Dr. BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA

USO DE GALACTOLIPASE PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS A PARTIR DE BIOMASSA VEGETAL

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Unidade São José do Rio Preto

Supervisor: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

PROGRAMA DE PÓS-DOUTORADO DA UNESP

São José do Rio Preto

2026

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a galactolipase produzida por *Burkholderia lata* BL02 e avaliar sua aplicação na obtenção de ácidos graxos a partir de galactolipídeos presentes em biomassa vegetal. A enzima foi produzida por fermentação submersa, apresentando atividade lipolítica de 521,35 U/mL e atividade específica de 1.579,84 U/mg de proteína. A caracterização demonstrou atividade sobre ésteres sintéticos, triacilgliceróis, óleos naturais e diferentes biomassas vegetais. Sobre os galactolipídeos MGDG e DGDG, a atividade específica atingiu 2.700±143 U/mg. A hidrólise foi avaliada tanto na fração lipídica extraída das folhas de espinafre quanto diretamente sobre a biomassa. Nos ensaios *ex situ*, observou-se o consumo progressivo de MGDG e DGDG e a formação de ácidos graxos livres, além da formação de ésteres alquílicos na presença de álcool. Nos ensaios *in situ*, foram obtidos 16,5±1,7 mg de ácidos graxos livres por grama de folhas de espinafre após 24 horas, correspondendo à liberação estimada de 89,2% dos ácidos graxos derivados dos galactolipídeos. A atividade também foi observada em folhas de capim e couve e mantida em ensaio ampliado com 45 g de espinafre. A análise proteômica associou a enzima a uma hidrolase de ésteres relacionada às lipases de *Burkholderia*. Desta maneira, os resultados demonstram o potencial da galactolipase de *B. lata* BL02 para a valorização da fração lipídica de biomassas vegetais.

Palavras chaves: *Burkholderia lata*; galactolipase; galactolipídeos; biomassa vegetal; ácidos graxos poli-insaturados.

1. INTRODUÇÃO

A transição para uma economia de base biológica tem estimulado o desenvolvimento de processos capazes de converter recursos renováveis em combustíveis, insumos químicos, alimentos, ingredientes funcionais e materiais de maior valor agregado. Nesse cenário, a biomassa vegetal representa uma matéria-prima abundante e diversificada. Entretanto, grande parte das estratégias de valorização concentra-se nas frações polissacarídicas e lignínicas, enquanto outros componentes, como os lipídeos associados às membranas celulares e aos cloroplastos, permanecem comparativamente pouco explorados. A integração de diferentes classes de biocatalisadores pode ampliar o aproveitamento da biomassa e favorecer o desenvolvimento de biorrefinarias mais completas e sustentáveis (Contato et al., 2025).

Entre os lipídeos encontrados nos tecidos fotossintéticos destacam-se os galactolipídeos, uma das classes lipídicas mais abundantes da biosfera devido à ampla distribuição das plantas, algas, microalgas e cianobactérias. Os principais representantes desse grupo são o monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e o digalactosildiacilglicerol (DGDG), que constituem grande parte dos lipídeos das membranas dos cloroplastos e tilacoides. MGDG e DGDG correspondem a aproximadamente 52% e 26% dos lipídeos dos cloroplastos, respectivamente, embora essas proporções possam variar entre espécies, tecidos e condições fisiológicas (Dörmann; Benning, 2002; Hölzl; Dörmann, 2007; Lyu et al., 2021).

Estruturalmente, MGDG e DGDG são formados por duas cadeias de ácidos graxos esterificadas ao glicerol e uma região polar contendo um ou dois resíduos de galactose, respectivamente. Essa estrutura diferencia os galactolipídeos dos triacilgliceróis encontrados principalmente nos óleos e gorduras de reserva. Nas plantas superiores, suas cadeias acílicas possuem predominantemente 16 ou 18 carbonos e são frequentemente poli-insaturadas. Essa composição é importante para as propriedades das membranas fotossintéticas, para a organização dos complexos proteicos dos tilacoides e para a adaptação das plantas às alterações ambientais (Hölzl; Dörmann, 2007; Lyu et al., 2021).

A formação do MGDG ocorre principalmente na membrana interna do envelope dos cloroplastos e é catalisada pela monogalactosildiacilglicerol

sintase 1-MGD1 (EC 2.4.1.46), que transfere um resíduo de galactose da UDP-α-D-galactose para o diacilglicerol. Parte do MGDG formado é posteriormente utilizada pelas digalactosildiacilglicerol sintases para a produção de DGDG, predominantemente no envelope externo do cloroplasto. Assim, o equilíbrio entre MGDG e DGDG participa diretamente da biogênese dos tilacoides, do funcionamento da maquinaria fotossintética e da estabilidade das membranas plastidiais (Nitenberg et al., 2020; Lyu et al., 2021).

Além da função estrutural, os galactolipídeos constituem uma importante fonte de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS). Em folhas e outros tecidos fotossintéticos, grande parte de suas cadeias acílicas é formada pelos ácidos α-linolênico (ALA, 18:3) e linoleico (18:2). O ALA é um ácido graxo essencial da família ômega-3 e apresenta interesse nutricional, farmacêutico e oleoquímico. Em alguns organismos e tecidos fotossintéticos, os galactolipídeos concentram uma parcela importante dos PUFAS presentes na biomassa. Entretanto, diferentemente dos triacilgliceróis acumulados em sementes e frutos oleaginosos, esses lipídeos encontram-se distribuídos nas membranas celulares e em concentrações da ordem de miligramas por grama de biomassa, dificultando sua recuperação (Sahaka et al., 2020; Amara et al., 2024).

Os métodos convencionais para obtenção de lipídeos vegetais normalmente envolvem extração mecânica ou utilização de solventes orgânicos. Esses processos são eficientes para matérias-primas ricas em óleos de reserva, mas apresentam limitações para a recuperação dos ácidos graxos presentes nos galactolipídeos das membranas. Neste sentido, o emprego de enzimas capazes de reconhecer e hidrolisar essas moléculas pode representar uma alternativa para o aproveitamento da fração lipídica presente em folhas, resíduos verdes, subprodutos agrícolas, algas e microalgas. Trabalhos recentes demonstraram que enzimas lipolíticas podem atuar diretamente sobre tecidos vegetais, liberando grande parte dos ácidos graxos ligados ao MGDG e DGDG sem a necessidade de extração prévia (Amara et al., 2024; Fachini et al., 2025).

As lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases de ésteres carboxílicos que atuam preferencialmente sobre triacilgliceróis, embora muitas dessas enzimas apresentem ampla especificidade de substrato. Já as galactolipases (EC 3.1.1.26) catalisam a hidrólise das ligações éster que unem os ácidos graxos ao esqueleto de glicerol de MGDG e DGDG, promovendo a liberação de ácidos

graxos livres e a formação de derivados parcial ou completamente desacilados. A presença de uma região polar constituída por um ou dois resíduos de galactose torna esses substratos estruturalmente diferentes dos triacilgliceróis e impõe características específicas para sua interação com a enzima.

A atividade galactolipásica, entretanto, não está restrita às enzimas originalmente classificadas como galactolipases. Lipases, fosfolipases, cutinases e proteínas relacionadas às lipases pancreáticas também podem apresentar atividade sobre MGDG e DGDG. Entre as enzimas microbianas estudadas estão a fosfolipase/lipase de *Fusarium solani* e a lipase de *Talaromyces thermophilus*, que apresentam elevada atividade sobre galactolipídeos organizados na forma de micelas, monocamadas ou substratos imobilizados. Esses resultados demonstram que fatores como a acessibilidade do sítio ativo, a região de ligação ao substrato e a interação da enzima com a interface lipídio-água influenciam diretamente a eficiência da hidrólise (Jallouli et al., 2015; Belhaj et al., 2018).

Apesar desses resultados, poucas galactolipases microbianas foram caracterizadas e ainda existem importantes questões relacionadas à estrutura e função dessas enzimas, ao reconhecimento dos grupos polares dos galactolipídeos, à seletividade pelas cadeias de ácidos graxos e, principalmente, ao seu comportamento quando aplicadas diretamente sobre matrizes vegetais. Recentemente, foi demonstrado que enzimas lipolíticas podem atuar diretamente sobre folhas, resíduos verdes e células de microalgas, liberando ácidos graxos poli-insaturados e, na presença de álcoois, também catalisar sua conversão em ésteres alquílicos. Desta maneira, as galactolipases apresentam potencial para aplicações na nutrição, oleoquímica e em processos integrados de valorização da biomassa (Amara et al., 2024; Fachini et al., 2025).

A bactéria *Burkholderia lata* BL02 produz uma lipase extracelular com elevada atividade sobre substratos diversos e estabilidade em diferentes condições físico-químicas. A produção dessa enzima por fermentação submersa utilizando óleo de frango como fonte de carbono foi otimizada, e estudos demonstraram sua atividade e estabilidade em diferentes condições de pH e na presença de sais biliares e proteases (Oliveira et al., 2015; Oliveira et al., 2024).

Em trabalhos anteriores, a lipase de *B. lata* BL02 também foi utilizada em conjunto com lacases, celulases e hemicelulases para avaliar sua

participação na desconstrução de diferentes biomassas vegetais. Os resultados mostraram uma maior contribuição da atividade galactolipásica nos materiais derivados de folhas, particularmente aqueles com maior participação dos lipídeos de membrana (Oliveira et al., 2026). Esses resultados abriram uma nova possibilidade de aplicação para essa enzima, desta vez direcionada especificamente à hidrólise dos galactolipídeos e ao aproveitamento de seus ácidos graxos.

Neste sentido, o presente trabalho avaliou a produção, purificação e atividade da lipase/galactolipase de *B. lata* BL02 e sua capacidade de hidrolisar MGDG e DGDG presentes em substratos sintéticos, extratos lipídicos e diretamente na biomassa vegetal. Foram estudadas reações sobre a fração lipídica previamente extraída (*ex situ*) e diretamente sobre os tecidos vegetais (*in situ*), buscando avaliar o potencial dessa enzima para a liberação e bioconversão dos ácidos graxos presentes nos galactolipídeos de fontes vegetais renováveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a galactolipase produzida pela bactéria *Burkholderia lata* BL02, visando à sua aplicação como biocatalisador para a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados por meio da hidrólise de galactolipídeos presentes em biomassa vegetal.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir a galactolipase de *B. lata* BL02 por fermentação submersa.
- Purificar a enzima utilizando técnicas cromatográficas e metodologias não convencionais, buscando o desenvolvimento de um procedimento de baixo custo e com reduzido número de etapas.
- Caracterizar cinética e bioquimicamente a enzima produzida por *B. lata* BL02, determinando suas constantes cinéticas e condições de atividade e estabilidade, tanto no extrato bruto quanto após a purificação.
- Aplicar a enzima diretamente sobre biomassas vegetais de diferentes fontes, em reações de hidrólise e alcoólise, visando à obtenção de ácidos graxos poli-insaturados e de seus respectivos ésteres alquílicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), e durante estágio de pesquisa desenvolvido no CIRAD, França. Parte dos ensaios de aplicação da galactolipase sobre diferentes biomassas vegetais foi desenvolvida com a participação do aluno de iniciação científica Artur Afonso Cavallante Melaré, sob orientação do pesquisador. Esses experimentos incluíram a hidrólise de folhas de espinafre, capim e couve, além do ensaio realizado em escala ampliada, e fizeram parte de seu Trabalho de Conclusão de Curso sobre a hidrólise de biomassa vegetal pela galactolipase de *Burkholderia lata* BL02 para obtenção de ácidos graxos poli-insaturados.

3.1. Microrganismo

Foi utilizada a linhagem bacteriana *Burkholderia lata* BL02, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da UNESP, campus de Assis. A linhagem foi utilizada como fonte da lipase extracelular com atividade galactolipásica.

3.2. Produção da lipase/galactolipase por fermentação submersa

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio Luria-Bertani (LB). Os frascos foram incubados entre 35 e 37 °C, sob agitação orbital de 180 rpm, por aproximadamente 48 horas ou até que a cultura atingisse concentração próxima de 10^8 células/mL. O crescimento bacteriano foi acompanhado por contagem direta em câmara de Neubauer.

Para a fermentação, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 3.000 mL contendo 600 mL de meio de fermentação composto por K_2HPO_4 1,0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L, NaCl 0,38 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g/L, $(NH_4)_2HPO_4$ 15 g/L e óleo de frango 1,25% (v/v). Os cultivos foram mantidos a 37 °C, sob agitação de 180 rpm.

Ao final da fermentação, as células bacterianas foram removidas por centrifugação a 8.500 × *g*, durante 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido, denominado extrato enzimático bruto, foi utilizado nas etapas posteriores de recuperação, purificação e determinação das atividades enzimáticas.

3.3. Delipidação e liofilização da preparação enzimática

O extrato enzimático bruto foi submetido à delipidação com *n*-hexano para remover os lipídios residuais provenientes do óleo de frango utilizado no meio de fermentação. Após a separação das fases, a fração aquosa contendo a enzima foi recuperada.

Parte da preparação enzimática delipidada foi utilizada diretamente nos ensaios enzimáticos. A fração remanescente foi liofilizada em equipamento Liotop L101 e armazenada até sua utilização nos experimentos de hidrólise.

3.4. Purificação da lipase/galactolipase por DEAE-celulose

A purificação da enzima foi realizada em uma única etapa utilizando DEAE-celulose como matriz adsorvente. Para isso, 5 g de DEAE-celulose foram adicionados a 50 mL da preparação enzimática previamente delipidada. A suspensão foi mantida sob agitação branda em banho de gelo durante 10 minutos para promover a adsorção da enzima à matriz.

Após a adsorção, a suspensão foi centrifugada a 4.000 × *g* durante 5 minutos. A matriz contendo a enzima adsorvida foi então lavada duas vezes com solução de NaCl 0,2 mol/L, seguida de centrifugação após cada lavagem para remoção das proteínas não adsorvidas ou fracamente ligadas à matriz.

A enzima foi recuperada da DEAE-celulose pela adição de isopropanol a 50% (v/v), preparado em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 7,0. Após centrifugação, o sobrenadante contendo a enzima purificada foi recuperado e submetido à diálise para remoção do isopropanol residual. Ao final, a preparação purificada foi liofilizada.

3.5. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

3.6. Determinação da atividade lipolítica com ésteres de *p*-nitrofenila

A atividade lipolítica foi inicialmente determinada pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP). As reações foram realizadas a 55 °C em

tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L, pH 7,0, contendo Triton X-100 como agente emulsificante.

Para avaliar a especificidade da enzima em relação ao comprimento da cadeia acílica, foram utilizados os seguintes ésteres de *p*-nitrofenila (Sigma-Aldrich): acetato (C2), butirato (C4), decanoato (C10), laurato (C12), miristato (C14), palmitato (C16) e estearato (C18).

A mistura reacional foi composta por 100 µL de substrato a 200 mmol/L, 800 µL de tampão citrato-fosfato 50 mmol/L, pH 7,0, contendo Triton X-100 a 0,45% (m/v), e 100 µL da preparação enzimática.

A formação de *p*-nitrofenol foi acompanhada por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio.

3.7. Seleção e preparo das biomassas vegetais

Foram utilizadas folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*), capim-são-Carlos (*Axonopus compressus*) e couve (*Brassica oleracea*). O espinafre foi utilizado como substrato de referência devido à elevada concentração de MGDG e DGDG em suas membranas fotossintéticas, enquanto o capim e a couve foram selecionados para avaliar a atividade da enzima sobre biomassas vegetais com diferentes composições lipídicas.

As folhas foram lavadas e submetidas a branqueamento em água destilada fervente durante 5 minutos para inativar as enzimas lipolíticas endógenas e reduzir a ocorrência de hidrólise espontânea ou oxidação dos ácidos graxos. Após a retirada do excesso de água, as folhas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 a 2 mm.

Parte das amostras foi utilizada ainda úmida e outra parte foi liofilizada. Em todos os experimentos foram preparados controles sem adição da enzima e mantidos nas mesmas condições de incubação das respectivas reações.

3.8. Hidrólise de galactolipídeos diretamente na biomassa vegetal (*in situ*)

3.8.1. Ensaios comparativos com espinafre, capim e couve

Os ensaios iniciais desenvolvidos na UNESP foram realizados em microtubos de 2 mL contendo 50 mg das folhas previamente branqueadas e 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0, contendo NaCl 150 mmol/L. As reações foram iniciadas pela adição de 30 mg da preparação enzimática bruta liofilizada.

As amostras foram incubadas a 45 °C, sob agitação orbital de 250 rpm, por períodos de até 24 horas. Durante a incubação, foram retiradas amostras em diferentes tempos para acompanhar o consumo dos galactolipídeos e a formação de ácidos graxos livres.

Para o espinafre, foram avaliados diferentes tempos entre 2 e 24 horas. As reações com capim foram analisadas após 6 e 24 horas, enquanto as amostras de couve foram avaliadas após 2 e 24 horas.

3.8.2. Ensaios padronizados durante o estágio no CIRAD

Durante o estágio desenvolvido no CIRAD, os ensaios de hidrólise *in situ* foram realizados com 50 mg de folhas de espinafre previamente branqueadas, suspensas em 1 mL de tampão contendo Tris-HCl 2 mmol/L, NaCl 150 mmol/L e $CaCl_2$ 15 mmol/L, pH 8,0. A reação foi iniciada pela adição de 5 mg da preparação de lipase/galactolipase.

As amostras foram incubadas a 40 °C, sob agitação orbital de 250 rpm, durante períodos entre 1 e 24 horas. Em paralelo, foram preparados controles sem adição da enzima, submetidos às mesmas condições experimentais. A ausência de formação de ácidos graxos livres nesses controles foi utilizada para confirmar a inativação das enzimas lipolíticas endógenas após o branqueamento.

3.9. Extração de galactolipídeos e hidrólise *ex situ*

Para os ensaios *ex situ*, os galactolipídeos foram inicialmente extraídos de folhas de espinafre previamente branqueadas utilizando clorofórmio:metanol na proporção de 2:1 (v/v). Foram utilizados 10 mL da mistura de solventes para cada grama de material vegetal úmido.

A suspensão foi mantida sob agitação a 200 rpm durante 20 minutos e, posteriormente, centrifugada a aproximadamente 2.300 × *g* por 10 minutos. A fase orgânica foi recuperada, desidratada com $MgSO_4$ anidro, filtrada em membrana de 0,45 µm e evaporada sob corrente de nitrogênio.

O extrato lipídico seco foi ressuspendido em tampão contendo Tris-HCl 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, $CaCl_2$ 15 mmol/L e taurodesoxicolato de sódio (NaTDC) 7,5 mmol/L, pH 8,0. O NaTDC foi utilizado para promover a dispersão dos galactolipídeos na fase aquosa. A ressuspensão foi realizada utilizando 10 mL de tampão para cada grama de espinafre úmido empregada inicialmente na extração.

As reações de hidrólise foram realizadas em microtubos contendo 1 mL do extrato lipídico reconstituído e 5 mg da galactolipase liofilizada. As amostras foram incubadas a 40 °C, sob agitação de 250 rpm, durante períodos entre 1 e 24 horas.

3.10. Hidrólise de galactolipídeos sintéticos

A especificidade da enzima sobre diferentes galactolipídeos foi avaliada utilizando monogalactosil di-octanoilglicerol (C8-MGDG), monogalactosil di-palmitoilglicerol (C16-MGDG) e digalactosil di-palmitoilglicerol (C16-DGDG).

Os substratos foram dispersos em solução contendo NaTDC 65 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0, NaCl 100 mmol/L e $CaCl_2$ 5 mmol/L. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e submetida à ultrassonicação em banho durante 8 minutos, à temperatura ambiente, para a formação de micelas mistas de galactolipídeos e sal biliar.

As reações foram realizadas com 1 mL da dispersão micelar e 5 mg da preparação enzimática. As amostras foram incubadas a 40 °C, sob agitação de 250 rpm, durante períodos entre 1 e 24 horas.

3.11. Reações de alcoólise dos galactolipídeos vegetais

A capacidade da enzima de catalisar reações de alcoólise foi avaliada utilizando o extrato de galactolipídeos de espinafre ressuspendido em meio contendo Tris-HCl, NaCl, $CaCl_2$ e NaTDC.

As reações foram suplementadas com metanol, em concentrações finais entre 2,0 e 6,0 mol/L, ou etanol, entre 0,5 e 2,0 mol/L. Foram adicionados 5 mg da preparação enzimática a cada 1 mL de meio reacional. As amostras foram incubadas a 40±1 °C, sob agitação orbital de 250 rpm, durante períodos entre 1 e 24 horas.

Ao final das reações, os produtos foram analisados quanto à formação de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e comparados aos controles realizados sem enzima ou sem adição de álcool.

3.12. Hidrólise *in situ* em aumento de escala

A possibilidade de ampliar a reação de hidrólise diretamente sobre a biomassa vegetal foi avaliada utilizando folhas de espinafre previamente branqueadas. O ensaio foi realizado em frasco Erlenmeyer de 750 mL contendo 45 g de folhas, 300 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,0, NaCl 150 mmol/L e 5 g da preparação enzimática bruta liofilizada.

O sistema foi incubado a 40 °C, sob agitação orbital de 250 rpm, durante 24 horas. Ao final da reação, foram adicionados 50 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). A suspensão foi mantida sob agitação durante 1 hora e, em seguida, centrifugada a 8.000 × *g* por 5 minutos, a 8 °C.

A fase orgânica foi recuperada, desidratada com $MgSO_4$, filtrada em membrana de 0,45 µm, concentrada e posteriormente analisada por cromatografia em camada delgada.

3.13. Extração dos lipídeos após as reações enzimáticas

Nos ensaios realizados em pequena escala, alíquotas de 500 µL do meio reacional foram adicionadas a 3,5 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). As amostras foram agitadas em vórtex durante 1 minuto e centrifugadas a 3.000 × *g* por 5 minutos. A fase orgânica foi recuperada, desidratada com $MgSO_4$ anidro e filtrada em membrana de 0,45 µm.

Quando necessário, o solvente foi evaporado sob corrente de nitrogênio e o extrato seco foi ressuspendido em clorofórmio:metanol 2:1 (v/v).

Para as análises quantitativas realizadas durante o estágio no CIRAD, os resíduos vegetais foram submetidos a extrações sucessivas com 1,5 mL e, posteriormente, duas porções de 1 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). As fases orgânicas foram reunidas, desidratadas com $MgSO_4$ anidro, filtradas e evaporadas sob corrente de nitrogênio. O extrato final foi ressuspendido em 3 mL da mesma mistura de solventes e armazenado a -20 °C até a análise.

3.14. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada

As análises qualitativas dos produtos das reações enzimáticas foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel 60. Foram aplicadas alíquotas de 5 µL de cada amostra.

3.14.1. Detecção de ácidos graxos livres e ésteres alquílicos

A separação dos ácidos graxos livres e dos ésteres alquílicos foi realizada por migração dupla. Na primeira etapa, as placas foram desenvolvidas por 50 mm utilizando *n*-hexano:éter dietílico:ácido fórmico (70:30:1; v/v/v). Em seguida, foi realizada uma segunda migração de 70 mm utilizando *n*-hexano.

Após a separação cromatográfica, as placas foram imersas em solução de sulfato de cobre saturado:ácido fosfórico:metanol:água (50:40:25:390; v/v/v/v), secas e aquecidas a 180 °C durante 7 a 8 minutos. Ácido α-linolênico, ácido linoleico ou ácido oleico foram utilizados como padrões, de acordo com o experimento.

3.14.2. Detecção de MGDG e DGDG

O consumo de MGDG e DGDG foi acompanhado utilizando placas desenvolvidas por 70 mm em clorofórmio:metanol:água (95:20:2,5; v/v/v).

Após a eluição, as placas foram imersas em solução de timol e ácido sulfúrico, secas e aquecidas entre 100 e 110 °C durante 10 minutos. C8-MGDG, C16-MGDG e C16-DGDG foram utilizados como padrões.

Em alguns ensaios qualitativos realizados com biomassa vegetal, também foi utilizado o sistema clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água, permitindo a separação simultânea de diferentes classes de lipídios polares.

3.15. Quantificação por HPTLC-densitometria

Para a quantificação de ácidos graxos livres e ésteres alquílicos, entre 5 e 10 µL dos extratos lipídicos foram aplicados como bandas de 5 mm em placas de HPTLC. As curvas de calibração foram construídas com ácido α-linolênico e linoleato de metila no intervalo de 50 a 750 ng.

Após a separação cromatográfica e a revelação com sulfato de cobre, as placas foram analisadas em densitômetro CAMAG TLC Scanner 3, em modo de reflectância, a 315 nm.

MGDG e DGDG foram quantificados após revelação com timol-ácido sulfúrico e leitura a 510 nm. A identificação foi realizada pela comparação dos fatores de retenção com os padrões sintéticos C16-MGDG e C16-DGDG. Para esses compostos, as curvas de calibração foram construídas no intervalo de 10 a 400 ng.

3.16. Identificação proteômica da lipase/galactolipase

A preparação enzimática purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). A banda correspondente à proteína com atividade lipolítica foi excisada do gel e submetida à digestão tríptica *in gel*.

Os peptídeos obtidos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador quadrupolo-tempo (microUPLC-ESI-qTOF-MS), no Laboratório de Proteômica do LaCTAD, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os espectros obtidos foram processados no programa ProteinLynx Global SERVER (PLGS, v. 3.0.3). A identificação das proteínas foi realizada utilizando bancos de dados específicos de *B. lata* disponíveis no UniProt, incluindo registros Swiss-Prot e TrEMBL, e complementada por buscas no NCBI.

Foi admitido, no máximo, um sítio de clivagem tríptica perdida. A identificação foi considerada positiva quando sustentada por pelo menos dois peptídeos únicos, com nível de confiança superior a 95% e taxa de descoberta falsa inferior a 1%. A fosforilase B de coelho foi utilizada como padrão interno na concentração de 200 fmol.

3.17. Modelagem molecular e análise estrutural

A estrutura tridimensional da éster-hidrolase de *B. lata* BL02 foi investigada por modelagem computacional. Os modelos estruturais iniciais foram obtidos utilizando AlphaFold2 e posteriormente refinados no programa MODELLER.

A qualidade global e local dos modelos foi avaliada pela função QMEANDisCo. A análise estrutural considerou a organização da tríade catalítica Ser-Asp-His, a acessibilidade do sítio ativo, a presença e conformação da região

móvel denominada *lid* e as características estruturais relacionadas à acomodação dos grupos polares de MGDG e DGDG.

Os modelos obtidos foram analisados de forma comparativa utilizando lipases homólogas do gênero *Burkholderia* como referência.

3.18. Análise estatística

Os experimentos quantitativos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente.

As comparações entre diferentes condições experimentais foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Quando aplicável, comparações específicas entre dois grupos foram realizadas pelo teste *t* de Student. As análises estatísticas foram conduzidas no programa OriginPro 10.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA), adotando-se nível de significância de 5%, sendo considerados significativos os resultados com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Produção da lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02

A lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02 foi produzida por fermentação submersa e recuperada no sobrenadante do cultivo. Após a separação das células e a delipidação do sobrenadante, foi obtida a preparação enzimática bruta utilizada nos ensaios posteriores, diretamente ou após liofilização.

A preparação apresentou atividade lipolítica de 521,35 U/mL e atividade específica de 1.579,84 U/mg de proteína, determinadas pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila. A quantidade de enzima obtida permitiu sua utilização nos ensaios de hidrólise de substratos sintéticos, galactolipídeos, extratos lipídicos e biomassas vegetais, incluindo os experimentos realizados em escala ampliada.

4.2. Perfil de atividade hidrolítica sobre substratos sintéticos e naturais

A atividade da lipase/galactolipase de *B. lata* BL02 foi avaliada sobre diferentes substratos sintéticos e naturais (Tabela 1). A enzima apresentou atividade sobre ésteres de *p*-nitrofenila com diferentes comprimentos de cadeia, trioleína, gordura de frango, óleo de gérmen de trigo e diretamente sobre biomassas vegetais.

Tabela 1. Atividade hidrolítica da lipase/galactolipase de *B. lata* BL02 sobre diferentes substratos sintéticos e naturais.

Substrato	Atividade de Éster Hidrolase (U/mL)
ρNP-Acetato (C2:0)	457,80 ± 87,7
ρNP-Butirato (C4:0)	581,40 ± 35,4
ρNP-Decanoato (C10:0)	1661,20 ± 165,0
ρNP-Laurato (C12:0)	2416,70 ± 50,3
ρNP-Miristato (C14:0)	2138,90 ± 97,7
ρNP-Palmitato (C16:0)	**3151,20 ± 111,9**
ρNP-Estearato (C18:0)	2879,00 ± 65,7
Trioleína 98% (C18:1)	2376,00 ± 64,0
Óleo de frango	3125,00 ± 88,39
Óleo de gérmen de trigo (Lipowheat®)	**2166,67 ± 72,17**
Folhas de capim	222,22 ± 27,78
Folhas de espinafre	166,67 ± 27,78
Palha de milho	55,57 ± 2,77

As reações foram realizadas a 55 °C, utilizando-se 200 mmol/L de substrato em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 7,0. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto por minuto. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Entre os ésteres de *p*-nitrofenila, a menor atividade foi observada sobre *p*NP-acetato (C2:0), com 457,80±87,70 U/mL. A atividade aumentou com os substratos de maior cadeia, atingindo o maior valor com *p*NP-palmitato (C16:0), de 3.151,20±111,90 U/mL. Elevadas atividades também foram obtidas sobre *p*NP-estearato (C18:0) e *p*NP-laurato (C12:0), demonstrando a preferência da enzima por substratos contendo cadeias acílicas mais longas.

A atividade sobre trioleína atingiu 2.376,00±64,00 U/mL. Entre os substratos naturais com maior conteúdo lipídico, a maior atividade foi obtida com gordura de frango, 3.125,00±88,39 U/mL, seguida pelo óleo de gérmen de trigo, com 2.166,67±72,17 U/mL.

A enzima também apresentou atividade diretamente sobre as biomassas vegetais. As maiores atividades foram obtidas com folhas de capim-são-Carlos e espinafre, correspondendo a 222,22±27,78 U/mL e 166,67±27,78 U/mL, respectivamente. Sobre palha de milho, a atividade foi de 55,57±2,77 U/mL. Desta maneira, além da atividade sobre substratos lipídicos convencionais, a enzima foi capaz de atuar diretamente sobre componentes presentes em tecidos vegetais.

4.3. Confirmação da atividade galactolipásica

Além da atividade sobre ésteres sintéticos e triacilgliceróis, a enzima apresentou atividade sobre os galactolipídeos MGDG e DGDG. A atividade específica determinada sobre esses substratos foi de 2.700±143 U/mg, enquanto sobre tributirina foi obtida atividade específica de 8.345±132 U/mg (Tabela 2).

Tabela 2. Atividades específicas da enzima de *B. lata* BL02 sobre tributirina e galactolipídeos.

Substrato	Atividade específica (U/mg)
Tributirina (C4:0)	8.345 ± 132
Galactolipídeos (MGDG/DGDG)	2.700 ± 143

Esses resultados demonstraram que a enzima de *B. lata* BL02 apresenta atividade sobre substratos estruturalmente distintos, incluindo triacilgliceróis e galactolipídeos de membranas vegetais. A elevada atividade sobre MGDG e DGDG confirmou sua atividade galactolipásica e forneceu a base para os ensaios posteriores de hidrólise dos galactolipídeos presentes em extratos lipídicos e diretamente na biomassa vegetal.

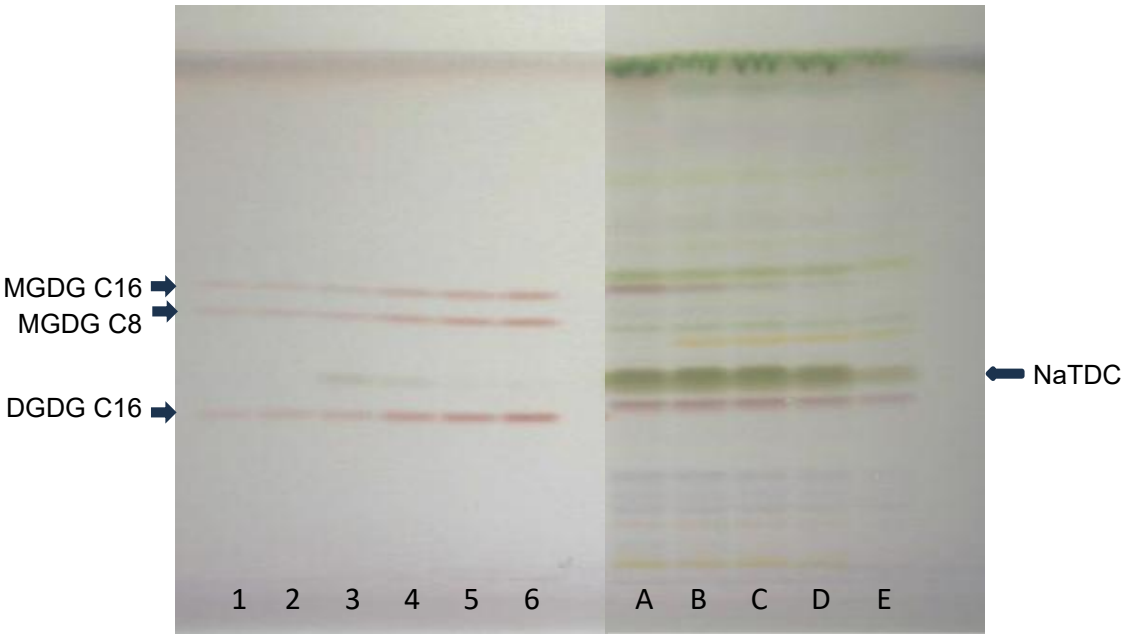
4.4. Hidrólise e alcoólise *ex situ* dos galactolipídeos de espinafre

Inicialmente, a atividade galactolipásica foi avaliada sobre os lipídios previamente extraídos das folhas de espinafre. O consumo de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG) foi acompanhado por cromatografia em camada delgada, utilizando revelação com timol-ácido sulfúrico (Figura 1).

A análise cromatográfica mostrou redução progressiva das bandas correspondentes a MGDG e DGDG em relação ao controle sem enzima. A

diminuição da intensidade dessas bandas foi observada durante todo o período avaliado, demonstrando a hidrólise dos dois galactolipídeos pela enzima de *B. lata* BL02 e a continuidade da reação até 24 horas.

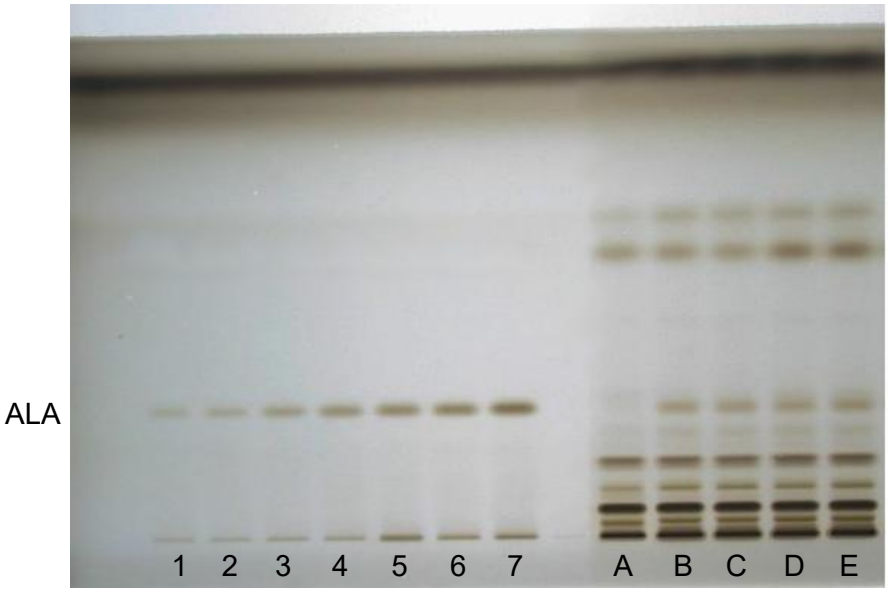
Figura 1. Hidrólise *ex situ* dos galactolipídeos MGDG e DGDG extraídos de folhas de espinafre pela lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02.



Linhas de 1 a 6: Padrões sintéticos de DGDG C16, MGDG C8 e MGDG C16 foram utilizados para identificação das bandas. As amostras correspondem ao controle sem enzima e às reações após 1, 3, 5 e 24 horas. Após as reações, os lipídios foram extraídos e separados por HPTLC em sílica utilizando clorofórmio:metanol:água (95:20:2,5; v/v/v), seguida de revelação com timol-ácido sulfúrico. Condições da reação: 45 °C, pH 8,0 e 250 rpm.

A formação dos produtos da hidrólise foi acompanhada em um segundo sistema cromatográfico, direcionado à separação dos ácidos graxos livres. Já após a primeira hora de reação foi observada uma banda com mobilidade semelhante à do padrão de ácido α-linolênico, ausente no controle sem enzima. A intensidade dessa banda aumentou nos tempos seguintes, acompanhando a redução das bandas de MGDG e DGDG (Figura 2). Desta maneira, o consumo dos galactolipídeos ocorreu concomitantemente à formação de ácidos graxos livres.

Figura 2. Formação de ácidos graxos livres durante a hidrólise *ex situ* dos galactolipídeos extraídos de folhas de espinafre pela lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02.

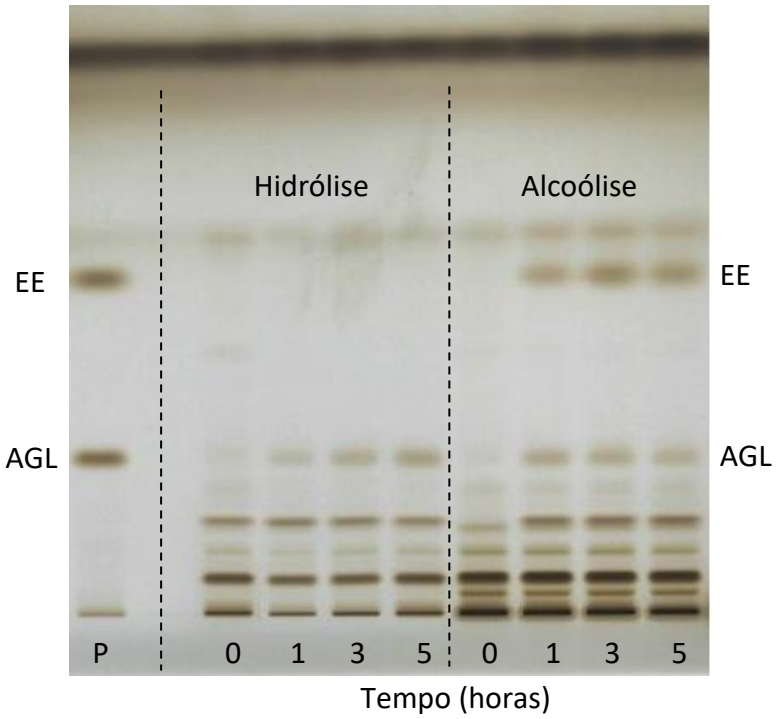


Linhas de 1 a 7: Padrão ácido α-linolênico (ALA, C18:3) nas concentrações de 0,075 µg, 0,100 µg, 0,150 µg, 0,200 µg, 0,250 µg, 0,300 µg e 0,400 µg, respectivamente. Linhas A: reação sem adição de enzima (Branco); B: reação de hidrólise com 1 h; C: reação de hidrólise com 3 h; D: reação de hidrólise com 5 h; e E: reação de hidrólise com 24 h. As reações de hidrólise dos galactolipídeos foram seguidas por extração dos lipídeos e a sua separação em placas de HPTLC em sílica utilizando migração dupla: 50 mm em Hexano/DEE/ác. fosfórico (60:40:1, v/v/v) e 70 mm em *n*-Hexano. Condições do ensaio: 45 °C, pH 8,0 e 250 rpm.

Após a confirmação da atividade hidrolítica, foi avaliada a capacidade da enzima de catalisar reações de alcoólise. Para isso, os galactolipídeos extraídos das folhas de espinafre foram incubados com a lipase/galactolipase de *B. lata* BL02 na presença de álcool, e as reações de hidrólise e alcoólise foram acompanhadas paralelamente durante cinco horas (Figura 3).

Nas reações de hidrólise, observou-se aumento progressivo da banda correspondente aos ácidos graxos livres, acompanhado pela redução da região cromatográfica dos lipídios polares. Nas reações realizadas na presença de álcool, além dos ácidos graxos livres, surgiram bandas com mobilidade correspondente aos ésteres etílicos de ácidos graxos. A intensidade dessas bandas aumentou ao longo da reação, demonstrando que a enzima também catalisou a formação de ésteres alquílicos a partir dos galactolipídeos presentes no extrato vegetal.

Figura 3. Reações de hidrólise e alcoólise dos galactolipídeos extraídos de folhas de espinafre pela lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02.



As reações foram acompanhadas nos tempos de 0, 1, 3 e 5 horas. Foram utilizados linoleato de etila como padrão para os ésteres etílicos de ácidos graxos (EE) e ácido α-linolênico como padrão para os ácidos graxos livres (AGL). O tempo zero corresponde ao extrato de lipídios polares antes da reação enzimática. As bandas localizadas abaixo da região dos AGL correspondem a pigmentos e outros lipídios polares presentes no extrato.

Em conjunto, esses resultados demonstraram que a enzima de *B. lata* BL02 atua sobre os galactolipídeos de espinafre em diferentes condições reacionais. Em meio aquoso, ocorreu a hidrólise com liberação de ácidos graxos livres, enquanto na presença de álcool também foi observada a formação de ésteres alquílicos. Assim, além da atividade galactolipásica, a enzima apresentou capacidade de catalisar a alcoólise dos galactolipídeos vegetais.

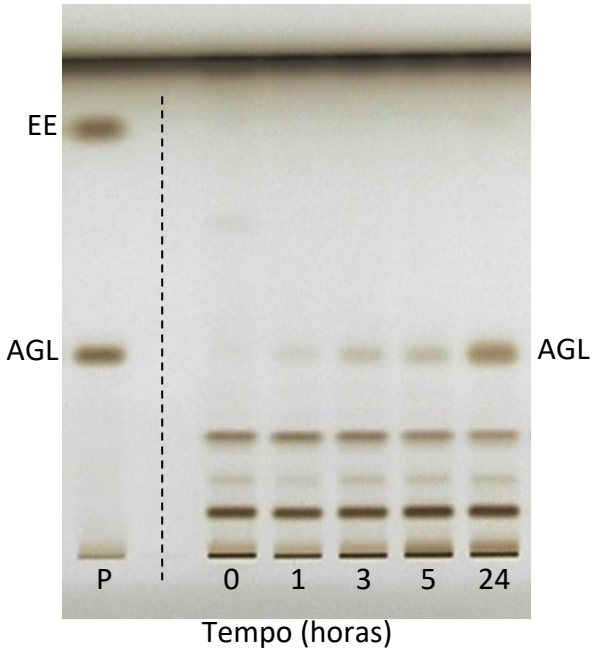
4.5. Hidrólise *in situ* de galactolipídeos presentes em folhas de espinafre

Após os ensaios realizados com os galactolipídeos previamente extraídos, a atividade da enzima foi avaliada diretamente sobre a biomassa vegetal, sem extração prévia da fração lipídica. Para isso, folhas de espinafre foram utilizadas como substrato e a liberação de ácidos graxos livres foi acompanhada durante 24 horas.

A composição inicial das folhas apresentou 32,2±2,6 mg/g de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e 22,5±1,9 mg/g de digalactosildiacilglicerol (DGDG), correspondendo a 54,7±3,3 mg de galactolipídeos por grama de biomassa.

A formação de ácidos graxos livres foi observada já nos tempos iniciais da reação e aumentou progressivamente durante o período avaliado (Figura 4). Após 24 horas, foram obtidos 16,5±1,7 mg de ácidos graxos livres por grama de folhas de espinafre. No controle sem enzima não foi observada formação detectável de ácidos graxos livres, indicando que os produtos formados foram decorrentes da ação da galactolipase de *B. lata* BL02.

Figura 4. Cinética de liberação de ácidos graxos durante a hidrólise *in situ* dos lipídeos presentes em folhas de espinafre pela galactolipase de *Burkholderia lata* BL02.



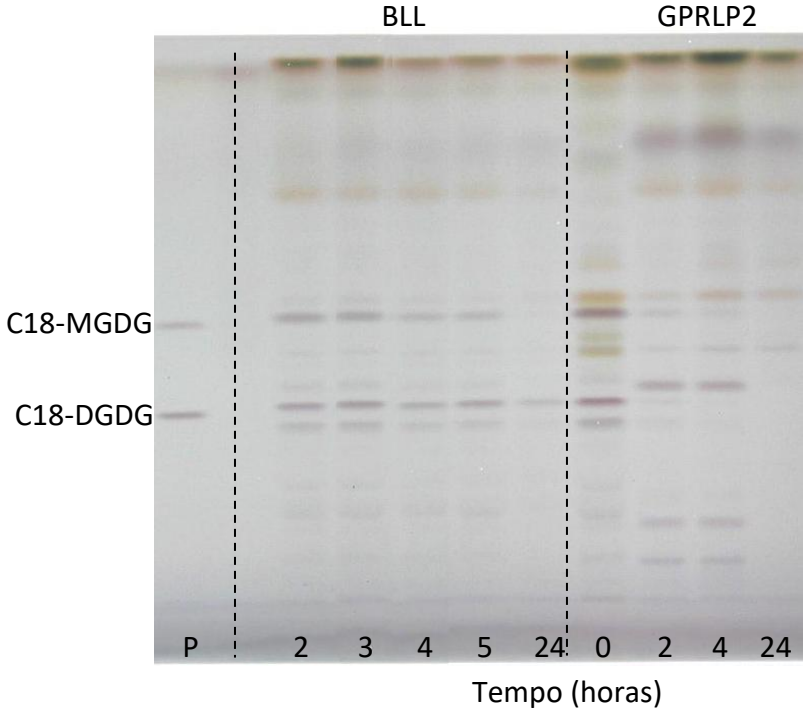
A reação foi acompanhada nos tempos de 0, 1, 3, 5 e 24 horas. Ácido α-linolênico, ácido graxo livre (AGL), e linoleato de etila, como éster etílico (EE) foram utilizados como padrões de referência. O tempo zero corresponde ao extrato lipídico obtido antes da reação enzimática. As bandas localizadas abaixo da região dos ácidos graxos livres correspondem a pigmentos e outros lipídios polares presentes nas folhas.

Paralelamente à formação dos produtos, foi acompanhado o consumo dos galactolipídeos presentes nas folhas. A análise cromatográfica mostrou redução progressiva das bandas correspondentes a MGDG e DGDG, demonstrando que a formação dos ácidos graxos livres ocorreu

concomitantemente à hidrólise dos galactolipídeos presentes diretamente na biomassa vegetal (Figura 5).

Com base na quantidade inicial de MGDG e DGDG e nos ácidos graxos liberados, estimou-se uma liberação de aproximadamente 76,5% dos ácidos graxos derivados dos galactolipídeos após 4 horas e de 89,2% após 24 horas de reação. Esses resultados foram obtidos utilizando 5 mg da preparação enzimática por mililitro de meio reacional.

Figura 5. Consumo de MGDG e DGDG durante a hidrólise *in situ* de folhas de espinafre pela galactolipase de *Burkholderia lata* BL02 e comparação com a proteína 2 relacionada à lipase pancreática de porquinho-da-índia (GPLRP2).



A atividade da enzima de *B. lata* BL02 (BLL) foi comparada à da proteína 2 relacionada à lipase pancreática de porquinho-da-índia (GPLRP2). As reações foram conduzidas em tampão Tris-HCl 2 mmol/L, contendo NaCl 150 mmol/L, pH 8,0. Após a reação, os substratos e produtos foram extraídos pelo método de Folch (Folch; Lees; Sloane Stanley, 1957), separados por CCD e revelados com timol–ácido sulfúrico. As pistas correspondentes aos diferentes biocatalisadores e tempos de reação estão identificadas na figura.

Nas condições avaliadas, a GPLRP2 promoveu hidrólise superior a 95% após 2 horas e superior a 99% após 4 horas, utilizando 500 µg de enzima por mililitro. A enzima de *B. lata* BL02 apresentou uma reação mais lenta e atingiu 89,2% de liberação após 24 horas, utilizando 5 mg/mL da preparação enzimática.

Apesar dessa diferença, a elevada conversão final demonstrou que a galactolipase de BL02 foi capaz de hidrolisar os galactolipídeos ainda associados às membranas da biomassa vegetal.

Desta maneira, a formação progressiva de ácidos graxos livres, acompanhada pela redução de MGDG e DGDG, demonstrou que a galactolipase de *B. lata* BL02 pode atuar diretamente sobre os galactolipídeos presentes nas folhas de espinafre, sem a necessidade de extração prévia da fração lipídica.

4.6. Hidrólise *in situ* em diferentes biomassas vegetais

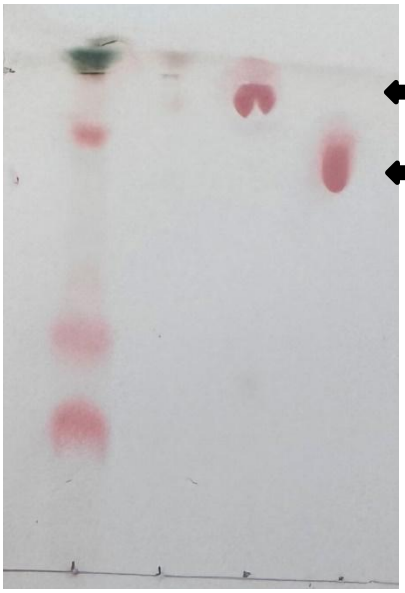
Após a confirmação da atividade sobre folhas de espinafre, a lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02 foi avaliada diretamente sobre folhas de capim e couve. Esses ensaios foram realizados para verificar se a atividade observada no espinafre também ocorria em outras biomassas vegetais, sem extração prévia da fração lipídica.

4.6.1. Hidrólise in situ de folhas de capim

A análise cromatográfica dos extratos obtidos das folhas de capim mostrou diferenças entre o controle sem enzima e a amostra incubada com a preparação enzimática durante 24 horas (Figura 6). Após a reação, observou-se redução da intensidade das bandas localizadas na região correspondente aos padrões de MGDG e DGDG, indicando o consumo de compostos com mobilidade cromatográfica compatível com esses galactolipídeos.

Desta maneira, a redução das bandas com mobilidade correspondente a MGDG e DGDG mostrou que a enzima também foi capaz de atuar sobre os lipídios presentes nas folhas de capim. Como a avaliação foi qualitativa, esses resultados demonstram a ocorrência da hidrólise, mas não permitem determinar a extensão da conversão dos galactolipídeos nessa biomassa.

Figura 6. Hidrólise *in situ* de galactolipídeos presentes em folhas de capim pela lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02.



Linha A: controle sem adição da enzima; linha B: reação após 24 horas; linha C: padrão de monogalactosildiacilglicerol (MGDG, C16:0); linha D: padrão de digalactosildiacilglicerol (DGDG, C16:0). Após a reação, os lipídios foram extraídos e separados em placa de sílica utilizando clorofórmio:metanol:água (25:15:1,25; v/v/v), seguida de revelação com timol-ácido sulfúrico.

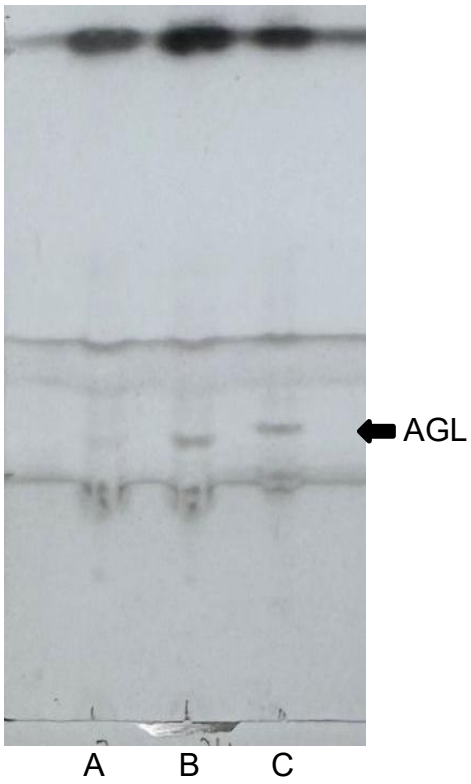
4.6.2. Hidrólise *in situ* de folhas de couve

A atividade da enzima também foi avaliada diretamente sobre folhas de couve. A análise cromatográfica mostrou o aparecimento de bandas na região correspondente aos ácidos graxos livres já após 2 horas de reação, que permaneceram visíveis após 24 horas (Figura 7). O controle sem enzima apresentou menor intensidade nessa mesma região cromatográfica.

O aumento da intensidade das bandas na região dos ácidos graxos livres já após 2 horas mostrou que a preparação enzimática promoveu a hidrólise dos lipídios presentes nas folhas de couve. A permanência dessas bandas após 24 horas confirmou a formação de produtos lipídicos durante a incubação.

Em conjunto, os resultados obtidos com capim e couve mostraram que a atividade observada inicialmente sobre folhas de espinafre não ficou restrita a essa biomassa. A enzima de *B. lata* BL02 também apresentou atividade sobre outras matrizes vegetais, embora esses ensaios tenham caráter qualitativo e não permitam comparar diretamente a eficiência de hidrólise entre as diferentes biomassas.

Figura 7. Formação de ácidos graxos livres durante a hidrólise *in situ* dos lipídeos presentes em folhas de couve pela lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02.



Linha A: controle sem adição de enzima; linha B: reação após 2 horas; linha C: reação após 24 horas. AGL: Ácidos Graxos Livres. Após as reações, os lipídeos foram extraídos e separados em placa de sílica por migração dupla. A placa foi revelada com solução de sulfato de cobre. Condições do ensaio: 45 °C, pH 8,0.

4.7. Hidrólise in situ de folhas de espinafre em escala ampliada

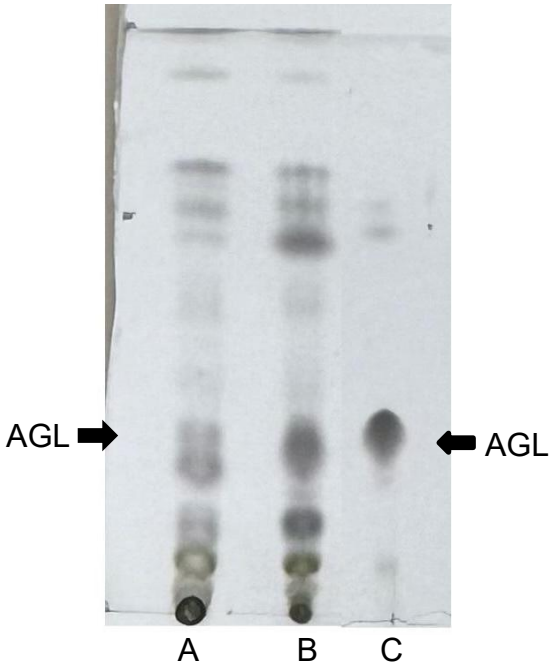
Após os ensaios realizados em pequena escala, a hidrólise *in situ* foi conduzida em sistema ampliado para verificar se a atividade da enzima seria mantida com o aumento das quantidades de biomassa, meio reacional e preparação enzimática.

O ensaio foi realizado com 45 g de folhas de espinafre previamente tratadas, suspensas em 300 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo NaCl 150 mmol/L. Foram adicionados 5 g da preparação enzimática bruta liofilizada, e a reação foi conduzida durante 24 horas.

A análise por cromatografia em camada delgada mostrou aumento da intensidade da banda localizada na região correspondente aos ácidos graxos livres na amostra incubada com a enzima, em comparação com o controle sem enzima (Figura 8). A banda formada apresentou mobilidade semelhante à do

padrão de ácido α-linolênico, demonstrando que a atividade hidrolítica foi mantida após a ampliação do sistema reacional.

Figura 8. Formação de ácidos graxos livres durante a hidrólise *in situ* de folhas de espinafre em escala ampliada pela lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02.



Linha A: controle de folhas de espinafre sem adição de enzima; linha B: reação após 24 horas de incubação com a preparação enzimática; linha C: padrão de ácido α-linolênico (C18:3). Após a reação, os lipídeos foram extraídos e separados em placa de sílica por migração dupla: 1ª, 50 mm em *n*-hexano:éter dietílico:ácido fosfórico (60:40:1; v/v/v); 2ª, 70 mm em *n*-hexano. Condições registradas para o ensaio: 45 °C, pH 8,0.

A maior intensidade da banda correspondente aos ácidos graxos livres na amostra tratada com a enzima demonstrou que o aumento das quantidades de biomassa e preparação enzimática não impediu a hidrólise dos lipídios presentes nas folhas de espinafre.

Entretanto, como a análise realizada nesse ensaio foi qualitativa, os resultados demonstram apenas a manutenção da atividade enzimática no sistema ampliado. Não foi possível determinar o rendimento, a produtividade ou a eficiência de recuperação dos ácidos graxos nessa condição. Essas determinações exigiriam a quantificação dos galactolipídeos inicialmente presentes, dos ácidos graxos liberados ao final da reação e a realização de um balanço de massa do processo.

Em conjunto, os resultados obtidos em pequena escala e no sistema ampliado demonstraram que a lipase/galactolipase de *B. lata* BL02 foi capaz de atuar diretamente sobre diferentes biomassas vegetais e que sua atividade sobre folhas de espinafre foi mantida quando a reação foi conduzida com maior quantidade de biomassa.

4.8. Proteômica e modelagem da estrutura tridimensional da galactolipase de *Burkholderia lata* BL02

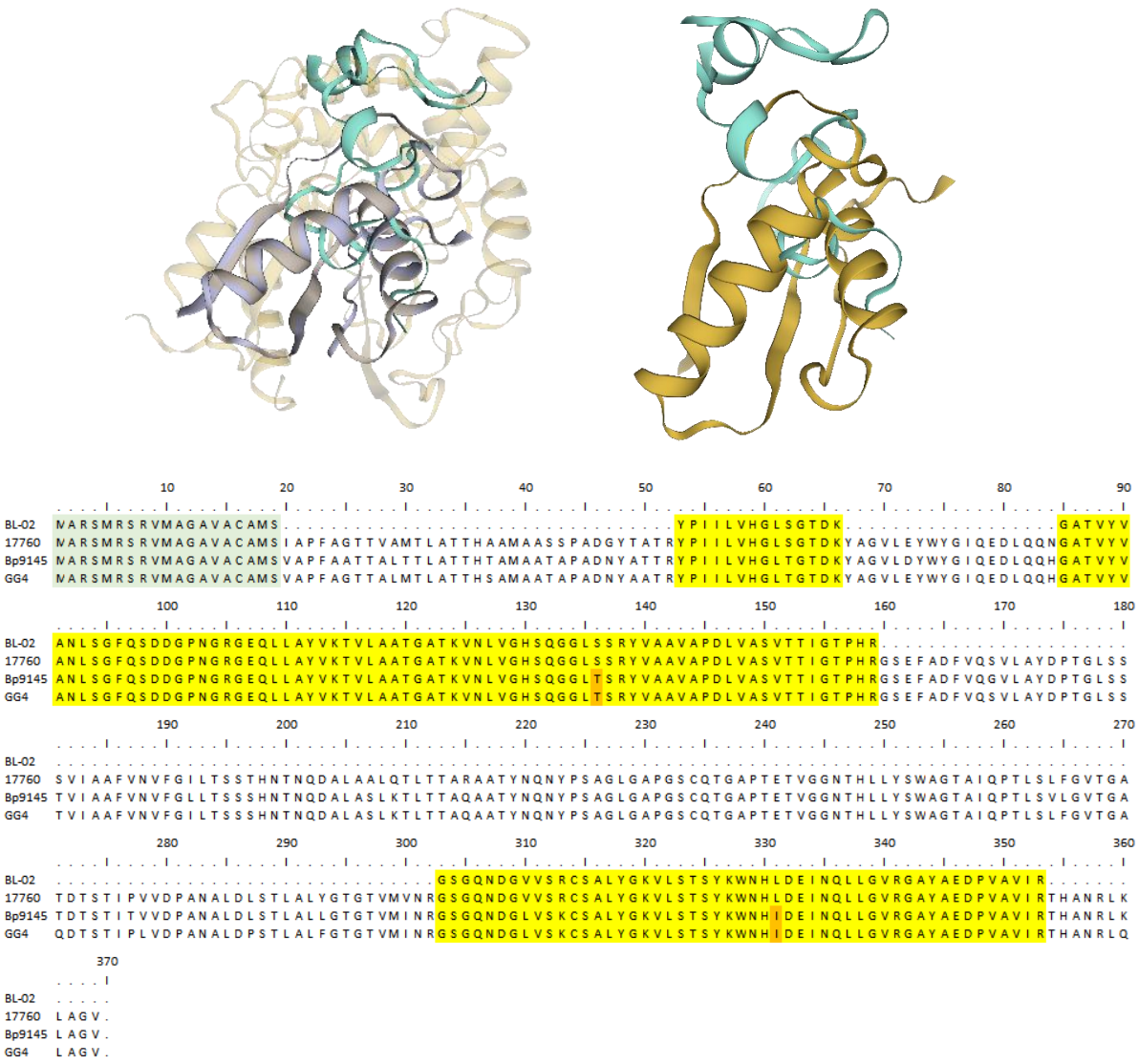
A análise proteômica da preparação purificada permitiu obter fragmentos da sequência da lipase/galactolipase de *B. lata* BL02. A sequência completa da proteína, entretanto, não foi determinada. Desta maneira, a identificação foi realizada pela comparação dos fragmentos obtidos com proteínas depositadas nos bancos de dados e pertencentes principalmente ao gênero *Burkholderia*.

A maior correspondência foi observada com uma triacilglicerol lipase de *Burkholderia lata* ATCC 17760, com 155 dos 364 resíduos representados pelos fragmentos identificados. Também foram encontradas correspondências com a triacilglicerol lipase de *Burkholderia cenocepacia* Bp9145 (154/364 resíduos) e com uma colesterol esterase de *Burkholderia cepacia* GG4 (153/364 resíduos) (Figura 9).

Com base nos fragmentos obtidos e na similaridade com essas proteínas, foram construídos modelos tridimensionais para comparação estrutural. A sobreposição com a lipase de *B. lata* ATCC 17760 mostrou similaridade geral entre os modelos, compatível com a associação da enzima de BL02 à família das lipases/éster-hidrolases de *Burkholderia* (Figura 9).

Entretanto, como a sequência completa da proteína de *B. lata* BL02 ainda não foi obtida, o modelo estrutural deve ser considerado preliminar. Os fragmentos identificados permitem relacionar a enzima a lipases já descritas para o gênero *Burkholderia*, mas não são suficientes para estabelecer com segurança todas as características de sua estrutura tridimensional.

Figura 9. Estruturas gerais (A) e sequências dos fragmentos (B) da lipase de *Burkholderia lata* BL02 sobre a lipase de *Burkholderia lata* ATCC 17760.



(A) Sobreposição da lipase de *B. lata* ATCC 17760 com (B) fragmentos da lipase de *B. lata* BL02. Os modelos foram gerados pelo AlphaFold2. (C) Comparação das sequências de lipase de *B. lata* BL02, B. lata ATCC 17760, *B. cenocepacia* Bp9145 e colesterol esterase de *Burkholderia cepacia* GG4. Os pontos representam aminoácidos idênticos. Os traços indicam lacunas introduzidas para maximizar o alinhamento. Os resíduos de aminoácidos idênticos aos fragmentos estão destacados em caixas amarelas. Caixas verdes indicam o peptídeo sinal.

Os resultados da análise proteômica, associados ao perfil catalítico observado neste trabalho, indicam que a proteína de BL02 pertence a uma família de éster-hidrolases relacionada às lipases de *Burkholderia*. Entretanto, os dados disponíveis ainda não permitem identificar uma característica estrutural específica responsável pela atividade sobre MGDG e DGDG. A obtenção da sequência completa da proteína será necessária para uma análise estrutural

mais detalhada e para a investigação dos determinantes relacionados à sua atividade galactolipásica.

4.9. Comparação da atividade galactolipásica com outras enzimas lipolíticas

A atividade específica da lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02 sobre MGDG e DGDG foi comparada com os valores descritos para proteínas relacionadas às lipases pancreáticas e diferentes lipases microbianas. A comparação considerou as atividades sobre tributirina, utilizada como substrato representativo de triacilgliceróis, e sobre os galactolipídeos MGDG e DGDG (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da atividade específica de enzimas lipolíticas sobre tributirina e galactolipídeos.

Enzima	Tributirina (C4:0) (U/mg)	Galactolipídeos (MGDG/DGDG) (U/mg)
B. lata BL02 Lipase	8.345±132	2.700±143
rGPLRP2[a]	2.700±300	9.795±105
rHPLRP2[b]	1.250±150	4.762±85
Fusarium solani Cutinase	2.596±96	1.284±45
Thermomyces lanuginosus Lipase	7.834±850	1.122±51
Candida antarctica A Lipase	309±11	176±7
Rhizomucor miehei Lipase	413±44	126±4
Candida rugosa Lipase	753±44	20±1
Rhizopus oryzae Lipase	3.375±270	41±3
Pseudomonas glumae Lipase	1.179±35	0
Pseudomonas cepacia Lipase	86±8	0
Penicillium camembertii Lipase	875±10	0
Yarrowia lipolytica LIP2 Lipase	8.102±590	0
Candida antarctica B Lipase	670±15	0

[a] Proteína 2 relacionada à lipase pancreática de porquinho-da-índia; [b] proteína 2 relacionada à lipase pancreática humana. Com exceção da lipase produzida por *B. lata* BL02 neste estudo, os valores referentes às demais enzimas foram obtidos de Amara et al. (2013).

A enzima de *B. lata* BL02 apresentou atividade específica de 2.700±143 U/mg sobre MGDG e DGDG. Esse valor foi superior aos observados para todas as enzimas microbianas incluídas na comparação. Entre elas, as maiores atividades sobre galactolipídeos foram apresentadas pela cutinase de *F. solani*, com 1.284±45 U/mg, e pela lipase de *T. lanuginosus*, com 1.122±51 U/mg. Outras lipases microbianas apresentaram atividades menores ou não apresentaram atividade detectável sobre MGDG e DGDG.

As maiores atividades galactolipásicas da comparação foram observadas para as proteínas relacionadas às lipases pancreáticas. A rGPLRP2 apresentou atividade específica de 9.795±105 U/mg sobre MGDG e DGDG, enquanto a rHPLRP2 apresentou 4.762±85 U/mg. Desta maneira, a atividade da enzima de *B. lata* BL02 foi inferior à dessas duas proteínas de origem mamífera, mas superior às atividades das demais enzimas microbianas apresentadas na Tabela 3.

Ao mesmo tempo, a preparação de *B. lata* BL02 apresentou elevada atividade sobre tributirina, correspondente a 8.345±132 U/mg. Assim, a enzima apresentou atividade tanto sobre um triacilglicerol quanto sobre os galactolipídeos MGDG e DGDG, o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente com ésteres sintéticos, óleos naturais, extratos lipídicos e biomassas vegetais.

5. DISCUSSÃO

5.1. Produção enzimática e perfil catalítico da lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02

A produção da lipase/galactolipase de *Burkholderia lata* BL02 por fermentação submersa resultou em uma preparação extracelular com atividade lipolítica de 521,35 U/mL e atividade específica de 1.579,84 U/mg de proteína, determinadas com palmitato de *p*-nitrofenila. A secreção da enzima para o meio de cultivo facilita sua recuperação, uma vez que dispensa etapas de ruptura celular e reduz a complexidade do processamento inicial. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados com a mesma linhagem, nos quais a produção extracelular da lipase foi induzida por gordura de frango e a enzima apresentou atividade sobre diferentes substratos lipídicos (Oliveira et al., 2015).

O perfil obtido com os ésteres de *p*-nitrofenila mostrou aumento acentuado da atividade entre os substratos de cadeia curta e aqueles contendo cadeias médias e longas. A atividade passou de 457,80±87,70 U/mL com *p*NP-acetato (C2) e 581,40±35,40 U/mL com *p*NP-butirato (C4) para valores superiores a 2.000 U/mL entre C12 e C18, atingindo 3.151,20±111,90 U/mL com *p*NP-palmitato (C16). Esse comportamento está de acordo com resultados anteriores para a enzima de BL02, que demonstraram atividade sobre cadeias

acílicas entre C8 e C20 e maior atividade sobre substratos contendo ácido palmítico e oleico (Oliveira et al., 2024).

Desta maneira, os resultados indicam maior atividade da enzima sobre ésteres contendo cadeias acílicas mais longas. Entretanto, como os substratos foram avaliados em uma única concentração, esses valores representam um perfil comparativo de atividade e não permitem estabelecer, isoladamente, preferência cinética entre os diferentes substratos.

A atividade elevada sobre trioleína, de 2.376,00±64,00 U/mL, mostrou que a enzima também atua eficientemente sobre triacilgliceróis de cadeia longa. Resultados semelhantes foram observados com substratos naturais complexos, principalmente gordura de frango, com atividade de 3.125,00±88,39 U/mL, e óleo de gérmen de trigo, com 2.166,67±72,17 U/mL. Assim, o comportamento observado com os ésteres sintéticos também foi mantido quando foram utilizados substratos lipídicos mais complexos.

A hidrólise de trioleína e de gorduras naturais é compatível com o comportamento esperado para lipases que atuam sobre substratos hidrofóbicos de cadeia longa. Entretanto, esses resultados, por si só, não permitem concluir sobre a ocorrência de ativação interfacial. Essa propriedade depende da resposta da enzima à formação da interface lipídio-água e, em muitas lipases, está relacionada à movimentação da região denominada *lid*. Portanto, os resultados demonstram a atividade da enzima sobre triacilgliceróis de cadeia longa, enquanto a caracterização de seu comportamento interfacial exigiria experimentos específicos.

Além da atividade sobre triacilgliceróis, a enzima apresentou atividade específica de 2.700±143 U/mg sobre MGDG e DGDG. Quando comparado à atividade de 8.345±132 U/mg sobre tributirina, esse resultado mostra que a preparação de BL02 é capaz de hidrolisar tanto lipídios neutros quanto galactolipídeos de membrana. Essa característica é particularmente interessante porque a atividade sobre MGDG e DGDG não é comum entre as lipases microbianas.

Na comparação com outras enzimas descritas na literatura, a atividade galactolipásica de BL02 foi superior à observada para a cutinase de *Fusarium solani*, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* e as lipases de *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae*. Além disso, algumas

lipases com atividade expressiva sobre tributirina apresentaram atividade muito baixa ou não detectável sobre MGDG e DGDG (Amara et al., 2013; Jallouli et al., 2015). Esses resultados mostram que uma elevada atividade sobre triacilgliceróis não significa necessariamente uma atividade equivalente sobre galactolipídeos.

A enzima de BL02 apresentou atividade inferior à das proteínas relacionadas às lipases pancreáticas de porquinho-da-índia e humana, que apresentaram os maiores valores entre as enzimas comparadas. Entretanto, entre as enzimas microbianas avaliadas, BL02 apresentou uma das maiores atividades sobre MGDG e DGDG. Esse aspecto é relevante do ponto de vista biotecnológico, uma vez que enzimas microbianas podem ser produzidas por processos fermentativos e apresentam maior possibilidade de desenvolvimento de sistemas de produção e aplicação em escala.

As comparações entre diferentes galactolipases devem considerar também as condições utilizadas nos ensaios. A organização de MGDG e DGDG em micelas ou outras estruturas interfaciais, a concentração de sais biliares, a composição das cadeias acílicas e a área disponível para interação com a enzima podem alterar consideravelmente a atividade observada. Belhaj et al. (2018), por exemplo, demonstraram que a atividade da lipase de *Talaromyces thermophilus* sobre MGDG e DGDG variou quando os substratos foram apresentados como micelas mistas, filmes monomoleculares ou depositados sobre superfícies. Portanto, os valores de atividade entre diferentes estudos devem ser comparados considerando também o sistema experimental empregado.

A atividade sobre MGDG e DGDG amplia as possibilidades de aplicação da enzima de BL02. Esses galactolipídeos constituem importantes reservatórios de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas fotossintéticas, mas, diferentemente dos triacilgliceróis presentes em sementes oleaginosas, encontram-se distribuídos nas membranas dos tecidos vegetais e não podem ser recuperados simplesmente por prensagem. Neste sentido, a hidrólise enzimática representa uma alternativa para acessar essa fração lipídica da biomassa vegetal (Sahaka et al., 2020; Amara et al., 2024).

Em conjunto, esses resultados mostram que a enzima de *B. lata* BL02 apresenta um perfil catalítico mais amplo do que aquele observado apenas para

uma lipase atuando sobre triacilgliceróis. Sua atividade sobre MGDG e DGDG demonstrou uma importante atividade galactolipásica e abriu a possibilidade de sua aplicação diretamente sobre a fração lipídica de biomassas vegetais, como avaliado nos experimentos seguintes.

5.2. Hidrólise *ex situ* e *in situ* dos galactolipídeos presentes na biomassa vegetal

A aplicação da enzima de *Burkholderia lata* BL02 sobre os galactolipídeos de folhas de espinafre deve ser analisada considerando a organização particular desses lipídeos nos tecidos fotossintéticos. MGDG e DGDG constituem a maior parte dos lipídeos dos cloroplastos e exercem funções estruturais na formação e na estabilidade das membranas dos tilacoides. Estimativas indicam que MGDG e DGDG correspondem, respectivamente, a aproximadamente 52% e 26% dos lipídeos dos cloroplastos, embora essas proporções e a composição das cadeias acílicas variem entre espécies e em resposta às condições ambientais (Lyu; Gao; Guo, 2021).

MGDG e DGDG constituem uma parcela importante dos lipídios presentes nas membranas dos cloroplastos e tilacoides. Em folhas verdes, essas moléculas representam uma fonte significativa de ácidos graxos, principalmente poli-insaturados. Entretanto, diferentemente dos triacilgliceróis acumulados em sementes e frutos oleaginosos, os galactolipídeos encontram-se distribuídos nas membranas celulares e em concentrações da ordem de miligramas por grama de biomassa. Desta maneira, sua recuperação não pode ser realizada por processos mecânicos simples, como prensagem, tornando a hidrólise enzimática uma alternativa interessante para acessar os ácidos graxos associados a MGDG e DGDG (Lyu; Gao; Guo, 2021; Amara et al., 2024).

Nos ensaios *ex situ*, a redução progressiva das bandas correspondentes a MGDG e DGDG foi acompanhada pelo aparecimento e aumento das bandas atribuídas aos ácidos graxos livres. Assim, o consumo dos galactolipídeos ocorreu simultaneamente à formação dos produtos, confirmando a atividade galactolipásica da preparação de *B. lata* BL02. Durante a hidrólise, além dos ácidos graxos livres, também podem ser formados intermediários parcialmente desacilados, como monogalactosilmonoacilgliceróis e digalactosilmonoacilgliceróis.

A utilização dos galactolipídeos previamente extraídos facilitou o contato entre a enzima e o substrato, uma vez que os lipídios foram dispersos em meio contendo taurodesoxicolato de sódio. Mesmo nessas condições, a reação continua dependendo da organização dos galactolipídeos na interface. MGDG e DGDG são moléculas anfipáticas e podem formar diferentes agregados em função de sua concentração, da composição das cadeias acílicas e da presença de sais biliares. Portanto, a atividade observada depende tanto do reconhecimento do substrato pelo sítio ativo quanto de sua disponibilidade na interface lipídio-água.

Esse efeito foi demonstrado por Belhaj et al. (2018) utilizando a lipase de *Talaromyces thermophilus*. A enzima foi capaz de hidrolisar MGDG e DGDG apresentados como micelas mistas, filmes monomoleculares ou substratos depositados em superfície, porém a atividade variou de acordo com a organização física dos galactolipídeos. Desta maneira, a comparação entre diferentes galactolipases deve considerar não apenas os valores de atividade, mas também a forma como o substrato foi disponibilizado para a enzima.

Nos ensaios realizados neste trabalho, a redução da banda de MGDG pareceu ocorrer mais rapidamente do que a de DGDG durante as primeiras horas de hidrólise *ex situ*. Uma possível explicação está relacionada à estrutura da região polar dessas moléculas. O MGDG apresenta apenas um resíduo de galactose, enquanto o DGDG possui uma cabeça digalactosídica mais volumosa e polar, o que pode modificar sua organização na interface e o acesso da enzima às ligações éster. Diferenças na hidrólise de MGDG e DGDG também foram observadas para outras enzimas lipolíticas (Amara et al., 2010; Belhaj et al., 2018).

Entretanto, esse resultado deve ser interpretado apenas como uma indicação. As análises por CCD foram predominantemente qualitativas e as concentrações iniciais de MGDG e DGDG no extrato natural não eram necessariamente equivalentes. Assim, a redução mais rápida de uma banda não permite concluir que a enzima apresenta maior afinidade ou eficiência catalítica sobre MGDG. A confirmação dessa diferença exigiria ensaios quantitativos realizados com concentrações conhecidas de cada substrato.

O mesmo cuidado deve ser adotado para a identificação dos ácidos graxos formados. As bandas observadas apresentaram mobilidade

cromatográfica compatível com o padrão de ácido α-linolênico, um dos principais ácidos graxos encontrados nos galactolipídeos de folhas verdes. Entretanto, a cromatografia em camada delgada não permite distinguir de maneira conclusiva os diferentes ácidos graxos presentes na amostra, como C18:3, C18:2 e C18:1. A identificação e quantificação individual desses compostos deverá ser realizada por técnicas de maior resolução, como cromatografia gasosa ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

A etapa seguinte consistiu na aplicação da enzima diretamente sobre as folhas de espinafre. Nesse sistema, os galactolipídeos permaneceram associados às membranas e aos demais componentes da biomassa vegetal. As folhas apresentaram inicialmente 32,2±2,6 mg/g de MGDG e 22,5±1,9 mg/g de DGDG, totalizando 54,7±3,3 mg de galactolipídeos por grama de biomassa. Após 24 horas de reação, foram obtidos 16,5±1,7 mg de ácidos graxos livres por grama de folhas.

Com base na quantidade inicial de MGDG e DGDG e nos produtos formados, foi estimada a liberação de aproximadamente 76,5% dos ácidos graxos derivados dos galactolipídeos após 4 horas e de 89,2% após 24 horas. Esses resultados demonstram que uma parcela elevada dos galactolipídeos permaneceu acessível à ação da enzima mesmo sem a extração prévia da fração lipídica.

Esse comportamento está de acordo com estudos recentes realizados diretamente sobre estruturas fotossintéticas. Sahaka et al. (2023) avaliaram a hidrólise de MGDG e DGDG por PLRP2 em micelas, extratos naturais e cloroplastos intactos de espinafre. Os autores observaram elevada liberação dos ácidos graxos mesmo quando os galactolipídeos permaneciam organizados nas membranas dos cloroplastos, demonstrando que essa estrutura não impede necessariamente o acesso da enzima às ligações éster.

Posteriormente, Amara et al. (2024) demonstraram que a PLRP2 de porquinho-da-índia e a cutinase de *Fusarium solani* também foram capazes de atuar diretamente sobre folhas e resíduos verdes, liberando os ácidos graxos presentes em MGDG e DGDG sem uma etapa anterior de extração lipídica. Esses resultados, juntamente com os obtidos para a enzima de *B. lata* BL02, mostram que os galactolipídeos presentes diretamente na biomassa vegetal podem constituir substratos acessíveis para diferentes galactolipases.

A liberação estimada de 89,2% após 24 horas mostra que a enzima de BL02 apresentou elevada conversão final dos ácidos graxos associados aos galactolipídeos. Entretanto, a reação ocorreu mais lentamente e utilizou maior quantidade de preparação enzimática do que os ensaios realizados com GPLRP2. Portanto, os valores de conversão final não devem ser utilizados isoladamente para concluir que as enzimas apresentam eficiência catalítica semelhante. Uma comparação direta exigiria normalização pela quantidade de proteína ativa, atividade específica, concentração de substrato e condições interfaciais utilizadas em cada sistema.

Os resultados obtidos com *Chlamydomonas reinhardtii* também reforçam a possibilidade de utilizar galactolipases diretamente sobre estruturas fotossintéticas. Fachini et al. (2025) observaram liberação de aproximadamente 93% dos ácidos graxos derivados dos galactolipídeos utilizando GPLRP2 diretamente sobre a biomassa da microalga. Nesse estudo, o ácido α-linolênico foi o principal ácido graxo liberado, e a presença de etanol também permitiu a formação de ésteres etílicos. Esses resultados mostram que a hidrólise direta dos galactolipídeos pode ser aplicada não apenas a folhas, mas também a outras biomassas ricas em membranas fotossintéticas.

Um aspecto importante observado nesse tipo de processo é a suscetibilidade dos ácidos graxos poli-insaturados à oxidação. Fachini et al. (2025) verificaram que, quando as enzimas endógenas da biomassa microalgal não foram previamente inativadas, ocorreu oxidação do ácido α-linolênico e formação de fitoprostanos após a lipólise. Neste sentido, o branqueamento utilizado no presente trabalho teve importância não apenas para reduzir a interferência das lipases endógenas, mas também para limitar possíveis transformações secundárias dos ácidos graxos liberados. Entretanto, a estabilidade oxidativa desses produtos durante a reação e o armazenamento ainda deverá ser avaliada em estudos específicos.

A atividade *in situ* também foi observada em folhas de capim e couve. No capim, a redução das bandas atribuídas aos galactolipídeos indicou o consumo desses compostos após a incubação com a enzima, enquanto na couve foram observadas bandas com mobilidade compatível com ácidos graxos livres já nos tempos iniciais da reação. Esses resultados mostram que a ação da

enzima de *B. lata* BL02 não ficou restrita ao espinafre e pode ocorrer em diferentes matrizes vegetais.

Entretanto, esses ensaios tiveram caráter qualitativo e não permitem comparar diretamente a eficiência da enzima entre espinafre, capim e couve. A intensidade das bandas cromatográficas pode ser influenciada pelo conteúdo inicial de galactolipídeos, pela composição lipídica de cada biomassa, pela presença de pigmentos e ceras e pela própria eficiência de extração dos produtos. Desta maneira, uma comparação quantitativa entre essas fontes vegetais deverá considerar o conteúdo inicial de MGDG e DGDG e a quantidade de ácidos graxos efetivamente liberados em relação ao total teoricamente disponível em cada matriz.

A manutenção da atividade no ensaio conduzido com 45 g de folhas de espinafre demonstrou que a reação continuou funcional após o aumento das quantidades de biomassa, meio reacional e preparação enzimática. Esse resultado é importante porque mostra que a atividade observada nos ensaios em pequena escala não foi perdida quando o sistema foi ampliado.

Porém, como a avaliação desse ensaio foi qualitativa, ainda não é possível afirmar que o aumento de escala ocorreu com manutenção do rendimento ou da produtividade. Para essa avaliação será necessário quantificar substratos e produtos, estabelecer o balanço de massa do processo e estudar aspectos como mistura, transferência de massa, carga enzimática, recuperação dos ácidos graxos e estabilidade dos produtos formados.

Em conjunto, os ensaios *ex situ* e *in situ* demonstraram que a galactolipase de *B. lata* BL02 é capaz de atuar tanto sobre galactolipídeos previamente extraídos quanto diretamente sobre os lipídios presentes nas membranas vegetais. A elevada liberação de ácidos graxos obtida diretamente das folhas de espinafre mostra que a etapa de extração lipídica antes da hidrólise enzimática pode, em princípio, ser eliminada. Essa possibilidade simplifica o processo e amplia o potencial de utilização de folhas e resíduos verdes como fontes de ácidos graxos. Entretanto, a aplicação prática ainda dependerá da redução da carga enzimática, da identificação e quantificação individual dos produtos, do controle da oxidação e do desenvolvimento de uma etapa eficiente de recuperação dos ácidos graxos da biomassa residual.

5.3. Identificação proteômica e modelagem estrutural preliminar da galactolipase

A análise proteômica representou um avanço na caracterização da enzima de *Burkholderia lata* BL02, até então baseada principalmente em suas propriedades bioquímicas e catalíticas. A análise por microUPLC-ESI-qTOF-MS forneceu fragmentos peptídicos com correspondência a hidrolases de ésteres do gênero *Burkholderia*, permitindo relacionar a proteína presente na preparação purificada a uma família de enzimas lipolíticas. Entretanto, a cobertura obtida foi parcial e não permitiu determinar a sequência completa da proteína.

Entre as proteínas utilizadas para comparação, a maior correspondência foi observada com uma triacilglicerol lipase de *B. lata* ATCC 17760, com 155 dos 364 resíduos representados pelos fragmentos identificados. Valores muito próximos foram obtidos para a triacilglicerol lipase de *B. cenocepacia* Bp9145, com 154/364 resíduos, e para uma colesterol esterase de *B. cepacia* GG4, com 153/364 resíduos.

A proximidade entre esses valores indica que a proteína de BL02 pertence provavelmente a uma família de hidrolases de ésteres relacionada às lipases de *Burkholderia*, mas não permite atribuir os fragmentos de forma inequívoca a uma única proteína. Esse aspecto é particularmente importante para enzimas lipolíticas, uma vez que proteínas com elevada similaridade de sequência podem apresentar diferenças importantes na especificidade de substrato e no comportamento interfacial (Bashiri; Curtis; Ofiteru, 2022). Desta maneira, a identificação obtida deve ser considerada em nível de família proteica até que a sequência completa do gene e da proteína seja determinada.

A partir dos fragmentos identificados e de proteínas homólogas, foi realizada a modelagem tridimensional preliminar da enzima. O modelo apresentou organização geral compatível com o dobramento α/β-hidrolase encontrado em diferentes lipases bacterianas. Esse resultado está de acordo com estruturas já determinadas para lipases relacionadas de *Burkholderia*, nas quais são observadas a tríade catalítica Ser-Asp-His e uma região móvel do tipo *lid*, relacionada ao acesso ao sítio catalítico (Kim et al., 1997).

Entretanto, como a sequência completa da enzima de BL02 ainda não está disponível, essas características não podem ser diretamente transferidas para a proteína estudada. O modelo permite visualizar uma organização

estrutural plausível para uma lipase relacionada às hidrolases de ésteres de *Burkholderia*, mas não permite definir com segurança a posição dos resíduos catalíticos, a conformação da região *lid* ou outras características específicas do sítio ativo.

Essa limitação é especialmente importante para compreender a atividade sobre MGDG e DGDG. Diferentemente dos triacilgliceróis, esses substratos apresentam uma região polar formada por um ou dois resíduos de galactose. Desta maneira, características relacionadas à abertura do sítio ativo, à região *lid* e à interação da superfície da enzima com a interface lipídica podem participar do reconhecimento desses substratos. Entretanto, os resultados obtidos até o momento não permitem identificar uma cavidade, região ou conjunto de resíduos especificamente responsável pela atividade galactolipásica.

Neste sentido, a principal contribuição da análise estrutural foi aproximar a enzima de BL02 das lipases/éster-hidrolases de *Burkholderia* e fornecer uma primeira referência para estudos posteriores de estrutura e função. A compatibilidade geral do modelo com lipases bacterianas está de acordo com a atividade observada sobre triacilgliceróis, enquanto a elevada atividade sobre MGDG e DGDG indica uma característica funcional que ainda precisa ser explicada em nível molecular.

A determinação da sequência completa deverá ser, portanto, o próximo passo para a identificação definitiva da enzima. A localização do gene correspondente aos peptídeos detectados permitirá sua clonagem e expressão heteróloga, possibilitando verificar se a proteína recombinante reproduz as atividades lipásica e galactolipásica observadas na preparação produzida por BL02. Essa confirmação também será importante para demonstrar que ambas as atividades são efetivamente atribuídas à mesma proteína.

Com a sequência completa e a atividade da proteína recombinante confirmadas, poderão ser realizados estudos mais detalhados envolvendo mutagênese dos resíduos catalíticos e das regiões relacionadas ao acesso do substrato, além de modelagem e dinâmica molecular na presença de MGDG e DGDG. Esses experimentos poderão ajudar a identificar as características responsáveis pelo reconhecimento dos galactolipídeos e compreender por que a enzima de BL02 apresenta atividade elevada sobre esses substratos.

Assim, embora a análise proteômica ainda não tenha permitido estabelecer a identidade molecular completa da galactolipase, os fragmentos obtidos relacionaram a proteína a uma família de hidrolases de ésteres de *Burkholderia*. A modelagem forneceu uma primeira referência estrutural, mas a relação entre estrutura e atividade galactolipásica dependerá da identificação completa da proteína e de sua posterior caracterização molecular.

5.4. Potencial de integração em biorrefinarias e desafios para a recuperação de ácidos graxos poli-insaturados

A proposta deste trabalho foi utilizar uma galactolipase microbiana para acessar a fração lipídica presente nas membranas da biomassa vegetal. Diferentemente dos triacilgliceróis acumulados em sementes oleaginosas, MGDG e DGDG encontram-se distribuídos nos tecidos fotossintéticos em concentrações da ordem de miligramas por grama de biomassa, dificultando sua recuperação por prensagem ou por outros processos físicos convencionais. Neste sentido, a hidrólise enzimática pode representar uma alternativa para liberar os ácidos graxos esterificados nesses galactolipídeos e permitir seu posterior aproveitamento.

Os resultados obtidos demonstraram a primeira etapa dessa proposta. A enzima de *Burkholderia lata* BL02 hidrolisou MGDG e DGDG previamente extraídos e também atuou diretamente sobre os galactolipídeos presentes nas folhas. No espinafre, foi estimada a liberação de 76,5% dos ácidos graxos derivados dos galactolipídeos nos tempos iniciais da reação e de 89,2% após 24 horas. Além disso, a formação de ácidos graxos livres foi mantida no ensaio realizado com 45 g de folhas e 5 g da preparação enzimática.

Resultados semelhantes foram descritos por Amara et al. (2024), que demonstraram a hidrólise direta de MGDG e DGDG presentes em folhas e resíduos verdes, sem necessidade de extração prévia da fração lipídica. Os autores também mostraram que, na presença de etanol, os ácidos graxos provenientes dos galactolipídeos podem ser convertidos em ésteres alquílicos. Desta maneira, a ação direta de galactolipases sobre a biomassa abre a possibilidade de combinar a liberação e a posterior conversão desses ácidos graxos em um mesmo processo.

Fachini et al. (2025) obtiveram resultado semelhante utilizando células integrais de *Chlamydomonas reinhardtii*, com liberação de até 93% dos ácidos graxos derivados dos galactolipídeos. Nesse caso, o ácido α-linolênico foi identificado como o principal produto, e foi demonstrada a formação de ésteres etílicos. Esses resultados ampliam a possibilidade de aplicação das galactolipases para diferentes tipos de biomassa fotossintética, incluindo folhas, resíduos verdes e microalgas.

Entretanto, a liberação dos ácidos graxos também cria um desafio importante relacionado à sua estabilidade. Os ácidos graxos poli-insaturados são particularmente suscetíveis à oxidação devido à presença de múltiplas ligações duplas. Quando esterificados nos galactolipídeos, esses compostos permanecem organizados nas membranas; após a hidrólise, tornam-se mais expostos ao oxigênio, à luz, à temperatura e a outros fatores capazes de promover sua oxidação.

Neste sentido, o branqueamento utilizado antes das reações teve a função de inativar enzimas endógenas e reduziu a formação de ácidos graxos livres nos controles sem adição da galactolipase. Esse tratamento também pode contribuir para diminuir transformações secundárias dos produtos liberados. Porém, a estabilidade dos ácidos graxos após a hidrólise ainda precisa ser avaliada, principalmente quando o objetivo for a recuperação de uma fração rica em ácidos graxos poli-insaturados.

Desta maneira, a hidrólise deverá ser associada a uma etapa rápida de recuperação e estabilização dos produtos. Estratégias como redução da exposição ao oxigênio e à luz, controle da temperatura e utilização de agentes antioxidantes ou quelantes poderão ser avaliadas de acordo com a aplicação pretendida. Produtos destinados às áreas nutricional, oleoquímica ou energética apresentam exigências diferentes de pureza, estabilidade e processamento, e essas características deverão orientar as etapas posteriores de recuperação.

Outra possibilidade é a conversão dos ácidos graxos em ésteres alquílicos ainda durante o processo. No presente trabalho, a formação desses produtos foi observada qualitativamente nas reações de alcoólise, demonstrando que a enzima de BL02 também apresenta capacidade para essa conversão. Entretanto, ainda será necessário determinar a conversão, a composição e o

rendimento de recuperação dos ésteres formados antes de avaliar as vantagens dessa estratégia em relação à recuperação direta dos ácidos graxos livres.

A escolha entre a recuperação dos ácidos graxos livres e sua conversão em ésteres dependerá principalmente da finalidade do produto. No caso de aplicações nutricionais ou oleoquímicas, será necessário identificar e quantificar individualmente os ácidos graxos liberados e estabelecer procedimentos adequados de purificação e estabilização. Para aplicações envolvendo ésteres alquílicos, a conversão enzimática pode facilitar etapas posteriores de separação e transformação química. Entretanto, considerando o baixo conteúdo lipídico por unidade de biomassa, a utilização dessa fração exclusivamente para produção de combustível provavelmente não representa a aplicação de maior valor para o processo.

Por esse motivo, a aplicação da galactolipase parece mais interessante quando integrada a uma biorrefinaria de biomassa verde. Nesse conceito, folhas, gramíneas e resíduos agrícolas podem ser fracionados para obtenção de diferentes produtos, incluindo proteínas, carboidratos, fibras, pigmentos, lipídios e outras moléculas de interesse. O aproveitamento de várias frações da biomassa permite distribuir os custos de processamento e agregar valor a componentes que normalmente seriam pouco explorados isoladamente.

Neste contexto, a galactolipase de *B. lata* BL02 poderia participar inicialmente da recuperação da fração lipídica das membranas vegetais. A remoção desses lipídios também pode contribuir para modificar a organização das membranas e favorecer o acesso de outras enzimas aos componentes da biomassa, embora esse efeito precise ser avaliado especificamente dentro de um processo integrado. Além disso, a atividade sintética já observada para preparações dessa enzima amplia as possibilidades de aproveitamento dos produtos gerados a partir das diferentes frações vegetais.

Assim, este trabalho demonstrou a liberação enzimática dos ácidos graxos presentes nos galactolipídeos da biomassa vegetal e mostrou que essa reação pode ser realizada sem uma etapa prévia de extração dos lipídios. Entretanto, a obtenção de uma fração de ácidos graxos poli-insaturados purificada e estável ainda dependerá da identificação e quantificação individual dos produtos, da redução da carga enzimática, do controle da oxidação, do desenvolvimento de métodos eficientes de recuperação e da integração dessa

etapa com o aproveitamento das demais frações da biomassa. Esses pontos representam os principais passos para avançar da prova de conceito demonstrada neste trabalho para uma aplicação integrada em biorrefinaria.

6. CONCLUSÃO

A lipase/galactolipase produzida por *Burkholderia lata* BL02 apresentou amplo perfil catalítico, com atividade sobre ésteres sintéticos, triacilgliceróis, óleos naturais e galactolipídeos. A elevada atividade sobre MGDG e DGDG confirmou sua atividade galactolipásica e diferenciou essa preparação de diversas lipases microbianas que apresentam baixa ou nenhuma atividade sobre esses substratos.

A enzima foi capaz de hidrolisar os galactolipídeos previamente extraídos das folhas de espinafre, promovendo o consumo de MGDG e DGDG e a formação de ácidos graxos livres. Mais importante, essa atividade foi mantida quando a enzima foi aplicada diretamente sobre a biomassa vegetal. Nas folhas de espinafre, foi estimada a liberação de 89,2% dos ácidos graxos derivados dos galactolipídeos após 24 horas de reação, demonstrando que uma parcela elevada desses lipídios pode ser acessada sem uma etapa prévia de extração.

A atividade também foi observada diretamente em folhas de capim e couve, mostrando que a aplicação da enzima não ficou restrita ao espinafre. Além disso, a formação de ácidos graxos livres foi mantida quando a reação foi conduzida com 45 g de folhas de espinafre, indicando que o aumento das quantidades de biomassa e preparação enzimática não impediu a ocorrência da hidrólise. Entretanto, como esses experimentos foram predominantemente qualitativos, ainda são necessários estudos quantitativos para determinar rendimento, produtividade, recuperação dos produtos e os efeitos da ampliação do sistema reacional.

A análise proteômica associou a proteína presente na preparação purificada a uma hidrolase de ésteres relacionada às lipases de *Burkholderia*. Entretanto, a cobertura parcial obtida ainda não permite estabelecer definitivamente a identidade molecular da enzima ou explicar as características estruturais responsáveis por sua atividade sobre MGDG e DGDG. A identificação do gene, o sequenciamento completo da proteína e sua expressão recombinante serão importantes para confirmar que as atividades lipásica e galactolipásica

estão associadas à mesma proteína e permitir estudos posteriores de estrutura e função.

Os resultados também demonstraram a formação de uma fração de ácidos graxos livres a partir dos galactolipídeos da biomassa vegetal. Entretanto, os métodos utilizados neste trabalho não permitiram identificar e quantificar individualmente os ácidos graxos poli-insaturados presentes nessa fração. Desta maneira, análises por cromatografia gasosa ou técnicas acopladas à espectrometria de massas serão necessárias para determinar sua composição e confirmar o potencial de recuperação de ácidos graxos específicos.

Em conjunto, os resultados demonstram o potencial da galactolipase de *B. lata* BL02 para o aproveitamento da fração lipídica presente em biomassas vegetais. A possibilidade de promover a hidrólise diretamente sobre folhas, sem extração prévia dos galactolipídeos, representa uma alternativa para integrar essa enzima a processos de valorização de biomassas verdes. O avanço dessa aplicação dependerá principalmente da identificação dos ácidos graxos liberados, da redução da carga enzimática, da otimização da produção e recuperação da enzima, do controle da oxidação e do desenvolvimento de métodos eficientes para recuperação dos produtos. Desta maneira, o trabalho estabelece uma base para o desenvolvimento de processos integrados de biorrefinaria voltados ao aproveitamento de uma fração lipídica vegetal ainda pouco explorada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARA, S. et al. Lipolysis of natural long chain and synthetic medium chain galactolipids by pancreatic lipase-related protein 2. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1801, n. 4, p. 508–516, 2010. DOI: 10.1016/j.bbalip.2010.01.003.

AMARA, S. et al. The galactolipase activity of some microbial lipases and pancreatic enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, n. 4, p. 442–451, 2013. DOI: 10.1002/ejlt.201300004.

AMARA, S. et al. Using enzymes to harvest fatty acids from galactosyldiacylglycerols, the most abundant lipids in plant biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 12, n. 10, p. 4103–4113, 2024. DOI: 10.1021/acssuschemeng.3c07439.

BASHIRI, R.; CURTIS, T. P.; OFIŢERU, I. D. The limitations of the current protein classification tools in identifying lipolytic features in putative bacterial lipase sequences. *Journal of Biotechnology*, v. 351, p. 30–37, 2022. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.04.011.

BELHAJ, I. et al. Galactolipase activity of *Talaromyces thermophilus* lipase on galactolipid micelles, monomolecular films and UV-absorbing surface-coated substrate. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1863, n. 9, p. 1006–1015, 2018. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.05.016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

CONTATO, A. G.; PASIN, T. M.; POLIZELI, M. L. T. M. Microbial enzymes for biomass conversion. *Annual Review of Microbiology*, v. 79, n. 1, p. 663–683, 2025. DOI: 10.1146/annurev-micro-051524-025214.

DÖRMANN, P.; BENNING, C. Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science*, v. 7, n. 3, p. 112–118, 2002. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02216-6.

FACHINI, B. R. et al. Digestion and bioconversion of microalgal galactolipids by direct action of lipolytic enzymes on *Chlamydomonas reinhardtii* biomass. *Algal Research*, v. 90, art. 104121, 2025. DOI: 10.1016/j.algal.2025.104121.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5.

HÖLZL, G.; DÖRMANN, P. Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. *Progress in Lipid Research*, v. 46, n. 5, p. 225–243, 2007. DOI: 10.1016/j.plipres.2007.05.001.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01195-0.

JALLOULI, R. et al. The galactolipase activity of *Fusarium solani* (phospho)lipase. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1851, n. 3, p. 282–289, 2015. DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.12.010.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.

KIM, K. K. et al. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, v. 5, n. 2, p. 173–185, 1997. DOI: 10.1016/S0969-2126(97)00177-9.

LYU, J.; GAO, R.; GUO, Z. Galactosyldiacylglycerols: from a photosynthesis-associated apparatus to structure-defined *in vitro* assembling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 32, p. 8910–8928, 2021. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c00204.

NITENBERG, M. et al. Mechanism of activation of plant monogalactosyldiacylglycerol synthase 1 — MGD1 — by phosphatidylglycerol. *Glycobiology*, v. 30, n. 6, p. 396–406, 2020. DOI: 10.1093/glycob/cwz106.

OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, R. É.; LOIOLA, L. E. A.; NASCIMENTO, V. M. G. Overproduction and properties of lipase by a wild strain of *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 using chicken fat. *Annals of Microbiology*, v. 65, n. 2, p. 865–877, 2015. DOI: 10.1007/s13213-014-0928-6.

OLIVEIRA, B. H.; BOURLIEU, C.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P.; NASCIMENTO, V. M. G. Lipolysis of *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 lipase in simulated human digestive environments: a candidate for enzyme replacement therapy. *Food Bioscience*, v. 58, art. 103737, 2024. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.103737.

OLIVEIRA, B. H.; NASCIMENTO, V. M. G.; POLIZELI, M. L. T. M. *Burkholderia lata* BL02 galactolipase as an important biocatalyst for plant biomass deconstruction and sugar ester synthesis. *Preprints.org*, versão 1, 2026. DOI: 10.20944/preprints202604.2227.v1.

SAHAKA, M. et al. The digestion of galactolipids and its ubiquitous function in Nature for the uptake of the essential α-linolenic acid. *Food & Function*, v. 11, p. 6710–6744, 2020. DOI: 10.1039/D0FO01040E.

SAHAKA, M. et al. *In situ* monitoring of galactolipid digestion by infrared spectroscopy in both model micelles and spinach chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 252, art. 105291, 2023. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2023.105291.

TERWILLIGER, T. C. et al. AlphaFold predictions are valuable hypotheses and accelerate but do not replace experimental structure determination. *Nature Methods*, v. 21, p. 110–116, 2024. DOI: 10.1038/s41592-023-02087-4.

8. ORIENTAÇÕES

Durante o período de realização do pós-doutorado, foram desenvolvidas atividades de orientação e coorientação de alunos de graduação, conforme descrito a seguir.

8.1. Orientações de alunos de graduação

Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Artur Cavallante Melaré

Título: “Hidrólise de biomassa vegetal utilizando galactolipase de *Burkholderia lata* BL02 para obtenção de ácidos graxos poli-insaturados”.

Luiza Pobbe de Carvalho

Título: “Ligação seletiva da lipase de *Burkholderia lata* BL02 em matrizes celulósicas e avaliação da eficiência de diferentes solventes na sua recuperação”.

9. DISCIPLINAS MINISTRADAS COM A RESPECTIVA CARGA HORÁRIA E/OU A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE EXTENSÃO.

Durante o período de realização do pós-doutorado, não foram ministradas disciplinas sob responsabilidade formal do pesquisador, nem foram desenvolvidas atividades de extensão vinculadas diretamente ao projeto de pós-doutorado.

DECLARAÇÃO DE REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE PESQUISA

DECLARAMOS, para os devidos fins, que o Pós-Doutorando BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA:

Colaborou na orientação de projetos de Iniciação Científica/TCC de ARTUR CAVALANTE MELARÉ, aluno do Curso de ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS, projeto HIDRÓLISE DE BIOMASSA VEGETAL UTILIZANDO GALACTOLIPASE DE *Burkholderia lata* LBBIO BL02 durante o ano de 2024.

DECLARAMOS, também, estar cientes do que estabelece a Resolução UNESP nº 12/2022.

São José do Rio Preto, 04/02/2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA
Data: 04/02/2025 09:56:00-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Dr. BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA
PÓS-DOUTORANDO

Documento assinado digitalmente
gov.br GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ
Data: 04/02/2025 10:43:27-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Prof. Dr. GUSTAVO O. BONILLA RODRIGUEZ
SUPERVISOR

Documento assinado digitalmente
gov.br VALERIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO
Data: 05/02/2025 08:47:36-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Prof.ª. Dr.ª VALÉRIA M. GOMES DO NASCIMENTO
SUPERVISORA DA ATIVIDADE DE PESQUISA

Documento assinado digitalmente
gov.br PITAGORAS DA CONCEICAO BISPO
Data: 12/02/2025 17:10:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Prof. Dr. PITÁGORAS DA C. BISPO
CHEFE DO DPTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNESP/ASSIS

DECLARAÇÃO DE REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE PESQUISA

DECLARAMOS, para os devidos fins, que o Pós-Doutorando BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA:

Colaborou na orientação de projetos de Iniciação Científica/TCC de LUIZA POBBE DE CARVALHO, alunA do Curso de ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS, projeto PURIFICAÇÃO DE LIPASE DE *burkholderia lata* BL02 POR MÉTODO ALTERNATIVO UTILIZANDO CELULOSE EM MÉTODO NÃO CONVENCIONAL durante o ano de 2024.

DECLARAMOS, também, estar cientes do que estabelece a Resolução UNESP nº 12/2022.

São José do Rio Preto, 04/02/2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA
Data: 04/02/2025 09:56:00-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dr. BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA
PÓS-DOUTORANDO

Documento assinado digitalmente
gov.br GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ
Data: 04/02/2025 10:47:11-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. GUSTAVO O. BONILLA RODRIGUEZ
SUPERVISOR

Documento assinado digitalmente
gov.br VALERIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO
Data: 05/02/2025 08:47:36-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª. Dr.ª VALÉRIA M. GOMES DO NASCIMENTO
SUPERVISORA DA ATIVIDADE DE PESQUISA

Documento assinado digitalmente
gov.br PITAGORAS DA CONCEICAO BISPO
Data: 12/02/2025 17:10:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. PITÁGORAS DA C. BISPO
CHEFE DO DPTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNESP/ASSIS

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

cirad
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT

Montpellier, August 3, 2025

CERTIFICATE

To whom it may concern,

It is with great pleasure that I formally certify that Dr. Bruno De Oliveira has been welcomed into our research team as part of the EXPLORE #7 international mobility support, of the I-SITE Excellence Program at the University of Montpellier.

The purpose was to implement the project untitled "Use of Galactolipase for Obtaining Polyunsaturated Fatty Acids from Plant Biomass".

During his stay (from June 22, departure from Sao Paulo, to July 27, return from Montpellier) Dr. De Oliveira has characterized the galactolipase activity of an enzyme produced by the bacterium *Burkholderia lata*. The enzyme activity has been assessed both *in situ*, *i.e* on spinach leaves and *ex situ* on a galactolipid extract (from spinach leaves). The conversion of galactolipids and the release of fatty acids by hydrolysis or fatty acid esters by transesterification in the presence of alcohol, were kinetically monitored by High-performance-thin-layer chromatography (HPTLC) and quantified by densitometry using pure standards.

The results obtained should prove to be a useful addition to the existing body of knowledge concerning the potential of this enzyme. This collaborative effort, initiated in 2016, has already resulted in the joint publication of two articles and should continue in the future.



Dr. Jérôme LECOMTE, PhD, Habil.
Senior Scientist, CIRAD
Joint Research Unit QUALISUD, Team 1