer de 1 L contendo 250 mL de água destilada. O béquer foi levado ao micro ondas por 20 min para o cozimento da batata. O conteúdo foi filtrado em gaze e seu volume, completado para 1L.

Após esse processo acrescentou-se 20 g/L de glicose, que foi dissolvida no infuso de batata orgânica e depois adicionado 15 g/L de ágar. Essa mistura foi homogeneizada e autoclavada a 121°C por 15 min, não foi necessário ajustar o pH pois o meio permanecia a um pH 6 a 6,5. Após esse procedimento o meio de cultura foi vertido em placas de petri.

3.2. INDUÇÃO ENZIMÁTICA

Para a avaliação da produção de lipase foi realizada uma fermentação em substrato líquido (FSL). Nesta fermentação foi utilizado um meio de cultura contendo fontes de carbono a base de óleo de oliva.

Um pequeno fragmento (7 mm) da cepa reativada foi retirado e inoculado em tubos contendo 20 mL de meio de cultura líquido composto de:

- 1) Peptona - 3 g.L⁻¹;
- 2) K₂HPO₄ – 2 g.L⁻¹;
- 3) CaCl₂ – 2 g.L⁻¹;
- 4) MgSO₄ . 7H₂O– 1 g.L⁻¹;

- 5) extrato de levedura – 2 g.L⁻¹;
- 6) 1% (v/v) de tween 80;
- 7) 2% (v/v) de óleo de oliva comercial.

Todos os reagentes foram colocados sob agitação em um agitador orbital durante 7 dias a uma temperatura de 30 °C com rotação de 100 g.

3.2.1. Determinação da atividade enzimática

O método para determinação da atividade enzimática foi adaptado de Winkler & Stukmann (1979). Este método baseia-se na reação de hidrólise em meio aquoso do palmitato de *p*-Nitrofenila (*p*-NPP), conforme mostrado na Fig. 6, catalisada pela lipase em presença de surfactantes: goma arábica (Sigma) e Triton X-100 (Sigma). Como produto dessa reação tem-se a formação do *p*-nitrofenol que em solução assume uma coloração amarela e que pode ser quantificado com leitura no comprimento de onda 410 nm em espectrofotômetro.

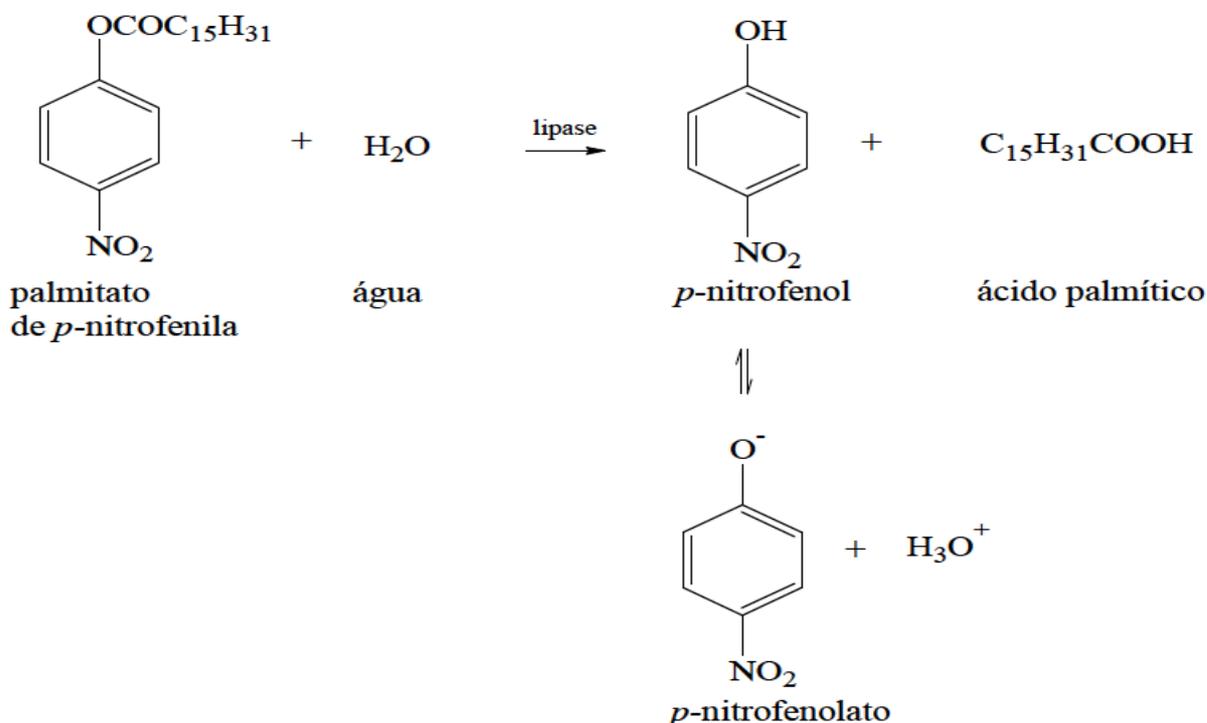


Figura 6: Síntese da reação de hidrólise do *p*-NPP catalisada por lipase (BARON, 2008)

Para a reação da hidrólise com o substrato líquido foram preparada duas soluções:

- 1) **Solução A:** palmitato de *p-nitrofenila* (Sigma) diluído em isopropanol, a uma concentração de 3 mg/mL^{-1} .
- 2) **Solução B:** 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica diluída em 450 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,0.

A leitura da absorbância em 410 nm da solução de cada isolado foi comparada com a da reta padrão para o p-NP, a fim de quantificar a produção de lipase pelos isolados. Uma unidade de atividade de lipase (U) é definida como a quantidade de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de p-NP. mL^{-1} sob as condições do ensaio.

Foram aliqotados 1 mL do meio metabólico em microtubos de 1,5 mL e centrifugado a $10000 g$ a 4°C durante por 20 min (Figura 10). Foi acrescentado 1 mL da solução A e adicionado a 9 mL da solução B, lentamente e sob agitação. A mistura foi realizada antes da determinação da atividade, visto que, o substrato é instável quando em meio aquoso.

Desta solução foram colocados 0,9 mL e um micror tubo de $2 \mu\text{L}$ e adicionado 0,1 mL do sobrenadante do meio centrifugado ou de tampão (branco). Os tubos foram levados ao banho seco a 37°C sob agitação durante 15 minutos.

A reação foi transferida para uma cubeta de 1 mL, onde foi realizada a leitura contra um branco contendo o substrato e tampão sem o meio. A cinética da reação foi acompanhada pela leitura das absorbâncias.

3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Um fragmento de 7 mm da cepa retirado do cultivo em BDA foi inoculado em 40 mL de caldo de BD acrescido de extrato de levedura, contidos em erlenmayer de 125 mL e mantido sob agitação constante ($100 g$, 30°C , durante 72 horas). Após esse período, foi filtrada em papel de filtro comum para obtenção do micélio.

3.3.1. Extração do DNA

O micélio foi triturado em presença de nitrogênio líquido em almofariz e transferido para microtubos de $2 \mu\text{L}$, pesado e adicionado 10 volumes, da massa úmida, de tampão de extração (SDS 1%; NaCl 1,4M; Tris-HCl 100mM pH 8; EDTA

20mM). Incubado a 60 °C durante 60 min. Em seguida foi adicionado 5% da solução de Lizozima (50mg/mL), incubando por 30 min à 37°C. Após esse período de incubação foram adicionados 5% da solução de Proteinase K (20mg/mL) e 1% de SDS 10%. A amostra foi colocada sob agitação à 55°C por 2h. Em seguida a amostra foi resfriada e centrifugada a 9000 g por 15 min, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foi adicionando o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido de agitação mecânica em agitador tipo vortex e centrifugação sob as mesmas condições descritas. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a extração com FCI repetida. Novamente fase aquosa foi coletada e a esta adicionada volume igual de éter etílico, seguido de agitação mecânica e centrifugação por 9000 g durante 5 min. Para precipitação dos ácidos nucleicos foi acrescentado igual volume de isopropanol gelado e mantido em gelo úmido por 20 min. A seguir, os tubos foram centrifugados a 9000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% com uma centrifugação intermediária a 9000 g por 5 min, o precipitado permaneceu em temperatura ambiente para secagem e em seguida foi reidratado com 30 µL de TE + RNase (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM de EDTA; 10mg/mL RNase).

Para confirmar a extração e quantificação aproximada do DNA, 3 µl do produto de extração com 2 µL de tampão de amostra TEB 5X pH 8.0 (400 mM Tris-HCl, 12,5 mM EDTA, 565 mM Ácido Bórico, 32% de Glicerol, 0,01% de Azul de Bromofenol) e concentração padrão Lambda (Invitrogen) foram aplicados em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo na concentração de 0,05 µg/ml. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com tampão TBE 1X pH 8.0 (80mM Tris-HCl; 113 mM ácido bórico; e 2,5 mM EDTA) a 120 volts por 30 minutos. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultravioleta.

3.3.2. Amplificação

Com a finalidade de amplificar a região ITS para identificação da cepa com os iniciadores ITS1 e ITS4 (Tabela 1), foi realizada uma PCR com o conjunto de reagentes “GoTaq” (Promega). Para uma reação de 25 µL, foram utilizados os seguintes reagentes na concentração final 1X tampão para PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0,2

mM de dNTPs, 0,4 μ M de cada iniciador, 50 ng de DNA, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e água ultrapura q.s.p.

Tabela 1: Iniciadores ITS

Iniciadores ITS	
Iniciador	Sequência
ITS 1	5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems), com a seguinte programação:

1. Desnaturação inicial à 95°C por 4 minutos;
2. 35 ciclos de:
 - a. 45 segundos à 95°C (desnaturação da cadeia recém sintetizada);
 - b. 40 segundos à 58°C (pareamento dos iniciadores);
 - c. 3 minutos à 72°C (polimerização da cadeia).
3. Etapa final à 72° por 10 minutos, para que a atividade terminal transferase da Taq DNA polimerase adicionasse bases adenina ao final da cadeia.

Para verificar a eficiência da reação, 1 μ l do produto de cada reação PCR com 2 μ l de tampão de amostra TEB 5X pH 8,0, o marcador de peso molecular 1Kb Fig. 7A) DNA Ladder (Invitrogen) e o marcador 100 pb Fermentas (Fig. 7B) foram aplicados em gel de agarose 2% corado com 0,05 μ g/ml Brometo de Etídeo. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com tampão 1X TBE a 130 volts por 35 minutos. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados em transluminador.

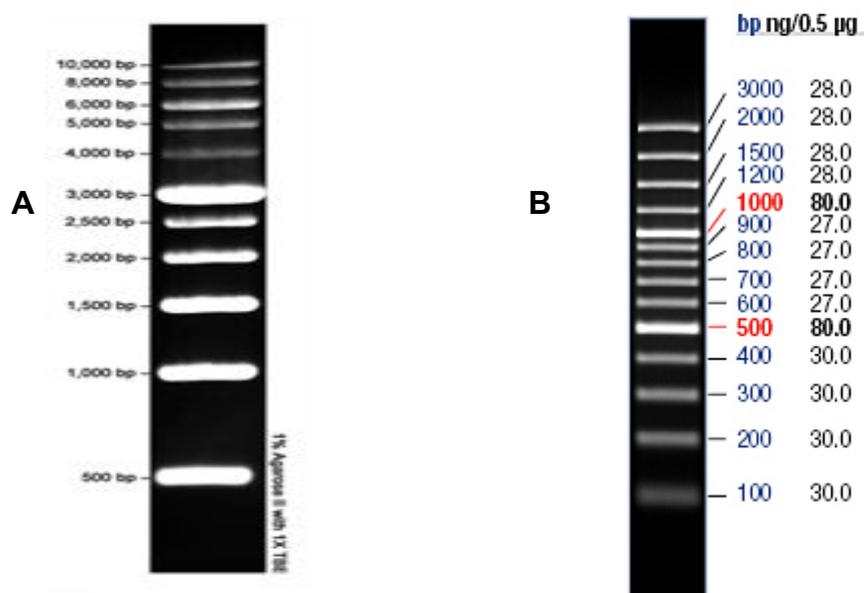


Figura 7: Marcadores de massa molecular: (A) 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); (B) 100pb Fermentas

3.3.3. Sequenciamento

O protocolo de identificação molecular utilizado no presente trabalho foi adaptado de White & Lee (1990) e realizado em parceria com o Laboratório de Genética Molecular e Genomas, de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), sob a coordenação do professor Dr. Francisco G. Nóbrega.

O conjunto de reagentes Go®TaqFlexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) e os oligonucleotídeos ITS4 e ITS5 foram usados para amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do cistron ribossomal seguindo as recomendações do fabricante. A termociclagem (Express Thermal Cycler Hybaid Limited), constou de uma desnaturação inicial à 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos: 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30s.

O sequenciamento direto a partir dos amplicons foi realizado com o reagente "Big Dye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems TM) segundo a reação: 1 x Big Dye Terminator Sequencing mix, 1 x sequence buffer, 200 ng do produto de PCR, 100 nM de cada oligo, ITS4 ou ITS5, água ultrapura para um volume total de 10 µl. A termociclagem constou de 40 ciclos a 95°C 30 s, 50°C 30 s e 60°C 1 min.

As sequências foram obtidas por eletroforese capilar realizada em um analisador automático ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), seguindo as instruções do fabricante. As sequências foram analisadas com o programa Lasergene® SeqMan™ II para o Windows versão 5.00 (DNASTAR) e foram comparadas contra o banco de sequências nucleotídicas não redundantes (nr/nt) do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com a ferramenta BLASTN disponível no sítio do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

3.4. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS LIPASES DE FUNGOS

3.4.1. Alinhamento

Foram selecionadas para essa parte do estudo sequências de lipases mais bem anotadas nos Bancos de Dados: (1) UniProt/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/>), onde as sequências são anotadas e revisadas manualmente por seus autores, possuindo então uma alta qualidade de anotação e não redundância nas sequências depositadas, reunindo resultados experimentais e computadorizados, com conclusões científicas; e (2) Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), que possui uma larga coleção de famílias proteicas onde cada uma possui alinhamento múltiplo de sequências e modelos ocultos de Markov. As sequências de aminoácidos dessas lipases foram alinhadas usando o programa de alinhamento múltiplo de sequências do Clustal W. (THOMPSON et al., 1994)

Uma vez que, até o momento, a produção de lipase pelo fungo *Endomelanconiopsis endophytica* não foi descrita, diversas sequências de lipases de fungos foram utilizadas na tentativa de encontrar regiões similares entre elas que pudessem ser alvo de iniciadores. Uma análise filogenética preliminar mostrou que as sequências mais próximas do fungo em estudo foram as da classe *Dothideomycetes*. Porém as sequências não estão anotadas e apresentam poucas informações, dessa maneira foram escolhidas as sequências de fungos mais bem anotadas nos bancos de dados e a partir dessa triagem, tais sequências foram alinhadas com as sequências de *Dothideomycetes*.

Os alinhamentos foram visualizados e editados utilizando o programa Jalview (WATERHOUSE et al., 2009) que é um programa de alinhamento múltiplo de

sequência escrito em Java, é utilizado em diversas plataformas com servidores como o Clustal W e T-Coffee.

A ferramenta BLAST foi utilizada para a procura de sequências similares entre os diversos fungos. As estruturas tridimensionais foram visualizadas através do programa Swiss-Pdb-Viewer (GUDEX & PEITSCH, 1996) que é um aplicativo de interface amigável que permite analisar varias proteínas ao mesmo tempo, as proteínas podem ser sobrepostas para deduzir alinhamentos estruturais e comparar os sítios ativos ou partes relevantes.

Nas sequências sem anotação do peptídeo sinal foi utilizada a ferramenta SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que permite obter a predição de peptídeos sinais e a localização do sítio de clivagem em sequências de aminoácidos em diferentes microrganismos (BENDTSEN et al., 2004).

3.4.2. Montagem do Dendograma

Para a montagem do dendograma foi utilizado o programa Jalview. A árvore de similaridade foi montada utilizando o método de Distancia UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) ou Método de Agrupamento Pareado com Média Aritimética Não Ponderada.

3.5. ISOLAMENTO DO GENE

3.5.1. Construção dos iniciadores degenerados

Para construção dos iniciadores (Tabela 2) foram mantidas as regiões que deram similaridade com o alinhamento dos peptídeos de *E. endophytica* sequenciados no trabalho da Msc. Auricelia Matos da Gama e que foram gentilmente cedidas para o desenvolvimento do presente trabalho. Para o desenho foi utilizado o servidor <http://www.idtdna.com>, segundo os parâmetros:

- Concentração do sal monovalente Na^+ : 50 mM
- Concentração de DNA: 200 nM
- Concentração do sal bivalente MgCl^{++} : 1,5 mM
- Concentração de dNTP: 0,2 mM

- Temperatura de pareamento dos Iniciadores (°C): temperatura mínima de 55 °C, temperatura ótima de 59 °C e temperatura máxima de 62 °C;
- Quantidade de GC (%): condição mínima de 35%, condição ótima de 48% e condição máxima de 60;
- Tamanho dos iniciadores (nucleotídeos): tamanho mínimo de 17, tamanho ótimo de 20 e tamanho máximo de 25

Tabela 2: Iniciadores degenerados para lipase

Iniciadores Degenerados	
Iniciador	Sequência
L1F	5'-TCAACTACCGCGTCCGG-3'
L1BF	5'-KTCARCTACMGMGTSSGG-3'
L2F	5'-GCATTTGGAGGCGATCCA-3'
L2BR	5'-HTGGRTCDCCWCCRAA-3'
L3R	5'-CACCGGCACTCTCACC-3'
L3BR	5'-CACCBGCACTVDCWCC-3'

3.5.2. Confirmação da especificidade dos iniciadores por PCR

Com a finalidade de confirmar a especificidade da amplificação, foi realizada uma PCR com o conjunto de reagentes “GoTaq” (Promega). Para uma reação de 25 µL, foram utilizados os seguintes reagentes na concentração final 1X tampão para PCR, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada iniciador, 50 ng de DNA, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e água ultrapura q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems), com a seguinte programação:

1. Desnaturação inicial à 95°C por 4 minutos;
2. 35 ciclos de:
 - a. 45 segundos à 95°C (desnaturação da cadeia recém sintetizada);
 - b. 40 segundos à 58°C (pareamento dos iniciadores);
 - c. 3 minutos à 72°C (polimerização da cadeia).
3. Etapa final à 72° por 10 minutos, para que a atividade terminal transferase da Taq DNA polimerase adicionasse bases adenina ao final da cadeia.

Para verificar a eficiência da reação, 1 µl do produto de cada reação PCR com 2 µl de tampão de amostra TEB 5X pH 8.0, o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) e o marcador 100pb Fermentas foram aplicados em gel de agarose 2% corado com 0,05 µg/ml Brometo de Etídeo. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com tampão 1X TBE a 130 volts por 35 minutos. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados em transluminador.

3.5.3. Variações da reação padrão para melhorar a qualidade da amplificação

Para verificação a condição ideal da PCR, foi realizado um gradiente de temperatura de pareamento dos iniciadores versus diferentes concentração de magnésio. A reação de PCR em gradiente foi modificada apenas as temperaturas de anelamento dos iniciadores em intervalos regulares de 55°C, 57°C, 58°C e 59°C.

A concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂), um importante cofator da enzima DNA polimerase, é crítica para uma reação de PCR. Foram testadas as concentrações 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM e 4mM, em todas as temperatura anteriormente citadas.

3.5.4. Purificação do produto de PCR por Eletroeluição

Para purificação foi preparado TBE 0,25X (250 mL de TBE 1X, 750 mL de água destilada e deionizada), em seguida, as bandas de interesse foram cortadas diretamente do gel de agarose 1%. Os fragmentos do gel contendo o DNA de interesse foram colocados dentro de sacos de diálise e contendo TBE 0,25X e eletroeluídas por eletroforese, 200V por 50 min. Ao final dessa primeira fase os polos foram invertidos e a mesma voltagem foi aplicada por 20 seg. Todo o volume do saco diálise foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. A amostra foi precipitada com a adição de igual volume de isopropanol e incubada por 30 min a -20°C. Após esse período, centrifugou-se a amostra a 10000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *precipitado* foi lavado com a adição de 500 µL de Etanol 80%, posteriormente a amostra foi centrifugada a 10000 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi posto para secar em temperatura ambiente. As amostras foram reidratadas com 30 µL de TE 10mM.

3.5.5. Preparação da célula quimicamente competente

Foi realizado um pré-inóculo da linhagem RR1 de *E. coli* em 30 mL de LB por 12h a 37°C 100 g no agitador rotatório (New Brunswick Scientific, Classic Series). Um mililitro do pré-inóculo foi transferido para um erlemayer de 500 mL (10% do volume) contendo 50 mL de LB. A cultura foi incubada no agitador rotatório a 37°C e 200 g. Após 1h crescimento bacteriano foi coletado 1mL de amostra e realizado a leitura de OD₆₀₀ para determinação do crescimento até alcançar uma turvação de aproximadamente 1, que se deu em aproximadamente 2h de cultivo.

A cultura foi transferida para um tubo *falcon* de 50mL (estéril) e centrifugada a 4000 g, a 4°C por 10 min. Em seguida descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado em 15 mL de 10mM CaCl₂ gelado. A solução foi centrifugada novamente e o sobrenadante descartado.

Em seguida as células foram ressuscitadas em 15 mL de 50mM CaCl₂ gelado e 30 min no gelo. Após isso, a solução foi centrifugada a 4000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em 5mL de 50mM CaCl₂, permanecendo no gelo até o momento do uso.

3.5.6. Clonagem, transformação, coleta dos recombinantes

Os produtos da amplificação por PCR, foram clonados no vetor pCR 2.1 (Fig. 7), utilizando-se o conjunto de reagentes TOPO TA Cloning for Sequencing (Invitrogen). A reação foi realizada mantendo as mesmas proporções sugeridas pelo fabricante, mas para um volume final de 2 µL. Para essa reação foram utilizados 0,35 µL de Vetor TOPO, 0,35 µL de tampão salino e 1,30 µL de produto de PCR.

O volume total da ligação foi adicionado em 100 µL de suspensão de células competentes contidas em um microtubo de 2 mL, a mistura bem homogeneizada permaneceu em gelo por 30 min, seguido de um choque térmico de 42°C por 2 min e gelo por 1 min. Em seguida acrescentou-se 900 µL de LB. A cultura ficou sob agitação no agitador orbital por 1h a 37°C. Em seguida, foi centrifugada por 3 minutos a 10000 g. Parte do sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado no meio restante que permaneceu no tubo. Todo o volume foi plaqueado em meio LA Xgal (100mL de meio LA; 100uL de Blue-White Select

Screening Reagent-Sigma) e as placas foram incubadas a 37°C por no máximo 12 horas.

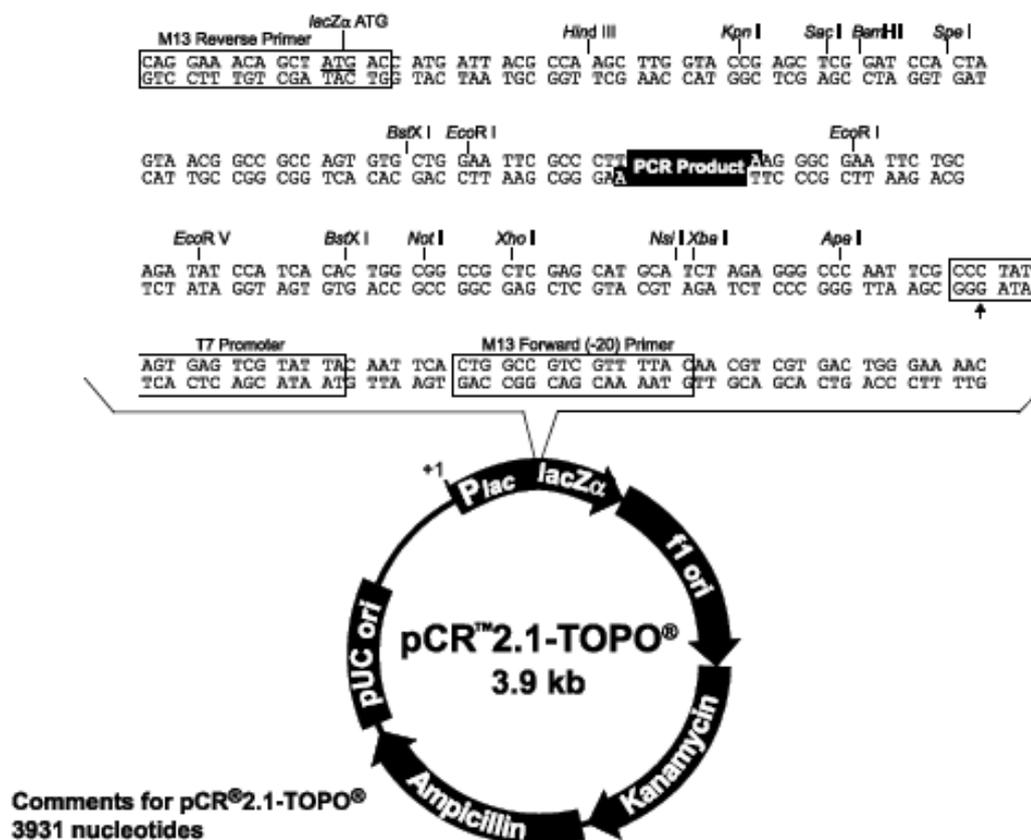


Figura 8: Vetor pCR 2.1TOPO TA Cloning for Sequencing (Invitrogen)

Os recombinantes (colônias brancas) foram repicados de forma ordenada (no padrão das microplacas de 96 poços) em meio LA. As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas.

3.5.6.1. Minipreparação do DNA plasmidial

Para a extração dos plasmídeos, foi utilizada a minipreparação de DNA plasmidial adaptado de Sambrook et al. (2001).

Os clones foram selecionados aleatoriamente e inoculados em 3 mL de LA em tubos falcon de 15 mL. A amostra foi incubada em agitação de 200 g por 12h a 37 °C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugados a 1500 g, 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o excesso drenado com os tubos invertidos sobre papel absorvente.

O precipitado foi ressuspenso em 200 µL do tampão osmótico (0,9 M dextrose; 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM EDTA) e em seguida foram adicionados 400 µL de solução de lise (1% SDS; 0,2M NaOH). Os tubos foram agitados à mão até se obter um aspecto homogêneo e em seguida deixados em temperatura ambiente. Passados 5 min, foram adicionados 400 µL da solução de neutralização (acetato de potássio 5M, ajustado o pH para 4,8 com ácido acético glacial). As amostras foram homogeneizadas e permaneceram por 30 min em gelo. Após esse período, foi centrifugado por 30 min a 1500 g.

Foram transferidos 700 µL do sobrenadante para um microtubo previamente preparado com 700 µL de isopropanol. A amostra foi homogeneizada por inversão e incubada no freezer a -20 °C por 30 min. Após esse período foram centrifugados por 15 min a 10000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com a adição de 500 µl de etanol 80% e em seguida centrifugado por 5 min a 10000 g. O sobrenadante foi novamente descartado e o excesso drenado com os tubos invertidos sobre papel absorvente. Após a secagem, 37 °C por 1h, o DNA plasmidial, foi reidratado com 50 µL de TE + RNase (10 µg/mL).

3.5.6.2. Triagem dos recombinantes por PCR

Com a finalidade de encontrar o clone contendo o inserto de tamanho esperado, foi realizada uma PCR nas mesmas concentrações e condições descritas anteriormente, utilizando os iniciadores do vetor pCR 2.1-TOPO (Tabela 3). A amplificação foi realizada com 2 min de desnaturação inicial à 94°C, 30 ciclos: 94°C 30 seg, 50°C 40 seg, 72°C 2 min. Os plasmídeos foram diluídos 10X, 100X e 1000x e usado 1 microlitro de cada diluição para a reação.

Tabela 3: Iniciadores pCR 2.1

Iniciadores vetor pCR 2.1-TOPO	
Iniciador	Sequência
M13 F	5'-CTGGCCGTCGTTTTAC-3'
M13 R	5'-CAGGAAACAGCTATGA-3'

3.5.7. Digestão do DNA plasmidial com enzima de restrição

Para confirmar o tamanho do inserto, uma metodologia alternativa à PCR foi a digestão com endonuclease de restrição. Para tanto, 1 microlitro da diluição 10X foi digerido com a enzima EcoRI (Fermentas Life Sciences) nas condições estabelecidas pelo fabricante.

3.5.8. Sequenciamento

Os clones contendo inserto com tamanho esperado foram sequenciados. Foi utilizado o conjunto de reagentes “Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems) segundo a reação: 1 x Big Dye Terminator Sequencing mix, 1 x sequence buffer, 200 ng do produto de PCR, 100 nM de cada oligo do vetor, água ultrapura para um volume total de 10 µl. A termociclagem constou de 40 ciclos a 95°C 30 seg, 50°C 30 seg e 60°C 1 min.

A análise das sequências foi realizada em um analisador automático de sequências ABI Prism® 3130 XL (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante.

As sequências foram comparadas contra o banco de sequências nucleotídicas não redundantes (nr/nt) do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com a ferramenta BLASTN disponível no sítio do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

3.5.9. Desenho dos iniciadores específicos

A sequência correspondente ao sequenciamento do gene da lipase foi utilizada para o desenho dos iniciadores específicos (Tabela 4), usando a ferramenta PrimerQuest™, disponível no sítio da IDT DNA (<http://www.idtdna.com>) segundo os critérios:

- Concentração do sal monovalente Na⁺: 50mM
- Concentração de DNA: 200nM
- Concentração do sal bivalente MgCl⁺⁺: 1,5mM
- Concentração de dNTP: 0,2mM
- Temperatura de pareamento dos Iniciadores (°C): temperatura mínima de 55 °C, temperatura ótima de 59 °C e temperatura máxima de 62 °C;

- Quantidade de GC (%): condição mínima de 35%, condição ótima de 48% e condição máxima de 60%;
- Tamanho dos iniciadores (nucleotídeos): tamanho mínimo de 17, tamanho ótimo de 20 e tamanho máximo de 25

Tabela 4: Iniciadores específicos para lipase

Iniciadores Específicos	
Iniciador	Sequência
Est FW1	5'-CTAACGCTGGGCTGTACGAC-3'
Est FW2	5'-CGAACTTCTCCAACAGCAG-3'
Est FW3	5'-CACGATGCCGTTGCTAA-3'
Est R1	5'-GTCGTACAGCCCAGCGTTA-3'
Est R2	5'-CCTTCCTCTGGTCGTACA-3'

3.6. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total foi preparado utilizando o método de extração com TRIZOL®. Brevemente, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol® para cada 50-100 mg de tecido celular. Em seguida foram adicionados 50-100 µL de pérolas de vidro (“glass bead”). As células foram lisadas com o agitador mecânico BeadBeater” em 3 ciclos de 30 seg sob a rotação de 200 g. Em seguida as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente (23°C a 25°C) para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio (1:5 v/v clorofórmio;Trizol®), a amostra foi agitada à mão por 15 seg e em seguida incubada por 3 min em temperatura ambiente. Após esse período a amostra foi centrifugada a 12000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Para precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol (1:2 v/v, do Trizol utilizado no início). Os tubos foram agitados cuidadosamente por inversão e incubado por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi centrifugada a 12000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado (1:1 v/v do Trizol utilizado no início). Os tubos foram agitados em agitador mecânico tipo vortex e em seguida centrifugados a 7500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco por cerca de 15 min a 37 °C e depois reidratado

com 50 µL de H₂O DEPC. Para auxiliar a reidratação do RNA os tubos foram incubados por 30 min a 55°C.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro, sendo a concentração calculada em µg/mL através da fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times \text{CE} \times \text{Fd}$$

Onde A_{260} corresponde ao valor de absorvância da amostra ao comprimento de onda de 260nm; CE coeficiente de extinção médio do RNA (40); e Fd corresponde ao fator de diluição.

3.6.1. Eletroforese do RNA isolado

Para verificar a integridade do RNA extraído foi realizada uma eletroforese em gel não desnaturante (agarose 1%; corado com Brometo de Etídeo na concentração de 0,05 µg/ml; com tampão TBE DEPEC 1X). Foi aplicado 3 µl do RNA total com 2 µl de tampão de amostra TBE 5X (Ainda vou colocar o marcador na legenda da figura). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com tampão TBE DEPEC 1X a 130 volts por 35 minutos e visualizados em transluminador equipado com lâmpada UVB.

3.7. SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR DUPLA FITA

A construção da biblioteca de cDNA foi feita utilizando conjunto de reagentes *Clontech SMARTer™ cDNA Synthesis*. Inicialmente tem-se a síntese da primeira fita. com um oligo (dT) acrescido de um adaptador na extremidade 5' e complementar a um iniciador também que consta no conjunto de reagentes . Para a síntese da primeira fita foi utilizado para a RT-PCR, 200ng de RNA, 1 µL do iniciador 3'SMART CDS II A, q.s.p. H₂O deionizada, para um volume final de 4,5 µL. Essa reação foi incubada por 3 min a 72°C, seguido por 2 min a 42°C (Termociclador Veriti, Applied Biosystems). Em seguida foi preparada a mistura:

- 2 µL de tampão 5x First-Strand
- 0,25 µL de DTT (100mM)
- 1 µL do oligonucleotídeo SMARTer II A (12 mM)

- 0,25 µL do Inibidor de RNase
- 1 µL de SMARTScribe Reverse Transcriptase (100U)

O volume total dessa segunda mistura (5,5 µL) foi adicionado ao volume total da primeira mistura contendo apenas RNA e iniciador, totalizando 10 µL. Em seguida a reação foi incubada a 42°C por 1h seguida de incubação a 72°C por 10 min. Ao final da reação foi adicionado 40 µL de TE.

A reação de LD-PCR inicia-se com a desnaturação a 95 °C por 1 min seguido de um número de ciclos por 15 seg a 95 °C (desnaturação), 30 seg a 65 °C e 3 min a 68 °C. O número de ciclos variou de 18 a 27 ciclos. Amostras dos produtos desses ciclos foram retiradas e observadas em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio, para visualizar qual era o menor número de ciclo capaz de produzir um produto para ser visualizado, evitando assim, amplificação excessiva dos transcritos mais expressos.

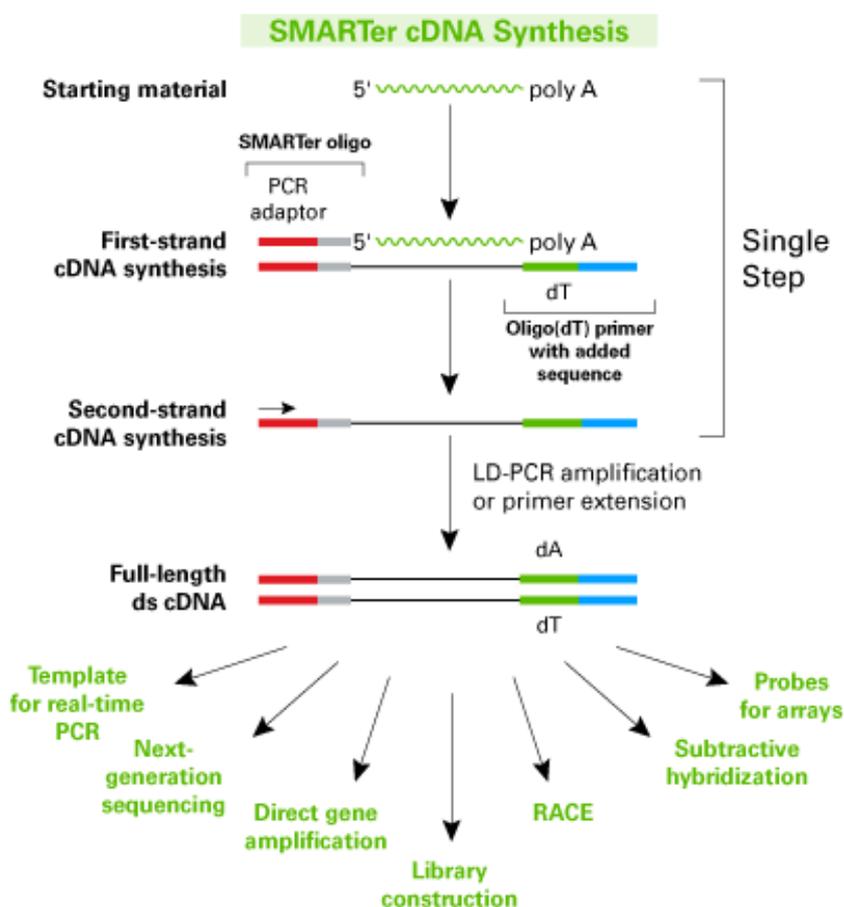


Figura 9: Fluxograma da construção da biblioteca de cDNA SMARTer

3.7.1. Amplificação parcial do gene da lipase a partir do DNA complementar total

Com a finalidade de verificar a existência do expresso de RNA do gene da lipase no cDNA dupla fita total recém-sintetizado, foi realizada uma PCR com conjunto GoTaq (Promega). Para uma reação de 25 μ L, foram utilizados em concentração finais: 1X do tampão para PCR, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 mM dos iniciadores (Forward: 5' PCR II A; Reverse: SMART 3'CDS II A) , 50 ng de cDNA, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e água ultra pura q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems), com 95°C por 2 min seguido de 35 ciclos de 95°C 15 seg 63°C 20 seg 72°C 15 seg.

3.7.2. Purificação do DNA complementar dupla fita

Utilizando conjunto de reagentes *Clontech SMARTer™ cDNA Synthesis protocol C*, a amostra foi purificada por cromatografia em coluna conforme descrito pelo fabricante. Brevemente, foi adicionado ao produto de PCR igual volume de fenol: cloroformio: álcool isoamílico (25:24:1) e em seguida agitado mecanicamente em agitador tipo vortex. A amostra foi centrifugada a 12000 g por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 700 μ L de n-butanol e agitado mecanicamente em agitador tipo vortex. Em seguida foi centrifugado a 12000 g rpm por 1min em temperatura ambiente. A fase orgânica foi removida e descartada. Para o preparo da coluna SPIN CHROMA + TE-1000, a mesma foi invertida várias vezes para suspender completamente a matriz de gel. Cuidadosamente a amostra foi aplicada no centro da superfície plana do leito do gel. Em seguida aplicou-se 150 μ L de tampão TNE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM NaCl, 0,1mM EDTA) e a drenagem foi feita por gravidade.

3.7.3. Adição de uma base desemparelhada nas extremidade 3' das moléculas de DNA complementar

Para a adição da base A ao cDNA dupla fita purificado, a amostra foi submetida a reação em presença de Taq DNA polimerase com a combinação de 720 ng de cDNA dupla fita, 0,2 mM de dATP, 1X de tampão para PCR, 1,5 mM

MgCl₂, água ultrapura q.s.p. para 25 µL. A reação consta apenas de incubação à 72°C por 10 min.

3.7.4. Quantificação do DNA complementar dupla fita

A quantificação da amostra de cDNA dupla fita foi feita por espectrofotômetro, sendo a concentração calculada em µg/mL através da fórmula:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times \text{CE} \times \text{Fd}$$

Onde A_{260} corresponde ao valor de absorvância da amostra ao comprimento de onda de 260nm; CE corresponde ao coeficiente de extinção que para DNA é 50; e Fd corresponde ao fator de diluição.

3.7.5. Clonagem do DNA complementar total e identificação do gene

Os cDNAs com a base adenina desemparelhada foram clonados no vetor PCR 2.1 conforme já descrito anteriormente, bem como a seleção dos recombinantes, preparação do DNA plasmidial e sequenciamento.

Para a extração dos plasmídeos, foi utilizada a preparação de DNA plasmidial, *boiling lysis*, adaptado de Sambrook et al. (2001). A preparação foi realizada em placas de 96 poços onde as amostras foram inoculadas em 2 mL de LA, incubada em agitação de 200 g por 12h a 37 °C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 4000 g, 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o excesso drenado com os tubos invertidos sobre papel absorvente. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água ultrapura e homogeneizado em agitador mecânico tipo vortex. Em seguida foram adicionados 300 µL de solução de lise Stet (0,1 M NaCl; 5%, volume a volume de Tween 20; 1 mM EDTA; 0,1 M Tris HCl pH 8,0). A solução de lise foram adicionados 5 mg/mL de lisozima e 10 mg/mL de RNase. As placas foram homogeneizadas em agitador mecânico tipo vortex e deixadas a temperatura ambiente, Passados 5 min, as placas foram levadas ao forno de microondas em alta potência até que se observou fervura. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. Imediatamente após, a placa foi removida do microondas e 100 µL de água ultrapura gelada foi adicionada e homogeneizada em

agitador mecânico tipo vortex. As placas permaneceram no gelo por 30 minutos e em seguida foram centrifugadas por 30 min, a 2500 g, a 4°C.

Duzentos microlitros do sobrenadante foram coletados e transferidos para placas novas previamente preparadas com 100 µl de 5M acetato de amônio incubadas no freezer a -20°C por 30 min, em seguida foram e centrifugadas por 30 min a 2500 g, a 4°C. Novas placas foram preparadas com 130 µL de isopropanol, e 20 µL de 2,5M acetato de sódio para receber 180 µL do sobrenadante da placa anterior. As placas foram incubadas no freezer a -20°C por 30 min. Após esse período, foi centrifugado por 30 min, a 2500 g, a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com a adição de 200 µl de etanol 80% e em seguida centrifugado por 5 min a 4000 g. O sobrenadante foi novamente descartado e o excesso drenado com as placas invertidas sobre papel absorvente. Após a secagem, o DNA plasmidial foi reidratado com 50 µL de TE + RNase (10 µg/mL).

Foram coletados 184 clones que seguiram para as etapas de sequenciamento e identificação, conforme já descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a hidrólise frente ao substrato p-NPP, conforme reta padrão mostrada na tabela 4, a cepa CBA 309 apresentou uma atividade lipásica de 1821 U/mL.

Tabela 5: Reta Padrão p-NPP

alíquotas	mM p-NP	µM p-NP	tampão	total	ABS
1,8	0,09	90	0,2	2	0,840
1,6	0,08	80	0,4	2	0,753
1,4	0,07	70	0,6	2	0,658
1,2	0,06	60	0,8	2	0,563
1	0,05	50	1	2	0,468
0,8	0,04	40	1,2	2	0,378
0,6	0,03	30	1,4	2	0,279
0,4	0,02	20	1,6	2	0,191

A produção de lipases tem sido desenvolvida principalmente por fermentação submersa (FSM) devido aos aspectos de engenharia dominados e desenvolvidos; está associada ao crescimento microbiano e conseqüentemente, às variações da composição e condições do cultivo (SHARMA et al, 2001).

Cihangir & Sarikaya (2004) estudaram a produção de lipase extracelular de *Aspergillus* sp. isolado de diversas regiões da Turquia, as cepas isoladas apresentaram atividade enzimática de 17 U/mL. Já Colen et al. (2006) estudou 59 cepas de fungos isoladas no Nordeste brasileiro e utilizou técnicas de enriquecimento do meio de cultura, selecionou como bom produtor de lipase, o fungo *Colletotrichum gloesporioides*, com produção de lipase de 27,700 U/L. Isolando 20 fungos produtores de lipase na Índia, Shukla & Gupta (2007) determinaram três fungos como excelentes produtores de lipase, as cepas de *A. niger* KG-2, *R. oryzae* KG-5, e *R. oryzae* KG-10, com atividade lipásica máxima de 48.66 I/U em condições otimizadas. Diversos autores determinaram fungos como bons produtores de lipases como *Penicillium wortmanii* com atividade de 12,5 U/mL (Costa & Peralta, 1999), *Penicillium cyclopium* com atividade de 38 U/mL

(CHAHINIAN et al, 2000), *Alternaria brassicicola* com atividade de 3,2 U/mL (Berto, 1997) e *A. niger* com atividade de 325 U/mL (ADHAM & AHMED, 2008).

Lipases produzidas por fungos e bactérias variam de acordo com a cepa, com posição do meio de cultura, condições de cultivo, pH, temperatura e fonte de carbono. Dessa maneira, um mesmo microrganismo produz lipase diferentes com atividades enzimáticas diferentes (SINGH & MUKHOPADHYAY, 2011).

Os resultados obtidos mostram que a atividade da lipase produzida, pelo fungo *E. endophytica*, é promissora, pois mostrou alta atividade comparando com outros organismos, conforme descrito anteriormente na literatura.

4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.2.1. Extração do DNA, Amplificação e Sequenciamento

A extração pelo método FCI resultou em um DNA de boa qualidade (Fig. 9). Dessa maneira o DNA foi então quantificado e aproximadamente 20 ng foram utilizados nas reações de PCR.



Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico; (1) a (3) marcador λ 50 ng, 100 ng e 200 ng respectivamente; (4) controle negativo; (5) e (6) DNA genômico

Foi possível amplificar por PCR um fragmento de aproximadamente 600pb correspondente a região ITS do cistron ribossomal (Fig. 10).

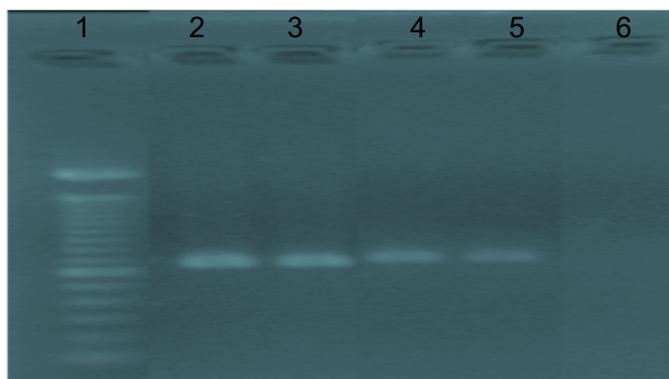


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação da região ITS: (1) 1kb, (2) ao (5) Gene ITS, (6) controle negativo

O sequenciamento da região ITS1 - 5,8S - ITS2, amplificada pelos iniciadores ITS1 (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') amplificou a sequência da cepa CBA 309 e gerou uma sequência de aproximadamente 429 nucleotídeos conforme figura 11.

```

> CBA 309 – Região ITS 1, 5,8 S e ITS 2 (Amplificado pelos iniciadores ITS 1 e
ITS 4)
CGGACCTCTTCTCTCACACCCTATGTGTATCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGC
CGCGGTCCTCCGCGGCCGGCCCCCTAACCGGGGCTGGCCAGCGCCCGCCA
GAGGACTACCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAAT
AAACTAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTTCACTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCCTTCACCGGACGC
GCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACC
TCGCTTTGG
  
```

Figura 12: Sequência da Cepa CBA 309

O alinhamento retornou com um percentual de identidade de 99%, Score de 787 bits (426), valor Expect (E) de 0,0 e nenhum “gap” conforme mostrado na figura 13.

Foi possível verificar a troca de bases na posição 30, de C para T (Figura 13), esse polimorfismo tem grandes chances de ser verdadeiro pois essa é a região ITS e essa mutação pode ser resultante da desaminação da citosina metilada para T,

essa desaminação é um processo importante na regulação da expressão do DNA e é um mecanismo de mutação bastante conhecido.

```

gb|GQ469968.1| Endomelanconiopsis endophytica strain CMW28552 18S ribosomal RNA gene, partial
sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and
internal transcribed spacer 2, partial sequence Length=604

Score = 787 bits (426), Expect = 0.0 Identities = 428/429 (99%), Gaps = 0/429 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 2   CGGACCTCTTCTCTCACACCCTATGTGTA|CTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTC 61
          |||
Sbjct 79   CGGACCTCTTCTCTCACACCCTATGTGTA|CTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTC 138

Query 62   CTCCGCGGGCCGGCCCCCTAACCGGGGCTGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACTACCAAACCTCC 121
          |||
Sbjct 139  CTCCGCGGGCCGGCCCCCTAACCGGGGCTGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACTACCAAACCTCC 198

Query 122  AGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGAT 181
          |||
Sbjct 199  AGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGAT 258

Query 182  CTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 241
          |||
Sbjct 259  CTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 318

Query 242  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCA 301
          |||
Sbjct 319  AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCA 378

Query 302  TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCCTCA 361
          |||
Sbjct 379  TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCCTCA 438

Query 362  CCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACC 421
          |||
Sbjct 439  CCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACC 498

Query 422  TCGCTTTGG 430
          |||
Sbjct 499  TCGCTTTGG 50

```

Figura 13: Alinhamento através do BLASTN

Os resultados permitiram classificar o fungo como a espécie *Endomelanconiopsis endophytica*, a classificação taxonômica encontra-se na tabela 6 . Sendo esta uma nova linhagem pertencente à família do Botryosphaeriaceae, e próxima taxonomicamente da espécie *Endomelanconiopsis microsporium* (ROJAS et al., 2008). Em alguns trabalhos esta nova espécie já têm sido descrita como endofítica, como no isolamento de seringueiras selvagens (*Hevea brasiliensis*), que

foi isolado da folha (GAZIS, et al., 2010), e na relação de simbiose de formigas (BAEL et al., 2009). E agora no presente trabalho vindo de uma cepa endofítica isolada do caule do *Aniba rosaeodora*, conhecida popularmente como pau-rosa, uma planta nativa da região amazônica que se extrai um óleo essencial, e que o fungo isolado sendo produtor de uma enzima, que justamente age na quebra desses triacilgliceróis, intensificando essa relação de simbiose do hospedeiro e da planta.

Tabela 6: Classificação da cepa CBA 309

Identificação da cepa CBA 309	
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Dothideomycetes
Ordem	Botryosphaeriales
Família	Botryosphaeriaceae
Gênero	Endomelanconiopsis
Espécie	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>

4.3. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS LIPASES DE FUNGOS

Foram selecionadas 45 sequências de fungos produtores de lipases (Tabelas 7 a 11), dessas, 30 são sequências bem anotadas de fungos e 15 são as sequências de *Dothideomycetes* (negrito) encontradas no Uniprot.

Tabela 7: Lipase 3

Código	Nome	Organismo	Família de Lipase
Q0V1P1	AT151_PHANO	<i>Phaeosphaeria</i>	Lipase_3 (membrana)
O13444	ATG15_CLAFU	<i>Cladosporium fulvum</i>	Lipase_3 (membrana)
P61871	LIP_RHINI	<i>Rhizopus niveus</i>	Lipase_3
P61872	LIP_RHIOR	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipase_3
P19515	LIP_RHIMI	<i>Rhizomucor miehei</i>	Lipase_3
P61870	MDLA_PENCA	<i>Penicillium camembertii</i>	Lipase_3
P61869	MDLA_PENCY	<i>Penicillium cyclopium</i>	Lipase_3
Q0V5U7	QOV5U7_PHANO	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Lipase_3
O59952	LIP_THELA	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Lipase_3

B2VVE9	B2VVE0_PYRTR	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Lipase_3
Q0UP12	QOUP12_PHANO	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Lipase_3
Q6WER3	Q6WER3_GIBZA	<i>Gibberella zeae</i>	Lipase_3
E4ZK26	E4ZK26_LEPMJ	<i>Leptosphaerium aculans</i>	Lipase_3
Q9P8F7	Q9P8F7_YARLL	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipase_3
F9XF28	Q9P8F7_YARLL	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Lipase_3
A7Y2W6	A7Y2W6_AURPU	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lipase_3

Tabela 8: Lipase 2

Código	Nome	Organismo	Família de Lipase
G7XYH9	G7XYH9_ASPKW	<i>Aspergillus kawachii</i>	Lipase_2
A2R1X8	A2R1X8_ASPNC	<i>Aspergillus niger</i>	Lipase_2
G3XQ80	G3XQ80_ASPNA	<i>Aspergillus niger</i>	Lipase_2

Tabela 9: Carboxilesterase

Código	Nome	Organismo	Família de Lipase
P20261	LIP1_CANRU	<i>Candida rugosa</i>	Carboxylesterase
P32947	LIP3_CANRU	<i>Candida rugosa</i>	Carboxylesterase
Q6S5M9	Q6S5M9_9ASCO	<i>Candida cylindracea</i>	Carboxylesterase
P32946	LIP2_CANRU	<i>Candida rugosa</i>	Carboxylesterase
P32948	LIP4_CANRU	<i>Candida rugosa</i>	Carboxylesterase
E3RTT7	E3RTT7_PYRTT	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	Carboxylesterase
B2WJ45	B2WJ45_PYRTR	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Carboxylesterase
P22394	LIP2_GEOCN	<i>Geotrichum candidum</i>	Carboxylesterase
P79066	LIP1_GEOFE	<i>Geotrichum fermentans</i>	Carboxylesterase
P17573	LIP1_GEOCN	<i>Geotrichum candidum</i>	Carboxylesterase
Q6ED33	Q6ED33_ASPNG	<i>Aspergillus niger</i>	Carboxylesterase
F9XNS5	F9XNS5_MYCGM	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Carboxylesterase
Q0TV99	Q0TV99_PHANO	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Carboxylesterase
E3RFB1	E3RFB1_PYRTT	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	Carboxylesterase

Tabela 10: Lipase secretada (LIP)

Código	Nome	Organismo	Família de Lipase
Q9P4E5	LIP10_CANAL	<i>Candida albicans</i>	LIP
Q9P8W5	LIP2_CANAX	<i>Candida albicans</i>	LIP
Q9P8W0	LIP5_CANAL	<i>Candida albicans</i>	LIP

Q9P8V9	LIP8_CANAL	<i>Candida albicans</i>	LIP
G3AT19	G3AT19_SPAPN	<i>Spathaspora passalidarum</i>	LIP
Q6BS23	Q6BS23_DEBHA	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LIP
Q9P4E7	LIP7_CANAL	<i>Candida albicans</i>	LIP
F9WZN3	F9WZN3_MYCGM	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	LIP
Q0URZ6	Q0URZ6_PHANO	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	LIP

Tabela 11: Lipase

Código	Nome	Organismo	Família de Lipase
Q6FW94	Q6FW94_CANGA	<i>Candida glabrata</i>	Lipase
C4YJ41	C4YJ41_CANAW	<i>Candida albicans</i>	Lipase
P34163	TGL1_YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lipase

O alinhamento dividiu as sequências lipásicas dos diferentes fungos em 5 grupos. Esses grupos correspondem aos 5 diferentes tipos lipases encontrados em fungos: Carboxilesterase, Lipase Secretada (LIP), Lipase, Lipase 2 e Lipase 3.

Com base nos resultados obtidos, foi montada uma árvore de distância UPGMA com o intuito de mostrar a divisão em grupos dos diferentes tipos de lipases fúngicas bem anotadas em conjunto com as lipases fúngicas da classe *Dothideomycetes* que não estão bem anotadas nos bancos de dados (Fig. 14). Dessa maneira pode-se perceber que as lipases da classe *Dothideomycetes* estiveram presentes em cada um dos 5 domínios das famílias de lipase citados nesse trabalho, o que denota a grande diversidade de lipase em diferentes fungos.

Realizar alinhamentos para verificação de regiões conservadas é uma ferramenta de grande valia para verificar a diversidade de lipases em diferentes organismos. Isso pode ser verificado no trabalho de Bell, et al (2002), que mostrou a região conservada do sítio ativo da lipase. Nesse trabalho os autores prospectaram genes da lipase por PCR, amplificando pequenas regiões de genes diretamente do cDNA e alinhou-as, confirmando o motivo conservado (Tabela 12), o que possibilita dividir em grupos as diferentes lipases de acordo com o grau de conservação.

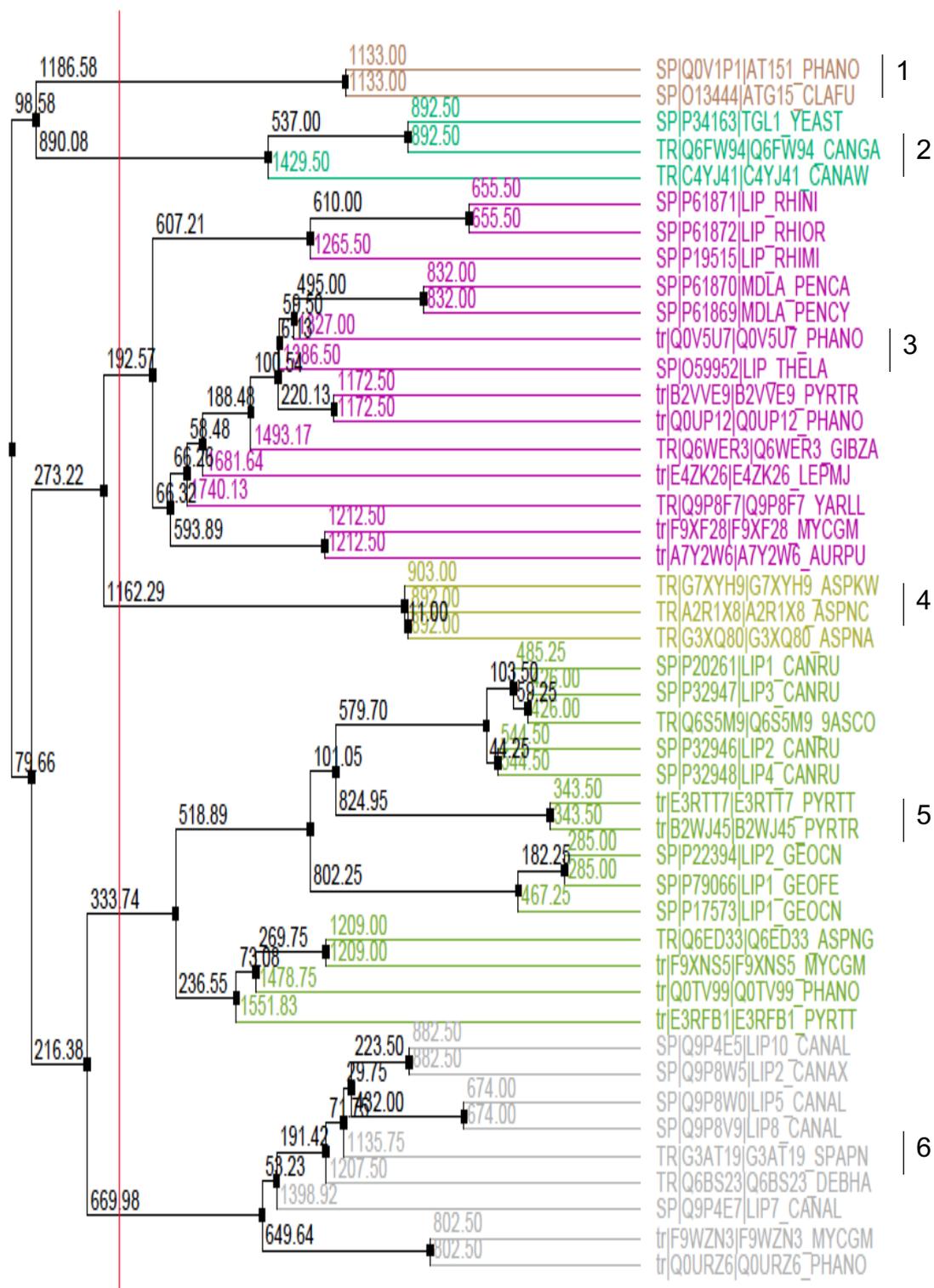


Figura 14: Dendrograma UPGMA, agrupado com a matriz de substituição Blosum 62, do alinhamento das sequencias de fungos com a classe *Dothideomycetes* com os respectivos códigos de acesso no Uniprot. (1) Lipase 3 - ligados a membrana; (2) Lipase; (3) Lipase 3; (4) Lipase 2; (5) Carboxilesterase; (6) Lipase Secretada - LIP

Tabela 12: Regiões conservados de lipases de microrganismos. Adaptado de Bell, et al (2002)

Origem da Lipase	Sítio Ativo
Grupo 1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GHSMGG
<i>Staphylococcus aureus</i> (NPj375790)	GHSMGG
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (A47705)	GHSMGG
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (AAC67547)	GHSMGG
<i>Staphylococcus hyicus</i> (A24075)	GHSMGG
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (AAF21294)	GHSMGG
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> (B69470)	GHSMGT
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (NPj110161)	GHSMGG
<i>Mycoplasma mycoides</i> (AAA95966)	GHSMGG
<i>Mus musculus</i> (NPj035974)	GHSMGG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NPj010343)	AHSMGG
<i>Bacillus pumilus</i> (CAA02196)	AHSMGG
<i>Bacillus subtilis</i> (NPj388152)	AHSMGG
<i>Bacillus licheniformis</i> (CAB95850)	AHSMGG
<i>Geobacillus</i> sp. TP10A (AAF63229)	AHSQGG
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> (CAA64621)	AHSQGG
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (AAL28099)	AHSQGG
<i>Burkholderia glumae</i> (A48952)	GHSQGG
<i>Chromobacterium viscosum</i> (AAL28099)	GHSQGG
<i>Burkholderia cepacia</i> (P22088)	GHSQGG
<i>Pseudomonas luteola</i> (AAC05510)	GHSQGG
<i>Pseudomonas fragi</i> (S02005)	GHSQGA
<i>Pseudomonas wisconsinensis</i> (AAB53647)	GHSQGS
<i>Proteus vulgaris</i> (AAB01071)	GHSQGP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NPj253500)	GHSQGG
<i>Bos taurus</i> (JC4017)	GHSQGT
<i>Homo sapiens</i> (NPj004181)	GHSQGT
<i>Vibrio cholerae</i> (NPj232620)	GSHHGG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NPj251552)	GSHHGG
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (S61927)	GSHHGS
Grupo 2	
<i>Yarrowia lipolytica</i> (Q99156)	GESAGS
<i>Moraxella</i> sp. (A39556)	GDSAGG
<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1 (AAG47649)	GDSAGG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (NPj215915)	GDSAGG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (NPj217486)	GDSAGG

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (NPj215916)	GDSAGG
<i>Rattus norvegicus</i> (LIRTH)	GDSAGG
<i>Clostridium perfringens</i> (BAA81642)	GDSAGA
Grupo 3	
<i>Serratia marcescens</i> (AAA81002)	GHSLGG
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (AAF87594)	GHSLGG
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (O59952)	GHSLGG
<i>Fusarium heterosporum</i> (JX0343)	GHSLGG
<i>Rhizopus niveus</i> (BAA31548)	GHSLGG
<i>Rhizomucor miehei</i> (A34959)	GHSLGG
<i>Aspergillus oryzae</i> (BAA12912)	GHSLGA
<i>Penicillium camemberti</i> (S32403)	GHSLGA

4.4. ISOLAMENTO DO GENE

4.4.1. Construção dos iniciadores e confirmação da especificidade por PCR

Fragmentos variando entre 100 e 200 pares de bases foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *E. endophytica* fixando a temperatura de pareamento dos iniciadores em 59 C e concentração de 2mM de MgCl₂, conforme mostrado na figura 15. Esse resultado condiz com o esperado de acordo com as combinações testadas e previstos pela análise *in silico*.

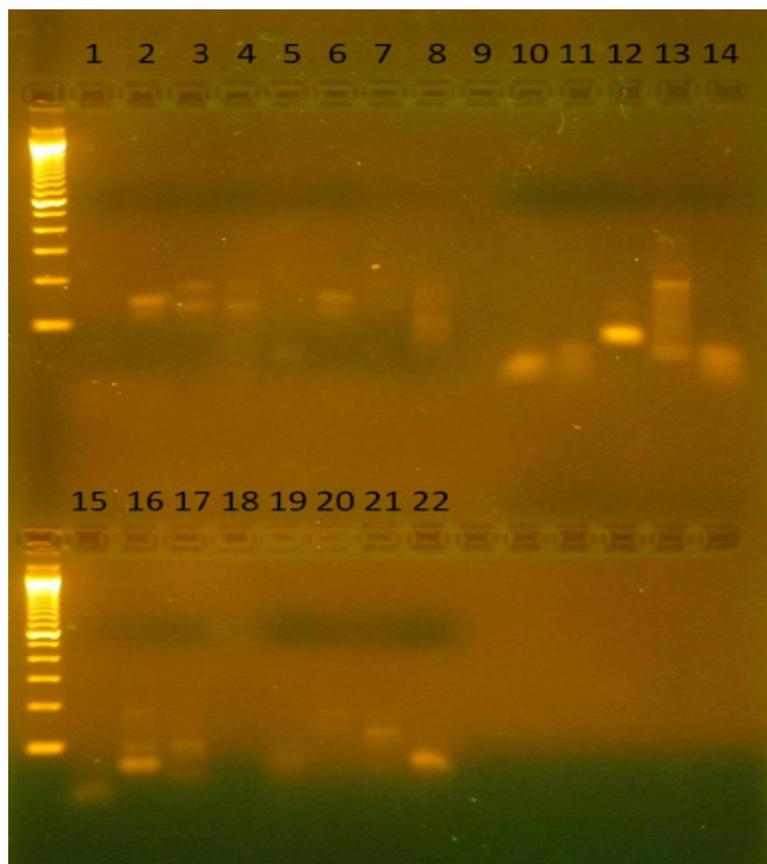


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da especificidade por PCR: (1) L1F/L2R, (2) L1F/L2B, (3) L1F/L3R, (4) L1F/L3BR, (5) L1BF/L2R, (6) L1BF/L2BR, (7) L1BF/L3R, (8) L1BF/L3BR, (9) nada, (10) L2F/L2R, (11) L2F/L2BR, (12) L2F/L3R, (13) L2F/L3BR, (14) L2BF/L2R, (15) L2BF/L2BR, (16) L2BF/L3R, (17) L2BF/L3BR, (18) nada, (19) L1F/L2R, (20) L1F/L3R, (21) L1F/L3BR, (22) L2F/L3R

4.4.2. Clonagem

A metodologia utilizando o sistema **TOPO** se mostrou eficaz, com um rendimento de transformantes variando entre 50 e 100 clones por placa. Foi realizada a extração do pDNA e posteriormente o sequenciamento.

4.4.2.1. Digestão com EcoRI

A digestão dos plasmídeos com a enzima de restrição EcoRI (Fig. 16) gerou três bandas conforme o esperado. O fragmento de maior massa molecular corresponde ao vetor seguindo banda de aproximadamente 150 bp

correspondentes ao fragmento de interesse e por fim um fragmento menor que 50 pb correspondente ao plasmídeo sem inserto.

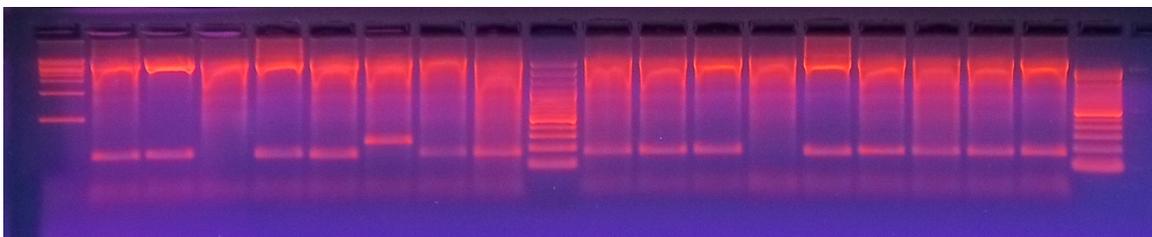


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão dos plasmídeos com a enzima de restrição EcoR1.

4.4.3. Sequenciamento e análises das sequencias

O sequenciamento dos plasmídeos com inserto resultaram em uma sequencia de aproximadamente 149 pb a qual foi submetida a ferramentas de bioinformática para identificação do inserto.

```
>Seq149bp. Lipase do fungo E. endophytica
TCAACTACCGCGTCGGAGCTTTTGGTTTCCTCTCCGGCCCGAACTTC
TCCAACAGCAGCCACGATGCCGTTGCTAACGCTGGGCTGTACGACCA
GAGGAAGGCCCTTGAGTGGGTCCAGCGCAATATCCACCTCTTCGGAG
GCGACCCAT
```

Figura 17: Sequência do plasmídeo com inserto

A sequência obtida apresentou similaridade com lipase já depositada no banco de dados NCBI. A lipase de *Leptosphaeria maculans* e caracterizado como da família Carboxilesterase com identidade de 67%.

O resultado apresentado é esperado pois o domínio Carboxilesterase possui alta diversificação e estão presentes em muitos eucariotos superiores. Esse resultado é corroborado no presente trabalho onde se classificou as diversas lipases em grupos e em diversos trabalhos, dentre eles estão os trabalhos de Sugihara et al (1990) e Shimada et al (1992) estudando lipases produzidas pelo fungo *Geotrichum candidum*. Esses trabalhos orientaram a classificação deste domínio Carboxilesterase na classificação da regiões conservadas de lipases.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
69.3 bits(168)	2e-12	Compositional matrix adjust.	32/48(67%)	39/48(81%)	2/48(4%)	+3
Query 3	NYRVGAFGFLSGPNFSSSHDAVANAGLYDQRKALEWVQRNIHLFGGD		146			
	NYR+GAFGF SGP F+ + V+N GLYDQR ALEW+Q++IHLFGGD					
Sbjct 195	NYRLGAFGFTSGPTFN--AEGGVSNLGLYDQRFLEWIQKHIHLFGGD		240			

Figura 18: Alinhamento através do BLASX

Uma revisão na literatura aponta que muitos genes de lipases microbianas vêm sendo clonados, incluindo importantes lipases comerciais como a de *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Termomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* e *Pseudomonas mendocina*, conforme mostrado por Schmidt-Dannert (1999). Contudo, a produção de enzimas recombinantes tem sido limitada às lipases de *C. antarctica*, *R. miehei*, *T. lanuginosa*, *P. pseudoalcaligenes* e *P. mendocina*, o que sugere a dificuldade na obtenção de altos níveis de lipases recombinantes, sendo necessárias diversas etapas de adaptação do método de clonagem para que se consiga aumentar a quantidade de lipase na posterior expressão.

4.4.4. Construção dos iniciadores específicos e confirmação da especificidade por PCR

Os iniciadores específicos foram construídos a partir do sequenciamento descrito anteriormente que resultou na sequência de aproximadamente 150pb. A amplificação por PCR utilizando os iniciadores específicos a partir do DNA genômico de *E. endophytica*, resultaram em fragmentos variando entre 60 e 100 pares de bases, nas condições com temperatura de pareamento a 59 °C e 3 mM de MgCl₂, conforme mostrado na Fig. 19.

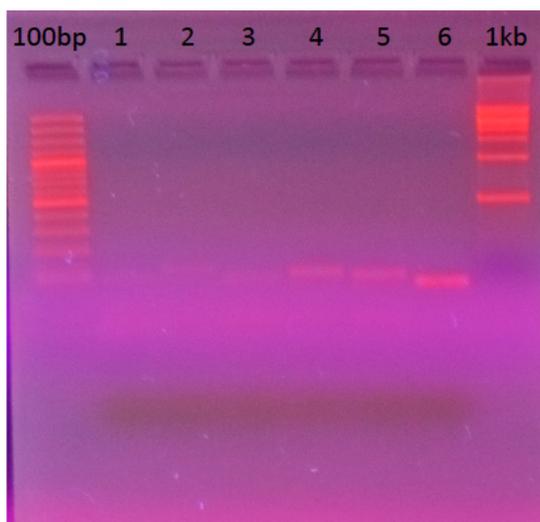


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação iniciadores específicos por PCR: (1) EstFW1/L2BR, (2) EstFW2/ L2BR, (3) EstFW3/L2BR, (4) L1FW/EstR1, (5) L1FW/EstR2, (6) EstFW2/EstR2

4.5. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

A extração do RNA com o método de TRIZOL se mostrou eficaz (Fig. 20). As médias das relações A_{260nm} / A_{280nm} , que determinam a qualidade das amostras de RNA, ficaram dentro da faixa de qualidade (1,6 a 2,0).

A análise de RNA pode fornecer informações importantes sobre expressão gênica e caracterização de transcritos, baseado nos métodos de Northern, PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), construção de bibliotecas de cDNA, ESTs, e outras (IBELLI et al. 2007).

Para analisar a integridade da amostra de RNA foi realizada a visualização eletroforética em gel de agarose não-desnaturante de 1,5%. Foi possível observar a separação das bandas dos diferentes tipos de RNAs. Além disso, pela análise do gel não se observou DNA nessa amostra.

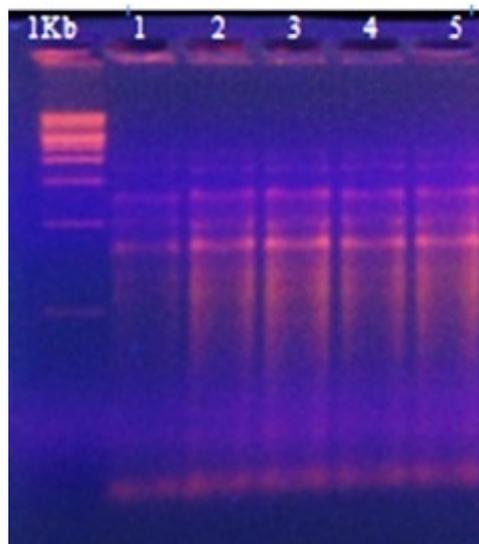


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose DEPEC 1% para confirmação da integridade do RNA

4.6. SÍNTESE E SEQUENCIAMENTO DO DNA COMPLEMENTAR DUPLA FITA

A construção da biblioteca de cDNA utilizando conjunto de reagentes *Clontech SMARTer™ cDNA Synthesis* se mostrou eficiente mantendo a integridade do DNA complementar dupla fita.

Foram sequenciados 2 placas de 96 poços onde 50 amostras deram resultados positivos. O sequenciamento do cDNA dupla fita resultou em sequências de aproximadamente 797pb as quais foram submetidas ao BLASTN para identificação do inserto e apresentaram similaridade com Fosfolipase A2 de *Vipera berus berus*, depositada no banco de dados NCBI (Fig. 21). O resultado mostrou identidade de 96%. A produção de Fosfolipase A2 por fungos já é conhecida conforme mostrado por Kohler et al (2006) onde fungos produzem fosfolipases A2 e B. A identificação de uma fosfolipase de víbora é explicado por uma combinação fatores: a qualidade do pDNA obtido pela preparação em placa não foi a ideal para o sequenciamento, a quantidade de pDNA usado estava acima dos limites da curva de calibração do aparelho para as bases iniciais o que acabou gerando uma sequência de qualidade baixa. Assim, o fato de o sequenciamento ter indicado uma fosfolipase em alguns dos clones sequenciados sugere fortemente que esses clones possivelmente contém a sequência completa do gene de interesse. Tais clones estão sendo preparados para extração do pDNA em quantidade e qualidade necessárias para um sequenciamento de ótima qualidade.

CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado que o isolado CBA309, identificado como *E. endophytica* possui atividade lipásica. Com abordagem molecular foi possível clonar e triar os clones que possivelmente contém a sequência completa do gene de interesse.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os clones que possivelmente possuem a sequência completa dos genes de interesse serão sequenciados novamente. Em se confirmando o resultado encontrado, a etapa seguinte será utilizar as ferramentas de bioinformática existentes para se determinar a estrutura da proteína, ainda, clonar e expressar o gene, purificar as enzimas obtidas para ensaios bioquímicos, bem como, buscar parcerias para se determinar a estrutura proteica por cristalografia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHAM, N. Z.; AHMED, E. M. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; production, partial purification and properties. **Indian Journal of Microbiology**, Vol. 49, 2008.

ARNOLD, F. H.; Direct Evolution: Creating Biocatalysts for th Future. **Chem. Eng. Sci.** Vol. 56, 1996.

ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, M.O.; PEREIRA, J.O.; XAVIER, M.A.S. **Noções básicas de tecnologia do DNA recombinante**. EDUA: Manaus, AM, 2005.

BAEL, V. S. A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; VALENCIA, M. C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. **Proc. R. Soc. B**. Publishe online, 2009.

BAKER, M. E. Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipoprotein lipase? **Biochem. J.** Vol. 255, 1988.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase-catalyzed modification of butterfat via acidolysis with oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Vol. 3, 1997.

BARON, Alessandra Machado. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para a utilização em biocatálise**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2008.

BARTON, G.J. **Creation and analysis of protein multiple sequence alignments**. In: BAXEVANIS, A.D.; OUELLETTE, B.F.F.(eds). *Bioinformatics: a pratical guide to the analysis of genes and proteins*. 2ed., John Wiley & Sons, 2001.

BELL, P. J. L.; SUNNA, A.; GIBBS, M. D.; CURACH, N. C.; NEVALAINEN, H.; BERGQUIST, P. L. Prospecting for a novel lipase genes using PCR. **Microbiology**. Vol.148, 2002.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, Vol. 340, 2004.

BERTO, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. **Biotechnology Letters**, Vol. 19, 1997.

BEVILAQUA, J. V. **Estudo da Catálise Enzimática em Meio Orgânico para a Produção de Protótipo de Fármaco Antiasmático**. Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

BIER, M. Lipases. **Methods Enzymol.** Vol. 1, 1955.

BLOW, D. Enzymology: more of the catalytic triad. **Nature**, Vol. 343, 1990.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxylesterases: classification, properties and applications in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, n.26, 2002.

BURKERT, J.F.M. **Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. Tese de Doutorado, UNICAMP, 2003.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. 6ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Lidel: Lisboa, Portugal, 2003.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, Vol. 27, 2004.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus sp.* **World J. Journal of Microbiology and Biotechnology**, VOL. 20, 2004.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium*, purification and characterisation of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. Vol. 64, 2000.

CHAPUS, C.; ROVERY, M.; SARDA, L.; VERGER, R. Minireview on pancreatic lipase and colipase. **Biochimie**. Vol.70, 1988.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Vol. 22, 2006.

CORREIA, V. A. B. **Seleção e caracterização molecular de uma lipase no metagenoma de solo do cerrado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Brasília, 2010.

COSTA, M. A.; PERALTA, R. M. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase. **Journal of Basic Microbiology**. Vol. 39, 1999.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quim. Nova**. Vol. 22, 1999.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; ERGAN, F. Advances in structural understanding of lipase. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, Vol. 10, 1992.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY, M. K.; DOCTOR, B. P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. **Protein Sci**. Vol. 2, 1993.

DARTOIS, V.; BAULARD, A.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. **Biochim.Biophys. Acta**, Vol. 1131, 1992.

DEREWENDA, Z.S.; DEREWENDA, U. Relationships among serine hydrolases: evidence for a common motif in triacylglyceride lipases and esterases. **Biochem. Cell. Biol.** Vol. 227, 1991.

FALCONE, C. O. **Avaliação da lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento.** Monografia do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipase por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2007.

FUKUMOTO, J.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Studies on lipase I: Purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** Vol.9, 1963.

GANDHI, N. Applications of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Vol. 74, 1997.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, 2010.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalysed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, Vol. 63, 2007.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.** Vol. 13, 2000.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C. Swiss-PdbViewer: A Fast and Easy-to-use PDB Viewer for Macintosh and PC. **Protein Data Bank Quaterly Newsletter**. Vol. 77, 1996.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**. Vol. 64, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

HUBE, B.; STEHR, F.; BOSSENZ, M.; MAZUR, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHAFER, W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. **Arch. Microbiol**, 2000.

IBELLI, A. M. G.; REGITANO, L. C. de A.; NICIMURA, S. C. M. **Extração de RNA**. In: REGITANO, L. C. de A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. de S. Protocolos em biologia molecular aplicada à produção animal. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

JAEGER, K .E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol**. Vol. 53, 1999.

JAEGER, K. E., REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol**. Vol. 16, 1998.

KOHLER, G. A.; BRENOT, A.; HAAS-STAPLETON, E.; AGABIAN, N.; DEVA, R.; NIGAM, S. Phospholipase A2 and Phospholipase B Activities in Fungi. **Biochim Biophys Acta**, 2007.

KRISHNA, S.H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **BiotechnologyAdvances**. Vol. 20, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**,. Sarvier, 3.ed, São Paulo, 2002, 975p.

LORENZ, P., ECK, J. Metagenomics and Industrial Applications. **Nature Reviews Microbiology**, Vol. 3, 2005.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Curr Opin Biotechnol**, Vol. 13, 2002.

McLEAN, J.; FIELDING, C.; DRAYNA, D.; DIEPLINGER, H.; BAER, B.; KOHR, W.; HENZEL, W.; LAWN, R. Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.** Vol. 83, 1986.

MYERS, M.; RICHMOND, R. C.; OAKESHOTT, J. G. On the origins of esterases. **Mol. Biol. Evol**, Vol. 5, 1988.

NAKASHIMA, S.; IKENO, Y.; YOKOYAMA, T.; KUWANA, M.; BOLCHI, A.; OTTONELLO, S.; KITAMOTO, K; ARIOKA, M. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells. **Biochem J**. Vol. 15, 2003.

PASTORE, Glaucia, M.; DA COSTA, Vinícius dos Santos R.; KOBLITZ, Maria Gabriela B.. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 2003.

PERSSON, B.; OLIVECRONA, G. B.; ENERBACK, S.; OLIVERCRONA, T.; JORNVALL, H. Structural features of lipoprotein lipase. Lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase cofactors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. **Eur. J. Biochem**. Vol. 179, 1989.

PRICE, M. F.; CAWSON, R. A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. Vol. 15, 1977.

PUGH, D.; CAWSON, R. A. The cytochemical localization of phospholipase a and lysophospholipase in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Vol. 13, 1975.

REN-BAO, L.; MEI-PING, C.; MING-CHE, W.; CHIA-YIN, L. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. **Bioresource Technology**, 2010.

ROJAS, E. I.; HERRE, E. A.; MEJÍA, L. C.; ARNOLD, A. E.; CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Endomelanconiopsis*: a new anamorph genus in the *Botryosphaeriaceae*. **The Mycology Society of America**, Vol. 100, 2008.

SAAD, E. B. **Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. **Adv. Appl. Microbiol.** Vol. 61, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SCHMIDT-DANNERT, C. Recombinant Microbial Lipases for Biotechnological Applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Vol. 7, 1999.

SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; McPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, Vol. 5, 1997.

SHUKLA, P.; GUPTA, K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. **Journal of Applied Science and Environmental Sanitation**, Vol. 2, 2007.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Appl Biochem Biotechnol**, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. New York, Vol. 19, 2001.

SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y., Induction of *Geotrichum candidum* Lipase by Long-Chain Fatty Acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Vol. 74, 1992.

SOARES, C. M. F. **Otimização por planejamento experimental da imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de estabilizantes**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 2000.

SORAGNI, E.; BOLCHI, A.; GAMBARETTO, C.; PERCUDANI, R.; BONFANTE, P.; OTTONELLO, S. A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A(2) in the symbiotic fungus *Tuber borchii*. **Embo J.**, Vol. 20, 2001.

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**. Amsterdam, Vol. 22, 2003.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. **Agric. Biol. Chem.** Vol. 52, 1988.

TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Purification, crystallization and some properties of lipase from *Geotrichum candidum*. **Agr. Biol. Chem.** Vol. 37, 1973.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. Vol. 22, 1994.

TERZIAN, C.; FERRAZ, C.; DEMAILLE, J.; BUCHETON, A. Evolution of the Gypsy endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup. **Mol. Biol. Evol.** Vol. 17(6), 2000.

WATERHOUSE, A.M.; PROCTER, J.B.; MARTIN, D.M.A; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2: a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, Vol. 25, 2009.

WHITE, T. B.; LEE, S..**Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (ed), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press: San Diego, USA, 1990.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriology**. Vol. 138, 1979.

WOLSKI, Elisângela. **Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium sp.* livre e imobilizado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2008.

ZNIDARSIC, P.; PAVKO, A. The morphology og filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. **Food Technology and Biotechnology**. Vol. 39, 2001.