

**Caracterização do gene *lip2* de  
*Trichoderma harzianum***

**Madalena Sofia Santos Vaz**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientado por

**Prof. Doutor Altino Branco Choupina**

**Prof. Maria de Lurdes Antunes Jorge**

**Bragança  
2010**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança e financiado por o Projecto PTDC/AGR – AAM/67628/2006: Identificação, caracterização e papel de factores moleculares associados ao mecanismo de infecção de espécies de *Fagaceae* por *Phytophthora cinnamomi* e por o projecto COMBATINTA/SP2.P11/02 Interreg IIIA.

*“Aos meus pais que amo muito”*

## **Agradecimentos**

Ao entregar este trabalho, é com o maior prazer, que agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para a sua realização e tornaram este momento possível.

Em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Doutor Altino Choupina, pela grande ajuda ao longo do trabalho laboratorial, permanente disponibilidade e incentivo.

A minha co-orientadora, Professora Lurdes Jorge, por todo o empenho, atenção dispensada, dedicação, amizade, apoio laboratorial e escrito, e também pelos conhecimentos transmitidos.

A professora Teresa Dias por estar sempre disponível para ajudar nos momentos precisos e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos, Fátima Martins, Valentim Coelho e Hélio Belo por todo o apoio, ajuda prestada e incentivo. Por todos os bons momentos e os momentos de mais dificuldades, a eles devo um especial agradecimento pela constante presença ao qual nunca vou esquecer.

Ao Paulo Rainha pelo seu incondicional apoio e presença em todos os momentos, por os constantes desabafos, por todo o reconforto, incentivo e carinho dado.

Aos colegas dos laboratórios, Ivone Martins, Rodrigo Costa, Ricardo Malheiro, por a disponibilidade demonstrada, incentivo e boa disposição.

Aos amigos, em especial Carla, Eric, Vera, Marisa, Cátia, Tânia, Vinhais, Teresa, Igor, Taveira, João, Ivo, Ricardo, Manuel, Anselmo e Vitória, pelo apoio, amizade e compreensão pela minha ausência nos últimos tempos.

A minha vis avó e irmão Hélder pela constante preocupação, ao meu afilhado Melvin que eu amo e finalmente aos meus pais Ondina e João por todo o amor e confiança depositada em mim, por todos os momentos, a eles, devo tudo.

## ***Lista de Figuras***

**Figura 1** – a) Hifas de *Trichoderma harzianum*, b) Conídios de *Trichoderma harzianum*.

**Figura 2** – *Trichoderma harzianum* em meio PDA.

**Figura 3** – Hidrólise por lipases de triacilglicerol em glicerol e ácidos gordos.

**Figura 4** – Hidrólise de triacetina pela lipase pancreática e esterase hepática de porco em função da concentração de substrato.

**Figura 5** – Representação do mecanismo de tampa das lipases.

**Figura 6** - Mecanismo de reacção de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases.

**Figura 7** – Representação esquemática do motivo estrutural conservado em enzimas da família  $\alpha/\beta$  hidrólase.

**Figura 8** – Estrutura do vector pGEM<sup>®</sup>-T.

**Figura 9** – Imagem da ORF do gene *lip2*.

**Figura 10** – Marcador de peso molecular 1Kb.

**Figura 11** – Estrutura do vector de clonagem bacteriano pET28a(+).

**Figura 12** – Região promotor do gene *lip2*.

**Figura 13** – Região terminador do gene *lip2*.

**Figura 14** – ORF do gene *lip2*.

**Figura 15** – Sequência deduzida de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *lip2*.

**Figura 16** – Pesquisa de motivos para *lip2* em bases de dados de famílias de proteínas.

**Figura 17**– Locais de fosforilações na sequência de aminoácidos de *lip2*.

**Figura 18** – Perfil hidopático de *lip2* segundo o algoritmo de Kyte & Doolittle.

**Figura 19** – Predição da estrutura secundária de *lip2*.

**Figura 20** – Estrutura tridimensional da proteína *lip2*.

**Figura 21** – Análise comparativa de sequências.

**Figura 22** – Dendrograma das distâncias evolutivas entre *lip2* e organismos relacionados.

**Figura 23** – Homologia entre *lip2* e *lip1*.

**Figura 24** – Extracção de DNA genómico de *Trichoderma harzianum*.

**Figura 25** – Amplificação do gene *lip2*.

**Figura 26** – Placa de Petri com os transformantes.

**Figura 27** – Digestão enzimática dos plasmídios com a enzima *Pst I*.

**Figura 28** – Digestão enzimática dos plasmídios.

**Figura 29** – Digestão enzimática dos plasmídios.

**Figura 30** – Electroforese desnaturante (SDS-PAGE).

**Figura 31** – Marcador de proteínas com a indicação dos tamanhos (kD).

## *Lista de tabelas*

**Tabela 1** – Programa de PCR.

**Tabela 2** – Composição de aminoácidos da proteína codificada pelo *lip2*.

## ***Lista de abreviaturas e siglas***

**% (p/v)** – Percentagem expressa em peso por volume.

**% (v/v)** – Percentagem expressa em volume por volume.

**µl** – Microlitro.

**BLAST** – “Basic Local Alignment Sequence Tool”.

**C-terminal** – Carboxil-terminal.

**D. O** – Densidade óptica.

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico.

**dNases** – Desoxirribonuclease.

**dNTPs** – 5’ trifosfato de 2’ desoxinucleotídeo (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)

**E.C** – Classificação enzimática.

**EDTA** – Ácido etilenodiamino-tetraacético ético.

**g** – Grama.

**IPTG** – Isopropil-β-D-galactosidase.

**Kb** – Quilobase.

**kDa** – Quilodalton.

**LB** – Meio de Lúria-Bertani.

**lip2** – Gene de *Trichoderma harzianum*.

**lip2** – Proteína de *Trichoderma harzianum*.

**mg** – Miligramas.

**ml** – Mililitro.

**mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro.

**NCBI** – Centro Nacional de Informação Biotecnológica, “National Center for Biotechnology Information”.

**nm** – Nanómetro.

**N-terminal** – Amino-terminal.

**ORF** – grelha de leitura aberta, “open reading frame”.

**PAGE** – Eletroforese em gel poliacrilamida abreviatura de “polyacrylamide gel”.

**Pb** – Pares de base.

**PCR** – Reacção em cadeia da polimerase abreviatura de “Polymerase chain reaction”.

**PDA** – Potato Dextrose Agar.

**Primer** – Oligonucleótido iniciador.

**RNA** – Ácido ribonucleico, “ribonucleic acid”.

**RNase** – Ribonuclease.

**rpm** – Rotação por minuto.

**SDS** – Dodecilsulfato de sódio, “sodium dodecyl sulphate”.

**SDS-PAGE** – Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.

**TAE** – Tampão Tris-Acetato-EDTA.

**TCA** – Ácido tricloroacético, “trichloroacetic acid”.

**TEMED N, N, N', N'** – Tetrametilletilenodiamnina.

**U** – Unidade enzimática.

**V** – Voltes.

## **Resumo**

Os fungos do género *Trichoderma* abrangem um grupo de fungos extremamente comuns em solos de todas as zonas climáticas. São eficientes produtores de enzimas com aplicações industriais, ou na natureza, estando envolvidos na degradação da parede celular dos fitopatogénios bem como na degradação de outros fungos, matéria orgânica e nutrientes secretados pelas raízes.

As estirpes de *Trichoderma* produzem enzimas extracelulares e antibióticos com efeitos antifúngicos, sobretudo *T. harzianum*, *T. virens* e *T. viride*, sendo por isso usados como agentes de biocontrolo. De entre as enzimas de degradação das paredes celulares produzidas, encontram-se  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanases, quitinases e proteases. Pensa-se que também as lipases poderão estar envolvidas na actividade enzimática de biocontrolo.

Este trabalho teve como objectivo a caracterização do gene *lip2* de *Trichoderma harzianum*, para isso recorreu-se a um conjunto de ferramentas de biologia molecular, bem como o recurso a programas bioinformáticos, de forma a efectuar a caracterização do gene, contribuindo assim para um melhor conhecimento deste.

Procedeu-se à clonagem do gene *lip2* num sistema de expressão, usando o vector pET-28a(+), e à avaliação da expressão da proteína lip2 por gel de SDS-PAGE em diferentes tempos de indução. Os resultados obtidos na clonagem indicaram uma banda total de 6584pb o que comprovou o sucesso da clonagem. A expressão da proteína após 8 horas de indução manifestou-se pela presença de uma banda de peso molecular estimado de 44kDa, observada por gel SDS-PAGE.

**Palavras-chave:** *Trichoderma harzianum*, lipase, *lip2*, clonagem, SDS-PAGE.

## ***Abstract***

*Trichoderma* spp. covers a group of fungi extremely common in soils of all climatic areas. These fungi are efficient enzyme producers, with industrial applications, or in nature, involved in the degradation of the cell wall of the phytopathogens as well as in the degradation of other fungi, organic matter and nutrients secreted by roots.

*Trichoderma* strains produce extracellular enzymes and antibiotics with antifungal effects, mainly *T. harzianum*, *T. virens* and *T. viride*, being by this way used as biocontrol agents. Among the degradation enzymes of the cells walls produced, are  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6 glucanases, chitinases and proteases. Lipases could also be involved in enzymatic activity related with biocontrol.

This work intention was the characterization of the *lip2* gene of the *T. harzianum*, thus were used a set of tools from molecular biology and bioinformatics tools in order to perform the study, contributing for a better knowledge of the gene.

*Lip2* gene was cloned in an expression system, using the pET-28a(+) vector, and the expression evaluation of the *lip2* protein was made in a SDS-PAGE gel at different induction times. The obtained results in the cloning showed a 6584bp band indicating that the cloning was well succeeded.

The protein expression was verified at 8 hours of induction by the presence of a band with an estimated molecular weight of 44kDa, in a SDS-PAGE gel.

**Key words:** *Trichoderma harzianum*, lipase, *lip2*, cloning, SDS-PAGE.

## Índice

<b>Lista de Figuras</b> .....	v
<b>Lista de tabelas</b> .....	vii
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	viii
<b>Resumo</b> .....	x
<b>Abstract</b> .....	xi
<b>Índice</b> .....	xii
<b>1 – Introdução</b> .....	1
1.1 – Introdução ao género <i>Trichoderma</i> .....	1
1.1.1 – Taxonomia .....	1
1.1.2 – Morfologia .....	2
1.1.3 – Ecologia e biologia dos fungos <i>Trichoderma</i> .....	3
1.2 – Utilização de <i>Trichoderma</i> em biocontrolo .....	4
1.3 – <i>Trichoderma harzianum</i> .....	6
1.4 – Lipases .....	7
1.4.1 – Definição .....	7
1.4.2 – Características cinéticas e físico-químicas das lipases .....	8
1.4.3 – Características estruturais das lipases .....	10
1.5 – Aplicações biotecnológicas das lipases .....	14
1.5.1 - Indústria farmacêutica .....	15
1.5.2 - Indústria alimentar .....	16
1.5.3 - Indústria de detergentes .....	17
1.5.4 – Outras aplicações .....	17
1.6 – Gene <i>lip2</i> em <i>Trichoderma harzianum</i> .....	18
<b>2 – Objectivos</b> .....	19
<b>3 – Material e métodos</b> .....	20
3.1 – Microrganismos utilizados .....	20
3.2 – Meios de cultura, manutenção e conservação .....	20
3.3– Preparação de células competentes.....	21
3.4– Clonagem da ORF do gene <i>lip2</i> no vector pGEM <sup>®</sup> -T.....	21
3.4.1 – Extração de DNA genómico de <i>T. harzianum</i> .....	22
3.4.2 – Quantificação de DNA genómico por espectrofotometria .....	22
3.4.3 – Amplificação da ORF do gene <i>Lip2</i> por PCR .....	23
3.4.4 – Visualização e purificação de produtos de PCR por gel de agarose low melting 0,8% (p/v) .....	25
3.4.5 – Ligação da ORF do gene <i>lip2</i> no vector pGEM <sup>®</sup> -T e transformação de células competentes de <i>E.coli</i> .....	26

3.4.6 –	<i>Extracção e quantificação do DNA plasmídico</i>	27
3.4.7 –	<i>Análise dos recombinantes no vector pGEM<sup>®</sup>-T por digestão enzimática para posterior clonagem no vector pET-28a (+)</i>	27
3.5 –	<i>Clonagem da ORF do gene lip2 no vector pET-28a(+)</i>	28
3.5.1 –	<i>Digestão do vector pET-28a(+)</i> com enzimas de restrição para clonar a ORF do gene lip2.	29
3.5.2 –	<i>Extracção do DNA e purificação por banda em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,8% (p/v) da ORF do gene lip2 e pET-28a(+)</i>	29
3.5.3 –	<i>Ligação da ORF do gene lip2 no vector pET-28a(+)</i> e transformação de células competentes de <i>E.coli</i> .	29
3.5.4 –	<i>Análise dos recombinantes por digestão enzimática</i>	29
3.6 –	<i>Expressão do gene lip2</i>	30
3.6.1 –	<i>Indução da expressão da proteína lip2</i>	30
3.6.2 –	<i>Preparação de proteínas a partir do meio de cultura</i>	30
3.6.3 –	<i>Preparação de proteínas a partir de lisados bacterianos</i>	31
3.6.4 –	<i>Quantificação da proteína lipase</i>	31
3.6.5 –	<i>Análise de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE</i>	31
3.6.6 –	<i>Detecção não específica de proteínas por coloração com o azul brilhante de Coomassie</i>	32
3.7 –	<i>Análise bioinformática do gene lip2 de Trichoderma harzianum</i>	32
3.7.1 –	<i>BLAST</i>	33
3.7.2 –	<i>CLUSTAL W</i>	33
3.7.3 –	<i>Análise de domínios conservados</i>	34
<b>4 –</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	35
4.1 –	<i>Caracterização do gene lip2</i>	35
4.1.1 –	<i>Estudo da região 5' (promotor)</i>	35
4.1.2 –	<i>Estudo da região 3' (terminador)</i>	36
4.1.3 –	<i>Estudo da região codificante</i>	37
4.2 –	<i>Análise das características da proteína</i>	38
4.2.1 –	<i>Análise comparativa da sequência proteica da lipase</i>	44
4.3 –	<i>Extracção de DNA</i>	47
4.4 –	<i>Clonagem e expressão do gene lip2</i>	47
4.4.1 –	<i>Clonagem do gene lip2 no vector pGEM<sup>®</sup>-T</i>	47
4.4.2 –	<i>Confirmação e digestão dos clones positivos</i>	48
4.4.3 –	<i>Clonagem do gene lip2 no vector pET28a(+)</i>	50
4.5 –	<i>Expressão da proteína</i>	51
<b>5 –</b>	<b>Conclusões</b>	54
<b>6 –</b>	<b>Bibliografia</b>	55

<b>7 – Anexos.....</b>	<b>66</b>
------------------------	-----------

# 1 – Introdução

## 1.1 – Introdução ao género *Trichoderma*

### 1.1.1 – Taxonomia

O género *Trichoderma* é cosmopolita em solos, madeiras em decomposição e material vegetal. As espécies de *Trichoderma* são frequentemente componentes dominantes na microflora do solo nos mais variados habitats. Isso deve-se à diversa capacidade metabólica das espécies de *Trichoderma* e à sua agressiva competitividade na natureza (Gams & Bissett, 1998).

A maior parte das estirpes de *Trichoderma* não têm sido associadas a um estado sexuado e acredita-se que são mitóticas. Algumas espécies de *Hypocrea* e de outros géneros aproximados descritos em *Hypocreales* têm anamorfos referentes a *Trichoderma*, em anos recentes um número crescente de teleomorfos de *Hypocrea* tem sido ligado frequentemente a anamorfos de *Trichoderma* através da investigação macromolecular (Gams & Bissett, 1998).

Apesar do género *Trichoderma* ser conhecido desde o início do século XIX e a sua associação com o teleomorfo *Hypocrea* ser reconhecida pelos irmãos Tulasne em 1865, a sua taxonomia continuou a ser pouco clara até décadas bem recentes (Gams & Bissett, 1998).

Rifai em (1969) fez a primeira tentativa para distinguir morfologicamente as espécies de *Trichoderma*, dividindo o género *Trichoderma* em nove “agregados de espécies”. Rifai baseou-se numa análise de características morfológicas e microscópicas dos isolados, e relatou pela primeira vez uma possível relação entre *Trichoderma* (anamorfo) e *Hypocrea* (teleomorfo). Posteriormente, Bissett *et al.*, (1991), agruparam as espécies em cinco secções: *T. Longibranchiatum*, *T. Hypocreanum*, *T. Pachybasium*, *T. Saturnisporium* e *T. Trichoderma*. Mais recentemente foram descritas cerca de setenta e cinco espécies do género *Trichoderma* (Grondona *et al.*, 1997; Chaverri *et al.*, 2001).

A taxonomia do género *Trichoderma* é largamente baseada em caracteres morfológicos tais como a forma dos conídios, tamanho, cor e ornamentação, o padrão das hifas e a formação de prolongamentos das hifas férteis ou estéreis dos conidióforos

(Rifai, 1969; Bissett, 1991). O rápido crescimento desse fungo em culturas, a produção de um micélio aéreo esparso, com o tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fiálides são características utilizadas para distinguir as espécies desses géneros (Resende, 2004). Estudos revelam que a análise morfológica é muito tendente a erros e que cerca de 50% dos *Trichoderma* spp. obtidos por análise morfológica foram identificados incorrectamente (Kubicek *et al.*, 2001). Métodos moleculares têm sido recentemente introduzidas em taxonomia de *Trichoderma* com a revisão de *Longibrachiatum* e *Trichoderma*, respectivamente, e teleomorfos relacionados (Samuels *et al.*, 2002).

### **1.1.2 – Morfologia**

As culturas de *Trichoderma* spp. são, geralmente de rápido crescimento a 25-30 °C, sendo termosensíveis a 35 ° C. As colónias, inicialmente são transparente em meio com cornmeal dextrose agar (CMD) ou brancas em meio rico, com potato dextrose agar (PDA). O micélio, geralmente não se manifesta em meio de cultura CMD, os conídios, em contrário, no período de uma semana formam-se em tufos compactos ou soltos, em tons de verde ou amarelo, ou, com menos frequência, branco. Um pigmento amarelo pode ser secretado no agar, especialmente em meio PDA. Um odor característico doce a “coco” é produzido por algumas espécies (Gams & Bissett, 1998).

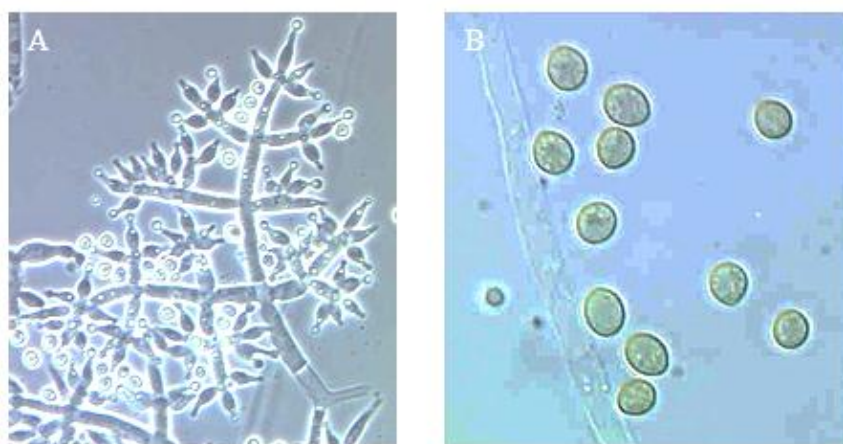
Os conídios, ovóides e hialinos, formam-se a partir de células conidiógenas. Estes encontram-se no final de estruturas ramificadas com aspecto piramidal, conhecidas como conidióforos, sobre as quais se situam células especiais, chamadas fiálides (Grondona *et al.*, 1997).

Os fiálides são altamente ramificados e, portanto difíceis de definir ou medir. São formados em diferentes anéis concêntricos ou formados a partir das hifas aéreas. Os ramos principais dos conidióforos produzem ramos laterais. O conidióforo do género *Trichoderma* assume um aspecto piramidal com ramos emparelhados (Gams & Bissett, 1998). (Figura 1).

A forma dos conídios varia desde de globoso até elipsoidal, ovóides, ou cilíndrico curto com a parte basal mais ou menos cónica e truncada. A amplitude de variação da dimensão dos conídios em *Trichoderma* não é grande, no entanto, algumas espécies podem sempre ser diferenciadas por pequenas diferenças de tamanho. A superfície dos conídios aparece liso na maioria das espécies em observação microscópica, no entanto,

também podem ter aspecto áspero ou rugoso como em *T. viride*, e podem ter forma de asa ou projecção de bolha como em outras duas espécies – *T. saturnisporum* e *T. ganense*. Os pigmentos dos conídios podem variar desde incolor até verde-escuro, ou menos frequente cinzento ou castanho (Gams & Bissett, 1998).

Os clamidósporos são comuns em diversas espécies, embora possam apresentar-se de uma maneira uniforme, formas globosas ou elipsoidais, terminais ou intercalares, de parede lisa, sem cor, amarelados ou esverdeados e com 6-15 µm de diâmetro na maioria das espécies (Gams & Bissett, 1998).



**Figura 1 - A)** Hifas e **B)** conídios de *Trichoderma harzianum* observado ao microscópio óptico; observação 1000x.

### ***1.1.3 – Ecologia e biologia dos fungos Trichoderma***

*Trichoderma* spp. abrangem um grande grupo de fungos que são extremamente comum em solos agrícolas, pradarias, florestas, sapais e desertos, no entanto são particularmente predominantes em climas húmidos (Danielson & Davey, 1973; Domsch *et al.*, 1980; Roiger *et al.*, 1991; Wardle *et al.*, 1993), podendo ser detectado no solo pelo cheiro, pois possui um odor característico devido ao volátil 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (Collins & Halim, 1972; Kikuchi *et al.*, 1974; Moss *et al.*, 1975).

São fungos de vida livre altamente interactivos na raiz, solo e ambientes foliares. Ficou conhecido, por muitos anos, devido ao facto de produzirem uma ampla gama de antibióticos (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998).

*Trichoderma* spp podem competir com outros microrganismos, como competem por exsudados chave a partir de sementes que estimulam a germinação de propágulos de planta - fungos patogénicos no solo (Howell, 2002) e, geralmente, competem com os microorganismos do solo por nutrientes e/ou espaço (Elad, 1996). Além disso, inibem ou degradam pectinases e outras enzimas que são essenciais aos fungos patogénicos de plantas, como por exemplo *Botrytis cinerea* (Zimand *et al.*, 1996).

Os fungos do género *Trichoderma* são eficientes produtores de enzimas como amilases, proteases e lipases, as quais podem ter aplicações industriais e, ou na natureza, estar envolvido na degradação de parede celular dos fitopatogénicos (Chérif & Benhamou, 1990), bem como degradar outros fungos, matéria orgânica e nutrientes secretados pelas raízes. Estirpes de *Trichoderma* são conhecidos pelas características oligotróficas e, em condições de laboratório, esses fungos colonizam em substratos extremamente pobre em nutrientes (Hjeljord *et al.*, 2001).

## 1.2 – Utilização de *Trichoderma* em biocontrolo

Nos últimos anos, tem-se notado uma crescente preocupação, em todo o mundo, com os problemas ambientais decorrentes das diversas actividades humanas, incluindo a agricultura. Esta preocupação resultou na procura de tecnologias de produções rentáveis, eticamente correctas e com perspectivas ecológicas. Para responder a este pedido, pesquisas científica têm avançado no desenvolvimento de soluções apoiadas em processos biológicos naturais. Nesse contexto, o controlo biológico constitui uma alternativa cada vez mais importante, uma vez que, na agricultura convencional, utilizada de forma complementar, contribui para a redução do uso dos agrotóxicos, enquanto na agricultura orgânica, insere-se em substituição a estes produtos (Silva & Mello, 2007).

Uma das funções que envolve a população dos microrganismos não fitopatogénicos está relacionada com a interferência no desenvolvimento dos mesmos (Luz, 1991). Na natureza há interacções contínuas entre os potenciais patogénios e os seus antagonistas, onde o controlo biológico funciona naturalmente.

Vários exemplos de microrganismos antagonistas usados contra fungos fitopatogénicos podem ser citados: *Dicyma pulvinata* no controlo do mal-da-serigueira (Mello *et al.*, 2005), *Gliocadium* no controlo de *Phytophthora* (Smith *et al.*, 1990), *Trichoderma harzianum* no controlo de *Theobroma cacao* (vassoura-de-bruxa do

cacaueiro) (De Marco *et al.*, 2000). Vale a pena salientar que em 90% dos antagonistas utilizados, há participação de diferentes espécies do género *Trichoderma* (Benítez, 2004). O comportamento desses fungos como antagonistas é essencial para o seu efectivo uso em biocontrolo, pois podem actuar utilizando vários mecanismos (Küçük & Kivanç, 2003).

Entre os fungos filamentosos, os do género *Trichoderma* são reconhecidos como os hiperparasitas mais importantes e mais estudados. Exibem variabilidade entre as linhagens em relação à actividade de biocontrolo; espectro de acção contra hospedeiros; propriedades fisiológicas e bioquímicas; como também a adaptação ecológica e ambiental (Silva, 2000). Esse hiperparasita tem a fase sexuada no Filo *Ascomycota*, Classe *Euasmycetes*, Ordem *Hypocreales*, Família *Hypocreaceae*, Género *Hypocrea* (Monte, 2001), sendo as espécies *T. harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* as mais utilizadas como agentes de controlo biológico de fitopatogénicos (Hermosa *et al.*, 2000). Segundo estes autores algumas espécies de *Trichoderma* são morfológicamente similares ao estágio anamórfico (fase sexuada), apresentando proximidade taxonómica. Entretanto muitas das linhagens, incluindo as utilizadas para biocontrolo, são classificadas como fungo imperfeito (Monte, 2001). *Trichoderma* também coloniza materiais de plantas herbáceas e lenhosas, onde o estágio sexual teleomorfo tem sido frequentemente encontrado (Harman *et al.*, 2004).

O biocontrolo ocorre de maneira indirecta, por competição de nutrientes e espaço; estimulação do crescimento das plantas; mecanismos de defesa; produção de antibióticos ou ainda, directamente por micoparasitismo. Esses mecanismos podem ainda actuar de forma sinérgica e a sua importância nos processos de biocontrolo dependem, não só da espécie, mas do isolamento de *Trichoderma*; do fungo que antagoniza; do tipo de cultura; das condições ambientais, tais como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e humidade (Benítez *et al.*, 2004).

O uso de *Trichoderma* tem sido eficaz no combate a patogénios radiculares como o nemátode da raiz *Meloidogine javanica* (Sharon *et al.*, 2001), *Pythium* spp. (Naseby *et al.*, 2000; Thrane *et al.*, 2000), *Rhizoctonia* spp. (Cúndom *et al.*, 2003), *Phytophthora* spp. (Etebarian *et al.*, 2000, Ezziyyani *et al.*, 2007) e patogénios da parte aérea, como: *Venturia* spp., *Botrytis* spp. (Hjeljord *et al.*, 2001, Lisboa *et al.*, 2007), *Crinipellis pernicioso*, (Sanogo *et al.*, 2002). Podem, também, ser utilizados no controlo de fitopatogénios de produtos de pós-colheita, como tubérculos (Okigbo & Ikediugwu,

2000), frutos (Batta, 2004) e na protecção de sementes (Burns & Benson, 2000; Harman *et al.*, 1980).

O potencial das espécies *Trichoderma* como agentes de biocontrolo de doenças de plantas foi descoberto na década de 30 (Weindling, 1932), sendo verificado o controlo de muitas doenças nos anos que se seguiram. Tais constatações têm levado ao aparecimento de diversos produtos comerciais formulados a partir de variadas espécies de *Trichoderma* em diversos países (Howell, 2003).

### 1.3 – *Trichoderma harzianum*

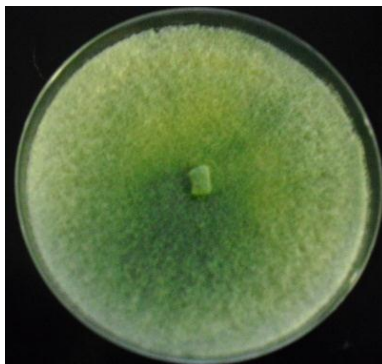
*Trichoderma harzianum* Rifai (*Ascomycota*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*) é um fungo filamentoso, assexual, isolado comumente de solos tropicais de material vegetal, ecossistemas rizosféricos e material orgânico em decomposição, numa proporção de  $10^1$  -  $10^3$  esporos por grama de solo (Samuels, 2006).

Os isolados de *Trichoderma harzianum* são ubíquos devido à sua natureza saprófita e encontra-se em solos e matéria orgânica em todas as latitudes. As condições óptimas para o crescimento e esporulação, variam entre espécies, mas a maioria são mesófilas, crescem num pH 6 e os esporos permanecem viáveis por um período de 45 dias (Samuels, 2006; Papavizas, 1985). A temperatura óptima de crescimento é a 30°C, sendo a temperatura máxima de crescimento 36°C (Gams & Bissett, 1998).

*Trichoderma harzianum* cresce rapidamente sobre diferentes substratos, utilizando monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos complexos, assim como purinas, aminoácidos, pirimidinas, aldeídos, e ácidos orgânicos como fonte de carbono e energia, produzindo assim um amplo espectro de metabólitos que incluem antibióticos, antifúngicos, pigmentos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas (Grondona *et al.*, 1997). Entre as fontes azotadas utilizadas em meio de cultura para *T. harzianum* destaca-se o sulfato de amónio, e outros compostos como aminoácidos, ureia e nitratos, utilizados para o crescimento vegetativo do fungo (Papavizas, 1985).

Macroscopicamente, *T. harzianum* forma colónias concêntricas, de bordas irregulares, com crescimento em meio sólido PDA de cor branca nos primeiros dias, e posterior formação de esporos de cor amarela ou verde (Figura 2). Outro aspecto importante da esporulação de *Trichoderma* é a habilidade de produzir clamidósporos,

que são estruturas de resistência, de aspecto tipicamente globoso ou subgloboso, que se formam nos extremos das hifas (Grondona *et al.*, 1997).



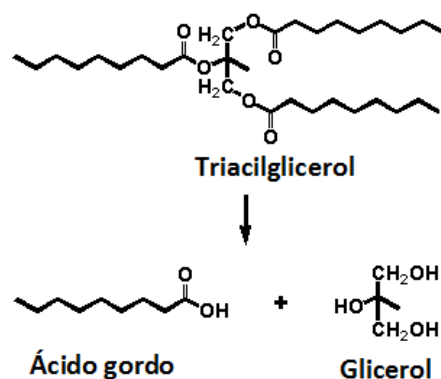
**Figura 2 – *Trichoderma harzianum* em meio PDA**

*Trichoderma harzianum* tem importância ao nível do controlo biológico de doenças de plantas, especialmente doenças infectadas através do solo. A acção de *T. harzianum* no controlo biológico está amplamente estudada por diversos autores (Liu & Yang, 2005).

## 1.4 – Lipases

### 1.4.1 – Definição

As enzimas lipases (E.C.3.1.1.3) pertencem à família das serinas hidrolases, que por sua vez incluem várias enzimas esterases. São enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, libertando ácidos gordos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Também têm a capacidade de catalisar reacções de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (Villeneuve *et al.*, 2000). Estas enzimas catalisam a hidrólise de óleos e gorduras em glicerol e ácidos gordos livres na interface óleo-água (Figura 3), no entanto, também são capazes de catalisar uma grande variedade de reacções em ambos os meios (aquosos e não aquosos), particularidade que as distingue das esterases (Saxena *et al.*, 2003). Uma característica importante das lipases é a sua capacidade de não só hidrolisar ligações éster, para transesterificar triglicéridos e resolver misturas racémicas, mas também de sintetizar ligações éster em meio não aquoso (Macrae & Hammond 1985).



**Figura 3 – Hidrólise por lipases de triacilglicerol em glicerol e ácidos gordos.**

A lipase irá dividir ésteres emulsionados de glicerina e de cadeia longa de ácidos gordos como trioleína (trioleilglicerol, TC18) (Sharma *et al.*, 2001). Para as esterases, o substrato considerado padrão é a tributirina (tributirilglicerol, TC4), que por sua vez, também pode ser hidrolisada por lipases (Jaeger *et al.*, 1999).

As lipases são amplamente distribuídas na natureza, e são produzidas por animais, plantas e microrganismos. As maiorias das lipases utilizadas para fins biotecnológicos, tem sido isoladas de bactérias e fungos (Lin *et al.*, 2006).

Normalmente é aceite que as esterases hidrolisam ligações éster em ester e triacilgliceróis de cadeia carbónica curta (< 10 carbonos), libertando ácidos gordos de baixo peso molecular, e, por isso também são denominadas esterases não-lipolíticas (Chahinian *et al.*, 2005) ou somente carboxilesterases (Bornscheuer 2002). Já as lipases hidrolisam preferencialmente triacilgliceróis de cadeia longa (> 10 carbonos).

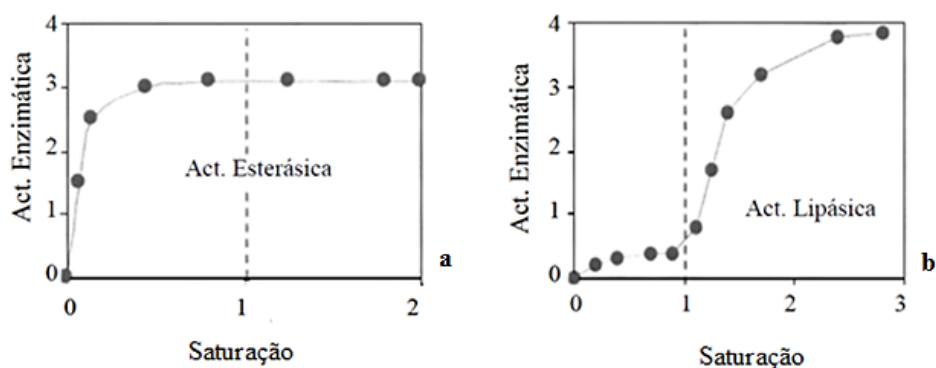
#### **1.4.2– Características cinéticas e físico-químicas das lipases**

A maioria das lipases apresenta uma faixa óptima de actividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e uma temperatura óptima para uma actividade máxima entre 30 e 40°C. No entanto, estas propriedades podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. As lipases, geralmente, são glicoproteínas ácidas (Hiol *et al.*, 1999), com massas

moleculares entre 20 e 60 kDa. O seu ponto isoeléctrico pode variar entre 4 e 5 (Ferrer *et al.*, 2000).

Como as lipases são enzimas hidrossolúveis, vão actuar no metabolismo e digestão dos triacilglicerois (Svendsen 2000; Aloulou *et al.*, 2006), apresentando assim uma baixa actividade ou mesmo serem inactivas em substratos solúveis em soluções aquosas. No entanto, apresentam maior actividade quando a concentração do substrato é suficientemente alta para formar agregados micelares ou emulsões, uma vez que têm a capacidade de interagir com a interface dos substratos agregados (Sarda & Desnuelle, 1958). Esse aumento de actividade, na presença de micelas ou emulsões, deve-se ao fenómeno conhecido como activação interfacial (Reis *et al.*, 2008). No caso da activação de esteres, a situação é diferente, isto porque as esterases catalisam hidrólise de esteres solúveis, trabalhando sem interface e obedecendo às equações de cinética enzimática de Michaelis-Menten, que são válidas apenas se as reacções catalíticas ocorrerem em fases homogéneas. Dessa forma, a análise das reacções catalisadas por lipases ocorre utilizando substrato lipídico sob a forma de emulsão. Ao contrário das lipases, as esterases actuam somente em compostos solúveis em água (Volpato *et al.*, 2010).

Este fenómeno, conhecido por activação interfacial, pode ser facilmente observado quando se avalia o efeito da concentração de substrato na actividade enzimática (Figura 4).



**Figura 4 – Hidrolise de triacetina pela lipase pancreática e esterase hepática de porco em função da concentração de substrato (Adaptado de Sarda e Desnuelle, 1958).**

Na figura 4a, observa-se o perfil de actividade da esterase hepática de porco frente a triacetina em concentrações solúveis e além do seu limite de solubilidade. Na figura 4b, observa-se o perfil de actividade da lipase pancreática de porco frente a triacetina.

Os substratos no estado solúvel são indicados em concentrações abaixo do limite de solubilidade (sinalizada com 1) e concentrações acima deste limite são denominados como substrato no estado agregado.

Este fenómeno de activação interfacial das lipases foi observado por (Holwerda *et al.*, 1936) e por (Schonheyder & Volquartz, 1945). Em ambos os casos, os trabalhos foram realizados com lipases pancreática de porco. Sarda e Desnuelle em 1958 purificaram esta lipase e estudaram detalhadamente este fenómeno, observando que a actividade da lipase sobre a tríacetina aumentava, notavelmente, uma vez que esta superava o seu limite de solubilidade. Levantaram-se duas hipóteses, denominadas de modelo da enzima e modelo do substrato.

O modelo da enzima foi proposto por Desnuelle e colaboradores em 1960, supondo que a activação interfacial poderia responder a uma mudança conformacional sofrido pelas lipases. Estas reacções não se podem descrever mediante uma reacção de Michaelis-Menten, uma vez que o processo de hidrólise possui diversas etapas (Verger *et al.*, 1990). No que diz respeito ao modelo do substrato, a activação é explicada com a modificação do substrato lipídico na interface: o aumento da concentração local do substrato no lugar do centro activo vai diminuir a orientação e conformação dos lípidos unidos na interface, relativamente à geometria do centro activo da enzima ou à diminuição do grau de hidratação do substrato (Muderhwa & Brockman, 1992; Smaby *et al.*, 1994).

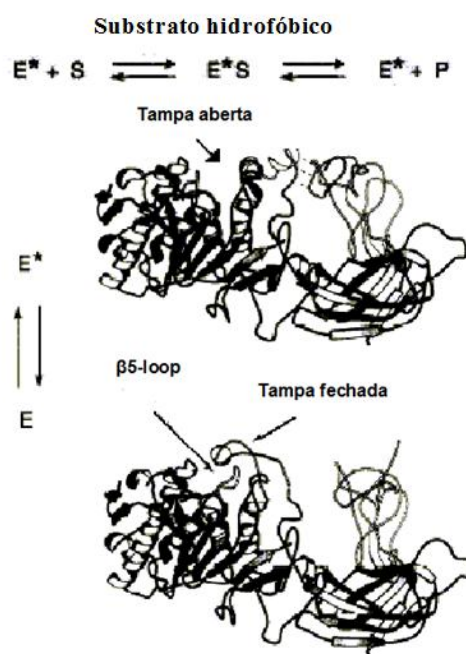
### ***1.4.3 – Características estruturais das lipases***

Pleiss e colaboradores em 1998 compararam a estrutura dos centros activos de diversas lipases e esterases e, como principal conclusão, observaram que os centros das lipases são normalmente mais largos e profundos do que os centros presentes nas esterases, o que poderia explicar a capacidade que as lipases têm de reconhecer substratos mais variados e com cadeias mais longas (p.ex.: trioleína).

Quando uma lipase está na fase aquosa, abaixo do seu limite de solubilidade ou na ausência de uma emulsão ou em baixa concentração de um substrato lipídico, há normalmente, uma hélice que cobre o centro activo, um oligopeptído helicóide denominado por motivo “*lid*” ou “tampa”, que protege o centro activo (figura 5). Essa tampa, anfifílica, é constituída por aminoácidos polares na parte externa e por

aminoácidos apolares na parte interna, em contacto com o centro activo (Kamiya *et al.*, 1999).

Diz-se que, a lipase com a tampa que cobre o centro activo está numa conformação fechada, e na presença de uma emulsão ao entrar em contacto com a interface formada pelo lípido, as lipases sofrem uma mudança conformacional na região da tampa, expondo o seu centro activo para a hidrólise das moléculas de triacilglicerol (Brzozowski *et al.*, 2000). O centro activo só fica exposto quando a tampa abre, ou seja, a enzima só catalisa uma reacção em interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas ou ainda na presença de um solvente hidrofóbico. O mecanismo de passagem à conformação fechada para conformação aberta é então designado por activação interfacial (Kuncová *et al.*, 2003).

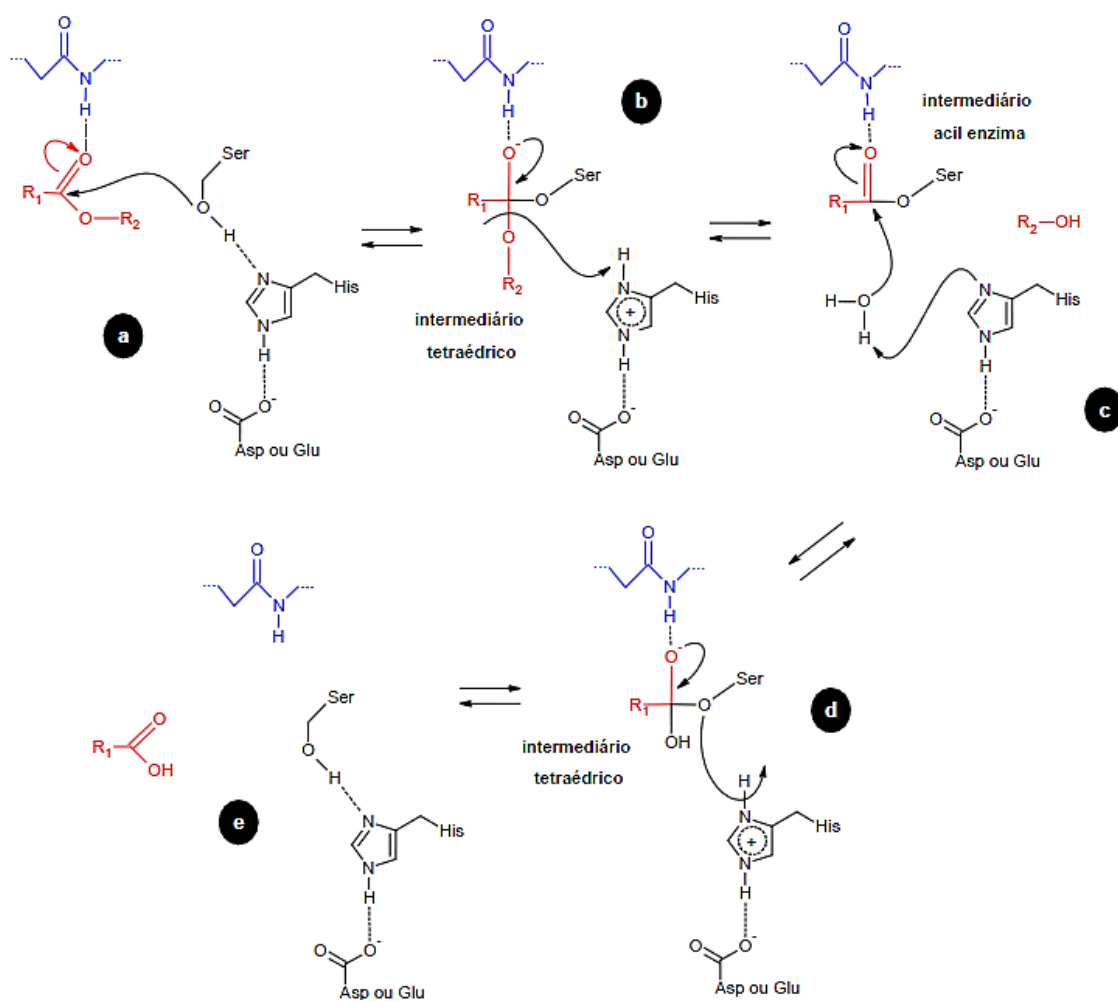


**Figura 5 – Representação do mecanismo de tampa das lipases (Ribeiro, 2006).**

O centro activo das lipases é geralmente caracterizado por uma tríade composta por serina, histidina e um resíduo ácido (ácido aspártico ou glutâmico), essencial para todas as reacções catalisadas por estas enzimas, sendo portanto classificadas como serina hidrolases (Jaeger *et al.*, 1999; Reetz, 2002).

Os mecanismos envolvidos na catálise das serinas hidrolases foram, inicialmente, propostos por Brady e colaboradores em 1990. Na figura 6, a primeira etapa consiste na retirada de um protão da serina, mecanismo pelo qual os resíduos de histidina e

aspartato são requeridos. O grupo hidroxilo do resíduo de serina ataca o carbono do grupo carbonilo do substrato formando um intermediário de enzima acilado. A presença de um espaço oxianiónico contribui para a estabilização da distribuição de carga e também para redução da energia mínima de formação do intermediário tetraédrico. A última etapa é denominada de desacilação: o grupo acil é transferido para a enzima e libertado pelo ataque de um nucleófilo (p. ex.: H<sub>2</sub>O) sendo assim, o centro catalítico da enzima é regenerado.

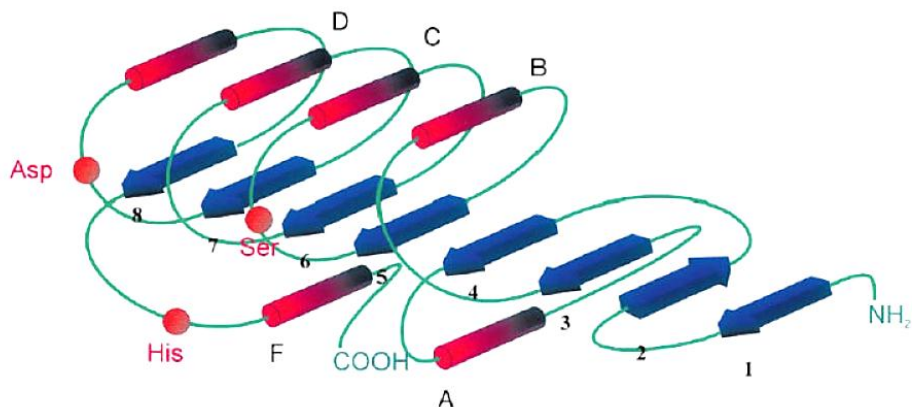


**Figura 6 - Mecanismo de reacção de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases.** A tríade catalítica e a água são visualizadas a preto, os resíduos do espaço oxianiónico a azul e o substrato a vermelho. **(a)** Ataque nucleofílico do hidroxilo da serina ao carbono susceptível da ligação éster; **(b)** intermediário tetraédrico; **(c)** intermediário acil enzima e ataque nucleofílico da água; **(d)** intermediário tetraédrico; **(e)** enzima livre. Modificado de Jaeger *et al.* (1994).

O resíduo da serina que participa na tríade catalítica, normalmente, encontra-se num pentapéptido conservado com uma sequência consenso (Gly-X-Ser-X-Gly), onde X representa qualquer um dos 20 aminoácidos. Actualmente, alguns bancos de dados de domínios conservados, por exemplo, o PROSITE (Sigrist *et al.*, 2002; Hulo *et al.*, 2008) e o Pfam (Finn *et al.*, 2008) utilizam a sequência do pentapéptido e da região ao seu redor para classificar se uma determinada sequência de aminoácidos codifica para uma lipase ou esterase. De facto, somente a sequência desta região tem sido insuficiente para diferenciar entre estes dois tipos de enzimas e, portanto, novos métodos de diferenciação têm sido sugeridos (Fojan *et al.*, 2000).

Foi observado que todas as lipases com estruturas terciárias resolvidas possuem a configuração chamada  $\alpha/\beta$  hidrolase (Schmidt-Dannert, 1999) (figura 7). Esta configuração foi identificada em 1992 através da comparação de cinco enzimas com funções catalíticas totalmente diferentes: dienolactona hidrolase, haloalcano dehalogenase, serino carboxipeptidase II de trigo, acetilcolinesterase e a lipase de *Geotrichum candidum*. Estas enzimas não possuem qualquer similaridade entre sequências, não actuam com substratos similares nem possuem o mesmo nucleófilo, contudo, possuem similaridades estruturais, combinadas com a preservação do arranjo dos resíduos catalíticos (Nardini & Dijkstra, 1999). Segundo estes autores, o grupo de enzimas com a configuração  $\alpha/\beta$  hidrólase cresceu e tem abrangido um grande grupo de enzimas, fazendo destas uma das mais versáteis e amplamente distribuídas configurações de proteínas.

Além de apresentarem o mesmo mecanismo reaccional, as carboxilesterases e as lipases apresentam algumas semelhanças estruturais. A principal é a presença da configuração  $\alpha/\beta$  hidrólase, sendo composto por várias  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  intercaladas. Este é uma configuração bastante comum às hidrólases, sendo também encontrado em outras famílias de enzimas como epóxido hidrólases (E.C. 3.3.2.3) (Arand *et al.*, 2005) e haloperoxidasas (E.C. 1.11.1.) (Hofrichter & Ullrich, 2006).



**Figura 7 – Representação esquemática do motivo estrutural conservado em enzimas da família  $\alpha/\beta$  hidrólase.**

Na figura 7, os filamentos em conformação  $\beta$  (1 a 8) formando uma estrutura em folha  $\beta$ -pregueada estão indicados pelas setas azuis, as estruturas em  $\alpha$ -hélices (A a F) estão indicadas pelas colunas em vermelho. As posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica estão indicadas por esferas vermelhas. A região aminoterminal é indicada por  $\text{NH}_2$  no início da cadeia e a região carboxiterminal por  $\text{COOH}$  no final da cadeia (Bornscheuer, 2002).

### 1.5 – Aplicações biotecnológicas das lipases

As lipases microbianas apresentam uma grande diversidade de aplicações industriais, por serem mais estáveis que as lipases animais, vegetais e por poderem ser produzidas a baixos custos, com alta velocidade de síntese, grande versatilidade, e com maior simplicidade na manipulação ambiental e genética da capacidade produtiva dos microorganismos (Cihangir & Sarikaya, 2004; Ellaiyah *et al.*, 2004). São, na maioria, extracelulares, uma evidência que facilita a sua extracção, isolamento e purificação (Carvalho *et al.*, 2003).

O potencial biotecnológico das lipases relaciona-se pelo facto de catalisar diversas reacções (eterificação e transesterificação), e não apenas hidrólises. Normalmente, preservam a sua estrutura e estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de cofactores mas requerem condições estáveis de temperatura e pH. Apresentam uma larga especificidade pelo substrato e alta enantiosseletividade (Elilbol

& Ozer, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Burkert *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2004; Contesini *et al.*, 2009; Rigo *et al.*, 2010).

As lipases de origem microbiana são utilizadas em alimentos, no fabrico de detergentes (hidrólise de gordura), de cosméticos (remoção de lípidos) e tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas). Como estas enzimas possuem um enorme potencial catalítico, também são utilizadas como biocatalisadores ideais em química orgânica, química fina (síntese de ésteres), na indústria farmacêutica, e na produção de aditivos alimentares (intensificação de aroma) (Elibol & Ozer, 2002; Burkert *et al.*, 2004; Cihangir & Sarikaya, 2004).

### **1.5.1 - Indústria farmacêutica**

A síntese de substâncias bioactivas tem sido praticada ao longo dos anos através da química orgânica convencional. Esta via de síntese, em alguns casos, pode resultar em problemas, como a instabilidade da molécula nas condições de reacção e a formação de mistura racémica, sendo a molécula de interesse um dos enantiómeros (Reetz, 2002).

A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se, especialmente, à enantioselectividade exibida por muitas destas enzimas. A catálise enantioselectiva permite a obtenção de produtos opticamente puros, uma vez que estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e actuarem, preferencialmente, num dos isómeros de uma mistura racémica. Esta característica é extremamente vantajosa, pois, em muitos casos, uns dos isómeros (R ou S) apresentam actividade biológica, enquanto o outro é menos activo ou até mesmo tóxico (Hasan, 2006). Como exemplo, pode-se citar o ácido 2-fenil-propanóico. Este composto é utilizado na síntese de drogas anti-inflamatórias não esteróides (Ibuprofeno e Naxopreno) e pode ser obtido através de reacções de transesterificação ou de hidrólise do éster correspondente, catalisadas por lipases. Outro exemplo que pode ser descrito, na utilização da lipase de *C. antarctica* numa resolução racémica dos derivados do ácido tiotetrónico, para a obtenção do composto (R)-triolactomicina, que possui um átomo de carbono quaternário quiral em C5, com excesso enantiomérico (Isaksson *et al.*, 2006; Toyama *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 1999).

Como as esterases e lipases são capazes de catalisar uma série de reacções e possuem uma boa estabilidade em solventes orgânicos, podem ser consideradas como excelentes biocatalisadores em fases intermediários de processos químicos

convencionais e na catálise de reacções químicas que envolvam substratos insolúveis em meio aquoso. Além disso, são aplicadas na resolução de misturas racémicas e na remoção selectiva de certos compostos. As lipases são, também, utilizadas na produção de antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores (Patel, 2002; Hasan, 2006). O uso de lipases nas indústrias da química fina e farmacêutica tem sido cada vez mais comum devido às características de químio-, regio- e/ou estereoselectividade (Reetz, 2002).

### **1.5.2 - Indústria alimentar**

Na indústria de alimentos, as lipases são intensamente utilizadas, principalmente na hidrólise da gordura do leite, intensificação do sabor dos queijos e na aceleração do processo de maturação, fabrico de derivados de queijo e na hidrólise de gorduras e óleos (Hasan, 2006).

As lipases são, também, utilizadas para modificar o sabor dos alimentos, síntese dos ésteres, dos ácidos gordos, e álcoois de cadeias curtas, sendo estes compostos básicos do sabor e aroma (Hasan, 2006).

A estereoselectividade das lipases é útil na síntese de biopolímeros como, por exemplo, em polifenóis e poliésteres, na resolução cinética de misturas racémicas de álcoois secundários em reacções de hidrólise, na eterificação e na transesterificação (Schulz *et al.*, 2000; Jaeger & Eggert, 2002).

Por exemplo, na indústria de lacticínios, no queijo e no leite, são utilizadas na aceleração do processo de maturação. Desta forma, a lipase tem sido utilizada na hidrólise selectiva dessa gordura, possibilitando a sua utilização na formação de produtos com aroma do queijo, na produção de substitutos de manteiga e outros aditivos usados em cereais, gomas e aperitivos. A adição desses hidrolisados confere uma variedade de efeitos organolépticos aos alimentos (Virto *et al.*, 2003).

Outro exemplo pode ser dado na indústria de panificação, no fabrico do pão, a lipase degrada os lípidos do trigo, modificando a sua interacção com o glúten, obtendo um resultado condicionador na massa, aumentando o volume do pão, melhorando a textura. Neste caso, utiliza-se a lipase 1,3 específica para obter este efeito (Castro *et al.*, 2004). A hidrólise realizada por lipases 1,3 específicas é aplicada para a obtenção de monoacilgliceróis que são usados como agentes emulsificantes (Freire & Castilho, 2008).

### **1.5.3 - Indústria de detergentes**

As lipases são utilizadas na indústria de detergentes para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, conseqüentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido. Alguns exemplos de enzimas utilizadas em detergentes são a Lipolase® (Novozymes), obtida do fungo *Thermomyces lanuginosa* e expressa em *A. oryzae*; a Lumafast® (Genencor, USA) e a Lipomax® (Gist-Brocades, Holanda), lipases bacterianas provenientes de *Pseudomonas mendocina* e *P. alcaligenes* (Jaeger & Reetz, 1998).

A área mais importante de aplicação comercial para as lipases hidrolíticas é em detergentes industriais ou domésticos (Horchani *et al.*, 2009), onde é geralmente usada em combinação com uma ou mais enzimas, tais como proteases, amilases e celulases, sendo responsável pela remoção de diversas gorduras (Castro *et al.*, 2004). As lipases, neste caso, devem possuir características de baixa especificidade ao substrato, termoestabilidade, e serem activas e estáveis em condições normalmente consideradas agressivas para uma enzima, como temperaturas de 40 a 60 °C e meios muito básicos (Sharma *et al.*, 2001).

### **1.5.4 – Outras aplicações**

Na indústria têxtil, as lipases são usadas para facilitar a remoção de lubrificantes, a fim de promover uma melhor absorção da tinta no tecido. As fibras sintéticas modificadas enzimaticamente são utilizadas para a produção de fios e tecidos (Hasan, 2006).

As possibilidades de aplicações das lipases na indústria oleoquímica são enormes. Pesquisas acerca da produção de biodiesel utilizando lipases através da transesterificação de triglicéridos com álcoois de cadeia curta, tem crescido significativamente nos últimos anos. Foram realizadas produções de biodiesel catalisadas por lipases a partir de diferentes tipos de óleos, tais como de girassol, soja, coco e palma (Lee *et al.*, 2002; Pizarro & Park, 2003; Talukder *et al.*, 2010).

As lipases também são utilizadas na indústria de papel e celulose para remoção de triacilgliceróis e ceras, removendo componentes hidrofóbicos que causam problemas no fabrico do papel (Kontkanen *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2004).

Na área ambiental, as lipases podem ser aplicadas na remoção de óleos presentes nas águas residuais de fábricas, restaurantes ou residências, ou provenientes de indústrias de refinação de óleos que poluem solos e água. A aplicação de microrganismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo é sugerida como uma alternativa de biorremediação (Jaeger & Eggert, 2002; Patel, 2002; Pizarro & Park, 2003).

#### 1.6 – Gene *lip2* em *Trichoderma harzianum*

As sequências nucleotídicas dos genes *lip1* e *lip2* foram identificados através da HE-TAIL PCR (High Efficiency Thermal Asymmetric Interlaced PCR) por Jorge *et al.*, (2008, 2010), e estão depositados na base de dados GenBank com os códigos de acesso AM180877.1 e AM774154 respectivamente.

## 2 – Objectivos

Os fungos do género *Trichoderma* são muito utilizados no controlo biológico devido à sua capacidade antagonista sobre fungos fitopatogénicos. Os mecanismos utilizados por *Trichoderma* spp. para antagonizar outros fungos são, competição (pelo espaço e/ou nutrientes), antibiose e micoparasitismo, estando neste último caso envolvidas enzimas líticas tais como proteases, glucanases, quitinases e lipases. Algumas dessas proteínas possuem um grande potencial agrícola, principalmente como componentes activos de novas formulações de fungicidas (Benítez *et al.*, 2004).

O objectivo deste trabalho pretende-se caracterizar o gene *lip2* de *Trichoderma harzianum*. Para concretizar este objectivo geral foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos que a seguir se indicam:

- Aplicação de técnicas bioinformáticas para caracterização do gene;
- Desenho de *primeres* com adaptadores para amplificação do gene *lip2*;
- Clonagem molecular do gene *lip2* no plasmídeo de expressão pET-28a(+);
- Análise dos transformantes;
- Caracterização da expressão heteróloga da lipase por gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

### 3 – Material e métodos

#### 3.1 – Microrganismos utilizados

*Trichoderma harzianum*- Utilizou-se a estirpe CECT 2413 de *T. harzianum* Rifai, proveniente da colecção espanhola de Cultivos Tipo, Burjassot, Valência.

*Escherichia coli* - A estirpe utilizada neste trabalho foi DH5 $\alpha$ , de genótipo (*supE44*,  $\Delta$ *lacU169*, (*f80lacZ* $\Delta$ *M15*), *hsd R17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) (Hanahan, 1983).

#### 3.2 – Meios de cultura, manutenção e conservação

O meio de cultura utilizado para o crescimento de *Trichoderma harzianum* foi o meio PDA (potato dextrose agar) (anexo I). A sua manutenção foi realizada através de repicagens regulares (de 10 a 30 dias) em meio PDA, com incubação à temperatura de 28°C e conservação à temperatura de 20-25°C. Adicionalmente, para conservar as estirpes durante longos períodos de tempo, os microrganismos foram conservados em glicerol a 30% (v/v) e congelados a -80°C.

O meio de cultura para o crescimento de *E.coli* DH5 $\alpha$  foi o meio LB (Luria-Bertani). A sua manutenção foi efectuada com repicagens em placas de Petri com meio LB-agar, seguindo-se uma incubação de 16h à temperatura de 37°C e uma conservação à temperatura de 4°C durante 2 meses. Adicionalmente, para manter as estirpes viáveis durante longos períodos de tempo, os microrganismos foram armazenados em glicerol a 30% (v/v) e congelados a -80°C.

As culturas bacterianas em meio líquido foram realizadas em meio LB com arejamento, a 37°C e a 180 rpm em agitador orbital (Stuart<sup>®</sup>, S150). Ao meio de cultura foi adicionado antibiótico de acordo com a resistência conferida pelos plasmídios, canamicina, numa concentração de 30  $\mu$ g/ml para o pET-28a(+) (Novagen) e ampicilina numa concentração de 100  $\mu$ g/ml para o pGEM<sup>®</sup>-T (Promega).

As colónias bacterianas foram isoladas em placas de Petri, com meio sólido LB com antibiótico e quando necessário para a identificação de recombinantes, foram adicionados IPTG 100 mM (isopropil- $\beta$ -D-galactosidase) e X-Gal 80  $\mu$ g/ml (5-bromo-

4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo). As placas de Petri formaram incubadas durante a noite a 37°C.

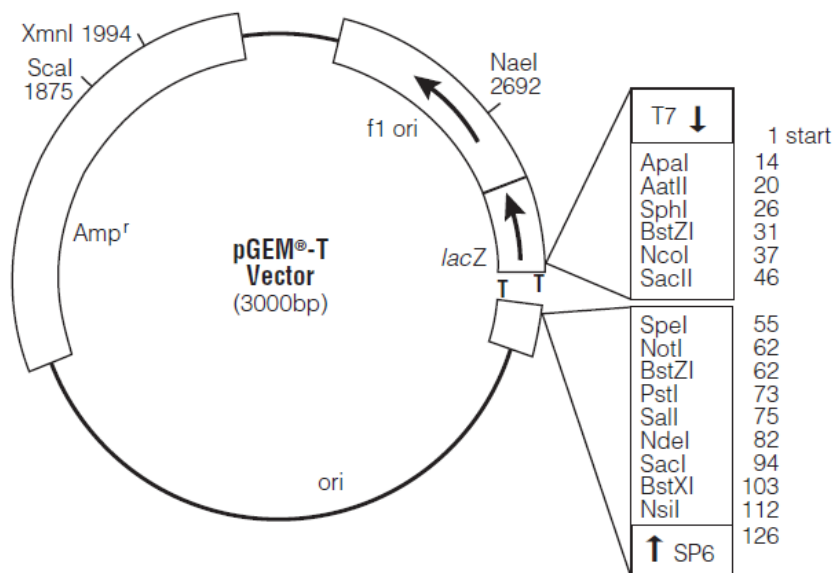
Os clones foram conservados em 50% (v/v) de glicerol e congelados a uma temperatura de -80°C e o seu DNA plasmídico congelado a -20°C em água ultrapura.

### 3.3– Preparação de células competentes

Para a preparação de células competentes inoculou-se a estirpe de *E. coli* em LB líquido, sem antibiótico, a uma temperatura de 37°C com agitação constante de 180 rpm até se obter uma densidade óptica (D.O) entre 0,4-0,5. Centrifugaram-se as células durante 5 minutos a 4°C e ressuspenderam-se numa solução MgCl<sub>2</sub> 0,1M, tendo-se mantido durante 10 minutos em gelo. Repetiu-se a centrifugação e foram novamente ressuspensas numa solução CaCl<sub>2</sub> 0,1M contendo glicerol 15 % (v/v) e armazenadas em alíquotas a -80 °C.

### 3.4– Clonagem da ORF do gene *lip2* no vector pGEM®-T

Para a clonagem dos produtos de PCR utilizou-se o plasmídeo pGEM®-T (Figura 8), um vector linearizado de 3000 pb preparado pela casa comercial “Promega”. Contém timidinas nas extremidades 5´ que viabilizam a ligação de produtos de PCR directamente, uma vez que a enzima *Taq* polimerase acrescenta adeninas na extremidade 3´ dos produtos de PCR, que hibridam com as timidinas do vector, aumentando a eficiência de ligação do produto de PCR no vector. Além disso, contém o gene *lacZ* da β- galactosidase, possibilitando a identificação das colónias que apresentam o plasmídeo recombinante de interesse. Quando o produto de PCR é ligado ao vector, o gene da β-galactosidase fica interrompido, inactivando assim a enzima, produzindo colónias brancas. Caso contrário, o gene fica contínuo e a enzima funcional, desta forma, quando é expressa, vai catalisar uma reacção de hidrólise do X-Gal (5-bromo-4-cloro-3- indoil-β-D-galactosídeo), um análogo cromogénico da lactose, formando colónias azuis.



**Figura 8- Estrutura do vetor pGEM®-T**

### 3.4.1 – Extração de DNA genómico de *T. harzianum*

Para a extração de DNA genómico de *T. harzianum*, cresceu-se o micélio em meio sólido PDA com celofane fervido e autoclavado com o objectivo de facilitar à recolha do micélio. Três a quatro dias depois da inoculação, procedeu-se a recolha do micélio e extração de DNA.

O protocolo de extração usado é baseado na lise celular, seguido de desproteinização e purificação do DNA (anexo II). O processo de extração consistiu na utilização de uma solução de lise constituída por (Tris-HCL 200 mM; EDTA 25 mM; NaCl 250 mM e 0.5% SDS (p/v)), seguido de uma desproteinização com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção 25:24:1) e precipitação de DNA através de lavagem com etanol de gradientes decrescentes (100% - 70%) a -20°C, sendo o *pellet* de DNA posteriormente seco e diluído em água ultrapura. O tratamento do DNA foi feito com RNase (5 mg/ml) durante 5 minutos a 37°C.

### 3.4.2 – Quantificação de DNA genómico por espectrofotometria

A quantificação de DNA de *T. harzianum* efectuou-se medindo a absorvância a 260 nm num espectrofotómetro Genesys. Este método baseia-se na quantidade de

radiação ultravioleta absorvida pelas bases nucleotídicas constituintes das cadeias de DNA, segundo a lei *Lambert-Beer*:

$$A = c L \varepsilon$$

Sendo *A*- absorvância da solução; *c*- concentração da solução; *L*- percurso óptico atravessado pela radiação (1cm) e  $\varepsilon$ - absorvidade específica ( $9,6 \times 10^3 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). As leituras das densidades ópticas foram efectuadas a dois comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm. O grau de pureza do DNA genómico foi calculado através da razão entre os valores de absorvância ( $A_{260}/A_{280}$ ). Para que o DNA seja considerado puro, é necessário que esta razão esteja compreendida entre 1,65 e 2. Uma razão  $A_{260}/A_{280}$  nm inferior a 1,65 indica que a amostra de DNA está contaminada com proteínas, por outro lado se essa razão for superior a 2 pode existir uma contaminação com RNA, sais e/ou reagentes utilizados durante a extracção. Após a obtenção das leituras espectrofotométricas, fizeram-se as respectivas diluições das várias amostras de DNA, de modo a obter uma concentração final de DNA de 80 ng/ $\mu\text{l}$ .

### 3.4.3 – Amplificação da ORF do gene *Lip2* por PCR

A técnica de PCR é uma metodologia que assenta, na amplificação *in vitro* baseada num processo *in vivo* – a replicação. Esta permite uma síntese exponencial e selectiva de uma quantidade reduzida de DNA. A técnica consiste num ciclo de três fases, que compreende a desnaturação do DNA molde, a hibridação (*annealing*) dos *primers* e a polimerização do DNA pela *Taq* DNA polimerase.

Para a amplificação da ORF por PCR foram desenhados *primers* com adaptadores, tendo em conta o local de restrição do *polilinker* do vector pET-28a(+), estes não devem possuir local de reconhecimento na ORF do gene e devem formarem extremos coesivos após a digestão. Deste modo é possível através digestão enzimática da ORF do gene *lip2* amplificada por PCR e digerida, inserir através de uma T4 DNA ligase o fragmento de DNA no vector. Assim sendo, foram escolhidas as enzimas *Nde I* e *Sal I*, visto serem as mais apropriadas. Em anexo III encontram-se descritos as condições químicas utilizadas.

Na figura 9, encontra-se desenhados os *primers* lip2petNdeI, no sentido 5'→3'- AGCATATGGGGTGGACATTTCTGG na região do promotor e um *primer* lip2petSalI no sentido 3'→5'- AGCGTCGACTTTACAACCTCGTCATG, a partir da sequência

nucleotídica da ORF do gene *lip2* (GenBank AM774154) usados para a clonagem. As bases marcadas no quadrado representam a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Nde I* e no círculo a sequência de reconhecimento da enzima *Sal I*.

```

AGCCGGTTTTGTTGAGCTGAGTTTCCAGCAAAGGCGCTCTCCTTGCTAGCATTCTGGGCATTTCTGCCAG
CCCCCATGCCGTCTTCCCTTCTCCATGATCTGATCATCGCCAGCGAACGAATTTAGCATATGGGGTGGACA
TTTCTGGGCCGCTTCGGGCTGTTGCTGCTTGTACAGCTCGTCGCTGCTGTCTTTGTTCGAGGCCGCTTACA
TCAATCAACAAGAACCCTTGGGCGTCAAAGAGCCAGCGTCTGTTTCGAGCATCCCCGTGGCCCTGTTCCG
GGATCTCGAACGACTGGCGAGGCTCGTTGACGTCTCATATTGCCCTGGCACCACAGGCATTCGCAAGCCG
TTCCAATGCGTCTCTCGATGCGATGAATCCCCAATGTGACGCTGGCCTCTACGTGGAGTACAGGCTTTC
TCTTCGGCGATAGCTGTGGGTTCATCGCAGTTGATCACGGCTCGGACCAGCAGCGTCGAAACGATGTGCT
TATAGGAGATGACGAGCAAGGCCCATCGTAGTTGCGTTCGGTGGGACCTACAGCATCACCAATACCATT
ATTGATCTGAGCACCATGCCGAAAAATACGTGCCATACCCGTCGCCAGATCACGGAGGAGAATCACCAG
AAAAGCCTAGCCATGAGTGCACAAATTGCACCGTACACAGTGGGTTTCTCGAGTCTTGGAAAAGCGCTCG
GGAATCGGTTCTGCCAGAACTCAAGGCACTGAGGGCAAGTATCCGTCTCACCCCGTCCATCTCATCGGC
CACAGCCTTGGAGGCGCCGTGGCTTGTCTTGCGGCACTCGAACTGAAAGTGTCTCTTGGCTGGGATGATG
TGACGGTTACCACGTTTGGAGAGCCTCGTGTTCGGCAACTCTGAGTTCGCCCACTTCGTTGACGATGTTTT
TTACCTCGACGGCATCATTGACCCTGAAAAGAGGACCTATCGACGAGTTACCCACGCCGACGACCCAGTA
CCCTTACTTCCACCGGGCGAGTTTGGTTACCAGTCACATGGCGGCGAGATATTCATCTCCAAGTCTGCCC
TCTCGCCATCTGAGACGGATGTCCAGCTATGCGTTCGGCGACGCAGATCCTAACTGCAGTGCCAGGGATGA
CAGCTCAATGGAAGTCTGCTCAATCGCCTTCTCCATTTCTGGGGAACGACTGCCTCTTTGGAAGAGTAC
ACGGAGAGGATGAGCATCCCCGACGCGGTTCAAATTGTGGCAGCTGTTTTTTGCTCATCGAGATTACTTCT
GGAGACTCGGACTATGTGTGCCCGGCGGACCCACAACTGGGGTTCGGCCTCCGTATGCGCCTCATGA
CGAGGAGTTGTAAAGTCGACGCTTTCATGATCGTTTGTGATGAAGAGCAAATAATATATATATGAGGAGTG
GGTTGTAATAAGATGGGAGTTGGATACCAACGTCCATTTTGGGAAGCAGGCAGTGGTACATAATATGGGA
CTTGGGGAGCGAGCATAAACATGATGAAATGATACCTACCTAGCTAAGAATTCCTTTAAACATGCTGAAT
ACCATTAATAAAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

```

**Figura 9 – Imagem da ORF do gene *lip2*, com o local onde foram desenhos os *primers*.**

A sublinhado encontram-se os *primers* desenhados para a amplificação da ORF do gene *lip2* para a respectiva clonagem no pET-28a(+). Com as caixas encontram-se os adaptadores onde estão compreendidos os locais de reconhecimento das enzimas *Nde I* no *primer forward* lip2petNdeI e *Sal I* no *primer reverse* lip2petSalI indicados pela cor cinza.

A reacção de PCR foi efectuada com uma concentração de *primer* 1,5 pmol/μl, dNTPs 0,5 mM, *Taq* DNA polimerase 1,25 U/ μl (Fermentas<sup>®</sup>), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e H<sub>2</sub>O para um volume total de 25 μl. A reacção de PCR foi realizada com recurso ao programa descrito na tabela 1.

**PCR:**

Desnaturação inicial	1 min. - 94°C
35 Ciclos de:	
1- Desnaturação do ADN	1 min. - 94°C
2- Hibridação	1 min. - 66°C
3- Extensão	1 min./kb aprox. - 72°C
Extensão final	5 min. - 72°C

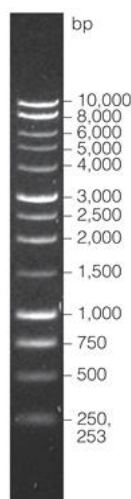
**Tabela 1** - Programa de PCR utilizado para a amplificação da ORF do gene *lip2* com os *primers* lip2petNdeI e lip2petSalI.

#### **3.4.4 – Visualização e purificação de produtos de PCR por gel de agarose low melting 0,8% (p/v)**

A separação e identificação dos fragmentos de DNA foram realizadas mediante electroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v). Os géis foram preparados com TAE 1X (Tris acetato 40 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM) com brometo de etídeo a 0,5 µg/ml, durante 40 minutos a uma intensidade de corrente de 80 V tendo-se controlado 25 µl de produto amplificado ao qual se adicionou 4 µl de *blue Orange dye* (Promega) 6x. Nos casos em que foi necessário efectuar a purificação dos produtos de PCR, estes foram separados por agarose de baixo ponto de fusão (*low melting*) a 0,8% (p/v), devido ao facto de ser possível obter maior rendimento de extracção da banda e por conseguinte obter uma melhor purificação do DNA.

Após a irradiação do gel por ultravioleta foi possível visualizar o tamanho e intensidade das bandas pretendidas por comparação com o marcador de peso molecular (marcador 1 Kb) (Figura 10), de modo a proceder-se à sua purificação através do kit comercial *PCR Clean-Up System* (Promega). A purificação de DNA consiste na passagem da amostra por uma coluna de cromatografia, na qual, os ácidos nucleicos ficam retidos na membrana de sílica, e através de uma solução de lavagem, são eliminados os componentes da mistura de PCR. Por fim, o DNA é iluído numa solução de água livre de nucleases.

As imagens dos géis foram tiradas com o aparelho Eagle Eye™ II de Stratagene.



**Figura 10 – Marcador de peso molecular 1Kb.**

### ***3.4.5 – Ligação da ORF do gene lip2 no vector pGEM<sup>®</sup>-T e transformação de células competentes de E.coli***

Após a amplificação e purificação do fragmento correspondente à ORF do gene *lip2* descrito anteriormente em 3.4.4, procedeu-se à clonagem no vector pGEM<sup>®</sup>-T (Promega). A reacção de ligação foi realizada para um volume total de 10 µl numa relação de 2:1 de inserto para 50 ng vector, 1U/µl enzima T4 DNA ligase (Promega) num tampão de reacção 1X, segundo a fórmula abaixo indicada. A reacção decorreu durante 16 horas a temperatura ambiente (25°C). No sistema de ligação, a concentração do inserto varia de acordo com a fórmula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{tamanho inserto (kb)} \times \text{inserto}}{\text{tamanho do vector (Kb)} \times \text{vector}}$$

Após a ligação procedeu-se à transformação de 90 µl de células competentes de *E.coli* DH5α em gelo e adicionaram-se 10 µl da mistura da ligação, para um volume final de 100 µl. Colocou-se em gelo durante 30 minutos e realizou-se o choque térmico de 42 °C durante 90 segundos e de seguida incubou-se 2 minutos em gelo. Adicionou-se 600 µl de meio líquido LB e colocou-se no agitador orbital (Stuart S150) durante 2 horas a 37 °C com agitação a 180 rpm. Por fim plaquearam-se alíquotas de 150 µl de células em meio LB com ampicilina (100 µg/ml) ao qual foi adicionado IPTG (100 µg/ml) e X-Gal (50 µg/ml) e incubou-se a 37°C. Ao fim de 16 horas foi possível verificar que a placa de Petri continha colónias azuis e brancas. As colónias brancas

foram crescidas em 4 ml de meio líquido de LB com ampicilina (100 µg/ml) afim de se proceder à extracção do DNA plasmídico.

#### **3.4.6 – Extracção e quantificação do DNA plasmídico**

Para a extracção do DNA plasmídico recorreu-se ao método descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Este método consiste na concentração das bactérias por centrifugação e ressuspensão numa solução PI (glucose 50 mM, Tris-HCL pH 8.0 20 mM e EDTA 10 mM), seguido de uma incubação com uma solução de lise, PII (NaOH 0.2 N e SDS 1% (p/v)) até se verificar a translucência da solução. Em seguida adicionou-se uma solução de neutralização, PIII (acetato de potássio 5M, e ácido acético glacial 3M) e após centrifugação recolheu-se o sobrenadante num tubo contendo 1 volume de isopropanol 100% (v/v) a -20 °C. Por fim procedeu-se à lavagem do *pelett* em etanol a 75% (v/v) e à secagem a 37 °C. O DNA extraído foi diluído em 20 µl de água ultra pura e a quantificação do DNA foi realizada como descrito no ponto 3.4.2.

#### **3.4.7 – Análise dos recombinantes no vector pGEM<sup>®</sup>-T por digestão enzimática para posterior clonagem no vector pET-28a (+)**

Após a extracção do DNA plasmídico referida no ponto 3.4.6 procedeu-se à análise dos recombinantes por digestão enzimática com a enzima *Pst I*, visto ser uma enzima que corta na ORF do gene *lip2* e no *polilinker* do vector pET-28a(+), confirmando assim a presença de clones que possuem o gene pela visualização de duas bandas em gel de agarose 0,8% (p/v), correspondentes ao vector e ao gene. As reacções de restrição foram realizadas durante 3h30m a uma temperatura de 37°C para um volume total de 30 µl. Para além do DNA, a mistura de reacção continha *Pst I* 2,5 U/µl, em tampão apropriado de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.5 – Clonagem da ORF do gene *lip2* no vector pET-28a(+)

Utilizou-se o plasmídio pET-28a(+), de 5369 pb (Figura 11), um vector que tem uma configuração His-Tag/thrombin/T7Tag no extremo N-terminal e uma sequência opcional His-Tag no extremo C-terminal. A sequência é numerada por uma convenção pBR322, para que a região da expressão T7 se inverta num mapa circular. É um plasmídio bacteriano autoreplicativo, cuja sequência se incluem os seguintes elementos: o gene de resistência à canamicina e a origem de replicação relaxada *colE1*. Os sítios únicos de restrição são mostrados no mapa circular. A região de clonagem/expressão da cadeia codificante transcrita pela T7 RNA polimerase são demonstrados em baixo.

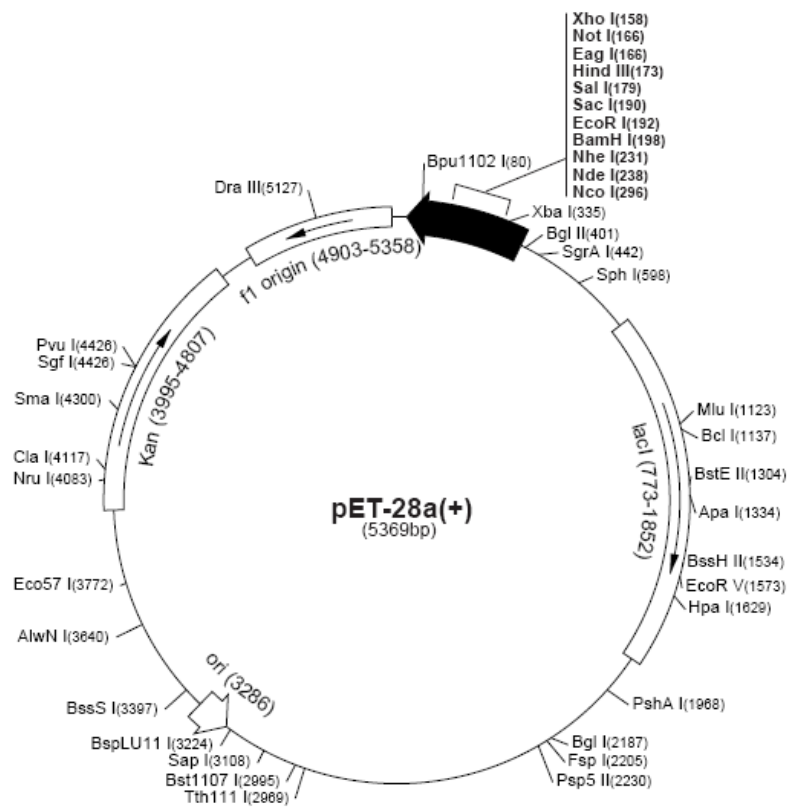


Figura 11 – Estrutura do vector de clonagem bacteriana pET28a(+).

### **3.5.1 – Digestão do vector pET-28a(+) com enzimas de restrição para clonar a ORF do gene lip2.**

Para a clonagem no vector pET-28a(+) procedeu-se à digestão enzimática com as enzimas de restrição da ORF do gene *lip2* clonado no vector pGEM<sup>®</sup>-T. Estes foram digeridos para um volume de 30 µl num tampão reacção 1X (Promega) com 2,5 U/µl de *Nde I* (Promega) e *Sal I* (Promega) durante 3h30m a uma temperatura de 37°C. Os fragmentos obtidos foram visualizados, extraídos e purificados através de gel de agarose 0,8% (p/v) de baixo ponto de fusão.

### **3.5.2 – Extração do DNA e purificação por banda em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,8% (p/v) da ORF do gene lip2 e pET-28a(+)**

Os fragmentos de DNA digeridos como referido no ponto 3.5.1 foram extraídos e purificados recorrendo ao corte da banda em agarose e o DNA foi purificado com o kit comercial *PCR Clean-Up System* (Promega) como referido no ponto 3.4.4.

### **3.5.3 – Ligação da ORF do gene lip2 no vector pET-28a(+) e transformação de células competentes de E.coli.**

A ligação da ORF do gene *lip2* foi realizada para um volume total de 10 µl numa relação de 3:1 de inserto para 100 ng de vector segundo a fórmula indicada no ponto 3.4.5, 1U/µl enzima T4 DNA ligase (Promega) num tampão de reacção 1X. A reacção decorreu durante 16 horas a temperatura ambiente (25°C).

A transformação foi realizada por choque térmico de acordo com o ponto 3.4.5, e as *E.coli* foram plaqueadas em LB com canamicina (30 µg/ml) e incubadas durante 16 horas a 37°C.

### **3.5.4 – Análise dos recombinantes por digestão enzimática**

As colónias obtidas no ponto anterior foram inoculadas em meio líquido LB com canamicina (30 µg/ml) e incubadas durante 16 horas a 37°C de modo a proceder-se à extração e quantificação do DNA plasmídico com referido no ponto 3.4.6. A análise do

DNA plasmídico dos clones foi efectuada, por digestão enzimática com as respectivas enzimas de restrição *Nde I* e *Sal I*.

As reacções de digestão foram realizadas durante 3h30m a uma temperatura de 37°C para um volume total de 30 µl. Para além do DNA, a mistura de reacção continha *Nde I* e *Sal I* 2,5 U/µl, em tampão apropriado 1X de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.6 – Expressão do gene *lip2*

#### **3.6.1 – Indução da expressão da proteína *lip2***

As colónias de *E.coli* transformadas com o plasmídio pET-28a(+), foram inoculadas em meio LB líquido, com canamicina (30 µg/ml) a 37°C sob agitação a 180 rpm até atingirem uma absorvância 0.5, para um comprimento de onda de 600nm. Os pré-inóculos foram então diluídos de 1:50 em LB com canamicina (30 µg/ml) e incubados a 37°C até atingirem uma absorvância de 0,5. A indução da expressão da proteína foi realizada pela adição de IPTG numa concentração final de 1 mM, após as culturas atingirem a densidade óptica de 0,5. A indução realizou-se de 8 em 8 horas a 37°C sobre agitação vigorosa a 220 rpm, durante 5 tempos de crescimento. As culturas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C onde se procedeu à precipitação das proteínas do sobrenadante e à extracção e precipitação através da lise celular das *E.coli*.

#### **3.6.2 – Preparação de proteínas a partir do meio de cultura**

Ao sobrenadante resultante do ponto 3.6.1 foi adicionado TCA (ácido tricloroacético) para uma concentração final de 8 % (v/v), para ocorrer a precipitação das proteínas. A precipitação decorreu durante 10 minutos. Seguidamente, procedeu-se à sedimentação do precipitado por centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos.

O *pellet* proteico obtido foi lavado com acetona refrigerada a -20 °C e sedimentado por centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos. Após evaporação da acetona, ressuspenderam-se os *pellet* proteicos numa solução de Tris-HCL 1M pH 6.8.

### **3.6.3 – Preparação de proteínas a partir de lisados bacterianos**

Os *pellet* bacterianos obtidos como referido no ponto 3.6.1 foram ressuspensos numa solução de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 50 mM e PMSF 1 mM).

As bactérias foram lisadas com agitação no vortex, até que a solução se apresentasse translúcida. Posteriormente, centrifugou-se a solução para sedimentar os detritos celulares, durante 30 minutos a 10000 rpm a uma temperatura de 4°C. O lisado celular clarificado foi ressuspensado numa solução Tris-HCl 1M pH 6.8.

### **3.6.4 – Quantificação da proteína lipase**

A quantificação da proteína lip2 foi realizada recorrendo ao *Protein quantification kit-general use* (FluKa) usando o método Bradford. Este método é baseado na interacção do corante Coomassie brilliant blue BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reacção, a interacção entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica, que absorve fortemente em 595 nm. Foi realizada uma quantificação da proteína lip2 obtendo-se uma concentração de 0.8 µg/µl.

### **3.6.5– Análise de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

A proteína foi analisada em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), constituído por um gel de concentração com 4% (p/v) de acrilamida e um gel de resolução com 15% de acrilamida (p/v).

Inicialmente, preparou-se o gel de resolução constituído por acrilamida 15%, Tris-HCl 1,5 M para uma concentração final de 25% (v/v), SDS 10% para uma concentração final de 1% (v/v). Para a polimerização do gel foi adicionado APS 10% (persulfato de amónia) para uma concentração final de 0,05% (v/v) e TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina) 0,05% (v/v).

O gel de resolução foi derramado entre duas placas de vidro (componentes do aparelho de separação electroforética utilizando Mini Protean 3, Biorad. Ver-teu-se de seguida o gel de concentração, preparado como descrito acima para o gel de resolução

mas, substituindo a solução Tris HCl 1,5M por Tris 0,5M e utilizando o dobro da quantidade de TEMED. De seguida, colocou-se um pente apropriado para a formação de poços no gel para a aplicação das amostras.

Antes de serem colocados no gel, as amostras foram misturadas com tampão de amostra (SDS a 4% (p/v), glicerol a 50% (v/v), Tris HCL a 0,25 M, azul de bromofenol a 0,005% (p/v) e  $\beta$ -Mercaptoetanol a 10% (v/v)), seguindo-se de desnaturação a durante 4 minutos a 95 °C.

Paralelamente às amostras foi corrido um marcador de pesos moleculares conhecidos de proteínas *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas).

A electroforese decorreu sob uma diferença de potencial de 100 V durante 90 minutos em tampão de electroforese (Tris base 25 mM, SDS a 0,1 % (p/v), glicina 192 mM e SDS a 0,1% (p/v)).

### **3.6.6- Detecção não específica de proteínas por coloração com o azul brilhante de Coomassie**

Recorreu-se à coloração de azul brilhante de Coomassie, composta por azul brilhante de Coomassie a 0,25% (p/v), metanol a 45% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v), onde ficaram submergidos, à temperatura ambiente (25°C) com agitação suave, durante 30 minutos.

Ao fim desse tempo procedeu-se à remoção do corante utilizando uma solução composta por metanol a 45% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v), ao qual foi substituída em intervalos de 60 minutos até se obter um contraste que permita a visualização e distinção das bandas no gel.

### **3.7 – Análise bioinformática do gene lip2 de *Trichoderma harzianum***

As sequências completas de nucleótidos do gene *lip2* de *T. harzianum* foram utilizadas para pesquisas de sequências similares em bancos de dados, utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) na página NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Segue-se a descrição das ferramentas bioinformáticas que foram utilizadas e as suas finalidades.

### **3.7.1- BLAST**

Foi utilizado o programa BLAST para verificar a homologia existente entre a sequência deduzida da ORF codificada por *lip2* de *Trichoderma harzianum* e outras depositadas em bases de dados de proteínas.

BLAST (Altschul *et al.*, 1990) é um algoritmo otimizado para fazer alinhamentos locais entre sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, procurando o maior grau de similaridade ou conservação entre a sequência em estudo e sequências depositadas nas bases de dados.

No final de cada alinhamento, o BLAST gera uma lista de sequências mais similares à sequência alvo e classifica cada alinhamento individual utilizando dois valores: o “*score*” e o “*E-value*”.

O “*score*” é um número constituído pela soma dos pesos atribuídos entre aminoácidos idênticos (maior peso), semelhantes (peso intermediário) e diferentes (peso negativo). Logo, quanto maior for “*score*”, maior a similaridade entre as sequências. O *E-value* é um valor estatístico que indica a expectativa de que outra sequência com *score* idêntico ou maior ao valor obtido num determinado alinhamento seja encontrada. Portanto, sequências com alto *score* exibem um baixo *E-value*, e sequências iguais possuem *E-value* igual a zero.

### **3.7.2- CLUSTAL W**

As sequências com identidade ou similaridade foram utilizadas para o alinhamento múltiplo utilizando o programa “Clustal W”.

Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) é um programa que executa alinhamentos globais utilizando programação dinâmica, é um método hierárquico. Ou seja, num alinhamento de múltiplas sequências, o primeiro passo é alinhar cada uma delas entre si através da programação dinâmica, em pares, e assim identificar pares com as maiores similaridades. Posto isso, o segundo passo na hierarquia é alinhar os pares mais similares dois a dois, até que todas sequências sejam alinhadas (Barton, 2001).

### ***3.7.3- Análise de domínios conservados***

Os domínios conservados são regiões com características estruturais similares que ocorrem em diferentes proteínas e que podem ser classificados por análise comparativa. A análise de domínios conservados indica-nos se uma determinada sequência de aminoácidos possui uma zona que representa um domínio encontrado em outras proteínas já conhecidas.

A pesquisa de padrões e de motivos foi feita recorrendo a ferramentas da expasy (<http://expasy.org/>) e EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

## 4 – Resultados e Discussão

### 4.1 – Caracterização do gene *lip2*

A bioinformática estrutural é uma subárea da bioinformática, caracterizada por dois objectivos: criar métodos para manipular informações da estrutura sobre macromoléculas biológicas (como DNA e proteínas) e aplicar estes métodos para a solução de problemas da área biológica, criando novos conhecimentos (Bourne & Weissig, 2003).

A sequência do gene *lip2* encontra-se depositada na base de dados GenBank AM774154 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

O gene *lip2* de *Trichoderma harzianum* sequenciado apresenta 1992 pb, sendo a sua ORF (*open reading frame*) constituída por 1215 nucleotídeos. Estão sequenciados 550 pb da região do promotor e 229 pb do terminador.

#### 4.1.1 – Estudo da região 5' (promotor)

Os principais elementos do promotor de um gene eucariota situam-se aproximadamente a 300 pb que antecedem o início de fase de leitura aberta - ORF. Na figura 12 estão representados alguns dos motivos encontrados frequentemente nesta região.

Encontra-se presente nesta região o sinal típico de início da transcrição, tendo-se identificado três possíveis sequências box – CAAT, a -134 pb, -304 pb e -318 pb, não sendo identificada a caixa TATA.

Existem muitas sequências ricas em CT, esta região rica em pirimidinas é encontrada na região promotora em muitos genes de fungos filamentosos e está, frequentemente associada a sítios de início de transcrição (Ballance, 1986; Cooley & Caten, 1993).

Os promotores podem actuar como regiões de controlo de regulação de genes. Os elementos de resposta ao ácido oleico, OREs ("*oleate response elements*") são elementos de transcrição existente nos promotores dos genes de enzimas lipolíticas, formado por dois tripletos de CGG-N<sub>(16-18)</sub> – CCG dispostos inversamente, intercalados por 16 a 18 nucleotídeos (Rottensteiner *et al.*, 2002). No promotor do gene *lip2* foi

possível identificar a sequência, mas com N=26, tal como tinha sido identificado no promotor do gene *lip1* de *T. harzianum* (Jorge, não publicado). Contudo, anteriormente já tinham sido descritas lipases cujo promotor apresentava sequências de OREs não canônicas (González-Ramos, 1997; Choupina, 2000).

```

-548  atgtccca cgcctgagg gagttagccg ccatcccgtt ttagcacgtg gccagcgcctc
-490  ttccaactaa ccgtacaggg ctcagcagacc ccagattttg ccccatctgc aaagtgccgc
-430  ctgcaaaactt tagtadctag ctgccctggc gtcgggcccc gccgaattgt gcatgctcac
-370  ctcgtgatct cgcccagctt gccaccgggt tcatgagacc aagtcagcca atgtctcgcc
-310  caattcaact ctgtgcaagag agcagcagcg aatcgtgaga tacaaaaaag cagttccgct
-250  ggggtgcgct tcccctctcg ccagcgggta caccaaagct gctttctctc gccactcagc
-190  gtctcgctct ccttgcgtc cttacgctcag ggcggatcc gaaaaagcat cccaattggt
-130  agccggtttt gttgagctga gtttccagca aaggcgtct ccttgctagc attctgggca
-70   tttctgccag ccccatgcc gtcttccttc tcatgatct gatcatgcc agcgaacgaa
-10  tttgaaaaatg

```

**Figura 12 – Região promotora do gene *lip2*.** Box- CAAT (verde), Blocos de pirimidina (vermelho), elementos de resposta ao ácido oleico (azul).

#### 4.1.2 – Estudo da região 3' (terminador)

Na região 3' não codificante (Figura 13) encontram-se as sequências necessárias para a finalização da transcrição. Nos eucariotas superiores, regiões ricas em adeninas participam na formação e poliadenilação do mRNA precursor. Estas sequências representam um sinal de clivagem, que é reconhecido por uma endonuclease específica (Poli A polimerase), que tem como função a adição de 100 a 200 resíduos de adenina, formando assim, a cauda poli A.

A partir da posição 1959 encontra-se uma zona rica em adeninas.

```

                                taaagtcgcg caacgattca tgatcgtttg atgaagagca
1801 aactaatata tatatgagga gtgggttgta ataagatggg agttggatac caacgtccat
1861 tttgggaagc aggcagtggg acataaatatg ggacttgggg agcgagcata aacatgatga
1921 aatgatacct acctagctaa gaattccttt aaacatgctg aataccattt aaaagaaaaa
1981 aaaaaaaaaatc

```

**Figura 13 – Região terminador do gene *lip2*.**

### 4.1.3- Estudo da região codificante

A fase de leitura aberta (ORF) foi identificada através do programa BioEdit.

A região codificante possui 1215 pb, codifica uma proteína de 404 aminoácidos com uma massa molecular estimada de 44604.3 Daltons (Figura 14). Esta sequência da proteína encontra-se na base de dados da UniProt, com o número de acesso B7ZET5\_TRIHA.

A composição em bases azotadas da fase de leitura aberta do gene *lip2* é: T-23,70%; C-27,98 %; A-20,99 % e G-27,33 %. A percentagem de (C + G) é de 55,31 %.

1	ATG GGG TGG ACA TTT CTG GGC CGC TTC GGG CTG TTG CTG CTT GTA	45
1	Met Gly Trp Thr Phe Leu Gly Arg Phe Gly Leu Leu Leu Leu Val	15
46	CAG CTC GTC GCT GCT GTC TTT GTC GAG GCC GCT TAC ATC AAT CAA	90
16	Gln Leu Val Ala Ala Val Phe Val Glu Ala Ala Tyr Ile Asn Gln	30
91	CAA GAA CCG TTG GGC GTC AAA GAG CCA GCG TCT GTT TCG AGC ATC	135
31	Gln Glu Pro Leu Gly Val Lys Glu Pro Ala Ser Val Ser Ser Ile	45
136	CCC GTG GCC CTG TTC GCG GAT CTC GAA CGA CTG GCG AGG CTC GTT	180
46	Pro Val Ala Leu Phe Ala Asp Leu Glu Arg Leu Ala Arg Leu Val	60
181	GAC GTC TCA TAT TGC CTT GGC ACC ACA GGC ATT CGC AAG CCG TTC	225
61	Asp Val Ser Tyr Cys Leu Gly Thr Thr Gly Ile Arg Lys Pro Phe	75
226	CAA TGC GTC TCT CGA TGC GAT GAA TTC CCC AAT GTG ACG CTG GCC	270
76	Gln Cys Val Ser Arg Cys Asp Glu Phe Pro Asn Val Thr Leu Ala	90
271	TCT ACG TGG AGT ACA GGC TTT CTC TTC GGC GAT AGC TGT GGG TTC	315
91	Ser Thr Trp Ser Thr Gly Phe Leu Phe Gly Asp Ser Cys Gly Phe	105
316	ATC GCA GTT GAT CAC GGC TCG GAC CAG CAG CGT CGA AAC GAT GTG	360
106	Ile Ala Val Asp His Gly Ser Asp Gln Gln Arg Arg Asn Asp Val	120
361	CTT ATA GGA GAT GAC GAG CAA GGC GCC ATC GTA GTT GCG TTC CGT	405
121	Leu Ile Gly Asp Asp Glu Gln Gly Ala Ile Val Val Ala Phe Arg	135
406	GGG ACC TAC AGC ATC ACC AAT ACC ATT ATT GAT CTG AGC ACC ATG	450
136	Gly Thr Tyr Ser Ile Thr Asn Thr Ile Ile Asp Leu Ser Thr Met	150
451	CCG CAA AAA TAC GTG CCA TAC CCG TCG CCA GAT CAC GGA GGA GAA	495
151	Pro Gln Lys Tyr Val Pro Tyr Pro Ser Pro Asp His Gly Gly Glu	165
496	TCA CCA GAA AAG CCT AGC CAT GAG TGC ACA AAT TGC ACC GTA CAC	540
166	Ser Pro Glu Lys Pro Ser His Glu Cys Thr Asn Cys Thr Val His	180
541	AGT GGG TTT CTC GAG TCT TGG AAA AGC GCT CGG GAA TCG GTT CTG	585
181	Ser Gly Phe Leu Glu Ser Trp Lys Ser Ala Arg Glu Ser Val Leu	195
586	CCA GAA CTC AAG GCA CTG AGG GCC AAG TAT CCG TCT CAC CCC GTC	630
196	Pro Glu Leu Lys Ala Leu Arg Ala Lys Tyr Pro Ser His Pro Val	210
631	CAT CTC ATC GGC CAC AGC CTT GGA GGC GCC GTG GCT TGT CTT GCG	675
211	His Leu Ile Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Cys Leu Ala	225
676	GCA CTC GAA CTG AAA GTG TCT CTT GGC TGG GAT GAT GTG ACG GTT	720
226	Ala Leu Glu Leu Lys Val Ser Leu Gly Trp Asp Asp Val Thr Val	240

721 ACC ACG TTT GGA GAG CCT CGT GTC GGC AAC TCT GAG TTC GCC CAC 765  
241 Thr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Val Gly Asn Ser Glu Phe Ala His 255

766 TTC GTT GAC GAT GTT TTT TAC CTC GAC GGC ATC ATT GAC CCT GAA 810  
256 Phe Val Asp Asp Val Phe Tyr Leu Asp Gly Ile Ile Asp Pro Glu 270

811 AAG AGG ACC TAT CGA CGA GTT ACC CaC GCC GAC GAC CCA GTA CCC 855  
271 Lys Arg Thr Tyr Arg Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro 285

856 TTA CTT CCA CCG GGC GAG TTT GGT TAC CAG TCA CAT GGC GGC GAG 900  
286 Leu Leu Pro Pro Gly Glu Phe Gly Tyr Gln Ser His Gly Gly Glu 300

901 ATA TTC ATC TCC AAG TCT GCC CTC TCG CCA TCT GAG ACG GAT GTC 945  
301 Ile Phe Ile Ser Lys Ser Ala Leu Ser Pro Ser Glu Thr Asp Val 315

946 CAG CTA TGC GTC GGC GAC GCA GAT CCT AAC TGC AGT GCC AGG GAT 990  
316 Gln Leu Cys Val Gly Asp Ala Asp Pro Asn Cys Ser Ala Arg Asp 330

991 GAC AGC TCA ATG GAA GGT CTG CTC AAT CGC CTT CTC CAT TTC TGG 1035  
331 Asp Ser Ser Met Glu Gly Leu Leu Asn Arg Leu Leu His Phe Trp 345

1036 GGA ACG ACT GCC TCT TTG GAA GAG TAC ACG GAG AGG ATG AGC ATC 1080  
346 Gly Thr Thr Ala Ser Leu Glu Glu Tyr Thr Glu Arg Met Ser Ile 360

1081 CCG ACG CGG TTC AAA TTG TGG CAG CTG TTT TTT GCT CAT CGA GAT 1125  
361 Pro Thr Arg Phe Lys Leu Trp Gln Leu Phe Phe Ala His Arg Asp 375

1126 TAC TTC TGG AGA CTC GGA CTA TGT GTG CCC GGC GGC GAC CCT ACA 1170  
376 Tyr Phe Trp Arg Leu Gly Leu Cys Val Pro Gly Gly Asp Pro Thr 390

1171 AAC TGG GGT CGG CCT CCG TAT GCG CCT CAT GAC GAG GAG TTG TAA 1215  
391 Asn Trp Gly Arg Pro Pro Tyr Ala Pro His Asp Glu Glu Leu

**Figura 14 – ORF do gene *lip2*.**

#### 4.2. – Análise das características da proteína

A proteína codificada pelo gene *lip2* apresenta um peso molecular estimado de 44604.3 Daltons, o seu ponto isoelectrico global calculado tem um valor estimado de 5.0.

Na composição de aminoácidos indicada na Tabela 2, pode-se realçar que a leucina é o aminoácido mais frequente.

Aminoácido	Nº	%	Aminoácido	Nº	%	Aminoácido	Nº	%
<b>Ala (A)</b>	27	6.7	<b>Gly (G)</b>	34	8.4	<b>Pro (P)</b>	28	6.9
<b>Arg (R)</b>	21	5.2	<b>His (H)</b>	13	3.2	<b>Ser (S)</b>	32	7.9
<b>Asn (N)</b>	9	2.2	<b>Ile (I)</b>	15	3.7	<b>Thr (T)</b>	23	5.7
<b>Asp (D)</b>	27	6.7	<b>Leu (L)</b>	41	10.1	<b>Trp (W)</b>	8	2.0
<b>Cys (C)</b>	10	2.5	<b>Lys (K)</b>	11	2.7	<b>Tyr (Y)</b>	12	3.0
<b>Gln (Q)</b>	11	2.5	<b>Met (M)</b>	4	1.0	<b>Val (V)</b>	31	7.7
<b>Glu (E)</b>	25	6.2	<b>Phe (F)</b>	22	5.4			

**Tabela 2 – Composição de aminoácidos da proteína codificada por *lip2*.** N) Indica o número total de cada aminoácido; %) indica a percentagem em relação ao total de aminoácidos.

1     **Met Gly Trp Thr Phe Leu Gly Arg Phe Gly Leu Leu Leu Leu Val**     15  
16     **Gln Leu Val Ala Ala Val Phe Val Glu Ala Ala** Tyr Ile Asn Gln     30  
31     Gln Glu Pro Leu Gly Val Lys Glu Pro Ala Ser Val Ser Ser Ile     45  
46     Pro Val Ala Leu Phe Ala Asp Leu Glu Arg Leu **Ala Arg Leu** Val     60  
61     **Asp Val Ser** Tyr Cys Leu Gly Thr Thr Gly Ile Arg Lys Pro Phe     75  
76     Gln Cys Val Ser Arg Cys Asp Glu Phe Pro Asn Val Thr Leu Ala     90  
91     Ser Thr Trp Ser Thr Gly Phe Leu Phe Gly Asp Ser Cys Gly Phe     105  
106    Ile Ala Val Asp His Gly Ser Asp Gln Gln Arg Arg Asn Asp Val     120  
121    Leu Ile Gly Asp Asp Glu Gln Gly Ala **Ile Val Val Ala Phe Arg**     135  
136    **Gly Thr Tyr Ser Ile Thr Asn Thr Ile** Ile Asp Leu Ser Thr Met     150  
151    Pro Gln Lys Tyr Val Pro Tyr Pro Ser Pro Asp His Gly Gly Glu     165  
166    Ser Pro Glu Lys Pro Ser His Glu Cys Thr Asn Cys Thr Val His     180  
181    Ser Gly Phe Leu Glu Ser Trp Lys Ser Ala Arg Glu Ser Val Leu     195  
196    Pro Glu Leu Lys Ala Leu Arg Ala Lys Tyr Pro Ser His Pro **Val**     210  
211    **His Leu Ile Gly His** **Ser** **Leu Gly Gly** Ala Val Ala Cys Leu Ala     225  
226    Ala Leu Glu Leu Lys Val Ser Leu Gly Trp Asp **Asp Val Thr** Val     240  
241    Thr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Val Gly Asn Ser Glu Phe Ala His     255  
256    Phe Val Asp Asp Val Phe Tyr Leu Asp Gly Ile Ile Asp Pro Glu     270  
271    Lys Arg **Thr** Tyr Arg Arg Val Thr His Ala Asp **Asp** **Pro Val Pro**     285  
286    **Leu Leu Pro** Pro Gly Glu Phe Gly Tyr Gln Ser His Gly Gly Glu     300  
301    Ile Phe **Ile Ser Lys Ser Ala Leu Ser Pro** Ser Glu Thr Asp Val     315  
316    Gln Leu Cys Val Gly Asp Ala Asp Pro Asn Cys Ser Ala Arg Asp     330  
331    **Asp Ser Ser** Met Glu Gly Leu Leu Asn Arg Leu Leu His Phe Trp     345  
346    Gly Thr Thr Ala Ser Leu Glu Glu Tyr Thr Glu Arg Met Ser Ile     360  
361    Pro Thr Arg Phe Lys Leu Trp Gln Leu Phe **Phe Ala** **His** **Arg Asp**     375  
376    **Tyr Phe Trp Arg Leu Gly** Leu Cys Val Pro Gly Gly **Asp Pro Thr**     390  
391    Asn Trp Gly Arg Pro Pro Tyr Ala Pro His Asp Glu Glu Leu

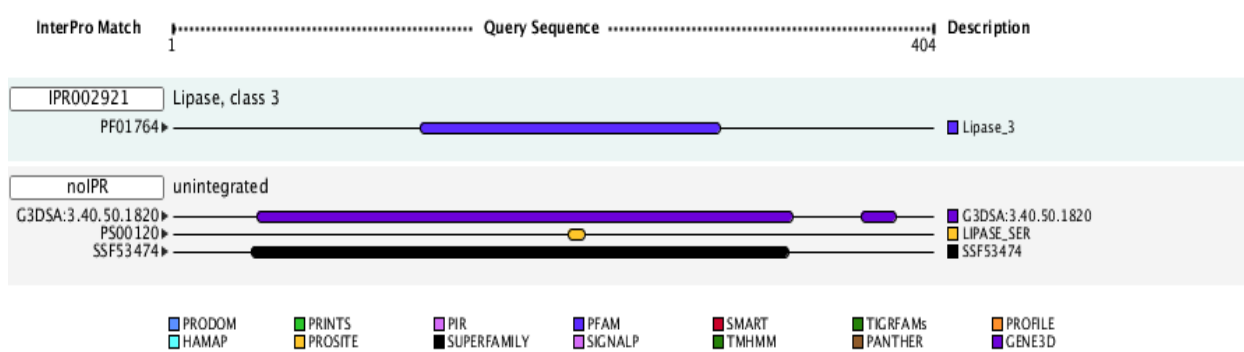
**Figura 15- Sequência deduzida de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *lip2*.** Péptido sinal a vermelho; localização peroxissomal a verde; N-glicosilação a rosa; espaço oxianiónico a azul; centro activo a laranja, com a serina activa na caixa a preto; resíduos do ácido aspártico e histidina nas caixas a cinza, na tríade catalítica a roxo; O-glicosilação a castanho.

Na figura 15 está representada a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *lip2*. Há 32 aminoácidos básicos (lisina e arginina); 52 ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico); 144 hidrofóbicos (alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina, triptofano e valina) e 97 polares (asparagina, cisteína, glutamina, serina, tirosina e treonina).

A proteína codificada por *lip2* é uma lipase com serina no centro activo (PROSITE PS00120) (Sigrist *et al.*, 2002). A sua estrutura primária coincide com o consenso G-X-S-X-G, descrito como centro activo de lipases (Reetz, 2002). Neste caso, a tríade catalítica é formada por três aminoácidos: uma serina, ácido aspártico, e uma histidina.

A sequência em redor da serina do centro activo está bem conservada, e é usada como "*signature pattern*". É a sequência [LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S- $\{$ YAG $\}$ -G-[GSTAC], que em *lip2* está presente na sequência VHLIGHSLGG, correspondente aos aminoácidos 210 a 219.

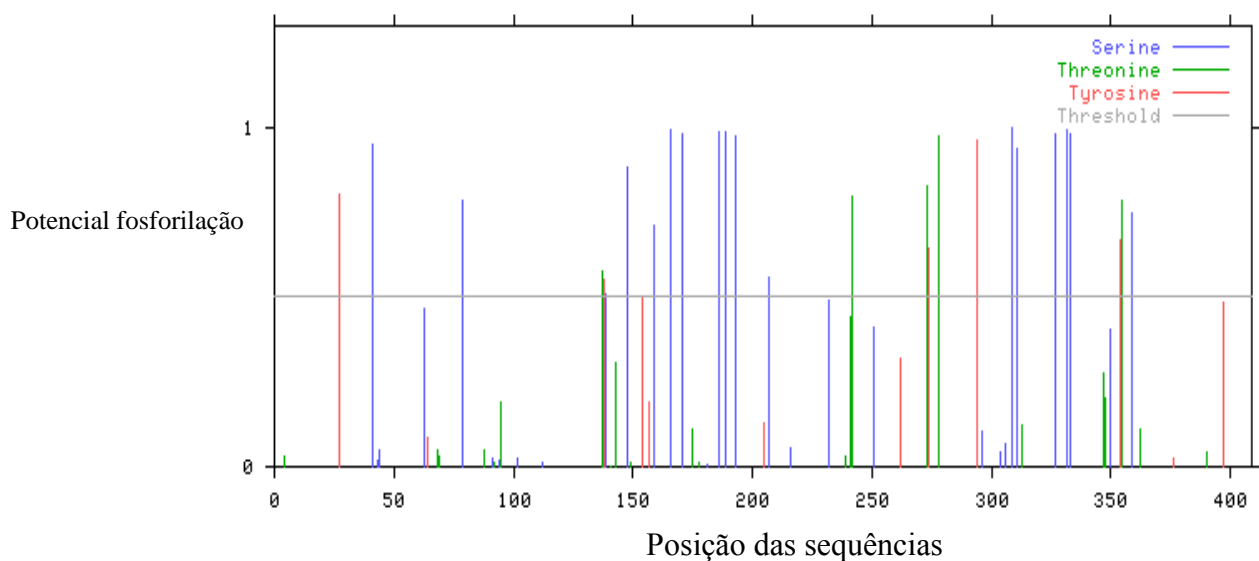
A proteína *lip2* é integrada na família das lipases\_classe3 (InterPro IPR002921), (Pfam PF01746) (posição 131-292). Na figura 16 encontram-se as classificações das diferentes bases de dados de famílias de proteínas para *lip2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>).



**Figura 16 – Pesquisa de motivos para *lip2* em bases de dados de famílias de proteínas.**

Aparecem na sequência deduzida de aminoácidos os sítios mais característicos das lipases: entre os resíduos 130-144, o espaço oxianiónico; de 210-219, o padrão das lipases com serina no centro activo (serina activa na posição 216); os resíduos de ácido aspártico e de histidina da tríade catalítica nas posições 282 e 373 respectivamente. Apresenta cinco possíveis sítios de N-glicosilação nos resíduos de asparagina nas posições 61, 146, 237, 331, 388. Nas proteínas eucarióticas a união do núcleo oligossacarídico estabelece-se através de uma ligação N-glicosídica com o átomo de um grupo amino de um resíduo de asparagina incluindo na sequência tripeptídica Asparagina-X-(Serina/Treonina), em que X pode ser qualquer aminoácido excepto Prolina (Murzin *et al.*, 1995). Não se encontraram locais de N-miristolação, mas foi possível identificar um local de O-glicosilação na posição 306 a partir do programa OGPET (<http://ogpet.utep.edu/OGPET/>), aparecendo como I-N-KSA-N-SP, sendo N qualquer aminoácido. Esta é uma modificação pós-tradução abundante nas proteínas nucleares e citoplasmáticas em eucariotas (Campo, 2008). As proteínas O-glicosiladas também são fosfoproteínas que formam reversíveis complexos multiméricos de proteínas, sugerindo que a O-glicosilação pode regular a fosforilação de proteínas, interacção proteína-proteína ou ambas (Julenius *et al.*, 2005).

Há 28 sítios preditos de fosforilações como indicado na figura 17: dezassete em serina, cinco em treonina e seis em tirosina. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

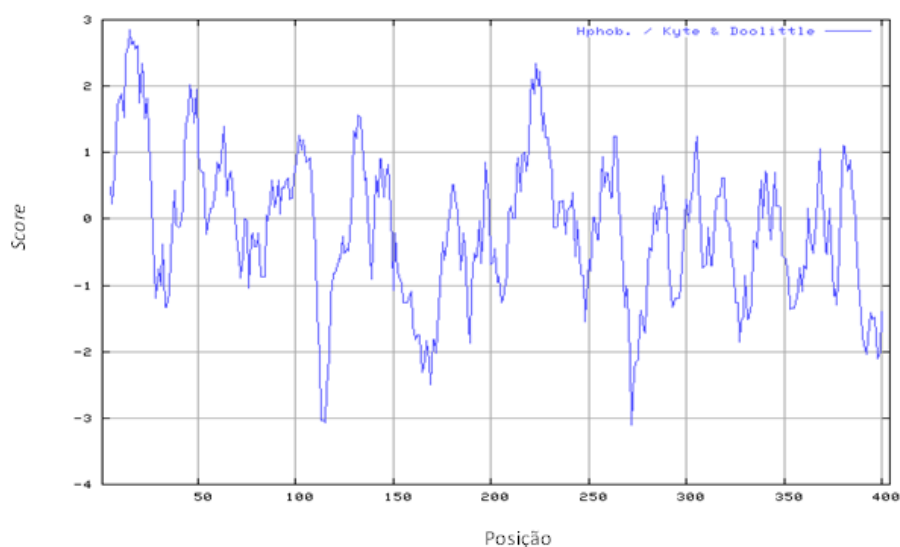


**Figura 17– Locais de fosforilações na sequência de aminoácidos de lip2.**

De acordo com o programa NetPhosk 1.0 server, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosk/>), os sítios de fosforilação por quinases com um *score* superior a 0.8 encontram-se nas posições: 68, 149, 273 (treonina) e 91, 186 (serina) para a fosforilação pela fosfoquinase C (PKC). Estas fosfoquinases estão envolvidas no controlo da função de outras proteínas através da fosforilação de grupos hidroxilo de serinas ou treoninas. As PKC são activadas por sinais tais como aumento de diacilglicerol ou cálcio.

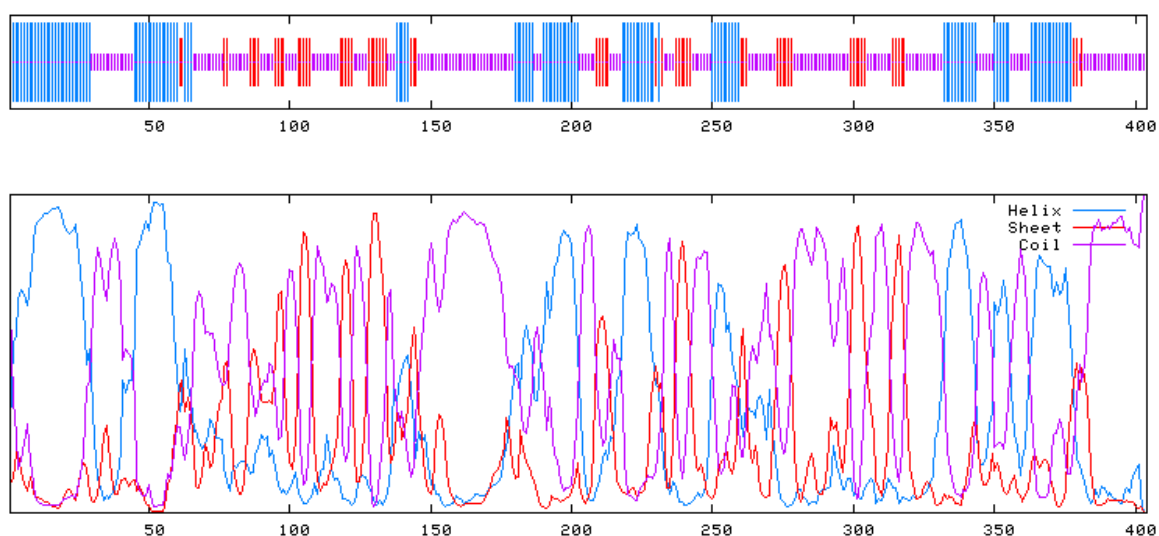
O estudo das proteínas peroxissomais revelou a existência de sequências de aminoácidos responsáveis pelo seu reconhecimento e direccionamento para o interior dos peroxissomas, tendo sido denominadas de PTS ("peroxisomal targeting signals" = sequência-sinal peroxissomal) (Waterham & Cregg, 1997). Esta consiste numa sequência conservada tripeptídica na extremidade carboxílica formada pelos aminoácidos Serina-Lisina-Leucina (SKL) podendo, no entanto, apresentar certas variantes sem afectar a sua função como (Ser/Al)-(Lys/Arg/His)-Leu (Subramani, 1996). Esta sequência encontra-se na posição 57 (Figura 15), indiciando para lip2 uma localização peroxissomal.

Geralmente as proteínas cujo destino final na célula é o retículo endoplasmático possuem uma sequência sinal no extremo amino terminal com características marcadamente hidrofóbicas. Na figura 18, encontra-se o perfil hidropático de lip2 de acordo com o algoritmo de Kyte & Doolittle (1982). De acordo com SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), o péptido sinal encontra-se na sequência nas posições 1-25, indicando que é uma proteína extracelular.



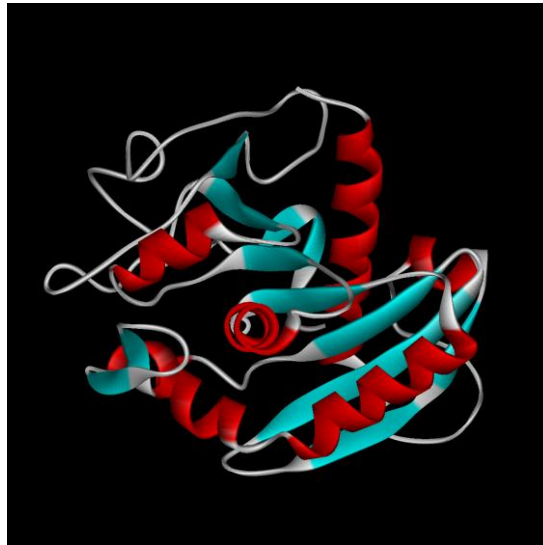
**Figura 18 – Perfil hidropático de lip2 segundo o algoritmo de Kyte & Doolittle (1982).**

O sistema de redes neurais de "Pôle BioInformatique Lyonnais/Network Protein Sequence Analysis" (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) prediz para a proteína lip2 uma estrutura secundária típica das  $\alpha/\beta$  hidrolases, em que se alterna vários domínios em conformação de hélice  $\alpha$  com domínios em conformação de folha  $\beta$ . A serina activa localiza-se no final de uma estrutura de folha  $\beta$ , o qual é característico deste tipo de centro activo (Figura 19).



**Figura 19 - Predição da estrutura secundária de lip2** de acordo com "Hierarchical Neural Network" (Combet *et al.*, 2000). A azul está representada a hélice  $\alpha$ , a vermelho as folhas  $\beta$  e a rosa os "coil".

Encontra-se representado na figura 20 a estrutura tridimensional de lip2, estando a azul as folhas  $\beta$ , a vermelho as hélices  $\alpha$  e a cinza os "coil" que fazem a ligação das folhas  $\beta$  com as hélices  $\alpha$ .



**Figura 20 – Estrutura tridimensional da proteína lip2**, tomando como referência a proteína pdb 1dt3, de *Thermomyces lanuginosa* (predição EasyPred).

(<http://www.cbs.dtu.dk/biotools/EasyPred/>)

#### **4.2.1 – Análise comparativa da sequência proteica da lipase**

A sequência de nucleótidos lip2 foi submetida aos bancos de dados de sequências proteicas (<http://www.uniprot.org/>), tendo-se verificado maior homologia da proteína codificada pelo gene lip2: B7ZET5\_TRIHA- *Hypocrea lixii*, com a proteína de *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* subsp. *pisi*) (EEU47691) com 75% de homologia e *E-value*  $1e^{-139}$ ; *Gibberella zeae* (hypothetical protein FG01240.1) (EAA68101) com 76% de homologia e *E-value*  $7e^{-132}$ ; *Gibberella zeae* (triacylglycerol lipase FGL2) (ABW74155) com 76% e *E-value*  $6e^{-131}$ ; e *Glomerella graminicola* (EFQ29359) com 71% de homologia e *E-value*  $3e^{-121}$ .

Fez-se o alinhamento de lip2 com as sequências de maior homologia referidas anteriormente, usando o algoritmo Clustal W2. Os resultados estão indicados na figura 21, e permitem verificar o grau de conservação existente nos motivos característicos de lipases.

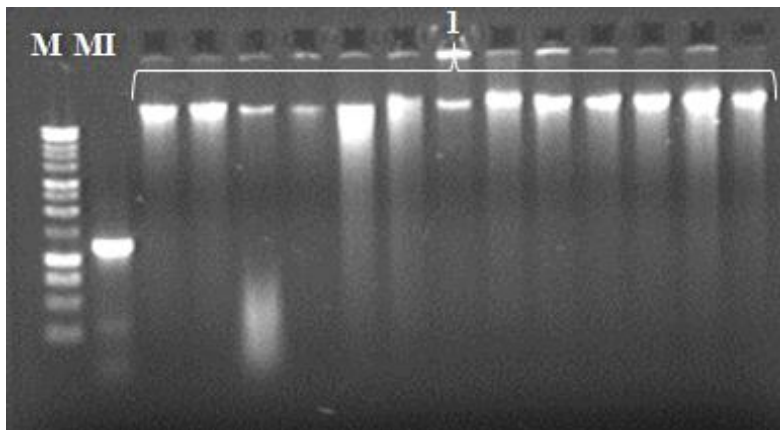
Desta comparação, pode-se dizer que lip2 compartilha com as outras proteínas características fundamentais da estrutura primária relacionadas com os domínios que conferem actividade enzimática, como a serina activa (caixa preto) e o espaço oxianiónico (caixa a laranja).





### 4.3 – Extracção de DNA

Os resultados da extracção do DNA genómico de *Trichoderma harzianum* para posterior utilização em PCR encontram-se ilustrada na figura 24.

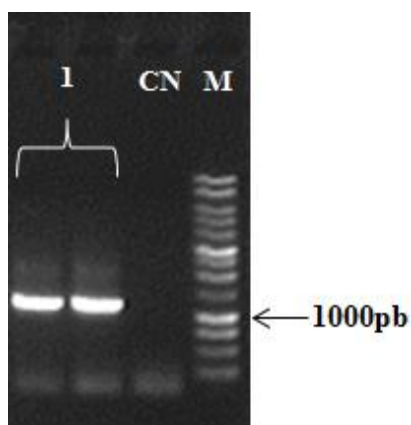


**Figura 24 -.** Extracção de DNA genómico de *Trichoderma harzianum*. Gel de agarose 0.8% (p/v), em TAE 1X. **M)** Marcador de peso molecular de 1kb (Promega); **MI)** Marcador de intensidade de 290 ng/μl; **1)** DNA genómico de *Trichoderma harzianum*.

### 4.4 - Clonagem e expressão do gene *lip2*

#### 4.4.1 - Clonagem do gene *lip2* no vector *pGEM®-T*

Um fragmento de 1215 pb foi amplificado por PCR a partir do DNA genómico de *T. harzianum*, com a combinação de oligonucleotídeos *lip2petNdeI* e *lip2pet sal I*. Os produtos da reacção de amplificação foram analisados mediante electroforese em gel de agarose 0.8% (p/v). Na amplificação do gene *lip2* visualizou-se uma banda do tamanho da ORF de 1215 pb, como seria esperado (Figura 25).

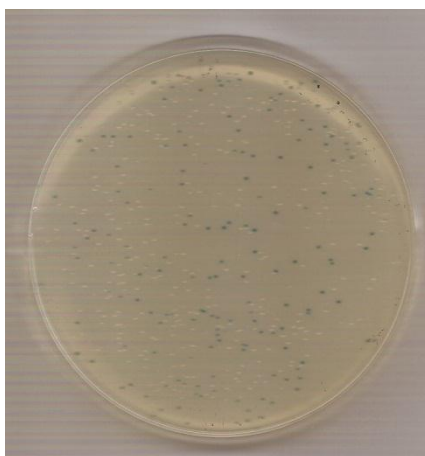


**Figura 25 – Amplificação do gene *lip2*.** Gel de agarose 0.8% (p/v), em TAE 1X. **1)** Fragmentos amplificados de 1215 pb; **CN)** controlo negativo; **M)** marcador de peso molecular 1kb (Promega).

As bandas correspondentes aos fragmentos amplificados foram, então, purificadas para posterior ligação e transformação no vector pGEM<sup>®</sup>-T.

O vector pGEM<sup>®</sup>-T é um sistema de clonagem particularmente construído para clonagem de produtos resultantes de reacções de PCR. Possibilita também o rastreio de colónias transformadas para posterior identificação dos clones recombinantes. O rastreio é realizado através da manifestação da cor. A inserção de um fragmento no local de clonagem traduz-se no aparecimento de colónias brancas, as recombinantes. A cor azul é indicativa da ausência de recombinação (Figura 26).

As bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$  transformadas foram semeadas em placas LB com ampicilina, IPTG e X-Gal.



**Figura 26 – Placa de Petri com os transformantes.**

Após o período de incubação, as colónias brancas, potencialmente recombinantes, foram seleccionadas ao acaso e subcultivadas em meio líquido LB com ampicilina. Procedeu-se a extracção de DNA plasmídico de cada uma das subculturas.

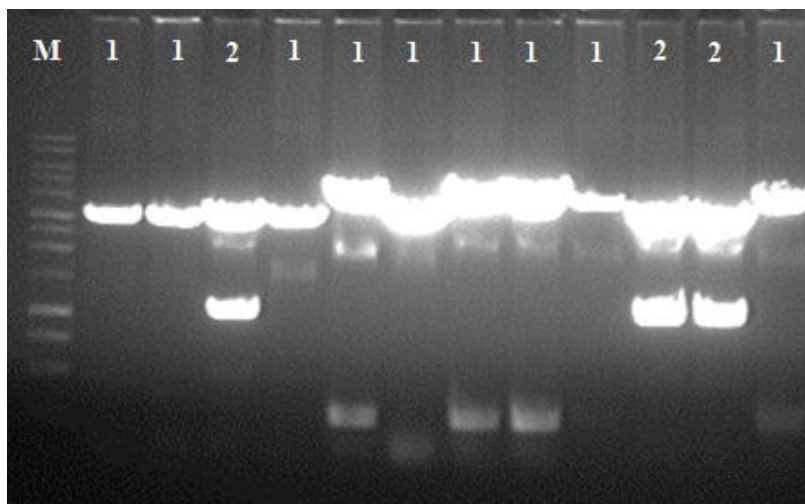
Este procedimento teve como objectivo principal., obter uma maior quantidade de DNA da ORF do gene *lip2* e facilitar a sua ligação no vector pET-28a(+), visto que, não foi possível clonar directamente através dos locais de restrição inseridos por PCR.

#### ***4.4.2 – Confirmação e digestão dos clones positivos***

A digestão com a enzima *Pst I* foi realizada para comprovar a presença do fragmento de interesse, (ORF do *lip2*).

O produto de DNA resultante da digestão enzimática foi separado por electroforese em gel de agarose 0.8% (p/v), observando-se duas bandas, uma de tamanho 3000pb e outra 980pb correspondente ao vector pGEM<sup>®</sup>-T, quando comparado com o marcador de peso molecular 1Kb (Promega).

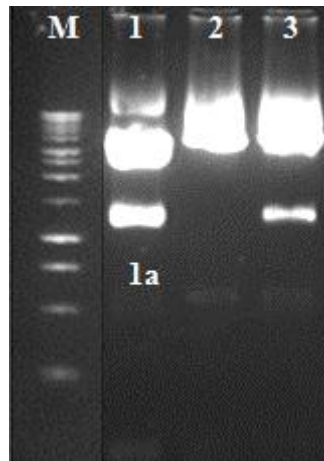
O resultado da digestão pode ser observada, na figura 27, para os clones escolhidos aleatoriamente. Este resultado revela-nos que nem todos os clones continham o inserto.



**Figura 27 – Digestão enzimática do vector pGEM<sup>®</sup>-T com a enzima *Pst I*.** Gel de agarose 0,8 % (p/v), em TAE 1X. **M)** Marcador de peso molecular de 1kb (Promega); **1)** Plasmídios não digeridos (3000pb); **2)** Plasmídios digeridos (3000pb e 980pb).

Após a confirmação dos transformantes positivos estes foram novamente digeridos para a obtenção do inserto de interesse. Realizou-se uma digestão com as enzimas *Nde I* e *Sal I* para ocorrer a libertação do fragmento e a fim de garantir que o fragmento digerido possuísse os locais de ligação ao vector pET-28a(+) (Figura 28).

O produto resultante da digestão enzimática foi separado por electroforese em gel de agarose 0.8% (p/v), e a banda de interesse, contendo o inserto, (Figura 28 (1a)) foi recortada.



**Figura 28 – Digestão enzimática dos plasmídios.** Gel de agarose 0,8 % (p/v) em TAE 1X. **M)** Marcador de peso molecular de 1kb (Promega); **1)** clone positivo digerido com *Nde I* e *Sal I*; **1a)** Fragmento de ORF *lip2*; **2)** Clone positivo digerido com *Nde I*; **3)** clone positivo digerido com *Sal I*.

Após a recuperação da banda procedeu-se à sua purificação. Também o plasmídeo pET28a(+) foi purificado após ter sido digerido com as enzimas *Nde I* e *Sal I*, com a finalidade de se proceder à ligação com a enzima T4 DNA ligase e transformação de *E.coli* DH5 $\alpha$ .

#### 4.4.3 - Clonagem do gene *lip2* no vector pET28a(+)

As *E.coli* seleccionadas, foram crescidas em LB com canamicina e procedeu-se à extracção do DNA plasmídico e à digestão enzimática com as enzimas *Nde I*, *Sal I* e *Pst I*, de modo a confirmar a clonagem da ORF do gene *lip2* e a orientação da mesmo.

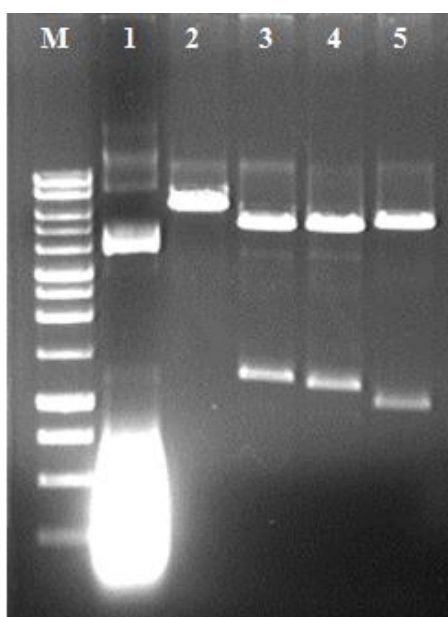
A enzima *Pst I* foi utilizada com o objectivo de confirmar o clone. A digestão enzimática originou a visualização de um fragmento de aproximadamente 5604pb correspondente vector pET-28a(+) e outro com 980pb, correspondente a parte do gene *lip2*, em gel de agarose (Figura 29 (5)).

Na digestão enzimática com a enzima *Nde I* verificou-se a presença de uma banda de 6584pb, confirmando a clonagem da ORF do gene *lip2* no vector pET-28a(+) (Figura 29 (2)). Ao contrário do que seria esperado, na digestão com a enzima *Sal I* verificou-se a presença de duas bandas. Tal facto deve-se à inserção de um local de reconhecimento para a enzima *Sal I* no *polinker* do vector de subclonagem pGEM<sup>®</sup>-T, visualizando-se

assim uma banda de aproximadamente 5369pb correspondente ao vector pET-28a(+) e outra de 1300pb correspondente à ORF do gene *lip2*, (Figura 29(3)).

Na digestão enzimática com as enzimas *Nde I* e *Sal I* observa-se um fragmento de DNA plasmídico com um tamanho 5369pb, correspondente ao vector pET-28a(+) e outro de 1215pb correspondente à ORF do gene *lip2*, como se pode observar na figura 29 (4).

Na figura 29 está representado o resultado da extracção de plasmídios recombinantes, sendo possível observar bandas com diferentes tamanhos comparativamente com o marcador de peso molecular e com o vector pET-28a(+) de 5369pb (Figura 29 (1)).



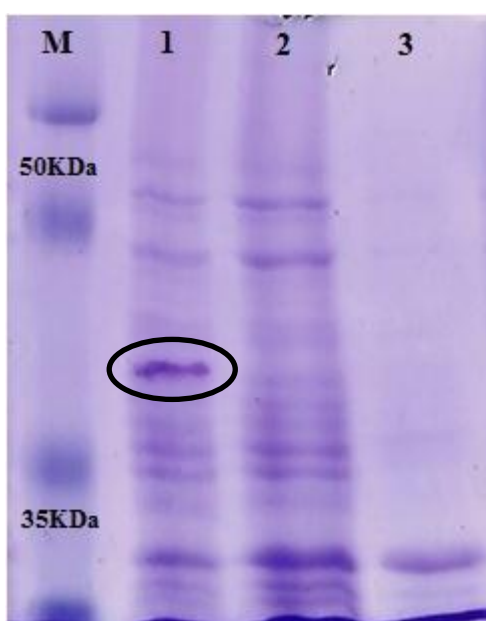
**Figura 29 – Digestão enzimática dos plasmídios.** Gel de agarose 0,8 % (p/v) em TAE 1X. **M)** marcador de peso molecular de 1kb (Promega); **1)** vector pET-28a(+) sem digerir; **2)** plasmídio digerido com a enzima *Nde I*; **3)** plasmídio digerido com *Sal I*; **4)** plasmídio digerido com *Nde I* e *Sal I*; **5)** plasmídio digerido com *Pst I*.

#### 4.5 – Expressão da proteína

O recurso ao sistema de expressão pET28a(+) permitiu a clonagem do gene *lip2* e desta forma efectuar o seu estudo isoladamente, sendo assim possível avaliar a expressão da proteína.

A indução da expressão da proteína foi realizada pela adição de IPTG e precipitação por TCA. Após a quantificação recorrendo ao *Protein quantification kit-general use* (FluKa) e usando a técnica de Bradford, foram carregadas amostras recolhidas para diferentes tempos no gel de poliacrilamida SDS-PAGE e descorado a fim de visualizar o perfil de bandas das diferentes amostras.

O perfil de bandas obtidas em SDS-PAGE (Figura 30) indica-nos a existência de uma banda de tamanho correspondente ao da proteína lip2 (tamanho estimado 44kD), por comparação com o marcador de proteínas *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) (Figura 31), entre a banda de 35kD e 50kD.

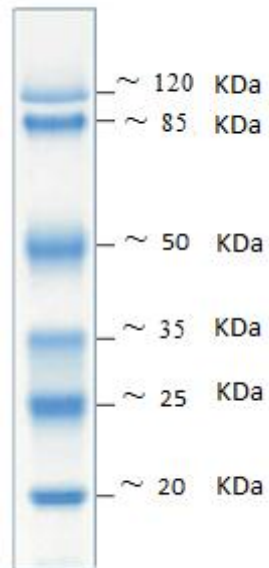


**Figura 30 - Electroforese desnaturante (SDS-PAGE) de lip2. M)** *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); **1)** proteína do sobrenadante induzida ao fim de 8horas; **2)** proteína do sobrenadante induzida ao fim de 16horas; **3)** proteína do sobrenadante não induzida.

Uma observação mais pormenorizada do gel indica que a proteína é expressa no meio com indução ao fim de 8 horas de crescimento. De acordo com a curva de crescimento da *E.coli*, a expressão ocorre na fase exponencial., não se verificando expressão nas restantes fases.

Os resultados revelam, que a proteína é encontrada no sobrenadante, ou seja, é excretada para o meio de cultura.

Tendo em conta que a proteína lip2 é uma proteína extracelular, os resultados coincidem com o teoricamente esperado.



**Figura 31** – marcador de proteínas com a indicação dos tamanhos (kDa). *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas)

## 5 – Conclusões

Com este trabalho conseguiu-se fazer uma primeira abordagem à caracterização do gene *lip2* de *T. harzianum*. *Lip2* tem uma ORF de 1215pb, e codifica uma proteína de 404 aminoácidos e 44 kDa (B7ZET5\_TRIHA). É uma triacilglicerol lipase com serina no centro activo. Pelas suas características diferentes das de outras lipases caracterizadas, é incluída na família das lipases\_classe 3 (InterPro IPR002921).

Apresenta valores de homologia superiores a 70% com lipases de *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* subsp. *lisi*) (*E-value*  $1e^{-139}$ ), *Gibberella zeae* (*E-value*  $7e^{-132}$  e de  $6e^{-131}$ ), e de *Glomerella graminicola* (*E-value*  $3e^{-121}$ ), mas não com *lip1* de *T. harzianum* (BOB099\_TRIHA), verificando-se que os dois genes (*lip1* e *lip2*) codificam proteínas com características diferentes.

A clonagem de *lip2* no vector de expressão bacteriano pET28a(+), seguida de indução, levou à expressão heteróloga da proteína, confirmada por SDS-PAGE. No entanto, pensa-se que esta expressão não se verifica a nível da actividade enzimática da proteína, uma vez que não foi possível detectar-se actividade esterásica ou lipolítica em placas de tributirina-agar ou de rodamina B lipase agar (ensaios não incluídos em material e métodos), o que nos leva a supor ser necessária a expressão em vector eucariota para uma mais completa caracterização de *lip2*.

Supõe-se que esta proteína, pela sua provável localização extracelular, possa contribuir, em conjunto com outras enzimas amplamente descritas em *T. harzianum*, no mecanismo de controlo biológico de fitopatogéneos.

## 6 – Bibliografia

- Aloulou A, Rodriguez JA, Fernandez S, Oosterhout DV, Puccinelli D & Carriere F (2006) Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Bioch Biophys Acta* **1761**, 995-1013.
- Arand M, Cronin A, Adamska M & Oesch F (2005) Epoxide Hydrolases: Structure, Function, Mechanism, and Assay. *Meth Enzymolo* **400**, 569-588.
- Ballance DJ (1986) Sequence important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* **2**, 229-236.
- Batta YA (2004) Postharvest Biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protec* **23**, 19-26.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC & Codón AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* **7**, 249-260.
- Bisset J (1991) A revision of the genus *Trichoderma*. II Infrageneric classification. *Can. J. Bot* **69**, 2357-2372.
- Bornscheuer UT (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Micro Rev* **26**, 73-81.
- Bornscheuer UT & Kazlauskas RJ (1999) Hydrolases in organic synthesis regio and stereoselective biotransformations. *Chembiochem* **7**, 1279-1280.
- Bourne PE & Weissig H (2003) Structural Bioinformatics, New Jersey: Wiley-Liss.
- Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Høge-Jensen B & Nørskov L (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770.
- Brzozowski AM, Savage H, Verma CS, Turkenburg JP, Lawson DM, Svendsen A & Patkar S (2000) Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase. *Bioch* **39**, 15071-15082.
- Burkert JFM, Maugeri F & Rodrigues MI (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Biores Technol* **91**, 77-84.
- Burns JR & Benson DM (2000) Biocontrol of damping-off *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. *Plant Dis* **84**, 644-648.
- Campo VL & Carvalho I (2008) Síntese de glicoaminoácidos de interesse biológico. *Quim. Nova* **31**, 1027-1033.

- Carvalho PO, Campos PRB, Noffs MD, Oliveira JG, Shimizu MT & Silva DM (2003) Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quim Nova* **26**, 75-80.
- Castro HF, Mendes AA, Santos JC & Aguiar CL (2004) Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím Nova* **27**, 146-156.
- Chahinian H, Ali YB, Abousalham A, Petry S, Mandrich L, Manco G, Canaan S & Sarda L (2005) Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with nonlipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Bioch Biophys Acta* **1738**, 29-36. (Chahinian *et al.*, 2005)
- Chaverri P, Samuels GJ & Stewart EL (2001) *Hypocrea virens* sp. Nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycol* **93**, 1113-1124.
- Chérif M & Benhamou N (1990) Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Rsciscis-lycopersici*. *Phytopathol* **80**, 1406-1414.
- Choupina A (2000) Contributo para a Caracterização do Sistemas de Lipases de *Yarrowia lipolytica*. Isolamento e caracterização do gene YILIP3.
- Cihangir N & Sarikaya E (2004) Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol* **20**, 193-197.
- Collins RP & Halim AF (1972) Characterization of the major aroma constituent of the genus *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food Chem.* **20**, 437-438.
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C & Deléage G (2000) NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *Trends Biochem Sci.* **25**, 147-150.
- Contesini FJ, Silva VCF, Maciel RF, Lima RJ, Barros FFC & Carvalho PO (2009) Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspegillus niger* by solid-state fermentation. *J Microbiol* **47**, 563-571.
- Cooley RN & Caten CE (1993) Molecular analysis of the *Septoria nodorum*  $\beta$ -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. *Mol Gene Genet.* **237**, 58-64.
- Cúndom MA, Mazza SM & Gutiérrez SA (2003) Short communication. Selection of *Trichoderma* ssp. Isolates Against *Rhizoctonia solani*. *Spanish J. of Agricul. Res* **1**, 79-81.
- Danielson RM & Davey CB (1973). The abundance of *Trichoderma* propagules and distribution of species in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 485-494.

- De Marco JL, Lima LHC, De Sousa MV & Felix CR (2000) A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. *World J. Microbiol. Biotechnol* **16**, 383-386.
- Desnuelle P, Sarda L & Ailhaud G (1960) Inhibition de la lipase pancreatique par la diethyl-p-nitrophenyl en emulsion. *Biochim Biophys Acta* **37**, 570-571.
- Domsch KH, Gams W & Anderson TH (1980) Compendium of soil fungi, Vol. 1. *Academic Press*, New York.
- Elad Y (1996) Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *Eur. J. Plant Pathol* **102**, 719-732.
- Elibol M & Ozer D (2002) Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem* **38**, 367-372.
- Ellaiah P, Prabhakar T, Ramakrishna B, Taleb AT & Adinarayana K (2004) Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochem* **39**, 525-528.
- Esposito E & da Silva M (1998) Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critical Rev. in Micro.* **24**, 89-98.
- Etebarian HR, Scott ES & Wicks TJ (2000) *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potencial biological control agent for *Phytophthora eryth roseptica*. *European J. of plant Pathol* **106**, 329-37.
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilabert C & Candela ME (2007) Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *J. of Phytopathol* **155**, 342-349.
- Ferrer M, Plou FJ, Nuero OM, Reyes F & Ballesteros A (2000) Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J of Chem Technol and Biotech* **75**, 569-576.
- Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut JS, Hotz HR, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL & Bateman A (2008) The pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**, 281-288.
- Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN & Petersen SB (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Bioch* **82**, 1033-1041.
- Freire DMA & Castilho LR (2008). Lipases em biocatálise. In: BON EPS, Ferrara MA, Corvo ML (Ed.) *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 506.

- Gams W & Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP & Harman GE (1998) *Trichoderma & Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis, London. 278 pg.
- González-Ramos F (1997) Aislamiento y caracterización de dos genes que codifican para enzimas enantioselectivas de interés industrial: lipasa de *Y. lipolytica* y D-aminoácido oxidasa de *Trigonopsis variabilis*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.
- Grondona I, Hermosa R, Tejada M, Gomis M, Mateos P, Bridge P, Monte E & Garcia-Acha (1997) Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne Fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3189-3198.
- Gupta R, Gupta N & Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 763-781.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harman GE (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol.* **96**, 190-194.
- Harman GE, Howel CR, Viterbo A, Chet I & Lorito M (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev/Micro* **2**, 43-56.
- Harman GE, Chet I & Baker R (1980) *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedlings diseases induced in radish and peas by *Pythium* sp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol* **70**, 1167-1172.
- Hasan F, Shah AA & Hameed A (2006) Industrial application of microbial lipase. *Enz Micro Technol* **39**, 235-251.
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E & Garcia-Acha I (2000) Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1890-1898.
- Hiol A, Jonzo MD, Druet D & Comeau L (1999) Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enz Microb Tech* **25**, 80-87.
- Hjeljord LG, Stensvand A & Tronsmo A (2001) Antagonism of nutriente-activated conidia of *Trichoderma harzianum (atroviride)* P1 against *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* **91**, 1172-1180.

- Hofrichter M & Ullrich R (2006) Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 276-288.
- Holwerda K, Verdake PE & de Willigen AHA (1936) Vergleichende untersuchungen über die verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger triglyceride unter einfluss von pankreasextrakt. *Rec Trav Chim Pays-Bas* **55**, 43-57.
- Horchani H, Mosbah H, Salem NB, Gargouri Y & Sayari A (2009) Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. *J Mol Catal B: Enz* **56**, 237-245.
- Howell CR (2002) Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathol* **92**, 177-180.
- Howell CR (2003) Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plants Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Diseases* **87**, 4-10.
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, Cuche BA, De Castro E, Lachaize C, Langendijk-Genevaux PS & Sigrist CJA (2008) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acid Res* **36**, 245-249.
- Isaksson D, Sjödin K & Högberg HE (2006) Enantiomerically enriched cryptone by lipase catalysed kinetic resolution. *Tetrahedron: Asymmetry* **17**, 275-280.
- Jaeger K, Dijkstra BW & Reetz MT (1999) Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**, 315-351.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M & Misset O (1994) Bacterial Lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 29-63.
- Jaeger KE & Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 390-397.
- Jaeger KE & Reetz MT (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnol* **16**, 396-403.
- Jorge L (não publicado). Contribuição al estudo de caracterização moleculae y bioquímica de la actividade lipásica en le género *Trichoderma*”.

- Jorge L, González F, Monte E & Choupina A (2008) HE-TAIL PCR, a powerful tool for identification of *Trichoderma harzianum lip1* gene. XVI National Congress of Biochemistry. University of the Azores, Ponta Delgada. 22-25.
- Jorge L, González F, Monte E & Choupina A (2010) Identification of *Trichoderma harzianum lip2* gene by HE-TAIL PCR. XVII National Congress of Biochemistry. Porto. 15-17 December 2010.
- Julenius K, Molgaard R, Gupta R & Brunak S (2005) Prediction, conservation, analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiolog* **15**, 153-164.
- Kikuchi T, Mimura T, Harimaya H, Yano H, Arimoto T, Masada Y & Inoue T (1974) Letter: Volatile metabolite of aquatic fungi. Identification of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma* and *Aspergillus* species. *Chem Pharm Bull* **22**, 1946-1948.
- Kontkanen H, Tenkanen M, Fagerström R & Reinikainen T (2004) Characterisation of steryl esterases activities in commercial lipase preparations. *J Biotech* **108**, 51-59.
- Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK & Lorito M (2001). *Trichoderma*: From genes to biocontrol. *Plant Pathology* **83**, 11-23.
- Küçük Ç & Kivanç M (2003) Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *J. Biol* **27**, 247-253.
- Kuncová G, Szilva J, Hetfleis J & Sabata S (2003) Catalysis in Organic solvents with Lipase immobilized by Sol-Gel Technique. *J Sol-Gel Sci Technol* **26**, 1183-1187.
- Kyte J & Doolittle R (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Lee KT, Foglia TA & Chang KS (2002) Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *J Am Oil Chem Soc* **79**, 191-195.
- Lin ES, Wang CC & Sung SC (2006) Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microb Tech* **39**, 98-102.
- Lisboa BB, Bochese CC, Vargas LK, Silveira JRP, Radin B & Oliveira AMR (2007) Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural., santa Maria-RS* **37**, 1255-1260.

- Liu PG & Yang Q (2005) Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Res. in Microbiol.* 156, 416-423.
- Luz WC da (1991) Controle Biológico das doenças foliares de trigo. In: Bettiol, W. (Org.). Controle Biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, p.383-388.
- Macrae AR & Hammond RC (1985) Present and future application so lipase. *Biotech Engin Rev* 3, 193-217.
- Mello SCM, Melo DF & Ávila ZR (2005) Avaliação de pesticidas sobre o crescimento e esporulação de *Dycima pulvinata*, agente de biocontrole de *Microcyclus ulei*. Brasil: CENARGEN/EMBRAPA, p.8 (Comunicado Técnico, 120).
- Monte E (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int of Microbiol* 4, 1-4.
- Moss MO, Jackson JM & Rogers D (1975) The characterization of 6-(pent-1-enyl)-alpha-pyrone from *Trichoderma viride*. *Phytoch* 14, 2706-2708.
- Muderhwa JM & Brockman HL (1992) Lateral lipid distribution is a major regulator of lipase activity. Implications for lipid-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 267, 24184-24192.
- Murzin AG, Brenner ES, Hubbard T & Chothia C (1995) SCOP: a structural classification of protein database for the investigation of sequence and structures. *J. Mol. Bio.* 247, 536-540.
- Nardini M & Dijkstra BW (1999)  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzymes: The Family Keeps Growing. *Curr Opin Struct Biol* 9, 732-737.
- Naseby DC, Pascual JA & Lynch JM (2000) Effect of biocontrole strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. of Applied Microbiol.* 88, 161-169.
- Kamiya N, Kasagi H, Inoue M, Kusunoki & Goto M (1999) Enantioselective Recognition Mechanism of Secondary Alcohol by Surfactant-Coated Lipases in Nonaqueous Media. *Biotechnol bioeng* 65, 227-232.
- Okigbo RN & Ikediugwo FEO (2000) Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. *J. of Phytopathol* 148, 351-355.
- Oliveira DTM (2000) Lipase extracelular de fungo filamentoso: isolamento e caracterização parciais. Dissertação, de Mestrado em ciência de Alimentos Faculdade de Farmácia da UFMG, 151p.

- Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N & Soccol VT (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* **29**, 119-131.
- Papavizas G (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. *An. Rev. Phytopathol.* **23**, 23-54.
- Patel RN (2002) Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enz Micro Technol* **31**, 804-826.
- Pizarro AVL & Park EY (2003) Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochem* **38**, 1077-1082.
- Pleiss J, Fischer M & Schmid RD (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemist and Physi of Lipids* **93**, 67-80.
- Reetz MT (2002) Lipases as Practical Biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 145-150.
- Reetz MT & Jaeger KE (1998) Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chem Phys Lipids* **93**, 3-14.
- Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser ME & Miller R (2008) Lipases at interfaces: A review. *Adv Colloid Interface Sci* **147-148**, 237-250.
- Resende ML, Oliveira JA & Guimarães RM (2004) Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Ciênc. agrotec.* **28**, 793-798.
- Ribeiro II (2006) Relatório de Estágio Imobilização de enzimas em materiais baseados em gelatinas. *FCT-UNL*.
- Rifai MA (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycolo. papers* **116**, 1-56.
- Rigo E, Ninow JL, Di Luccio M, Oliveira V, Polloni E, Remonato D, Arbter F, Vardanega R, DE Oliveira D & Treichel H (2010) Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT - Food Sci Technol* **43**, 1132-1137.
- Roiger DJ, Jeffers SN & Caldwell RW (1991) Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* **23**, 353-359.
- Rottensteiner H, Palmieri L, Hartig A, Hamilton B, Ruis H, Erdmann R & Gurvitz A (2002) The peroxisomal transporter gene *ANT1* is regulated by a deviate response element (ORE): characterization of the signal for fatty acid induction. *Biochem. J.* **365**, 109-117.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edn, New York: *Cold Spring Harbor*.

- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA & Petrini O (2002) *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycol* **94**, 146-170.
- Samuels JG (2006) *Trichoderma*: Systematics, the sexual and Ecology. *Phytopatol* **96**, 195-206.
- Sanogo S, Pomellia A, Hebbar PK, Bailey B, Costa JCB, Samuels GJ & Lumsden RD (2002) Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipelis pernicioso* on cacao. *Phytopathol* **92**, 1032-1037.
- Sarda L & Desnuelle P (1958) Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Bioch Biophys Acta* **30**, 513-521.
- Saxena RK, Sheoran A, Giri B & Davidson WS (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J Micro Method* **52**, 1-18.
- Schmidt-Dannert C (1999) Recombinant Microbial Lipases for Biotechnological Applications. *Bioorg Med Chem* **7**, 2123-2130.
- Schonheyder F & Volquartz K (1945) On affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. *Acta Physiol Scand* **9**, 57-67.
- Schulz T, Pleiss J & Schmid RD (2000) Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: a quantitative model. *Protein Sci* **9**, 1053-1062.
- Sharma R, Chisti Y & Banerjee UC (2001) Production, purification characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* **19**, 627-662.
- Sharon E, Bar-Eyal M, Chet I, Herra- Estrella A, Kleifeld O, & Spiegel Y (2001) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol*, **91**, 687-693.
- Sigrist CJA, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, Pagni M, Bairoch A & Bucher P (2002) *PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors*. *Brief. Bioinform* **3**, 265-274.
- Silva JBT & Mello SCM (2007) Utilização de *Trichoderma* no control de fungos fitopatogênicos. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Silva PRQ (2000) Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil. Tese de doutorado Brasil, UnB, 130p.
- Sivasithamparam K & Ghisalberti EL (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek CP, Harman GE (eds) *Trichoderma* and

- Gliocladium*, vol 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis., pp:139-191.
- Smaby JM, Muderhwa JM & Brockman HL (1994) Is lateral phase separation required for fatty acid to stimulate lipases in a phosphatidylcholine interface?. *Biochemistry* **33**, 1915-1922.
- Smith VL, Wilcox WF & Harman GE (1990) Potential for biological control of Phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathol* **80**, 880-885.
- Subramani S (1996) Protein translocation into peroxisomes. *Biol. Chem.* **271**, 32483-32486.
- Svendsen A (2000) Lipase protein engineering. *Bioch Biophys Acta* **1543**, 223-238.
- Talukder MMR, Wu JC, Fen NM & Melissa YLS (2010) Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochem Eng J* **49**, 207-212.
- Thrane C, Funck Jensen D & Tronsmo A (2000) Substrate colonization, strains competition, enzyme production in vitro, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* ssp. isolate P1 and T3. *Euro. J. of Pathol* **106**, 215-220.
- Toyama K, Tauchi T, Mase N, Yoda H & Takabe K (2006) Lipase-catalyzed kinetic resolution of thiotetronic acid derivatives bearing a chiral quaternary carbon: total synthesis of (R)-thiolactomycin and its O-analogue. *Tetrahedron Lett* **47**, 7163-7166.
- Verger R, Rivière C, Moreau H, Gargouri Y, Rogalska E, Nury S, Moulin A, Ferrato F, Ransac S, Carrière F, Cudrey M & Trétout T (1990) Enzyme Kinetics of Lipolysis. In "lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering". *Gbf Monographs* **16**, 105-116.
- Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J & Haas MJ (2000) Customizing lipase for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Cat B: Enz* **9**, 113-148.
- Virto M, Chávarri F, Bustamante MA, Barron LJR, Aramburu M, Vicente MS, Perez-Elortondo FJ, Albisiu M & De Renobales M (2003) Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. *Internat Dairy J* **13**, 391-399.
- Volpato G, Filice M, Ayub MAZ, Guisan JM & Palomo JM (2010) Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. *J Chromat A* **1217**, 473-478.

- Wardle DA, Parkinson D & Waller JE (1993) Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia* **94**, 165-172.
- Waterham H & Cregg J (1997) Peroxisomes biogenesis. *Bioassays* **19**, 57-66.
- Weindling R (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathol* **22**, 837-845.
- Zimand G, Elad Y & Chet I (1996) Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathol.* **86**, 1255-1260.

## 7 – Anexos

### Anexo I: Meios de Cultura, Tampões e Soluções utilizadas

#### Meio PDA

PDA (Potato Dextrose Agar – HIMEDIA), 39 g/l seguindo-se autoclavagem a 121°C

#### Meio LB (*Luria-Bertani*)

Meio rico para *E.coli*: Para 1 litro:

10 g de triptona

5 g extracto de levedura

10 g NaCl

Ajustou-se o pH a 7.5 com NaOH. Esterilização em autoclave, no caso do meio LB-agar foi adicionado 15g de agar e depois de autoclavado e procedeu-se ao plequeamento.

#### Anexo II: Extracção de DNA

Por cada 0,1 g de micélio fresco colocou-se aproximadamente 50 mg de areia estéril, 10 mg de PVPP e 750 µl de buffer de extracção B e macerou-se até a mistura ficar homogénea; centrifugou-se durante 7 minutos a 1300 rpm; removeu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 500 µl de fenol-clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1); inverteu-se os tubos cuidadosamente e centrifugou-se durante 5 minutos a 13200 rpm; recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo e preencheu-se os tubos com isopropanol (-20°C); inverteu-se os tubos cuidadosamente e centrifugou-se durante 10 min a 4°C a 13200 rpm; retirou-se o isopropanol e adicionou-se aos tubos 1 ml de etanol a 70%; inverteu-se cuidadosamente e centrifugou-se durante 2 min a 4°C a 13200 rpm; retirou-se o etanol e deixou-se secar o conteúdo do tubo, invertendo em estufa durante alguns minutos a 50-60 °C até secar o pellet do DNA; adicionou-se aproximadamente 35 µl de água estéril no tubo; acrescentou-se 5 mg/ml de RNase e colocou-se em banho-maria durante 5 minutos a 37 °C.

### **Anexo III: Amplificação do DNA por PCR**

#### dNTPs (200mM)

Adicionou-se, em tubos tipo *ependorf* de 0,5ml, 360µl de água destilada, 10µl de dATP, 10µl de dCTP, 10µl de dTTP e 10µl de dGTP. Agitou-se em *vortex* e armazenou-se a -20°C.

#### **Controlo de eficiência do PCR**

##### Gel de agarose 2% (p/v)

Dissolveram-se 0.6 g de agarose em 30 ml de tampão TAE 1×, sob aquecimento e com agitação, até a agarose estar completamente dissolvida. Adicionou-se 1µl de brometo de etídio 5µg/µl.

##### Gel de agarose 0.8% (p/v)

Dissolveram-se 0.24 g de agarose em 30 ml de tampão TAE 1×, sob aquecimento e com agitação, até a agarose estar completamente dissolvida. Adicionou-se 1µl de brometo de etídio 5 µg/µl.

#### **Solução de Brometo de Etídio**

Brometo de Etídio 0,5 µg/ml.

#### **Solução de *Orange G* concentrado (5×)**

12,5g Ficoll

0,125g *Orange G*

Dissolveu-se em água destilada e fez-se o volume até 50ml. Armazenaram-se em alíquotas de 2ml a -20°C.

#### **Solução de *Orange G* diluído (1×)**

Diluiu-se 100ml de *Orange G* 5× em 400ml de água destilada e armazenou-se a 4°C.