

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE
TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“OBTENÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE QUITINASES
RECOMBINANTES
DA FORMIGA *Atta Sexdens*”**

Katia Celina Santos Corrêa *

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA

Orientador(a): Dulce Helena Ferreira de Souza

*** Bolsista CNPq**

**São Carlos – SP
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Katia Celina Santos Corrêa, realizada em 21/08/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur (UFSCar)

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (UFC)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Marcos David Ferreira (EMBRAPA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“Aprenda com o passado, viva o presente e tenha esperança para o futuro. A coisa importante é nunca parar de se fazer perguntas”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e incentivo e em especial ao José Correa por toda paciência, e por estar sempre ao meu lado sendo nas boas e nas mais complicadas situações, não há dúvidas que você sempre será o meu porto seguro.

À Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, pela orientação, confiança e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago pela colaboração com os experimentos realizados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Embrapa Instrumentação Agropecuária.

Ao Dr. Vinícius Marquioni pela ajuda com experimentos e pelas discussões.

Ao Dr. William Marcondes e Dr. Filipe Habitzreuter pela colaboração nos estudos da morfologia das quitinas (RMN ^{13}C , DRX, Viscosimetria).

Ao Dr. Gabriel Henrique pela colaboração nos estudos de RMN ^1H

Aos meus colegas de trabalho pelas contribuições, convivência e aprendizado, e em especial a Larissa e o Lullie por serem grandes parceiros.

Aos meus amigos Jhony, Jocely e Fabia pelos encontros comemorativos para alegrar a vida nos momentos mais pesados.

Às secretárias da Pós-Graduação por toda atenção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar pela oportunidade oferecida.

Ao órgão financiador CNPq pelo suporte financeiro processo 141421/2020-6.

LISTA DE ABREVIATURAS

BMGY: *Buffered Glycerol-complex Medium*

BMMY: *Buffered Methanol-complex Medium*

BSA soro albumina bovino (*bovine serum albumin*)

cDNA: DNA complementar a um mRNA

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxiribonucleic acid*)

dNTP: Desoxinucleosídeos trifosfatos

E. coli: *Escherichia coli*

g: Unidade de força rotocentrífuga (gravidade)

kb: Kilobase

kDa: Kilodalton(s), unidade de massa molecular

LC: Cromatografia Líquida

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

ng: Nanograma

nm: nanômetro (unidade de medida correspondente a 10⁻⁹ metros)

Ni-NTA: Ácido Nitriliacético carregado com íons níquel

ORF: Fase de leitura aberta (*Open Reading Frame*)

pb: Pares de bases

pH: Potencial de hidrogênio

SDS: Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

YEPD: *yeast extract peptone dextrose*

YEPDS: *sorbitol yeast extract peptonedextrose sorbitol*

YNB: *Yeast Nitrogen Base*

LB: Luria Bertanié

CAD: Catalytic domain

CBM: Carbohydrate-binding module

GlcNAc: N-acetil-glucosamine

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados para obtenção das ORFs.....	21
TABELA 5.1 mostra as características de cada enzima, incluindo a atividade específica, avaliada nas melhores condições de pH e temperatura tendo como substrato a α -quitina coloidal.....	64
TABELA 6.1. Atribuições dos sinais nos espectros de RMN de ^1H	80
TABELA 6.2. Resultados de viscosimetria capilar para o meio reacional da enzima frente às diferentes quitinas.....	82
TABELA 6.3. Resultados de cristalinidade obtidos por RMN e DRX.....	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura da quitina, um polissacarídeo formado pela ligação β -(1-4) de monômeros de NAcGlc.....	2
FIGURA 1.2 - Ilustração dos três tipos da quitina.....	3
FIGURA 1.3 - Distribuição diversa, classificação, arquitetura do domínio e função das quitinases GH18.....	7
FIGURA 1.4 – Mecanismo de ação proposta comentada no texto.....	8
FIGURA 1.5 - Arquitetura do domínio das quitinases em insetos.....	13
FIGURA 1.6 - Arquitetura de uma sequência predita de quitinase da formiga cortadeira <i>A. echinator</i> (gi 746868993 ref XP_011065639.1).....	16
FIGURA 1.7 - Arquitetura de uma sequência predita de quitinase da formiga cortadeira <i>A. echinator</i>	17
FIGURA 2.1 Ilustração esquemática.....	18
FIGURA 2.2 Ilustração esquemática.....	19
FIGURA 3.1 – Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação dos genes.....	24
FIGURA 3.2 - Esquema do vetor de clonagem pPICZ α ligado aos três fragmentos amplificados.....	27
Figura 5.1 - Arquitetura de domínio da quitinase grupo II da formiga cortadeira <i>Acromyrmex echinator</i> e as cadeias polipeptídicas de <i>A. sexdens</i>	46
Figura 5.2 - Análise em gel de agarose 1 % do RNA total extraído de <i>A. sexdens</i> - Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific).....	47
FIGURA 5.3 – Análise em gel de agarose 1% dos fragmentos de DNA amplificados por PCR.....	48
FIGURA 5.4 - Análise em gel de agarose da reação de digestão enzimática dos clones.....	49
FIGURA 5.5 - Análise em gel de agarose da reação de digestão dos clones.....	49

FIGURA 5.6 – Arquitetura e sequência dos aminoácidos da AsChtII-C2B3.....	52
FIGURA 5.7 - Arquitetura e sequência dos aminoácidos da AsChtII-C3C4.....	54
FIGURA 5.8 - Arquitetura e sequência dos aminoácidos da AsChtII-C5B1.....	56
FIGURA 5.9 – Análise em SDS-PAGE do processo de purificação da AsChtII-C2B3.	58
FIGURA 5.10 - Análise em SDS-PAGE do processo de purificação da AsChtII-C3C4.	59
FIGURA 5.11 - Análise em SDS-PAGE do processo de purificação da AsChtII-C5B1.	60
FIGURA 5.12 - Espectros de RMN ¹ H das amostras coletadas da reação enzimática das quitinases AsChtII-C2B3(A), AsChtII-C3C4 (B) e AsChtII-C5B1 (C) frente ao substrato coloidal da α-quitina.....	61
FIGURA 5.13 - Efeito do pH na atividade das enzimas AsChtII-C2B3, AsChtII-C5B1 e AsChtII-C3C4.....	62
FIGURA 5.14 - Efeito da temperatura na (A) atividade enzimática das proteínas e (B) estabilidade térmica.....	64
FIGURA 5.15 – Interferência da AsChtII-C5B1 no crescimento de <i>C. albicans</i> na presença e ausência de CFW.....	67
FIGURA 5.16 – Interferência da AsChtII-C2B3 no crescimento de <i>C. albicans</i> na presença e ausência de CFW.....	68
FIGURA 5.17 – Interferência da AsChtII-C3C4 no crescimento de <i>C. albicans</i> na presença e ausência de CFW.....	68
FIGURA 5.18 – Melhores resultados de interferência das três enzimas no crescimento de <i>C. albicans</i>	69
FIGURA 5.19 -. Identidade sequencial entre os domínios catalíticos das enzimas.....	71
FIGURA 5.20- Alinhamento entre os domínios catalíticos das 3 enzimas.....	71
FIGURA 5.21 – Interferência no crescimento do fungo <i>A. fumigatus</i> pelas quitinases recombinantes.	73
FIGURA 5.22 – Interferência no crescimento do fungo <i>A. fumigatus</i> na presença da combinação entre as quitinases recombinantes.....	74

FIGURA 5.23 - Crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> A e B <i>L. theobromae</i> tratado com Amphotericin e C - Crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> na presença da enzima AsChtII-C2B3	77
FIGURA 5.24- Morfologia das hifas do fungo <i>L. theobromae</i> capturadas por MEV	79
FIGURA 6.1 – Espectros de RMN ^1H das amostras da reação da AsChtII-C4B1 sobre α -quitina e β -quitina coloidal	79
FIGURA 6.2 – Estrutura química N-acetilglicosamina	80
FIGURA 6.3 - Espectros de RMN ^{13}C para as amostras de BQ425	83
FIGURA 6.4 - Espectros de RMN de ^{13}C para as amostras BQ125	84
FIGURA 6.5 - Espectros de RMN de ^{13}C para as amostras QSigma	84
FIGURA 6.6 - Padrões de difração de raios X par as amostras BQ125	85
FIGURA 6.7 - Padrões de difração de raios X para as amostras BQ425	86
FIGURA 6.8 - Padrões de difração de raios X para as amostras QSigma	86
FIGURA 6.9 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da BQ125	89
FIGURA 6.10 – Microscopia eletrônica de varredura (FEG) da BQ425 e AQ coloidal	89
FIGURA 6.11- Porcentagem de proteína ligada ao substrato β -quitina, α -quitina coloidal e β -quitina, α -quitina solida, variando o tempo de incubação a 55°C	91
FIGURA 6.12 - Efeito da temperatura a 28 ° C da AsChtII-C4B1 frente ao substrato α -quitina coloidal variando o tempo de incubação e a estabilidade térmica da enzima na mesma temperatura	92
FIGURA 6.13 Avaliação da atividade da enzima no crescimento do fungo <i>L. theobromae</i> em meio sólido	93
FIGURA 6.14 - Avaliação da atividade da AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo em meio líquido	94
Figura 6.15 – Avaliação da massa dos micélios do fungo após ação da enzima	95
FIGURA 6.16 - Avaliação do efeito da AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo em meio solido e liquido	96
FIGURA 6.17- Alterações morfológicas sobre as hifas do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> sob ação da enzima, capturadas por MEV	97

RESUMO

OBTENÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE QUITINASES RECOMBINANTES DA FORMIGA *Atta sexdens*. As quitinases catalisam a clivagem da ligação β -1,4 de quitina, polissacarídeo produzido por diversos organismos incluindo insetos. Do ponto de vista biotecnológico essas enzimas têm potencial aplicação na área médica e em controle biológico. Apesar da importância, quitinases de insetos têm sido pouco estudadas. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar três quitinases recombinantes da formiga cortadeira *Atta sexdens*, contendo diferentes domínios catalíticos (C) e sítios de ligação à quitina, CBM (B). *A. sexdens* não tem ainda o genoma conhecido, mas a partir do genoma de *Acromyrmex echinatior*, também uma cortadeira, foram desenhados *primers* e foi possível amplificar DNA a partir de cDNA da *A. sexdens* que foram clonados no vetor pPICZ α A sendo as proteínas expressas em *Pichia pastoris*. As enzimas, chamadas AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1, apresentaram pH ótimo entre 4-5 e maiores atividades a 50 °C frente à quitina coloidal como substrato. Atividades específicas avaliadas mostraram que a presença do CBM não interfere na atividade tendo a AsChtII-C3C4, que não contém sítio de ligação à quitina, a maior atividade em quitina coloidal. As três enzimas foram avaliadas quanto à atividade fungicida usando *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, fungos patógenos humanos, como modelos. A enzima AsChtII-C5B1 inibiu o crescimento de *C. albicans* em 87,6% (a 150 ug/mL) e AsChtII-C2B3 e AsChtII-C3C4 inibiram em 61% e 54,5%, respectivamente, a 50 ug/mL. AsChtII-C2B3 e AsChtII-C5B1 inibiram o crescimento de *A. fumigatus* em 66% e 61%, a 50 ug/mL. Já a enzima AsChtII-C3C4, que não apresenta CBM, inibiu em 60% o crescimento do fungo a 25 μ g/mL. Outro objetivo do trabalho foi caracterizar uma quitinase recombinante anteriormente obtida, AsChtII-C4B1, frente à α -quitina e β -quitina, utilizando uma combinação de técnicas como ^{13}C RMN, difração de raios X, análise de viscosidade e MEV-FEG. α -quitina é constituinte da parede celular de fungos e do exoesqueleto de crustáceos e a β -quitina é encontrada em gládios de lulas. Os resultados obtidos mostraram que a AsChtII-C4B1 é capaz de hidrolisar α - e β -quitina, mostrando o potencial biotecnológico da enzima, podendo ser vislumbrado seu uso como fungicida, inseticida e na obtenção de quitosana a partir de cascas de caranguejo e camarão, por exemplo. Assim, foi avaliada a interferência da AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae*. O atraso no desenvolvimento dos micélios com modificações visuais nas hifas levou à análise por microscopia eletrônica de varredura, SEM, das mesmas, que mostrou que o tratamento com AsChtII-C4B1 provocou modificações importantes como enrugamento, arredondamento das bordas e buracos na superfície das hifas. Juntos o conjunto de dados obtidos nas diferentes abordagens do presente estudo mostraram que as proteínas recombinantes obtidas atuam sobre diferentes tipos de quitina e apresentam grande potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Quitinases; inseto; fungos; quitina, parede celular

ABSTRACT

OBTAINMENT AND BIOLOGICAL APPLICATION OF RECOMBINANT CHITININASES FROM THE ANT *Atta sexdens*. Chitinases catalyze the cleavage of the β -1,4 bond of chitin, a polysaccharide produced by several organisms including insects. From a biotechnological point of view, these enzymes have potential application in the medical field and in biological control. Despite their importance, insect chitinases have been little studied. The objective of this work was to obtain and characterize three recombinant chitinases from the leaf-cutter ant *Atta sexdens*, containing different catalytic domains (C) and chitin-binding sites, CBM (B). *A. sexdens* does not have a known genome, as yet, but from the genome of *Acromyrmex echinator*, also a leafcutter, primers were designed and it was possible to amplify DNA from *A. sexdens* cDNA that were cloned into the pPICZ α A vector, to proteins being expressed in *Pichia pastoris*. The enzymes, called AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 and AsChtII-C5B1, presented an optimum pH between 4-5 and greater activities at 50 °C using a colloidal chitin as a substrate. Specific activities evaluated showed that the presence of CBM does not interfere with the activity, the AsChtII-C3C4, which does not contain a chitin binding site, having the highest activity in colloidal chitin. The three enzymes were evaluated for fungicidal activity using *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*, human fungal pathogens, as models. The enzyme AsChtII-C5B1 inhibited the growth of *C.albicans* by 87.6% (at 150 ug/mL) and AsChtII-C2B3 and AsChtII-C3C4 inhibited it by 61% and 54.5%, respectively, at 50 ug/mL. AsChtII-C2B3 and AsChtII-C5B1 inhibited the growth of *A. fumigatus* by 66% and 61% at 50 ug/mL. The enzyme AsChtII-C3C4, which does not present CBM, inhibited the growth of the fungus by 60% at 25 μ g/mL. Another objective of the work was to characterize a previously obtained recombinant chitinase, AsChtII-C4B1, against α -chitin and β -chitin, using a combination of techniques such as 13 C NMR, X-ray diffraction, viscosity analysis and SEM-FEG. α -chitin is a constituent of the cell wall of fungi and the exoskeleton of crustaceans and β -chitin is found in squid gladia. The results obtained showed that AsChtII-C4B1 is capable of hydrolyzing α - and β -chitin, showing the biotechnological potential of the enzyme, with its use as a fungicide, insecticide and in obtaining chitosan from crab and shrimp shells being seen, for example. Thus, the interference of AsChtII-C4B1 in the growth of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae* was evaluated. The delay in the development of mycelia with visual changes in the hyphae led to analysis by scanning electron microscopy, SEM, of the same, which showed that treatment with AsChtII -C4B1 caused important changes such as wrinkling, rounding of the edges and holes on the surface of the hyphae. Together, the set of data obtained from the different approaches of the present study showed that the recombinant proteins obtained act on different types of chitin and have great biotechnological potential.

Keywords: Chitinases; fungi; chitin, cell wall

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1	
1.1 Quitina.....	1
1.2 Da extração à métodos de despolimerização do polímero da quitina	4
1.3 Quitinases	6
1.4 Quitinases na agricultura e na indústria biotecnológica	9
1.5 Quitinases de insetos	11
1.6 Formigas cortadeiras: O contexto do projeto	15
2 OBJETIVOS.....	18
3 METODOLOGIA - Parte I.....	20
3.1 Material biológico.....	20
3.1.1 Síntese dos Oligonucleotídeos.....	20
3.1.2 Extração de RNA de <i>A. sexdens</i> e a síntese de cDNA	21
3.1.3 Amplificação das sequências codificadoras das quitinases AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1	23
3.1.4 Clonagem dos DNAs AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1 no vetor pJET 1.2.....	24
3.1.5 Sub clonagem dos DNAs no vetor pPICZ α	25
3.1.6 Transformação dos clones pPICZ α _C2B3, pPICZ α _C3C4 e pPICZ α _C5B1 na linhagem <i>Pichia pastoris</i> KM71H ^(Mut^S) eletro competentes	27
3.1.7 Expressão das proteínas recombinantes AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1 em <i>P. pastoris</i>	30
3.1.8 Purificação das quitinases AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1	31
3.1.9 Atividade enzimática das quitinases.....	31
3.1.10 Determinação de pH e temperatura ótimos das quitinases	32
3.1.11 Termo estabilidade Enzimática.....	33
3.1.12 Atividade antifúngica.....	33
4 METODOLOGIA- Parte II.....	36
4.1 Estudos morfológicos da estrutura α -quitina e β -quitina sob a ação da quitinase AsChtII-C4B1	36
4.2 Preparo das amostras para análises por RMN.....	37
4.2.1 Análise das quitinas após reação com AsChtII-C4B1 por RMN	37

4.2.2	Processamento espectral e quantificação do composto	38
4.3	Análise de microscopia eletrônica dos substratos após a reação com a enzima AsChtII-C4B1	38
4.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C	39
4.5	Difração de Raios X (DRX)	39
4.6	Viscosimetria Capilar em Regime Diluído	40
4.7	O fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	42
4.7.1	Ensaio biológico da enzima AsChtII-C4B1 no fungo <i>L. theobromae in vitro</i>	42
4.7.2	Preparação das amostras biológicas para os experimentos de MEV.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO - Parte I	45
5.1	Amplificação dos DNAs referentes às quitinases de <i>A. sexdens</i>	45
5.2	Clonagem dos DNAs C2B3, C3C4 e C5B1 no vetor pJET1.2.....	47
5.3	Análise do sequenciamento dos clones	50
5.4	Obtenção das proteínas recombinantes.....	57
5.4.1	Transformação dos clones em linhagem KM71H de <i>Pichia pastoris</i> KM71H..	57
5.5	Caracterização bioquímica das enzimas.....	61
5.6	Efeito do pH nas quitinases.....	61
5.7	Efeito da temperatura e termo estabilidade das três proteínas	63
5.8	Atividade antifúngica <i>in vitro</i> das quitinases recombinantes	65
5.9	Ensaio de inibição do crescimento de <i>Candida albicans</i>	65
5.10	Ensaio de inibição do crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i>	72
5.11	Ensaio de inibição do crescimento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	75
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE II.....	79
6.1	Ação da enzima AsChtII-C4B1 sobre diferentes tipos de quitina	79
6.2	Avaliação da atividade da enzima AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo <i>L. theobromae</i>	91
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	98
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
9	ANEXOS.....	117

1 INTRODUÇÃO

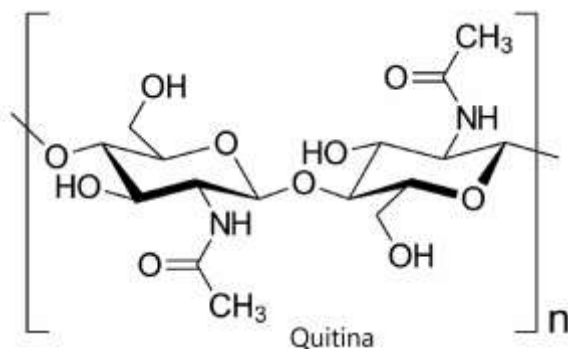
1.1 Quitina

Quitina é um polissacarídeo natural que ocorre em abundância na natureza após a celulose e tem despertado o interesse da comunidade científica devido à sua grande disponibilidade (AHMAD *et al.*, 2020). É um material biodegradável, possui biocompatibilidade, adotado de notáveis propriedades funcionais, como atividade antioxidante (KIDIBULE *et al.*, 2020) e antibacteriana (SÁNCHEZ *et al.*, 2017). Assim, a quitina pode ser aplicada em vários campos, que vão desde como conservante na indústria de alimentos (HOU *et al.*, 2023) a biocombustíveis e células de combustível microbianas (PETER *et al.*, 2021). A quitina tem sido usada para detecção de fungos e diagnóstico de doenças (SUBRAMANYAM *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2017).

A via geral da síntese de quitina é altamente conservada em fungos e artrópode e envolve uma série de enzimas que convertem diferentes açúcares em um polímero de N-acetil- β -D-glicosamina (NAcGlc) (ZHANG *et al.*, 2021). A quitina é composta por uma cadeia linear de monômeros de (NAcGlc), unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4), Figura 1.1.

A organização molecular da quitina, como um amino polissacarídeo, envolve anéis em macromoléculas que interagem com outros elementos covalentemente ou supramoleculares, aos quais define muito das funções no organismo vivo, que vão desde o crescimento, resistência mecânica a defesa contra microrganismos e doenças (BAI *et al.*, 2022). As micro fibrilas se combinam com açúcares, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos para formar paredes celulares em fungos, bem como cutículas de artrópodes e matrizes peritróficas, presente em crustáceos e insetos respectivamente (MERZENDORFER, 2006; ZHANG *et al.*, 2021).

FIGURA 1.1 - Estrutura da quitina, um polissacarídeo formado pela ligação β -(1-4) de monômeros de NAcGlc.

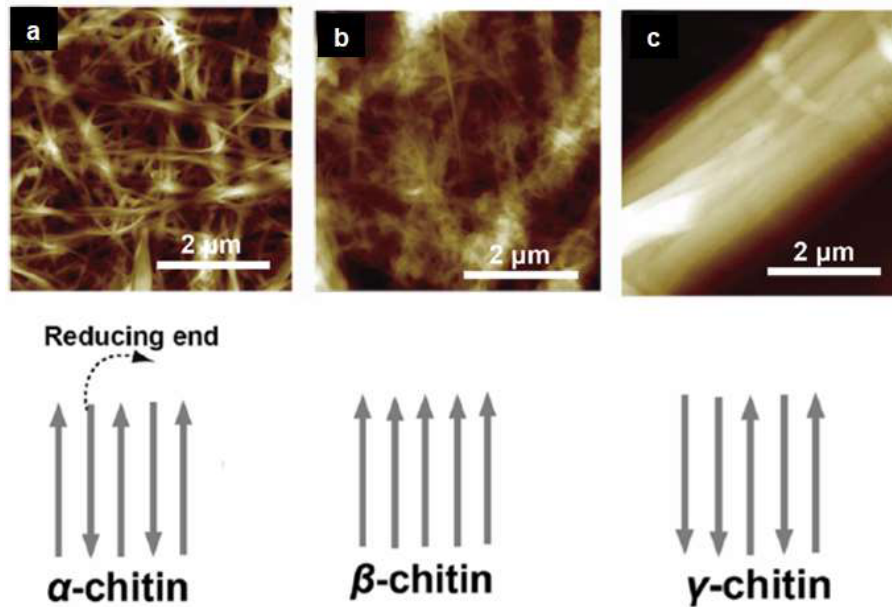


Fonte: Adaptada de (ZAINUDDIN e HAMID, 2021)

Imagens de microscopia de força atômica mostram que a quitina é polimórfica ocorrendo em três formas cristalinas denominadas de α -quitina, β -quitina e γ -quitina, (KAYA *et al.*, 2017), Figura 1.2. As formas estruturais estão associadas a uma direcionalidade em relação à sua extremidade redutora, que é um tautômero em equilíbrio entre o anel fechado e o anel aberto das formas do aldeído. As formas cristalinas diferem principalmente no seu grau de hidratação, no tamanho da célula unitária e no número de cadeias de quitina por célula unitária (MERZENDORFER, 2006).

A α -quitina é a mais abundante na natureza e pode ser extraída de cascas de caranguejos por exemplo, é a mais compacta devido ao arranjo das cadeias da quitina em modo antiparalela a qual favorece ligações de hidrogênio (MINKE e BLACKWELL, 1978). A β -quitina encontrada em lulas é a forma mais enfraquecida em relação à α -quitina, pois as cadeias estão arranjadas de uma forma paralela com forças intermoleculares fracas que levam a uma forma menos compactada (GARDNER e BLACKWELL, 1974). A γ -quitina é encontrada em casulos de artrópode e membranas larvais e consiste em uma camada intermediária de uma mistura de α e β -quitina, com propriedades e estrutura cristalina semelhantes à α -quitina (KAYA *et al.*, 2017). Na Figura 1.2 temos os três tipos de quitina (a) α -quitina, (b) β -quitina e (c) γ -quitina. As imagens obtidas por de microscopia de força atômica após o tratamento químico. As setas cinza indicam a orientação da quitina dentro dos domínios cristalinos.

FIGURA 1.2 - Ilustração dos três tipos da quitina.



Fonte: Adaptada de BAI *et al.*, 2022.

Em comparação com a celulose, um polímero formado por monômeros de glicose, a quitina é consideravelmente menos polar, mas hidratada na maioria dos animais e essa hidrofobicidade é devida as interações com proteínas hidrofóbicas (VINCENT, 2009). Devido às redes interfoliares serem fortemente mantidas pelas ligações de hidrogênio, a α -quitina é insolúvel na maioria dos solventes e embora a β -quitina também seja insolúvel em muitos solventes, ela exibe melhor solubilidade do que a α -quitina uma vez que as ligações entre as redes são mais fracas, assim varias moléculas polares podem penetrar na estrutura desse polímero (RINAUDO, 2006).

A solubilidade da quitina também depende do seu grau de acetilação superficial. A forma desacetilada da quitina, a quitosana, forma soluções ácidas altamente viscosas e geralmente é insolúvel acima de pH 6 (PILLAI *et al.*, 2009; YI *et al.*, 2005). No entanto, sais inorgânicos como o $\text{Ca}(\text{CNS})_2$, CaI_2 , CaBr_2 e CaCl_2 , facilitam a dissolução da quitina (BAI *et al.*, 2022). Derivados de quitina preparados em N,N-dimetilacetamida (DMAc)/5% LiCl em uma fase homogênea sob condições brandas apresentaram solubilidade sem degradação da cadeia principal (TERBOJEVICH *et al.*, 1988).

A diferença entre as formas de quitina conferem às matrizes quitinosas propriedades como rigidez, elasticidade e impermeabilização (ARAKANE e

MUTHUKRISHNAN, 2010; MUTHUKRISHNAN e MERZENDORFER, 2019). Por causa da ubiquidade de quitina no ambiente, a sua degradação tem sido extensivamente avaliada no que diz respeito à bioquímica geral, a biologia molecular, a biogeoquímica e a ecologia microbiana (VELIZ *et al.*, 2017).

1.2 Da extração à métodos de despolimerização do polímero da quitina

A forte estrutura cristalina da quitina a faz um material recalcitrante, com restrição na sua extração e utilização. Porém, produtos obtidos através da modificação da quitina, como por exemplo, a quitosana, apresentam propriedades que têm sido exploradas para uso no mercado biotecnológico (HOU *et al.*, 2023).

A obtenção do polímero da quitina industrialmente é extraído principalmente das cascas de crustáceos, caranguejos e camarões, por tratamento ácido seguido de tratamento alcalino para eliminação de carbonatos de cálcio e proteínas, respectivamente. Além disso, etapas adicionais como o processo de descolorização utilizando solventes orgânicos e inorgânicos são necessárias para obter um produto puro (EL KNIDRI *et al.*, 2018).

A forte estrutura cristalina da quitina restringe muito seu desenvolvimento e utilização. No entanto, os produtos provenientes da quitina contendo a presença de hidroxila ($-OH$) e grupos acetamida (CH_3CONH-), tornam estes produtos atrativos para o mercado biotecnológico devido à presença destes grupos orgânicos e com propriedades distintas (HOU *et al.*, 2023).

Os métodos de despolimerização/modificação da quitina baseiam se entre o método químico, físico e enzimático. A modificação química embora não seja a ideal é a mais utilizada, e este processo gera resíduos químicos resultantes que não são favoráveis ao meio ambiente (CHEN *et al.*, 2010).

A despolimerização é obtida principalmente pela desacetilação/degradação por tratamento alcalino/ácido e a introdução de novos grupos químicos utilizando solventes específicos. Basicamente, o efeito da modificação é dependente das condições estabelecidas, incluindo tipo de reagentes, tempo, temperatura e pH (ALLISON *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2021).

Os métodos físicos são utilizados com o intuito de reduzir a utilização de reagentes químicos. O uso de ultrassom tem sido empregado para a modificação

na estrutura da quitina proporcionando porosidade e reduzindo o tamanho das fibras ou partículas. No entanto, existem desvantagens, como alto consumo de energia, e difícil controle dos produtos formados, ou seja, diferentes produtos com diferentes pesos moleculares, tornando estes produtos indesejáveis para aplicações industriais em larga escala (HOU *et al.*, 2023).

Por caso das desvantagens dos métodos acima mencionados, os métodos biológicos como o uso da catalise enzimática para despolimerização da quitina vêm sendo relatado na literatura como a maneira mais eficaz e ecológica da modificação da quitina. Os processos geralmente são realizados entre 30 a 60 °C, com pH entre 4 a 12 por minutos ou por poucas horas (KROLICKA *et al.*, 2018; ARNOLD *et al.*, 2020; HOU *et al.*, 2023). Dois tipos de enzimas são utilizados nesses processos: As enzimas específicas e as não específicas.

As enzimas não específicas, ou seja, que não atuam nas ligações β -1,4-glicosídicas como por exemplo as lipases, celulasas, pectinases, lisozimas e proteases hidrolisam a quitina, implicando em um mecanismo endo- hidrolítico na maioria dos casos (POSHINA *et al.*, 2018).

As enzimas específicas que atuam no polímero da quitina exclusivamente nas ligações β -1,4-glicosídicas, como é o caso das quitinases (EC 3.2.1.14), conhecidas como glicosídeo hidrolases, hidrolisam a quitina com ação endoquitinases ou exoquitinases (PORIA *et al.*, 2021). As quitinases atuam no polímero gerando dímeros (GlcNAc)₂, trimeros(GlcNAc)₃ e monômeros de GlcNAc (KROLICKA *et al.*, 2018).

A especificidade das enzimas determina o substrato e o produto da quitina. Comparado com o modelo convencional ácido/alcalino de modificação da quitina, a maioria das enzimas gera produtos de alta pureza a baixas temperaturas e produzem menos resíduos químicos. No entanto, a produção de enzimas específicas são produzidas em escalas laboratoriais e ainda representa um alto custo para as indústrias à produção em alta escala (HOU *et al.*, 2023).

Um sinergismo entre o método químico e o enzimático pode ser uma vantagem. Apesar do método químico não ser o ideal, este contribui para a acessibilidade das quitinases às ligações glicosídicas. O método químico deve modificar a estrutura cristalina da α -quitina e preservar as interações que mantêm sua estrutura tridimensional, que é necessário para a atividade enzimática. A quitina coloidal, uma forma de quitina quimicamente pré-tratada com ácido clorídrico,

sulfúrico ou ácido fosfórico, tem sido utilizado com resultados positivos à ação das quitinases (CARDOZO *et al.*, 2019)

1.3 Quitinases

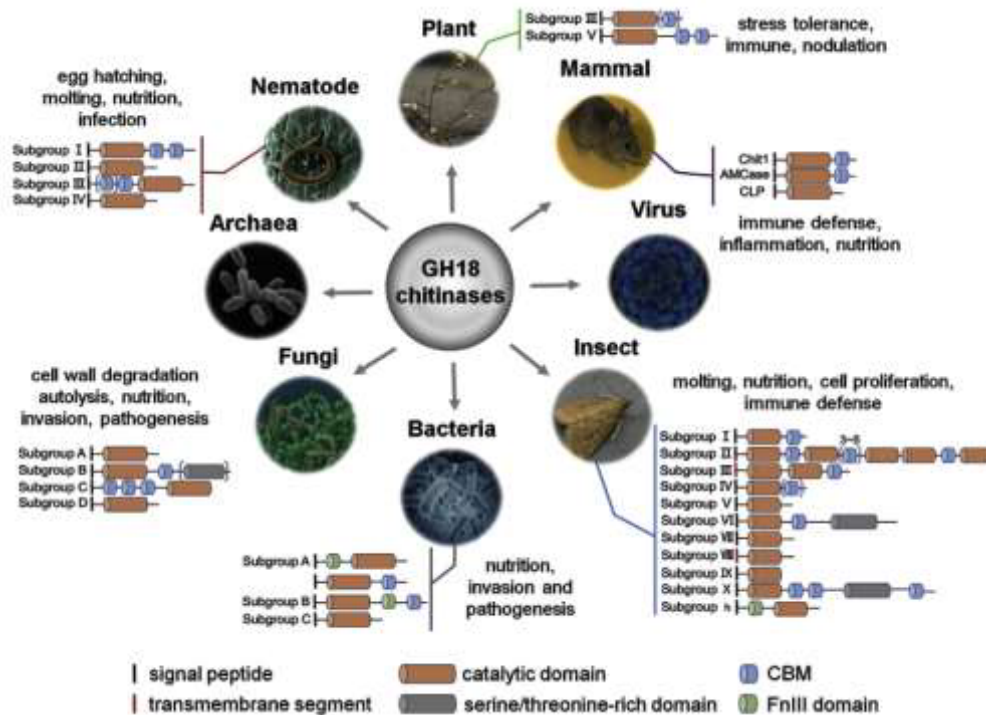
A degradação enzimática da quitina é importante em uma ampla variedade de processos biológicos e para o ciclo global do carbono (SØRLIE *et al.*, 2020). As quitinases são glicosídeos hidrolases (GHs) que clivam as ligações glicosídicas β -1,4 em aminopolissacarídeos, no polímero da quitina (PORIA *et al.*, 2021). As quitinases estão presentes em uma ampla gama de organismos, incluindo vírus, archaea, bactérias, fungos, protistas, artrópodes, plantas e mamíferos (ADRANGI; FARAMARZI, 2013).

De acordo com o banco de dados CAZY (*Carbohydrate-active enzymes database*), as enzimas quitinolíticas ocorrem nas famílias GH18, GH19, GH23 e GH48, a diferença entre as GHs estão na composição dos seus aminoácidos e nas propriedades catalíticas (OYELEYE; NORMI, 2018).

As quitinases da família GH18 estão presentes em quase todos os organismos, inclusive em plantas e mamíferos que não contêm quitina (CHEN *et al.*, 2020). As quitinases estão envolvidas na degradação de tecidos, regulação do desenvolvimento, patogenicidade e defesa imunológica e embora a função mais extensa das quitinases GH18 é degradar quitina endógena em organismos contendo quitina, muitos microrganismos produzem quitinases GH18 para fazer uso de quitina como fonte de nutrição (HUANG *et al.*, 2012).

Os genomas da maioria dos organismos codificam mais de uma quitinase GH18 podendo se dividir em subgrupos Figura 1.3. As quitinases da família GH18 consistem em vários elementos estruturais e funcionais como: um peptídeo sinal ou segmento transmembranar, ligantes ricos em serina/treonina, de um a cinco domínios catalíticos GH18, de zero a sete CBMs e um ou nenhum domínio semelhante à fibronectina tipo III (FnIII). A informação estrutural geralmente é limitada a domínios catalíticos.

FIGURA 1.3 - Distribuição diversa, classificação, arquitetura do domínio e função das quitinases GH18.



Fonte: (CHEN *et al.*, 2020)

A maioria das quitinases são proteínas modulares que, além do domínio catalítico, contém domínios auxiliares como o CBM (*carbohydrate-binding module*), caracterizado pela presença de seis a oito resíduos de histidinas que formam ligações de dissulfeto para estabilizar a estrutura terciária (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010). Essa região auxilia na atividade da enzima sobre substratos insolúveis através de resíduos aromáticos altamente conservados ancorando a enzima ao substrato e rompendo a estrutura cristalina do substrato resultando na formação de extremidades de cadeia livre (ADRANGI e FARAMARZI, 2013; HUANG *et al.*, 2012). A ausência do CBM não afeta a capacidade da enzima de degradar o substrato solúvel, mas reduz a capacidade em hidrólise de quitina insolúvel (HUANG *et al.*, 2012).

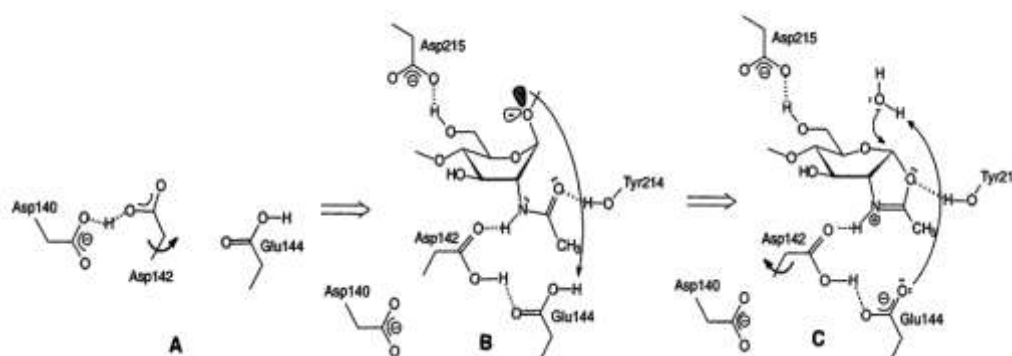
A região do ligante rico em serina/treonina é flexível e além de conectar os domínios são sítios de glicosilação que ajudam a estabilizar a quitinase na presença de protease (QUENTIN *et al.*, 2002).

O domínio catalítico das quitinases pertencentes à GH18 tem um enovelamento na forma de um barril $(\alpha/\beta)_8$ TIM (*triose-phosphate isomerase*) e são caracterizadas por 4 motivos sequenciais conservados: KXXXXXGGW em β -3, FDGXDLDWEYP em β -4, MXYDXXG em β -6 e GXXXWXXDXDD em β -8, (onde X

representa um aminoácido não específico) (CHEN *et al.*, 2018). O resíduo glutamato (E) do segundo motivo atua como o ácido catalítico, que doa o próton necessário para a clivagem da ligação glicosídica. Estudos mostram que a substituição do resíduo glutamato por resíduos de glutamina ou por ácido aspártico anula a atividade catalítica das quitinases (SYNSTAD *et al.*, 2004).

O processo catalítico das GH18 procede em um mecanismo de retenção assistido por substrato, o que implica que o grupo acetil do açúcar ligado ao subsítio -1 é essencial para a catálise (SØRLIE *et al.*, 2020). A Figura 1.4 ilustra o mecanismo catalítico proposto - Os resíduos de aminoácidos estão numerados de acordo com a quitinase bacteriana SmChiB do modelo *Serratia marcescens* (AALTEN *et al.*, 2016). (A) Os aminoácidos Asp-140, Asp-142 e Glu-144, conservados na maioria das quitinases da família GH18, são mostrados durante estágios separados de catálise. Asp-142 está muito longe para interagir com Glu-144. (B) A ligação do substrato (apenas -1 resíduo NAG de ligação é mostrado) causa distorção do anel do açúcar para a conformação de barco e a rotação de Asp-142 em direção a Glu-144, permitindo as interações entre o hidrogênio do grupo acetamida, Asp-142 e Glu-144. (C) A hidrólise do intermediário do íon oxazolínio levando a protonação do aminoácido Glu-144 e à rotação do Asp-142 para sua posição original, compartilhando um próton com o Asp-140.

FIGURA 1.4 – Mecanismo de ação proposta comentada no texto.



Fonte: Adaptada de (AALTEN *et al.*, 2016).

As quitinases GH18 são classificadas de acordo com o seu tipo de clivagem, sendo denominadas com ação endo as enzimas que catalisam a hidrólise

interna das cadeias de quitina em posições aleatórias. As quitinases de ação exo degradam a cadeia de quitina em seu terminal, seja a extremidade redutora ou não redutora (CHEN *et al.*, 2020).

As GHs precisam capturar uma única cadeia polimérica em sua fenda ou sulco de ligação ao substrato, o que significa que, no caso de um substrato cristalino, uma única cadeia polimérica precisa ser “descristalizada” antes de se tornar passível as ações dos GHs, no qual é provável que as quitinases ataquem seus substratos principalmente agindo nas extremidades da cadeia e em regiões amorfas e menos cristalinas do substrato (SØRLIE *et al.*, 2020).

Considerando os modos da reação enzimática, as quitinases GH18 também podem ser divididas em quitinases de processamento e quitinases de não processamento. As processivas têm a capacidade de deslizar ao longo da cadeia do substrato e prosseguir com a hidrólise sem a separação da enzima da cadeia de quitina após cada evento catalítico e como resultado produzem quantidades de extremidades redutoras solúveis quando comparadas com as GHs não processivas uma vez que liberam produtos solúveis. Em geral, as quitinases de ação exo são enzimas processivas e as quitinases de ação endo não têm processabilidade (BECKHAM *et al.*, 2014).

1.4 Quitinases na agricultura e na indústria biotecnológica

A tecnologia enzimática é um campo interdisciplinar e o com o avanço da biotecnologia abriu-se uma nova era de aplicações de enzimas em muitos processos industriais e nesse campo as quitinases têm uma ampla gama de aplicações em vários campos, incluindo médicos, industriais e agrícolas (DAHIYA *et al.*, 2006; PORIA *et al.*, 2021). Aplicações que usam processamento baseado em degradação enzimática tem atraído cada vez mais atenção devido às suas vantagens que incluem forte atividade biológica, processamento simples, condições suaves e ecologicamente corretas, no entanto para a produção de um complexo enzimático que envolva uma degradação utilizando sinergismo no caso entre as quitinases e a produção de proteína pura os custos ainda são muito elevados (LE e YANG, 2019).

No campo médico tem sido demonstrado o uso de quitinases na defesa do hospedeiro no sistema imunológico dos mamíferos. Seres humanos que

são deficientes em quitotriosidase apresentam uma taxa aumentada de infecção microfilária devido à atividade quitinolítica suprimida, permitindo que o parasita prospere dentro do hospedeiro. Loções e cremes antifúngicos para a pele contendo quitinases podem ser usados no tratamento de infecções dermatofíticas fúngicas (HAMID *et al.*, 2013; NUNES e PHILIPPS-WIEMANN, 2018).

A quitinase ácida (AMCase) de mamíferos estimula a resposta imune protetora a nematóides gastrointestinais e é dispensável para respostas alérgicas no pulmão (VANSELLA *et al.*, 2016). A AMCase é a primeira quitinase humana envolvida na patogênese da asma, considerado uma novidade, uma vez que os mamíferos não possuem a capacidade de utilizar a quitina como fonte de energia (IQBAL e ANWAR, 2019).

Pesquisas com a quitinase produzida por *Lactobacillus rhamnosus* GG inibiu o crescimento das hifas do patógeno humano *Candida albicans*, clivando o principal polímero da parede celular do fungo (ALLONSIUS *et al.*, 2019).

Estudos com a quitinase *like protein* YKL-40 mostram um enorme potencial como um biomarcador prognóstico para câncer do colon, ovário, osteossarcoma (câncer dos ossos) e vários tipos de câncer (NAGPURE *et al.*, 2013; PINTEAC *et al.*, 2021)

As quitinases vêm sendo aplicadas na conservação de alimentos, uma vez que podem degradar a parede celular de fungos contagiosos um dos principais problemas em termos de deterioração dos alimentos, bem como impedir o processo de germinação de esporos de fungos, ajudando assim a reduzir a decomposição e a degradação de alimentos (LE e YANG, 2019).

O controle biológico utilizando microrganismos que produzem quitinases apresentam impactos antifúngicos favoráveis contra muitos patógenos fúngicos pós-colheita (SHARMA *et al.*, 2023). Bactérias produtoras de enzimas quitinolíticas a quitinase ChiC isolada do *Salinivibrio* exibiu propriedades antifúngicas contra patógenos prejudiciais às culturas, como *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (LE; YANG, 2018). As chitinases chi60 e chit70 de *Xenorhabdus nematophilus* mostraram atividade de sinergismo e antifúngica inibindo a germinação de poros do *Verticillium dahliae* isolada das folhas de *Gossypiumhirsutum* e a *Coniella diplodiella* dos frutos de *Vitis vinífera* (LIU *et al.*, 2019).

De todas as técnicas, o processo enzimático para degradar a quitina vem ganhando atenção, pois traz várias vantagens como natureza ecológica, condições de processamento simples e suaves (PORIA *et al.*, 2021). Uma das preocupações recai sobre os resíduos de frutos do mar que tem baixa biodegradação, causando sérios impactos ambientais (SWIONTEK BRZEZINSKA *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2019). A reciclagem de resíduos de quitina também é crucial para equilibrar e sustentar o ciclo de carbono e nitrogênio do ambiente (DHOLE *et al.*, 2021).

As quitinases são empregadas na quebra de resíduos de moluscos para a fabricação de N-acetil-D-glucosamina, um monossacarídeo com grande potencial para aplicações biotecnológicas em fármacos, cosméticos, suplementos nutricionais e biomateriais (CARDOZO *et al.*, 2019; RATTANAKIT *et al.*, 2007).

A quitinase gerada a partir de *Paenibacillus barengoltzii* foi observada como um potencial candidato para o tratamento de resíduos de quitina (KUMAR *et al.*, 2018). O *Streptomyces rimosus* que residente no solo dissolveu os resíduos do camarão e também decompôs a quitosana (SWIONTEK BRZEZINSKA *et al.*, 2014) Outra quitinase também do solo *Pseudomonas fluorescens* degradou prontamente as cascas de camarão. Quando essas cascas (0,1 g) foram tratadas com a enzima, [3 mmoles (0,003 g-mol)] de N-acetil glucosamina foi gerado em 6 h (ALHASAWI; D. APPANNA, 2017).

A quitinase isolada de *Chitiniphilus shinanonensis* hidrolisa eficazmente as crostas rudimentares de quitina da casca do caranguejo gerando quitooligossacarídeos (COS). Os COS tem uma ampla aplicação atuando no sistema imunológico (KUMAR *et al.*, 2020), e na agricultura como no melhoramento do crescimento da planta durante condições de estresse (LE e YANG, 2019). Os COS também são eficientes contra micróbios patogênicos, ajudando a prevenir infecções em feridas (JAFARI *et al.*, 2021).

1.5 Quitinases de insetos

Apesar de insetos produzirem mais quitinases do que outros organismos (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010), as quitinases mais exploradas são as de bactérias, fungos e plantas e isso se deve a pequena quantidade de informações estruturais sobre as quitinases de insetos sendo assim um dos

principais fatores que dificultam sua exploração biotecnológica (SINGH e KUMAR, 2019).

As quitinases de insetos são expressas principalmente na epiderme, desempenham papéis fisiológicos importantes, incluindo ecdise da cutícula, crescimento e pupação (MUTHUKRISHNAN e MERZENDORFER, 2019). Outra função seria a de regular o processo de síntese e a degradação da membrana peritrófica.

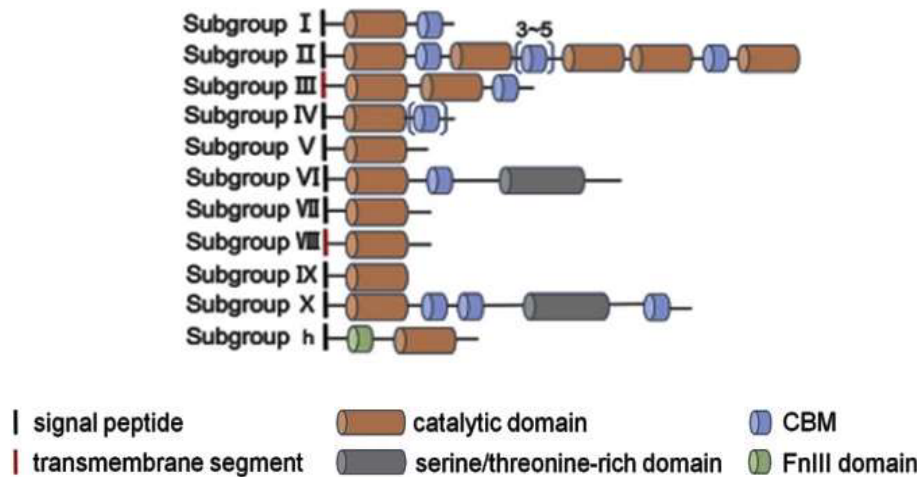
A regulação negativa de quitinases do subgrupo I, II e h, por exemplo, por RNAi mostraram os seguintes resultados nos insetos. A quitinase do subgrupo I é responsável pela quebra da cutícula, especialmente no estágio de pupa para adulto, a do subgrupo II resultou na deficiência na muda em todos os estágios de desenvolvimento e a quitinase do grupo h causou deficiência da muda e a morte do inseto. As quitinases possuem padrões de processamento diferentes nos insetos e sugeriu-se que elas trabalham em sinergismo na quebra da quitina, mais todas contribuem para a sobrevivência do inseto (CHEN *et al.*, 2020).

As quitinases também estão presentes em venenos e glândula salivares de alguns insetos. Nestes casos, o papel das quitinases pode ser a degradação da cutícula do hospedeiro (RATHORE e GUPTA, 2015).

As quitinases de inseto GH18 diferem nas composições dos domínios, propriedades enzimáticas, padrões de expressão e localização dos tecidos. Estudos como o mapeamento dos genes de quitinase, análise filogenética e o estudo de seu papel funcional em diferentes insetos permitiram classificar essas proteínas em onze subgrupos distintos (ChtI a ChtX e Chi-h) (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010; CHEN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2020).

Alguns insetos produzem mais de um grupo de quitinases e algumas delas não tem o CBM Figura 1.5.

FIGURA 1.5 - Arquitetura do domínio das quitinases em insetos.



Fonte: Adaptada de (CHEN *et al.*, 2020)

As quitinases do subgrupo I são caracterizadas pela presença de um domínio catalítico N terminal unida a um domínio CBM via uma região de *linker* rica em serina/treonina (LI *et al.*, 2015). As quitinases do Grupo II são muito maiores, com 4-5 domínios catalíticos e de 4-7 CBMs. É possível que quitinases como múltiplos domínios atuam na quebra de microfibrilas da quitina gerando cadeias simples e desagregadas, tornando o substrato mais acessível, facilitando o acesso de outras quitinases (CHEN *et al.*, 2018).

As enzimas do subgrupo III são formadas por dois domínios catalíticos e um CBM. Algumas quitinases pertencentes a esse grupo possuem predição de peptídeo sinal na região N-terminal, entretanto algumas quitinases possuem predição de ancoragem à membrana (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010). O subgrupo IV das quitinases de insetos possui peptídeo sinal, um único domínio catalítico e a maioria não possuem CBD sendo comumente expressas no intestino ou corpo gorduroso dos insetos (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010). A quitinase do subgrupo V contém um peptídeo sinal e um domínio catalítico GH18, mas nenhum CBM. No entanto, prevê-se que o domínio catalítico seja não catalítico devido à substituição de um resíduo que é necessário para a catálise (ZHU *et al.*, 2008b).

Quitinases do subgrupo VI são maiores que as do subgrupo I mas ambas são estruturalmente similares, possuindo peptídeo sinal, um domínio catalítico e um CBD. Seu transcrito é expresso exclusivamente na carcaça díptera (ZHU *et al.*, 2008a). As quitinases do grupo VII são estruturalmente similares às do grupo IV, entretanto, na análise filogenética o grupo VII forma um clado anexo que

fica próximo ao grupo II. O subgrupo VIII, possui um domínio catalítico e nenhum CBD. Além disso, há um domínio transmembranar indicando que a mesma é ancorada à membrana (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010).

As quitinases do grupo IX possuem apenas um único domínio catalítico. As quitinases do grupo X têm um arranjo de domínio único: um peptídeo de sinal N-terminal precedendo o domínio catalítico, seguido por dois CBMs muito próximos e um trecho C-terminal muito longo terminando com um terceiro CBM (TETREAU *et al.*, 2015). As quitinases do grupo h são encontradas apenas em lepidópteros e acredita-se que sejam obtidas por transferência horizontal de genes de bactérias. Como seus homólogos bacterianos, eles contêm um domínio de fibronectina tipo III (FnIII) na região N terminal e um domínio catalítico (LIU *et al.*, 2017).

As enzimas quitinolíticas de inseto têm sido apontadas como potenciais agentes biopesticida contra organismos pestíferos e patogênicos contendo quitina. A resistência a esses organismos indesejados pode ser transmitida pela degradação das estruturas vitais nos organismo, como a membrana peritrófica ou cutícula de insetos, cascas de ovos, bainhas de nematóides e a parede celular de fungos patógenos (KRAMER e MUTHUKRISHNAN, 1997)

A quitinase de *Bombyx mori* foi avaliada quanto ao potencial uso como biopesticida contra o besouro *Monochamus alternatus*. A ingestão oral de quitinase provocou redução do peso corporal e mortalidade. A fluorescência e as observações microscópicas confirmaram que a quitina presente na membrana peritrófica do besouro foi degradada pela ação da quitinase (KABIR *et al.*, 2006). A quitinase de *Lacanobia oleracea* (larva da mariposa do tomateiro) apresentou efeito antagônico contra *Haemaphysalis longicornis* ao reduzir a espessura da cutícula desse carrapato (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010).

A quitinase do inseto *Ostrinia furnacalis* teve um papel defensivo contra fungos como *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum gloeosporioides* (LIU *et al.*, 2020). A quitinase da formiga cortadeira *Atta sexdens* apresentou atividade inseticida contra larvas da *Spodoptera frugiperda* e atividade fungicida contra os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus fumigates* (MICOCCI *et al.*, 2023).

1.6 Formigas cortadeiras: O contexto do projeto

As formigas são artrópodes notáveis no mundo, representando metade da biomassa global de insetos (BENCKISER, 2010; BOULOGNE *et al.*, 2016). Em termos de diversidade de espécies, abundância relativa, impacto ecológico e hábitos sociais, as formigas emergem como um dos grupos mais proeminentes de artrópodes (DA SILVA ARAÚJO, *et al.*, 2018).

Os gêneros, *Atta* e *Acromyrmex*, são amplamente distribuídos no Brasil e países neotropicais. São conhecidas como formigas cortadeiras, e são considerados os mais importantes insetos herbívoros. As cortadeiras sobrevivem de folhas frescas de plantas, que servem de substrato para cultivo do fungo simbiótico, como consequência, esses insetos são conhecidos por apresentarem alto poder de dano em produções agrícolas, florestas naturais e plantadas (DELLA LUCIA *et al.*, 2014; DIONISI *et al.*, 2021; SCUDILLIO *et al.*, 2023).

Embora as formigas estejam vinculadas, na maioria dos estudos e pesquisas, aos danos econômicos e ambientais causados, há de se considerar a importância dessas formigas ao meio ambiente. Esses insetos contribuem para a construção de um ambiente propício ao crescimento de determinadas plantações que se beneficiam do solo aerado (devido à construção dos ninhos) e da matéria orgânica (resíduo dos ninhos não aproveitados pelos organismos que ali habitam) (SUEN *et al.*, 2011).

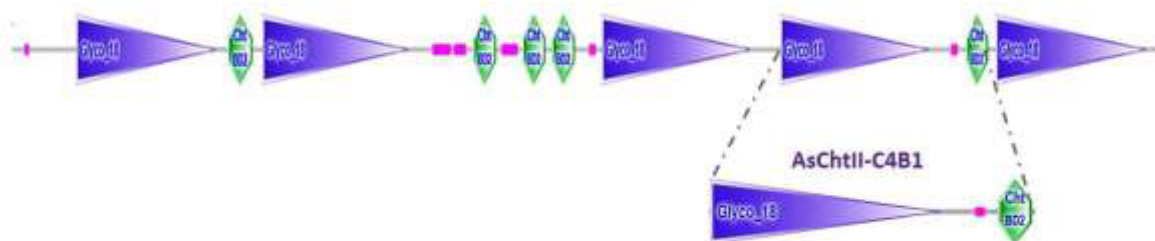
Pesquisas têm sido desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE) do Departamento de Química da UFSCar, com diferentes classes de enzimas da formiga cortadeira *Atta sexdens*. O genoma da *A. sexdens* ainda não foi sequenciado, mas no LBFE têm sido desenvolvidas metodologias para amplificação de DNA de *A. sexdens* baseado em sequências depositadas de outras formigas cortadeiras (MICOCCI *et al.*, 2023; SANTOS CORREA *et al.*, 2023).

No presente trabalho, a busca em banco de dados mostrou sequências referentes às quitinases de tamanhos muito diferentes de *Atta cephalotes* e *Acromyrmex echinator* (formigas cortadeiras), sugerindo quitinases pertencentes a diferentes grupos.

Uma sequência predita depositada de *Acromyrmex echinator* (gi|746868993|ref|XP_011065639.1), tem 2678 resíduos de aminoácidos e predição

de peptídeo sinal, cinco domínios catalíticos e cinco domínios de CBM, o que a classifica como pertencente ao subgrupo II, Figura 1.6. Baseado nesta sequência, *primers* foram desenhados e o DNA que codificaria o domínio catalítico 4 tendo o CBM (domínio de ligação à quitina) na região C-terminal (Figura 1.6) foi amplificado por PCR tendo como molécula molde o cDNA de *A.sexdens*. A cadeia polipeptídica, aqui chamada de AsChtII-C4B1, foi expressa em *Pichia pastoris*, apresentando atividade catalítica sobre quitina coloidal. Após purificação, a enzima mostrou atividade fungicida contra *Aspergillus fumigatus*. Além disso, a enzima também interferiu no desenvolvimento de larvas de *Spodoptera frugiperda* (MICOCCI *et al.*, 2023). Na Figura 1.6 ilustra a arquitetura da sequência: Região Rosa: região de baixa complexidade contida no linker; Região Verde: CBMs (domínio de ligação a quitina) e Região Roxa: Domínios catalíticos. Em destaque a quitinase AsChtII-C4B1.

FIGURA 1.6 - Arquitetura de uma sequência predita de quitinase da formiga cortadeira *A. echinator* (gi|746868993|ref|XP_011065639.1).

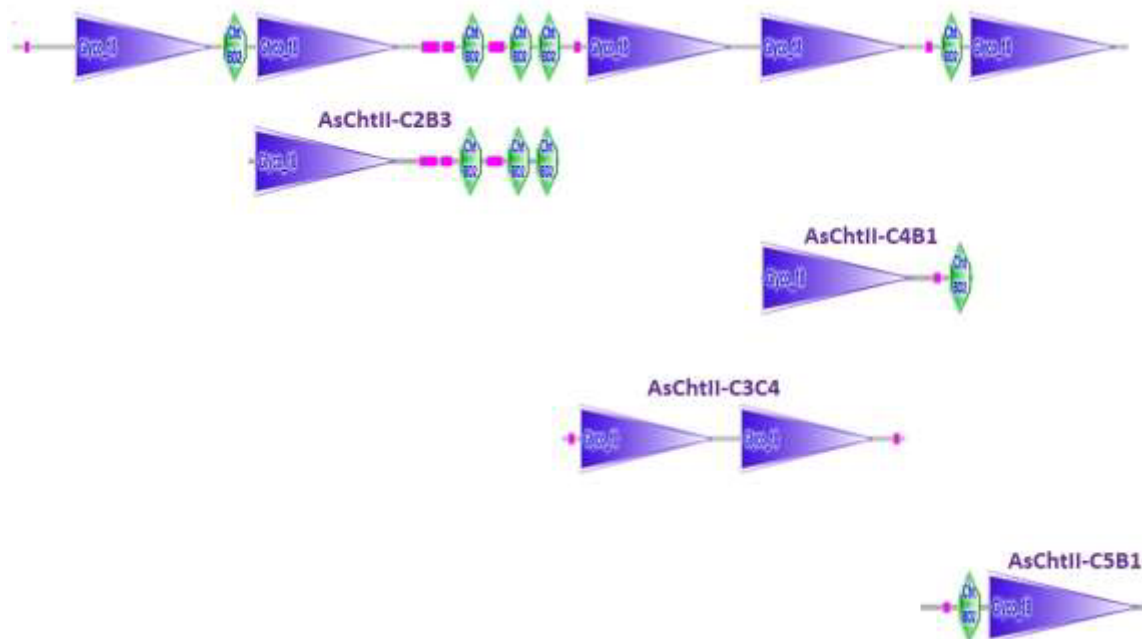


Fonte: Análise feita com o programa SMART: <http://smart.embl-heidelberg>

Os resultados obtidos com a AsChtII-C4B1 mostraram, então, que a cadeia contendo um domínio catalítico e um domínio de ligação à quitina (CBM) apresentou atividade sobre a quitina nos modelos testados de fungo e inseto e levam a questionar como seriam as atividades de diferentes módulos protéicos de *A. sexdens*, constituídas a partir da sequência de *A. echinator*. Um fato interessante a ser considerado é que os domínios catalíticos e CBMs não apresentam alta identidade e a obtenção destes módulos pode contribuir para melhor conhecer esta sequência. A proposta deste trabalho é expressar as cadeias polipeptídicas

denominadas AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1, Figura 1.7, e avaliar suas atividades fungicidas. Além disso, a enzima AsChtII-C4B1 também poderia ser melhor caracterizada frente à diferentes tipos de quitinas e ser testada em outros modelos de fungos.

FIGURA 1.7 - Arquitetura de uma sequência predita de quitinase da formiga cortadeira *A. echinator*



Fonte: Análise feita com o programa SMART: <http://smart.embl-heidelberg>

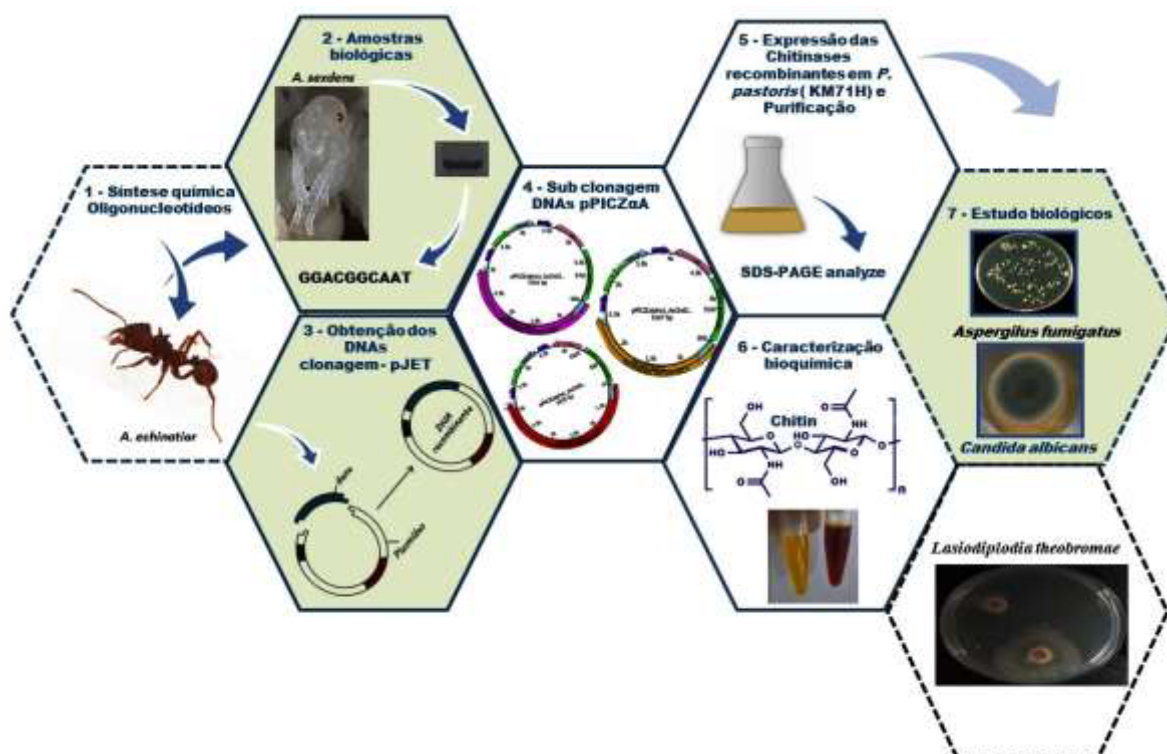
2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são a obtenção de quitinases recombinantes da formiga cortadeira *A. sexdens*, a caracterização bioquímica frente ao substrato α -quitina coloidal e avalia a atividade fungicida frente a fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae* e fungos patógenos humanos *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Também é objetivo do trabalho o estudo da atuação da enzima AsChtII-C4B1 em diferentes quitinas e avaliar sua atividade no crescimento do fungo *L. theobromae*.

Os assuntos serão abordados em duas partes nesta tese:

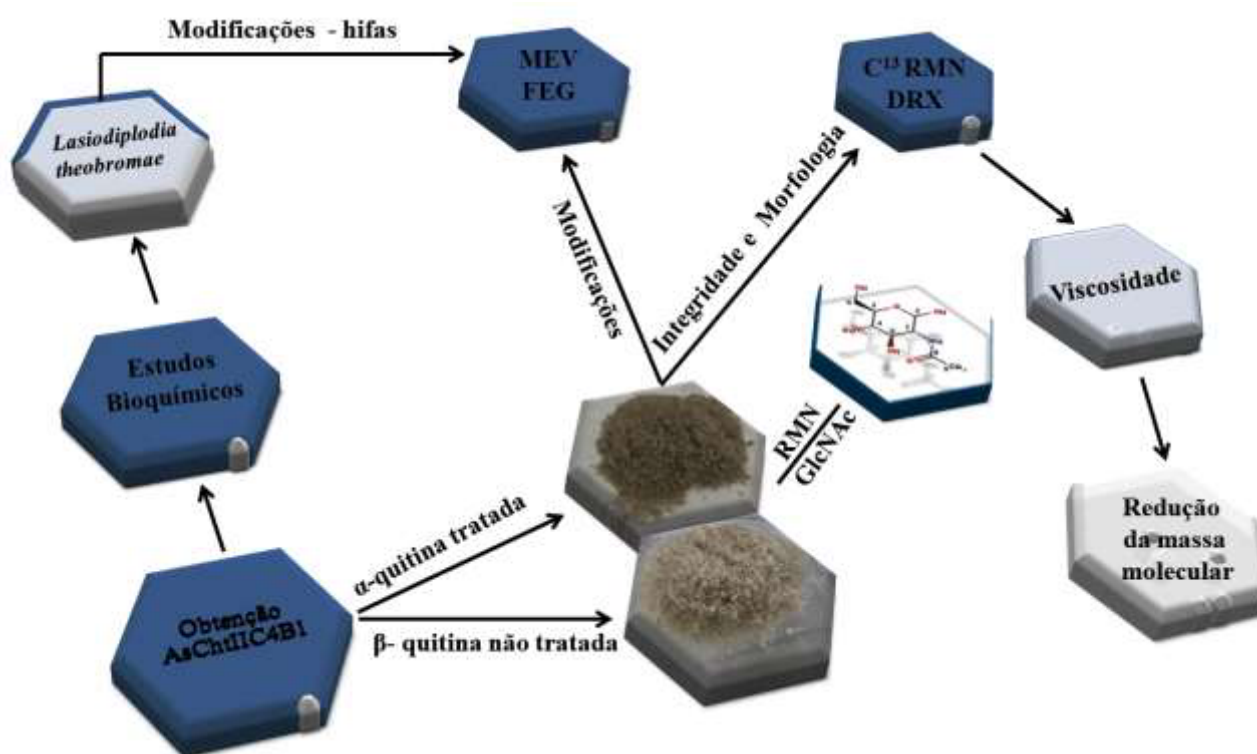
Parte I - Obtenção, caracterização das enzimas recombinantes e a ação fungicida das mesmas sobre fungos patógenos e fitopatogênico. Na Figura 2.1, uma breve introdução da metodologia empregada para obtenção e aplicação das quitinases AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1, utilizando nesta parte do estudo a α -quitina coloidal como substrato para a caracterização das mesmas.

FIGURA 2.1 – Ilustração esquemática



Parte II – Atividade fungicida contra o fungo *Lasiodiplodia theobromae* e Ação enzimática da quitinase AsChtII-C4B1 sobre diferentes tipos de quitina e sua. Na Figura 2.2 ilustra o esquema do estudo da ação fungicida da recombinante AsChtII-C4B1 no fungo *L. theobromae* e a atuação da enzima em α -quitina coloidal, β -quitina coloidal e sólida, utilizando uma combinação de técnicas de ^1H RMN, (^{13}C RMN/DRX), e análise viscosimetria.

FIGURA 2.2 - Ilustração esquemática



Fonte: Própria

3 METODOLOGIA - Parte I

Obtenção e estudos com cadeias polipeptídicas de quitinases de *A. sexdens*

3.1 Material biológico

Pupas da formiga cortadeira *A. sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) foram coletadas de um ninho mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP, Rio Claro, Brasil). As amostras foram recolhidas e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) livre de ribonuclease (RNase) e armazenadas a -80 °C até a extração do RNA.

3.1.1 Síntese dos Oligonucleotídeos

Para obtenção do gene de interesse foi necessária a construção por síntese química dos oligonucleotídeos de DNA complementares às extremidades de cada fita do cDNA. Estes oligonucleotídeos são os iniciadores da síntese de DNA *in vitro*, catalisada pela DNA polimerase. Como o genoma de *A. sexdens* não está sequenciado, a síntese dos oligonucleotídeos foi elaborada tendo como referência a sequência codificadora para uma quitinase da formiga cortadeira *Acromyrmex echinator* (XM_011067337.1), depositada no banco de dados *National Center for Biotechnology information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com 2678 resíduos de aminoácidos, contendo cinco domínios catalíticos e cinco módulos de domínios de ligação a quitina (CBM), sendo classificada como pertencente ao Subgrupo II da família GH18.

Nesse contexto, *primers* específicos (em vermelho), foram desenhados e sintetizados com os respectivos sítios para as enzimas de restrição, Tabela 3.1. Propondo a obtenção das ORFs que codificam para a expressão de cadeias polipeptídicas constituídas de domínios diferentes: AsChtII-C2B3, AsChtIII-C3C4, e AsChtII-C5B1.

TABELA 3.1 – Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados para obtenção das ORFs.

Nome	Sequencia 5' → 3'	Enzima
C2B3_F_pesca	GATCCRADAGAGRAACGCTG	
C2B3_R_pesca	GACGATACCAAGCCARTTGG	
C2B3_F	GCC GAATTC CATCATCATCATCATCCGCGTAT AGCGTGTTATATGACG	<i>EcoR I</i>
C2B3_R	GCC GCGGCCG CTCAGTCTGCGCATTTCGCCCGGG	<i>Not I</i>
C2B3_F_I	CATGACGTACGACTATCATGGATC	
C2B3_R_I	GTAAC TTTGGCGGTTGTAGTAGATG	
C3C4_F_pesca	GGAGAGTGTTTACGCTAAGGGC	
C3C4_R_pesca	GAGATCTTACCGAAGTTGCACAGATAATAC	
C3C4_F	GGCCCAG C CGGCC AGATGGCGACAAGGAAATTA C	<i>Sfi I</i>
C3C4_R	GGTACC ATTGGAGGTAGTGGGCTGGCTTCGATC	<i>Kpn I</i>
C3C4_F-I	GAATTGTAACAAGGGACCAGATTC	
C3C4_R_I	CGTTTAATCCGTGTACGTTTCTCTC	
C5B1_F_pesca	GCAGAATTAATCAAGAACTTGGCCTC	
C5B1_R_pesca	AATGCAGTCTGTTGTGTGACCGTTCCC	
C5B1_F	GG GAATTC GACTTTAAGAACAGATGTGG	<i>EcoR I</i>
C5B1_R	AAGCGGCCG CAATGCAGTCTGTTGTGTG	<i>Not I</i>
C5b1_R_I	GGTAAGATCTCGGAACAGTCCTG	

Fonte: Própria

3.1.2 Extração de RNA de *A. sexdens* e a síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizado segundo o protocolo descrito pelo fabricante do TRIzol®, procedimento este melhorado para a metodologia de extração de RNA em uma única etapa desenvolvido por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987). Para extração de RNA total, 80 mg de pupas foram maceradas em 2,0 mL de TRIzol® gelado. A mistura foi homogeneizada e descartou se o pellet. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada por 5

minutos a 12.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL e adicionou se 200 µL de clorofórmio, em seguida a mistura foi homogeneizada por 15 segundos e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação 12000 g por 15 minutos a 4 °C.

Transferiu 450 µL da fase aquosa para um tubo de 1,5 mL e adicionou se o mesmo volume de isopropanol. A mistura foi gentilmente invertida por 15 vezes seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Novamente a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C para a formação do *pellet*. O sobrenadante foi descartado e adicionou se ao *pellet* 1,0 mL de etanol 75 % gelado. A amostra foi centrifugada a 8.000 g por 8 minutos. Descartou se o sobrenadante e o precipitado foi seco a temperatura ambiente.

O *pellet* de RNA total foi ressuspendido em 50 µL de água tratada com DEPC (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A qualidade e quantificação de RNA total isolado foram estimados através das relações das absorbâncias da amostra medidas em 230, 260 e 280nm (A260/A280 e A260/A230) utilizando BioSpec-nano (Shimadzu). A integridade da amostra de RNA foi verificada por gel de agarose 1 % em tampão TAE em água tratada com DEPC contendo brometo de etídio (0,1 µg/mL). O gel foi submetido à eletroforese a 90 V por 40 minutos e posteriormente visualizado e fotografado através do sistema de foto documentação computadorizado (Gel Doc™ Ez System – Bio-Rad).

A partir do RNA total extraído foi obtido o cDNA (DNA complementar): O RNA foi tratado com DNase I (1 U) (Thermo Fisher Scientific), conforme o protocolo do fabricante. Cerca de 1 µg de RNA, 1 µL de tampão 10X, 1 µL de DNase I e completou o volume final (10 µL) da reação com água tratada com DEPC. A reação foi incubada por a 37 °C por 30 minutos, seguida da adição de 1 µL de EDTA. Incubou se a reação a 65 °C por 10 minutos.

Para a síntese do cDNA, foi utilizado o SuperScript® VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) conforme as orientações do fabricante. Para 1,5 µg de RNA tratado com DNase I foi adicionado 4 µL da transcriptase reversa (SuperScript® VILO Master Mix), completando a reação para um volume final de 20 µL com água tratada com DEPC. A amostra foi gentilmente homogeneizada e incubada a 25 °C por 10 minutos, seguida de incubação por 60 minutos a 42 °C Para finalizar a reação, esta foi incubada a 85 °C por 5 minutos. O cDNA foi guardado para posterior uso em freezer a -20 °C.

3.1.3 Amplificação das sequências codificadoras das quitinases AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1

O cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído da pupa da formiga *A. sexdens* e o par de oligonucleotídeos para cada construção foi utilizado na reação de polimerização em cadeia (PCR). Na amplificação dos DNAs de interesse foi utilizada a *Phusion*TM High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) conforme o protocolo do fabricante. Inicialmente foram utilizados os oligonucleotídeos aqui chamados de busca de cada construção para amplificar o gene de interesse. A primeira etapa para a obtenção dos genes foi utilizada a estratégia de obtenção dos genes utilizando inicialmente *primers* de busca sem os sítios de restrição, abrangendo regiões fora da sequência desejada com o intuito de delimitar a sequência a ser amplificada. Este tipo de reação tem como vantagem o ganho em especificidade e eficiência, uma vez que o produto de PCR (DNA-molde) obtido na primeira etapa estará em concentrações melhores, e os *primers* agora contendo os sítios para as enzimas de restrição utilizados na segunda etapa têm menos chances de anelarem em sequências inespecíficas devido à redução do tamanho do molde.

Os programas de amplificação para cada gene de interesse estão listados na Figura 3.1. Na primeira etapa utilizando os primers de pesca (A) e os primers contendo os sítios para as enzimas de restrição (B). A reação de PCR foi realizada em um termociclador Eppendorf Mastercycler.

FIGURA 3.1 – Condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação dos genes.

A		
C2B3	C3C4	C5B1
<ul style="list-style-type: none"> • 1 min a 98°C, seguido de 35 ciclos de 98°C por 15 seg, 69,7°C por 45 seg, 72°C por 2 min, e a extensão final 72 °C por 10 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 seg a 98°C, seguido de 30 ciclos de 98°C por 10 seg, 65°C por 30 seg, 72°C por 1.45 seg, e a extensão final 72 °C por 10 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 seg a 98°C, seguido de 30 ciclos de 98°C por 10 seg, 63,8°C por 30 seg, 72°C por 48 seg, e a extensão final 72 °C por 10 min.
B		
C2B3	C3C4	C5B1
<ul style="list-style-type: none"> • 1 min a 98°C, seguido de 35 ciclos de 98°C por 15 seg, 68,2°C por 45 seg, 72°C por 2 min, e a extensão final 72 °C por 10 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 seg a 98°C, seguido de 30 ciclos de 98°C por 10 seg, 72°C por 30 seg, 72°C por 1.45 seg, e a extensão final 72 °C por 10 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 seg a 98°C, seguido de 30 ciclos de 98°C por 10 seg, 66,7°C por 30 seg, 72°C por 48 seg, e a extensão final 72 °C por 10 min.

Fonte: Própria

Para a amplificação dos DNAs de interesse foram utilizados para cada reação 1 µl de cDNA, 0,5 µL de dNTPs (10 µM), 0,35 µM de cada par de oligonucleotídeo (sense e reverse), 0,25 µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) e 5 µl de Phusion Buffer 10X para uma reação de volume final de 25 µl.

O produto da reação de PCR foi analisado aplicando-se inicialmente 5 µl das amostras em gel de agarose 1 % contendo 0,025 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (80 mM Tris-HCl, 40 mM ácido acético glacial, 2,5 mM EDTA, pH 8,3). Posteriormente, o volume total da reação da primeira etapa do processo de PCR foi aplicado em gel de agarose, e os fragmentos de DNA de interesse foram recortados e purificados do gel de agarose utilizando (Gel and Purification Kit – Cellco Biotec) conforme a orientação do protocolo do fabricante. O produto purificado foi quantificado em espectrofotômetro BioSpec-nano (Shimadzu) e posteriormente usado como DNA-molde na segunda etapa de obtenção dos genes de interesse por reação de polimerização em cadeia (PCR).

3.1.4 Clonagem dos DNAs AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1 no vetor pJET 1.2

A clonagem dos três DNAs foi feita através da reação de ligação ao vetor pJET, usando o sistema CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) conforme as orientações do fabricante. Para as clonagem dos DNAs, 130 ng do DNA C2B3, 137 ng de C3C4 e 80 ng de C5B1 foram utilizados em uma reação contendo 10 µL do tampão reacional, 1 µL do vetor pJET, 1 µL da T4 ligase completando a reação com água *milliQ* autoclavada para um volume de 20 µL de reação

Os clones foram transformados em células competentes da linhagem de *DH5α* de *E. coli*. O processo de transformação utilizado foi por choque térmico, seguindo o protocolo modificado desenvolvido por HANAHAN (1983). As reações foram submetidas a choque térmico incubadas por 30 minutos no gelo, seguindo de 2 minutos à 42°C sob agitação de 250 rpm, seguido de incubação no gelo por 2 minutos. Às misturas foram adicionados 270 mL de meio SOC (meio LB + glicose) previamente aquecido e seguido de incubação por 1 hora à 37°C sob agitação de 250 rpm.

Os produtos da transformação foram plaqueados em placas Petri contendo meio LB Agar e ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas e as colônias crescidas foram inoculadas em meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) e o DNA plasmidial de cada construção foi obtido utilizando o kit (Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit - Cellco Biotec). O processo de clonagem foi avaliado através da análise de digestão dos clones com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI* para AsChtII-C2B3 e AsChtII-C5B1 e as enzimas *KpnI* e *SfiI* para AsChtII-C3C4. Os resultados obtidos foram visualizados em gel de agarose 1%.

Os clones foram quantificados por espectrofotômetro BioSpec-nano (Shimadzu) e enviados para o sequenciamento realizado no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco Instituto de Biociências - USP -Setor de Sequenciamento de DNA. O centro de pesquisa utiliza o ABI 3730 DNA Analyser, um sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia Life Technologies – Applied Biosystems.

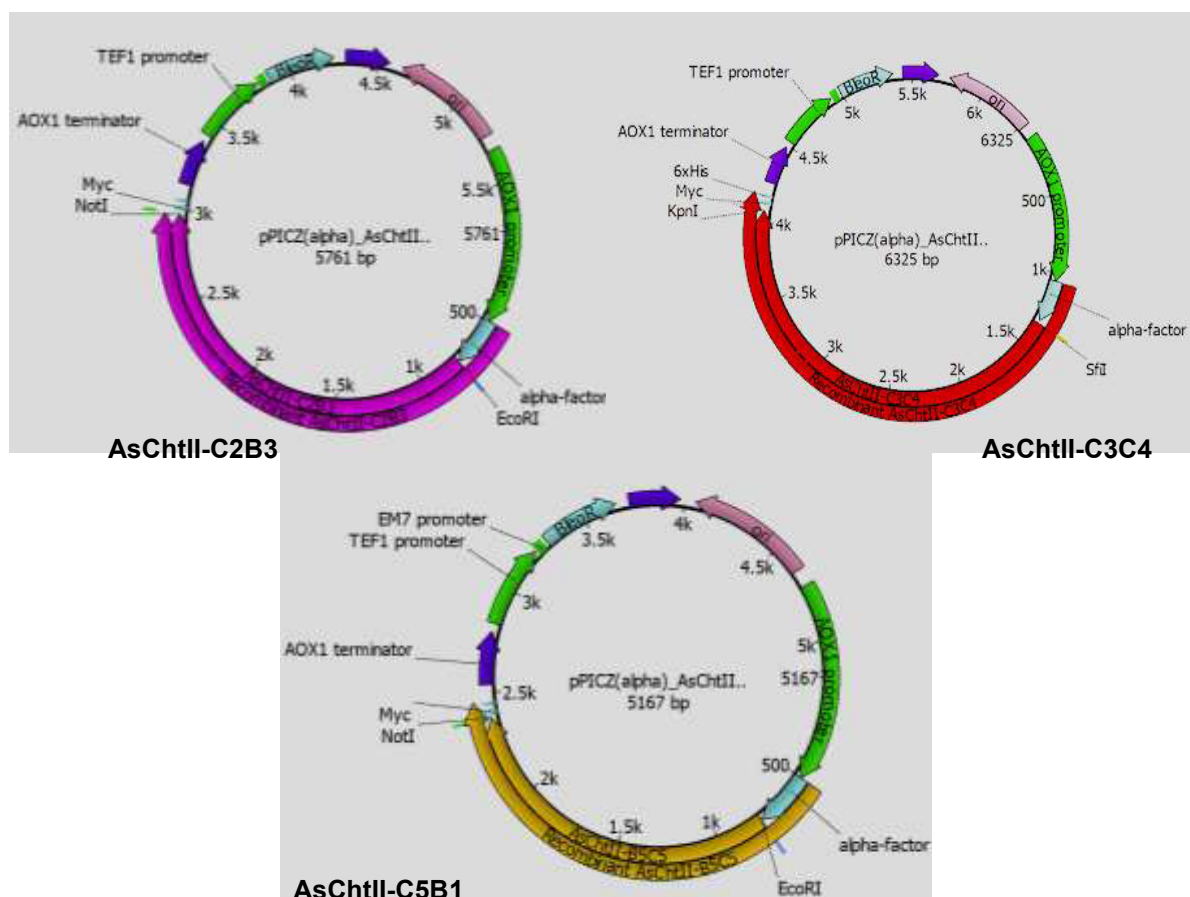
3.1.5 Sub clonagem dos DNAs no vetor pPICZαA

Para a sub clonagem dos DNAs no vetor pPICZαA (Invitrogen), os clones em pJET de cada construção (3000 ng) foram digeridos com as enzimas de

restrição específicas, e analisados em gel de agarose. Após excisão das bandas do gel, o DNA foi purificado, quantificado e usados em reação e ligação com o vetor pPICZ α A (Invitrogen) previamente digerido com as mesmas enzimas. A proporção escolhida para cada reação de ligação foi de 1:3 (1 de vetor para 3 de inserto). A reação de ligação foi realizada para um volume final de 20 μ L, contendo vetor e inserto digeridos (160 ng de C5B1, 250 ng de C2B3 e 280 ng C3C4, 120 ng de vetor), 2 μ L de 10X T4 DNA tampão ligase e 0,5 μ L de T4 DNA ligase (5 U/ μ L) (Cellco Biotec). A reação foi incubada a 4 °C por 16 horas e a solução foi usada na transformação de DH5 α de *E. coli* conforme descrito no item 3.1.4, porém agora utilizando o antibiótico zeocina (25 μ g/mL).

As colônias selecionadas para cada construção foram crescidas *overnight* em meio LB Low Salt e Zeocina (25 μ g/mL). O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit (Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit - Cellco Biotec). A clonagem foi avaliada através da digestão dos clones com as enzimas de restrição *Nco*I e *Eco*RI para AsChtII-C2B3 e AsChtII-C5B1 e as enzimas *Kpn*I e *Sfi*I para AsChtII-C3C4 e os resultados obtidos foram visualizados em gel de agarose 1%. Os clones foram quantificados por espectrofotômetro BioSpec-nano (Shimadzu) e enviado para o sequenciamento. Uma análise *in silico* das clonagens das quitinases no plasmídeo pPICZ α A foi realizado usando o programa UGENE, Figura 3.2. As proteínas recombinantes previstas têm um sinal de secreção de alfa-fator em seus terminais N e um epitopo c-Myc no C terminal. A digestão *in silico* e a clonagem foram realizadas utilizando UGENE.

FIGURA 3.2 - Esquema do vetor de clonagem pPICZ α ligado aos três fragmentos amplificados.



Fonte: Figura retirada do programa UGENE

3.1.6 Transformação dos clones pPICZ α _C2B3, pPICZ α _C3C4 e pPICZ α _C5B1 na linhagem *Pichia pastoris* KM71H^(Mut^S) eletrocompetentes

O sistema de expressão *Pichia pastoris* foi utilizado para a expressão das proteínas recombinantes. Esse microorganismo eucarioto além de possuir capacidade de crescimento rápido, processamento de proteínas, dobramento de proteínas e modificação pós-traducional, de fácil manipulação quanto o de *E. coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*.

A linhagem KM71H (Mut^S) possui o locus AOX1 interrompido, e como resultado este fenótipo tem o crescimento lento na presença de metanol, porém na presença do promotor AOX1 esta linhagem possui a capacidade de produção na presença de metanol. Portanto o uso do metanol é para indução e produção de

proteínas e não como fonte de carbono para crescimento celular. Na presença de glicerol o promotor AOX1 permanece inapto havendo somente crescimento celular. Interrompido o glicerol por metanol o promotor AOX é fortemente induzido e a fonte de carbono neste caso passa a ser destinada para a produção de proteína (LOOSER *et al.*, 2015).

O DNA linear pode gerar transformantes estáveis de *P. pastoris* via recombinação homóloga entre o DNA e regiões de homologia dentro do genoma (Cregg *et al.*, 1985; Cregg *et al.*, 1989). Nesse contexto, para haver a recombinação homóloga com o genoma da levedura e o plasmídeo contendo o gene de interesse há a necessidade da linearização dos clones.

Cerca de 10 µg de cada clone pPICZαA_C2B3, pPICZαA_C3C4, pPICZαA_C5B1 foi utilizado na reação de linearização separadamente. A enzima usada no processo foi a *FastDigest SacI* (Thermo Scientific), tampão 10x *SacI*, e água ultrapura para um volume final de 200 µL. A reação foi mantida a 37 °C por 40 minutos. Para o clone pPICZαA_C2B3, a enzima *MssI*(*PmeI*) (Thermo Scientific) foi usada na reação e o tempo de incubação foi de 2 horas a 37 °C. Após essa etapa os DNAs linearizados foram precipitados (concentrados) para serem usados na reação de transformação na linhagem KM71H de *Pichia pastoris* (Invitrogen) por eletroporação.

Para a precipitação foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio ao DNA linearizado sob agitação por alguns segundos, seguido de centrifugação por 2 minutos a 15.000g formando duas fases. A fase superior contendo o DNA foi transferida para outro tubo e adicionou se acetato de sódio 3 M em uma proporção de 1:10 (1 de DNA e 10 de acetato de sódio). O etanol 100% gelado (2,5 V) foi adicionado e a mistura foi armazenada *overnight* no freezer (-20°C).

O precipitado foi centrifugado a 15000g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* formado foi adicionado etanol 70% gelado seguido centrifugação a 15.000g a 4°C por 20 minutos. O precipitado foi incubado em estufa à 37°C por aproximadamente 30 minutos para secagem, e posteriormente foi ressuscitado em 10 µL de água ultrapura. Tanto o DNA linearizado quanto o precipitado foram analisados em gel de agarose 1 %.

As células competentes da linhagem KM71H foram produzida de acordo com o manual “EasySelect™ *Pichia* Expression kit” (Invitrogen - K1740-01). Para a transformação por eletroporação, cerca de (10 µg) do DNA linearizado e

precipitado de cada construção plasmidial e 80 μ L de células foram utilizados. As amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação de 0,2 cm (mantidas no gelo por 5 minutos). As células foram pulsadas de acordo com os parâmetros para *P. pastoris* (2.500 V, 200 Ω , 25 μ F e 5 milissegundos) utilizando um eletroporador GenePulser (BioRad). Imediatamente após o choque foi adicionado à cubeta 1 mL de sorbitol 1 M estéril gelado e a mistura foi homogeneizada cuidadosamente. Transferiu-se o conteúdo das cubetas para tubos estéreis de 15 mL e incubou-se por 90 minutos a 30 °C na estufa. As células transformadas foram plaqueadas em meio YPDS ágar (extrato de levedura 1 %, peptona 2 %, dextrose 2 %, sorbitol 1,0 M, ágar 2 %) com 100 μ g/mL de Zeocina. As placas foram incubadas a 30 °C por 3 dias.

A avaliação de colônias transformantes foi feita através de PCR usando os *primers* específicos para cada construção e DNA genômico da colônia de *P. pastoris* crescida na presença de 500 μ g/mL de Zeocina como DNA molde. Cinco colônias foram obtidas para a construção pPICZ α -C5B1, cinco colônias para a construção pPICZ α -C2B3 e onze colônias para construção pPICZ α -C3C4.

As colônias selecionadas para ambas as construções tiveram o DNA genômico extraído. Em seguida, a eficiência da transformação de *P.pastoris* KM71H foi confirmada por PCR utilizando o DNA genômico como DNA molde.

A extração de DNA genômico de colônias de *P. pastoris* foi feita de acordo com o protocolo já padronizado no nosso laboratório, descrito brevemente a seguir. Uma amostra de cada colônia selecionada foi homogeneizada em 600 μ L de tampão de extração (NaCl 0,5 M, EDTA 0,0 5M, Tris 0,1 M e β -mercaptoetanol 0,2%), com posterior adição de 50 μ L SDS 20%. A mistura foi incubada por 1 minuto sob leve agitação seguido de incubação a 60 °C por 15 minutos. Em seguida, à solução foram adicionados 300 μ L acetato de potássio 5 M seguido de leve agitação por 1 minuto. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 13.200 g por 10 minutos. Cerca de 840 μ L do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 2 mL e foi adicionado o mesmo volume de isopropanol seguida de agitação breve, centrifugação nas mesmas condições acima já mencionado. O sobrenadante foi descartado e 500 μ L de etanol 70% foram adicionados ao *pellet*. Esta solução foi posteriormente centrifugada a 13.200 g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* incubado em estufa à 60 °C por 15 minutos para secagem. Após o *pellet* secar, este foi homogeneizado em 50 μ L de água ultrapura.

A reação de PCR foi preparada com volume final de 25 μ L contendo o DNA genômico como molde, tampão 10x Phusion, enzima Phusion™ High Fidelity DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific), dNTP, os mesmos *primers* de cada construção utilizados para amplificar o DNA da C2B3, C3C4 e C5B1. As condições dos ciclos da reação de PCR para amplificação dos genes mencionado na Figura 3.1 foram utilizados para cada reação de PCR.

3.1.7 Expressão das proteínas recombinantes AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1 em *P. pastoris*.

Para expressar as proteínas recombinantes, colônias da AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1 foram inoculadas em 10 mL de meio BMGY (1 % extrato de levedura, 2 % peptona, 1, 34% yeast nitrogen base (YNB), 1, 64 μ M de biotina, 1 % glicerol e tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0), suplementado com Zeocina (100 μ g/mL) e mantidas a 29 °C e 250 rpm por 24 horas. O inóculo foi transferido para *erlenmeyers* de 2000 mL contendo 500 mL de meio BMGY e mantidos novamente a 29 °C e 250 rpm por 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Os pellets foram homogeneizados em 100 mL meio BMMY (1 % extrato de levedura, 2 % peptona, 1, 34 % yeast nitrogen base (YNB), 1, 64 μ M de biotina, 0,5 % metanol e tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0) e transferido para *erlenmeyers* de 1000 mL.

A cada 24 horas 1 % de metanol (100%) foi adicionado ao meio de cultura para promover a indução. O processo foi mantido a 29 °C por 144 horas. Após este período o meio de cultura foi centrifugado a 3800g por 8 minutos a 4 °C. A amostra foi recolhida e armazenada a -20 °C para análise da atividade enzimática e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).

Como amostra controle o vetor pPICZ α (vazio) foi transformado na linhagem *P. pastoris* KM71H e os procedimentos de purificação e utilização das enzimas em caracterização biológica foi também efetuado com o sobrenadante (meio extracelular) da colônia transformada com o vetor pPIC vazio.

3.1.8 Purificação das quitinases AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1

Para a primeira etapa de purificação das quitinases foi a precipitação das proteínas recombinantes utilizando sulfato de amônio (80%). Cerca de 100 mL do extrato bruto (sobrenadante) foi utilizado no processo. A adição do sal ao extrato bruto foi sob agitação por um período de 15 minutos e em seguida o meio de cultura ficou em repouso por 45 minutos a temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 10000g por 40 minutos a 4 °C e os pellets foram homogeneizados em 5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,9. Após essa etapa foi realizada a diálise do meio de cultura usando SnakeSkin (3.5K MWCO) contra 400 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 5,9 a 4 °C durante 3 horas com 3 trocas de tampão. A amostra obtida após a precipitação com sulfato e amônio e diálise foi chamada e Extrato Enzimático.

O extrato enzimático foi submetido a uma segunda etapa de purificação, a cromatografia de afinidade em metal por fluxo de gravidade, usando uma coluna contendo 2 mL de resina de níquel NI-NTA Superflow (Qiagen). A coluna foi equilibrada previamente com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,9 e 10 mL da amostra foi aplicada a coluna, que permaneceu fechada e estática por 10 horas. Após o período incubação, cerca de 20 mL do mesmo tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 5,9 foi utilizado para a lavagem da resina para a retirada de impurezas. A eluição da proteína foi realizada com tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 5,9 suplementado com 500 mM de imidazol (5 mL).

As amostras eluídas da coluna foram dialisadas contra o tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 5,9 para a retirada do imidazol. A terceira etapa de purificação foi realizada utilizando uma coluna de exclusão molecular (Superdex 75), utilizando o fosfato de sódio 50 mM e pH 5,9 acrescentado de 150 mM de NaCl. As proteínas foram eluídas num fluxo de 0,5 mL/min. As etapas da purificação foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

3.1.9 Atividade enzimática das quitinases

Para a avaliação da atividade enzimática, a quitina coloidal 5% (m/v) foi utilizada como substrato, sendo preparado conforme descrito por (SOUZA *et al.*, 2009). Para o preparo da quitina coloidal, 60 mL de HCl (Merck S.A.) concentrado foi adicionado a 5 gramas quitina (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente por 1 h sob agitação. Após essa etapa, a essa mistura foi adicionada a 200 mL de etanol 50% gelado sob agitação. O precipitado foi filtrado em papel de filtro e lavado com água destilada até que o pH da quitina coloidal atingisse o pH 7,0.

A atividade enzimática foi determinada pelo método (DNS 3,5- ácido dinitrosalicílico) (Sigma-Aldrich), que mede a concentração de açúcar redutor em solução (MILLER, 1959; PANWAR *et al.*, 2014). Assim, 200 µL da enzima parcialmente purificada foram homogeneizados com 200 µL de quitina coloidal 5 % em tampão citrato-fosfato (MCILVAINE, 1921), pH 5,0 e foram encubadas por 1 hora a temperatura de 50 °C sob agitação de 250 rpm. Após esse período, 400 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico foram adicionados à reação. A mistura reacional foi aquecida por 10 min a 100 °C e depois resfriada a -20 °C por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 10.000 g por 5 min e o sobrenadante foi submetido à medição de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (BIOMATE 160). Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão de N-acetilglucosamina (GlcNAc) que variou de 0,1 a 1 mg/mL.

A atividade da quitinase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de GlcNAc por minuto, nas suas melhores condições de pH e temperatura (item 3.1.10).

A concentração das proteínas foi medida pelo método de Bradford utilizando a BSA como padrão (MARION M. BRADFORD, 1976).

3.1.10 Determinação de pH e temperatura ótimos das quitinases

O pH ótimo para cada quitinase foi determinado medindo a atividade enzimática a 50 °C em tampão citrato-fosfato na faixa de pH 3,0 a 8,0. As condições de preparo das reações para o pH ótimo foram feitas conforme descrito do item 3.1.9.

Para os ensaios da obtenção da temperatura ótima, estas foram feitas no pH ótimo para cada quitinase e a temperatura foi estudada na faixa de 25 °C a 80 °C.

Os resultados obtidos foram expressos pela média das absorvâncias de três réplicas de três experimentos independentes com os desvios padrão indicados.

3.1.11 Termo estabilidade Enzimática

A termo estabilidade enzimática foi avaliada pela determinação da atividade após incubação das quitinases parcialmente purificadas nas temperaturas: 4 °C, 28 °C, 37 °C, 50 °C e 55 °C. O tempo de incubação para avaliar as quitinases na presença do substrato foram feitos em intervalos de 1, 8, 16, 24, 48, 72 horas.

3.1.12 Atividade antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica das quitinases foram utilizados dois modelos de fungos patogênicos humanos: o fungo *Aspergillus fumigatus* e a levedura *Candida albicans* (ATCC64548).

Para monitorar o crescimento de *A. fumigatus* tipo selvagem 2.5×10^4 conídios da cepa foi cultivados em 200 µL de meio mínimo (glicose 1 % (v/v), 1 x sais de contendo nitrato e 1 x oligoelementos, pH 6,5), (I. MALVAZI e G.H. GOLDMAN, 2012) que foram suplementadas com concentrações variáveis das quitinases parcialmente purificada (100, 50 e 25 µg/mL). As quitinases foram avaliadas separadamente e também um estudo foi feito para analisar um possível sinergismo entre as quitinases contra o fungo *A. fumigatus*.

O corante resazurina na concentração final de 0,002 % (m/V) foi utilizado como *dye*. O tempo de incubação para a avaliação antifúngica das quitinases sobre o fungo foi de 24 a 30 h a 37 °C. O experimento foi realizado em placas preta de 96 poços (Greiner Bio-One; 655,086).

Após o período de incubação, a porcentagem de redução de resazurina foi determinada fluorimetricamente medindo a fluorescência nos comprimentos de onda 570 nm (excitação) e 615 nm (emissão). A Fluorescência foi

determinado com um leitor de placas Spectra Max SpectraMax i3 (Molecular Devices). Os valores médios obtidos foram usados para calcular a porcentagem de crescimento do fungo, na presença e ausência das quitinases. Para padronizar as condições do ensaio, o fungicida comercial Amphotericin B (2 µg/mL) foi avaliada pelo ensaio de resazurina.

A porcentagem da redução da resazurina e a inibição do crescimento foram calculadas usando a normalização com modificações (MONTEIRO *et al.*, 2012) :

$$\% \text{ de redução} = 100 \times (\text{IFAT}/\text{IFCNT})$$

Sendo:

IFAT, intensidade fluorescente do agente de teste

IFCNT, intensidade fluorescente da célula não tratada;

E finalmente, calcula-se a porcentagem de inibição de crescimento do fungo como:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \% \text{ de redução} - \% \text{ de redução do controle tratado (pPICZalfa vazio)}.$$

Para serem avaliadas neste estudo, as quinasses foram esterilizadas por filtração em membrana de ultrafiltração (0,22 µm - KASVI) e todos os experimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

Para os ensaios com a *Candida albicans* 2.5×10^4 conídios da cepa foram cultivados em 200 µL de meio mínimo (glicose 1% (v/v), 1 x sais de contendo nitrato e 1 x oligoelementos, pH 6,5), que foram suplementadas com concentrações variáveis das quitinases parcialmente purificada (150, 100 e 50 ug/mL). O tempo de incubação para a avaliação antifúngica das quitinases sobre a *C. albicans* foi de 24 a 30 horas a 37 °C. Para avaliar o potencial efeito sinérgico de AschtII-C5B1, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C2B3 foi realizado na presença do *calcofluor White* (CFW) um agente que fragiliza a parede celular do fungo competindo por ligações de

hidrogênios com as enzimas β -1,3-glucano e ao β -1,6-glucano que conectam com a quitina (RAM; KLIS, 2006).

Como controle do experimento foi utilizado o cultivo do *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZ α A vazio na mesma concentração das AsChtII-C5B1, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C2B3.

O crescimento das células de *C. albicans* foi acompanhado pela leitura da densidade ótica a 600. As quinasses foram esterilizadas por filtração em membrana de ultrafiltração (0,22 μ m - KASVI) e todos os experimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

4 METODOLOGIA- Parte II

Ação enzimática da quitinase AsChtII-C4B1 sobre diferentes substratos de quitina e sua atividade antifúngica contra o fungo *L. theobromae*.

4.1 Estudos morfológicos da estrutura α -quitina e β -quitina sob a ação da quitinase AsChtII-C4B1

A obtenção da AsChtII-C4B1 foi realizada segundo o protocolo realizado por (MICOCCI *et al.*, 2023) com algumas modificações, sendo a alterada a concentração de metanol como indutor da expressão para 1% e mudando o pH da solução tampão na purificação em níquel mudado de 7 para 5,9 (observou-se melhora na atividade enzimática).

Quatro tipos de quitina foram avaliados neste estudo: α -quitina sólida, α -quitina coloidal, β -quitina coloidal e sólida. A α -quitina coloidal foi preparada de acordo com o método descrito por (SOUZA *et al.*, 2009). O substrato β -quitina natural foi extraída de lulas (*Doryteuthis* spp.), espécies encontradas na costa brasileira, procedimento de extração realizado por (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). A β -quitina foi então moída em moinho de facas equipado com peneira de 1 mm e moído em diferentes frações de pó com diâmetros médios (d), variando como $d < 0,125$ mm e $d > 0,425$ mm, procedimento realizado por (FACCHINATTO *et al.*, 2021). Para a obtenção do substrato β -quitina coloidal, o mesmo procedimento para obtenção da α -quitina coloidal foi realizado, conforme descrito no item 3.1.9.

Os substratos α -quitina coloidal e β -quitina coloidal foram preparados na concentração de 5 % (m/v), em tampão citrato-fosfato pH 5,0 (MCILVAINE, 1921), tanto. Para o meio reacional 1,0 mL de proteína purificada (0,713 mg) foi adicionada a 1 mL de substrato em tampão citrato-fosfato, totalizando um volume final de 2 mL. Os tubos contendo o meio reacional foram encubados sob agitação de 250 rpm por 48 h a 55 °C.

Após o período de encubação, uma amostra do meio reacional foi retirada para o teste colorimétrico utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich). O ensaio tem como base a detecção do N-acetil-D-glucosamina

(GlcNAc) liberado a partir da ação hidrolítica sobre o substrato (MILLER, 1959). O mesmo volume de DNS foi adicionado ao meio reacional e a amostra foi fervida por 10 min a 100 °C, resfriada a 20 °C, e em seguida centrifugada a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi submetido à medida de absorvância a 540 nm em espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-Vis) (BIOMATE 160) à temperatura ambiente. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso em média \pm DP.

4.2 Preparo das amostras para análises por RMN

Alíquotas de 350 μ L das amostras do produto da reação enzimática da AsChtII-C4B1 contra o substrato α -quitina coloidal, β -quitina coloidal, foram diluídas em 250 μ L da solução do padrão interno 3-trimetilsililpropionato de sódio – d4 (0,50 mM, TMSP em D₂O), resultando em soluções de 600 μ L com concentração do padrão interno de 0,21 mM. Posteriormente, um volume de 600 μ L de cada amostra foi transferido para um tubo de RMN padrão de 5 mm para as análises de RMN.

4.2.1 Análise das quitinas após reação com AsChtII-C4B1 por RMN

Os experimentos 1 D e 2 D das amostras foram obtidos a 25 °C em equipamento Bruker de 14,1 Tesla, AVANCE III, equipado com uma sonda de detecção direta PABBO (Broad Band Observe) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching Adjustment), gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável BCU-I, unidade geradora de gradiente de campo, e trocador de amostra automática “Sample-Xpress™”.

Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos usando uma sequência de pulso de supressão de solvente de pré-saturação do sinal da água (denominada noesygppr1d no TopSpin Bruker com gradiente de campo e, com a supressão do sinal da água pela irradiação na frequência 2822.04 Hz (O1). As condições foram: 64 promediações (ns), 4 “dummy scans” (ds), 65536 pontos de dados durante a aquisição (td), janela espectral de 20.0276 ppm (sw), ganho do receptor de 80.6 (rg), pulso de 90° de 11.850 μ s, tempo de aquisição entre cada aquisição 2.73 s (aq) e 5 ms de tempo de mistura (d8).

Os espectros de RMN de ^1H foram referenciados por meio do sinal do TMSP-d4 em 0,0 ppm. Para apoiar a atribuição do composto de interesse foram realizados experimentos de RMN 2 D, como ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, J_{res} , foram realizados em amostra selecionada. Para determinação do produto de interesse foi realizada uma consulta de bancos de dados espectrais (banco de dados de metaboloma humano, HMDB - Human Metabolome Database: Showing metabocard for N-Acetyl-D-glucosamine (HMDB0000215)).

4.2.2 Processamento espectral e quantificação do composto

Os espectros de RMN ^1H foram processados com um alargamento de linha de 0,3 Hz usando o software TopSpinTM 3.6.1 (Bruker, Biospin, Alemanha). A correção de fase e linha de base foi corrigida manualmente usando o Chenomix NMR Suite 8.4 (Chenomix Inc, Edmonton, Canadá). O composto foi identificado nos espectros de RMN ^1H usando a biblioteca de compostos incorporada na ferramenta Chenomx Profiler, cujos sinais de sobreposição dos compostos também foram deconvoluídos por software.

As atribuições de metabólitos foram confirmadas pela análise de mapas de correlação de RMN 2 D usando o software MestRenova e o banco de dados de metaboloma humano. Também pelo Chenomx, os espectros de RMN ^1H foram referenciados ao pico de TMSP a 0,00 ppm, que foi usado como padrão interno de concentração conhecida (0.5 mM) para quantificação o composto de interesse.

4.3 Análise de microscopia eletrônica dos substratos após a reação com a enzima AsChtII-C4B1

Os diferentes tipos de quitina usados como substrato para a enzima AsChtII-C4B1 foram submetidos à análise de microscopia eletrônica (MEV/FEG). Assim, as amostras de quitina resultantes da ação enzimática foram preparadas em porta amostras (*stubs*), recobertas com uma camada de ouro e/ou platina. As imagens de MEV foram obtidas em um equipamento JEOL, modelo JSM 6510, com

tensão de aceleração de elétrons de 5 kV a uma distancia de trabalho (WD) de 10 mm aplicadas em um suporte de silicone (5 mm × 5 mm) e as micrografias do (FEG) forma obtidas de um equipamento JEOL modelo 670F com tensão de aceleração 2 kV a distancia de trabalho (WD) de 3 mm.

4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (RMN-ES) de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Advance 400 (Bruker), acoplado a uma sonda de dupla-ressonância de 4 mm com rotação no ângulo mágico (MAS), operando a 100,5 MHz. Cerca de 100 mg das amostras liofilizadas foram utilizados e os espectros foram obtidos a 25 ± 1 °C. O grau médio de acetilação (GA) foi calculado a partir da equação (1), onde A_{CH_3} corresponde à área do sinal referente ao carbono metílico das unidades GlcNAc e $A_{\text{C1-C6}}$ é a soma das integrais dos sinais de carbonos do anel glicosídico.

$$\overline{GA} (\%) = \left(\frac{A_{\text{CH}_3}}{A_{\text{C1-C6}}/6} \right) \times 100 \quad (1)$$

O ordenamento molecular de curto alcance foi avaliado e o índice de cristalinidade I_{CrCP} foi calculado pelo ajuste dos sinais dos carbonos C4 e C6, de acordo com o método de deconvolução proposto por (FACCHINATTO *et al.*, 2020).

4.5 Difração de Raios X (DRX)

Os padrões de difração de raios X (DRX) das amostras de quitina foram adquiridos utilizando um difratômetro AXS D8 Advance (Bruker), com fonte de radiação de Cu K_α ($\lambda = 0,1548$ nm). As medidas foram realizadas no intervalo $5^\circ < 2\theta < 50^\circ$, com velocidade de varredura de 5° min^{-1} . Os índices de cristalinidade (ICr) foram estimados a partir do método de subtração da contribuição da região amorfa (A_{am}) pelo ajuste de curvas de *spline* cúbicas, da área total do padrão de difração (A_{tot}) utilizando o software Microcal Origin 2020 (OSORIO-MADRAZO *et al.*, 2010).

Além disso, as dimensões dos domínios cristalinos (L_{hkl}) foram estimadas a partir da largura à meia altura (LMA) dos picos de difração em $2\theta \approx 8,3^\circ$ (plano 020) e $\approx 19,7^\circ$ (plano 200), ajustando curvas Lorentzianas e aplicando a equação de Scherrer (2) (FACCHINATTO *et al.*, 2020, 2021).

$$L_{hkl} = \left(\frac{(0,9) (l_{K\alpha})}{(LMA)_{hkl} (\cos \theta)_{hkl}} \right) \quad (2)$$

4.6 Viscosimetria Capilar em Regime Diluído

As massas moleculares médias viscosimétricas (\overline{M}_v) das amostras de quitina foram determinadas a partir de suas viscosidades intrínsecas ($[\eta]$) e graus médios de acetilação (\overline{GA}). Para a determinação da viscosidade intrínseca, tanto quitina de partida quanto as tratadas enzimaticamente foram solubilizados em *N,N*-dimetilacetamida (DMAc) contendo 5% de cloreto de lítio (m/v). Aproximadamente 10 mg de cada amostra foram adicionados a 20 mL de DMAc/LiCl por 24h a temperatura ambiente. Em seguida, a solução resultante foi filtrada sob pressão positiva utilizando membranas de acetato de celulose com diâmetro médio de poros de 0,45 μm (Millipore®).

Após a filtração, 15 mL das soluções foram transferidos para um capilar de vidro com diâmetro de 0,84 mm e o conjunto foi imerso em banho termostático a $25,00 \pm 0,01$ °C. As medidas dos tempos de escoamento das soluções poliméricas foram realizadas utilizando um viscosímetro modelo AVS-360 acoplado a bureta automática AVS-20, ambos da empresa Schott-Geräte, GmbH.

As concentrações das soluções foram suficientemente baixas para resultar em viscosidades relativas (η_{rel}) entre 1,2 e 1,8 com objetivo de assegurar que as medidas fossem realizadas no regime diluído. A partir da adição de volumes definidos de solvente ao capilar, realizados de forma automatizada pela bureta, as soluções iniciais foram diluídas, possibilitando obtenção de tempos de escoamento diferentes em função da concentração da solução polimérica. Estes resultados permitem a determinação de viscosidade relativa (η_{rel}) e viscosidade reduzida (η_{sp})

de cada solução de concentração conhecida (C_p). Com isso, foram elaboradas curvas de η_{sp}/C vs (C_p) para verificar o ajuste à Equação de Huggins (3).

A partir da extrapolação da reta obtida à diluição infinita, é possível determinar a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) do polímero, que por sua vez é necessário para o cálculo da (HUGGINS, 1942; RINAUDO *et al.*, 1993). Estes ensaios foram realizados em triplicata.

$$\frac{\eta_{SP}}{C} = [\eta] = K_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (3)$$

Onde η_{sp} corresponde à viscosidade específica, $[\eta]$ à viscosidade intrínseca, K_h a constante de Huggins e C a concentração inicial do polímero.

Com os valores de viscosidade intrínseca, a Massa Molecular Viscosimétrica Média (\overline{M}_v), em $g \text{ mol}^{-1}$, foi determinada através dos parâmetros de Mark-Houwink-Sakurada (4) (KNAUL *et al.*, 1998) (K' e α), são específicos para cada polímero, solvente e temperatura. Estes coeficientes foram determinados para a quitina em DMAc/5%LiCl a 25 °C, e possuem valores de $2,4 \times 10^{-1} \text{ mL g}^{-1}$ e 0,69, respectivamente (TERBOJEVICH *et al.*, 1988).

Além disso, foram calculados os graus médios de polimerização viscosimétrica (\overline{GP}_v) das amostras de beta-quitina e *whiskers*, utilizando os valores de \overline{GA} obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN), a partir da equação (5), onde 161 e 203 correspondem às massas moleculares ($g \text{ mol}^{-1}$) das unidades GlcN e GlcNAc, respectivamente.

$$[\eta] = K \cdot \overline{M}_v^\alpha \quad (4)$$

$$\overline{GP}_v = \frac{(\overline{M}_v * 100)}{[161 * (1 - \overline{GA}) + 203 * \overline{GA}]} \quad (5)$$

4.7 O fungo *Lasiodiplodia theobromae*

O fungo *L. theobromae* (CDA 1169), isolado de caule de gravioleira (*Annona muricata*), Jaiba, MG, foi adquirido da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco e mantido em água estéril de acordo com o método de (CASTELLANI, 1963) em temperatura ambiente até o uso. A passagem da cultura do fungo para placa de Petri foi feita em meio de cultura BDA (Potato Dextrose Agar M096, HIMEDIA). A placa foi mantida em estado estático a 28 °C durante 3 dias para em seguida o fungo ser utilizado tanto em meio sólido como em meio líquido.

4.7.1 Ensaio biológicos da enzima AsChtII-C4B1 no fungo *L. theobromae in vitro*

Com o intuito de estudar qual substrato a enzima teria uma melhor afinidade de ligação, a porcentagem de proteína ligada ao substrato β -quitina e α -quitina coloidal e solidas variando o tempo de incubação (1 a 72 horas) a 55 °C foram avaliadas medindo as concentrações das proteínas em solução durante o período de incubação estipulado utilizando o método (BRADFORD, 1976), e a BSA como padrão.

Para avaliar o comportamento enzimático da AsChtII-C4B1 a temperatura a 28 °C, temperatura do crescimento do fungo *L. theobromaeda* a enzima teve como substrato α -quitina coloidal variando o tempo de incubação (1 a 72 horas) e a estabilidade térmica na mesma temperatura e período de incubação. Os resultados obtidos são expressos como média de três réplicas de três experimentos independentes.

Ensaio de atividade fungicida - Método 1

A atividade antifúngica foi medida usando um método de placa cilíndrica com algumas modificações (LI *et al.*, 2018). O fungo foi cultivado em placa Petri descartável (90 cm x 15 mm) contendo meio BDA (*Potato Dextrose Agar* M096, HIMEDIA) a 28 °C em uma incubadora por 72 horas. Uma amostra micelial

dessa placa com tamanho de 8 mm foi retirada e plaqueada no centro de outra placa Petri contendo BDA e após 72 horas de incubação a 28 °C, foram feitos nesta placa à distância de 1 cm da borda da colônia micelial, halos de 8 mm e 200 µl do extrato enzimático (0,166, 0,332 e 0,496 mg/mL), proveniente da primeira etapa de purificação (precipitação com $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ seguido da diálise) foram adicionados nos respectivos halos. Como controle utilizou-se o extrato de *P. pastoris* KM71H parcialmente purificado contendo o vetor pPICZαA vazio (precipitação com $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$,

A enzima purificada (200 µL) após coluna de níquel (0,770 mg/mL) foi testada da mesma maneira e o tampão fosfato de sódio 50mM, pH 5,9. Para que houvesse uma melhor difusão da solução contendo a enzima no meio BDA, as amostras plaqueadas foram incubadas a 4 °C durante a noite e em seguida as placas foram transferidas para uma incubadora a 28 °C por mais 72 horas.

Ensaio de atividade fungicida- Método 2

Do fungo cultivado em placa Petri descartável (90 cm x 15 mm) contendo o meio BDA (Potato Dextrose Agar M096, HIMEDIA) foi retirado uma amostra micelial com tamanho de 8 mm e colocado em 10 mL do meio líquido de constituído de $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,6 g L⁻¹, KH_2PO_4 4 g L⁻¹, CaCl_2 0,6 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g L⁻¹, peptona 1,8 g L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02 g L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g L⁻¹) (MANDEL e WEBER, 1991). O meio contendo o fungo foi incubado a 28 °C sob agitação constante de 150 rpm por 72 horas. Em seguida a quitinase purificada (coluna Ni-NTA) (0,710 mg/mL) foi adicionada ao meio e a cultura permaneceu por mais 72 horas sob as mesmas condições para verificar o crescimento micelial do fungo.

Após este período a DO (densidade ótica) a 600 nm do meio foi medida e a solução foi analisada em microscópio. Como controle, o mesmo procedimento foi feito com o fungo sem a presença da enzima. Os resultados obtidos são expressos como média de três réplicas de três experimentos independentes com os desvios padrão indicados.

Para analisar a biomassa seca do fungo após a ação da enzima contra a quitina contida na parede celular do fungo, este foi coletado, enxaguado com água milliQ e seco a 60 °C para determinar a biomassa seca. O controle fungo sem a

presença da enzima passou pelo mesmo procedimento experimental. Os resultados obtidos são expressos como média de três réplicas de três experimentos independentes com os desvios padrão indicados.

Ensaio de atividade fungicida - Método 3

Do fungo cultivado em placa Petri conforme descrito anteriormente foi retirada uma amostra micelial com halo de 8 mm e plaqueado na placa de duas maneiras – o micélio voltado para cima na superfície do BDA e um outro em contato direto com o BDA e sobre estes foram gotejados quitinase na concentração de 0,710 mg/mL.

4.7.2 Preparação das amostras biológicas para os experimentos de MEV

Para investigar o efeito da AschtII-C4B1 na morfologia da quitina contida na parede celular do fungo, amostras provenientes do método 2 foram utilizadas para serem analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram incubadas em uma solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 5% CaCl 0,05%) para a fixação e preservação do material biológico.

As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente e em seguida a solução de Karnovsky foi descartada e as amostras foram desidratadas variando a porcentagem de acetona a cada 10 minutos (30%, 50%,70%, 90% e 100%), sendo na porcentagem de 100% o procedimento da desidratação foi realizada por 3x a cada 10 minutos. As amostras foram congeladas e em seguida liofilizadas. Após a liofilização as amostras biológicas foram preparadas em porta amostras (*stubs*) e recobertas com uma camada de ouro. Posteriormente foram analisadas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o intuito de ver as possíveis alterações morfológicas nas hifas do fungo. As micrografias foram obtidas em um equipamento JEOL, modelo JSM 6510, com tensão de aceleração de elétrons de 5kV a uma distancia de trabalho (WD) de 10 mm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I

Quitinase do grupo II (ChtII), membro da família glicosídeo hidrolases 18 (GH18), é uma enzima importante em todos os estágios de desenvolvimento de insetos (SU *et al.*, 2016; ROYER *et al.*, 2002). Possui alto peso molecular e contém de quatro ou cinco domínios catalíticos e quatro a sete domínios de ligação à quitina (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010; CHEN *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2008). No entanto, nem todos os domínios catalíticos são ativos, uma substituição do aminoácido glutamato, doador de prótons, pode ocorrer sugerindo que esse domínio pode carecer da atividade catalítica mesmo mantendo a capacidade de ligação ao substrato (YANG, 2019).

Uma quitinase do grupo II da espécie lepidóptera *Ostrinia furnacalis* teve dois domínios catalíticos ativos cristalizados e segundo as propriedades catalíticas e estruturais analisadas sugerem que a quitinase do grupo II no inseto pode ter a função de ser a primeira enzima a descristalizar inicialmente a quitina cuticular no inseto deixando o polímero mais acessível para as demais quitinases atuarem, ou seja um trabalho de sinergismo entre as quitinases essenciais para a despolimerização completa da quitina no inseto (CHEN *et al.*, 2018).

Devido à sua importância no desenvolvimento de insetos, mas também em outros organismos que apresentam quitina, as quitinases representam um vasto e promissor campo de pesquisa. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de cadeias recombinantes contendo domínios quitinases da formiga cortadeira *Atta sexdens*, sua caracterização e avaliação como possíveis fungicidas.

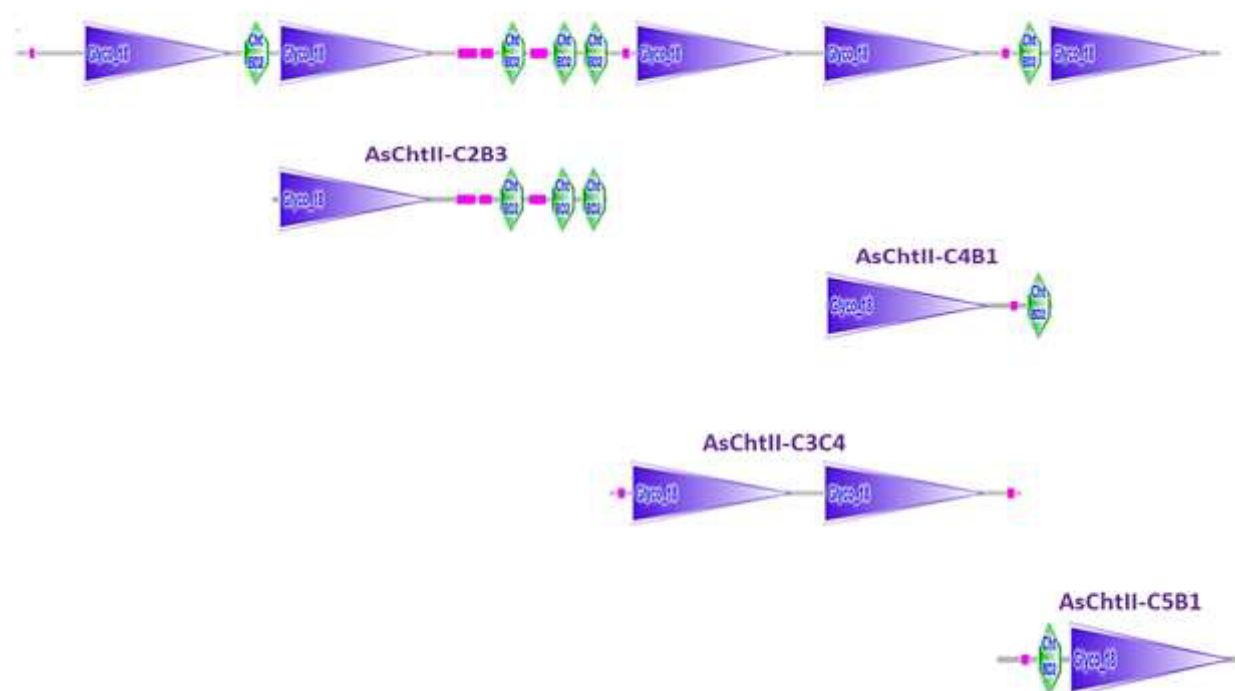
5.1 Amplificação dos DNAs referentes às quitinases de *A. sexdens*

A formiga cortadeira *Atta sexdens* ainda não possui o seu genoma estudado e, portanto, não era possível desenhar *primers* para amplificação de DNA relativos às quitinases. A síntese dos oligonucleotídeos para obtenção dos genes foi elaborada tendo como referência a sequência codificadora para uma quitinase da formiga *Acromyrmex echinatio* (XP_011065639) depositada no banco de dados *National Center for Biotechnology information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A proteína predita desta sequência de nucleotídeos teria 2678 resíduos de

aminoácidos com predição de peptídeo sinal, cinco domínios catalíticos e cinco módulos de domínios de ligação a quitina (CBM), sendo classificada como pertencente ao Subgrupo II da família GH18 (FIGURA 5.1, primeira linha). Os domínios catalíticos e os CBMs apresentam baixa similaridade sequencial, conforme avaliado por alinhamentos de sequências-dados não mostrados, e iniciamos o estudo de obtenção de diferentes cadeias polipeptídicas de *A. sexdens* baseada na sequência depositada da XP_011065639 de *Acromyrmex*. Assim, a proteína denominada AsChtII-C4B1 (Figura 5.1) foi expressa em *P. pastoris* e foi estudada quanto à sua atividade larvívica e fungívica (MICOCCHI et al., 2023).

No presente trabalho foi proposta a expressão de 3 cadeias polipeptídicas aqui denominadas de AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4, e AsChtII-C5B1, que estão ilustradas na Figura 5.1. AsChtII-C2B3 apresenta um domínio catalítico quitinase e três domínios de ligação à quitina (CBM), AsChtII-C3C4 apresenta dois domínios catalíticos quitinase e AsChtII-C5B1 apresenta um domínio catalítico e um domínio CBM.

Figura 5.1 - Arquitetura de domínio da quitinase grupo II da formiga cortadeira *Acromyrmex echinaior* e as cadeias polipeptídicas de *A. sexdens*.

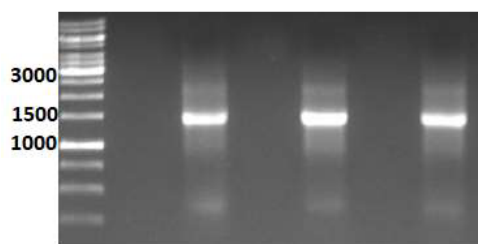


Fonte: Análise feita com o programa SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>.

O sistema de expressão escolhido para obtenção das enzimas foi o de *Pichia pastoris* que por ser eucarioto permite modificações pós-traducionais e o vetor foi o pPICZalpha, que permite a expressão para o meio extracelular da proteína heteróloga e cauda de histidina na região C-terminal da mesma.

Assim, a partir dos *primers* desenhados, os DNAs foram amplificados por PCR. Para tanto, a extração do RNA total foi realizada a partir da fase pupa da formiga *A. sexdens* e o RNA foi analisado em gel de agarose e através da transcriptase reversa foi sintetizado o cDNA. A (Figura 5.2) ilustra a análise dos produtos de 3 reações de formação de cDNA. Uma observação é que para a construção C2B3 o *primer forward* continha sequência para expressão de cauda de histidinas no N-terminal da proteína e o *primer reverse* continha *stop códon*.

Figura 5.2 - Análise em gel de agarose 1 % do RNA total extraído de *A. sexdens*- Marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific).



Fonte: Própria

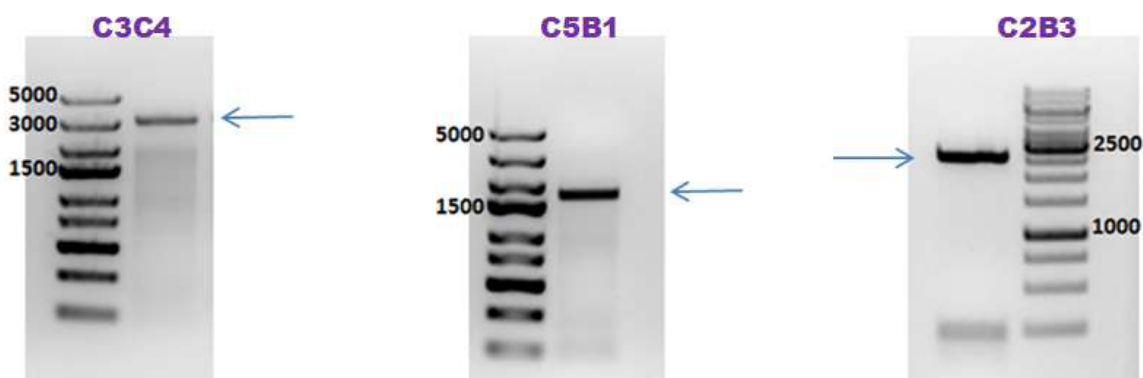
5.2 Clonagem dos DNAs C2B3, C3C4 e C5B1 no vetor pJET1.2

A primeira etapa para a obtenção dos DNAs foi realizada utilizando, inicialmente, *primers* de *busca* sem os sítios de restrição, abrangendo regiões maiores do que a sequência desejada, pois estudos anteriores no nosso laboratório mostraram que para amplificação de DNA de massa molar alto esta é a melhor estratégia. A partir dos *primers* de busca e utilizando como molécula molde o cDNA da *A. sexdens*, foi possível amplificar DNAs (dados não mostrados) que foram usados sequencialmente como molécula molde para amplificação dos fragmentos de DNA desejados (usando agora os *primers* com os sítios e restrição).

A amplificação do DNA relativo ao C2B3, talvez pelo fato de ser um DNA de massa molecular elevada, somente foi positiva com *primer forward* contendo sequência de nucleotídeos que resultariam em cauda de histidina na região N-terminal da proteína.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos DNAs C2B3, C3C4 e C5B1 foram bem sucedidas para obtenção de fragmentos de DNA com os tamanhos esperados, conforme análise em gel de agarose (Figura 5.3). Eram esperados (e foram obtidos) amplicons de 3000 pb para C3C4, 1600 pb para C5B1 e 2400 pb para C2B3.

FIGURA 5.3 – Análise em gel de agarose 1% dos fragmentos de DNA amplificados por PCR. Marcador de peso molecular (1 kb).

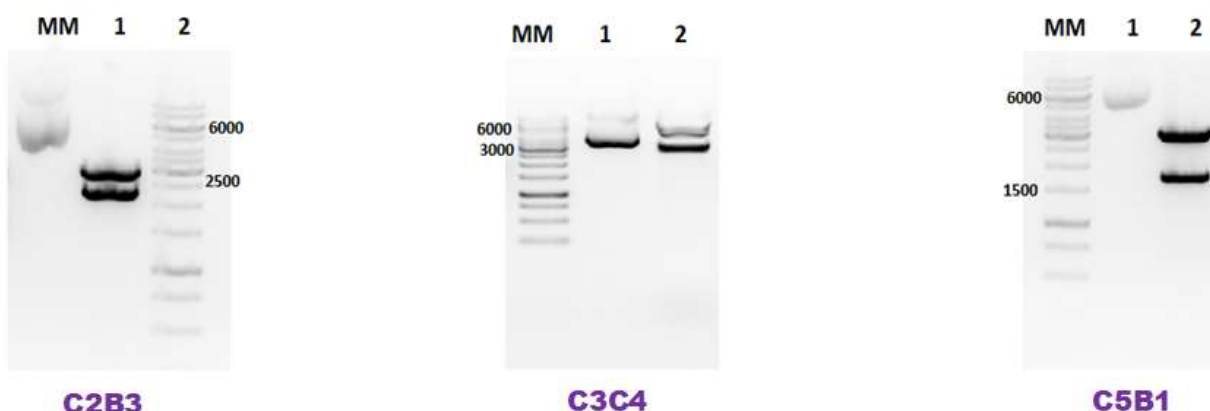


Fonte: Própria

A clonagem dos 3 DNAs amplificados foi feita por reação de ligação dos DNAs ao vetor de clonagem pJET, usando o sistema CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) conforme as orientações do fabricante. A clonagem foi avaliada através da digestão dos DNAs após a reação de ligação, com enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI* para C5B1 e C2B3, *KpnI* e *SfiI* para C3C4.

A digestão dos clones pJET_C2B3, pJET_C3C4 e pJET_C5B1 gerou dois fragmentos de DNA, um que apresenta uma banda de aproximadamente 3000 pb referente ao vetor pJET e os fragmentos de 2400 pb, 3000 pb e 1600 pb (Figura 5.4), mostrando que a clonagem foi bem sucedida.

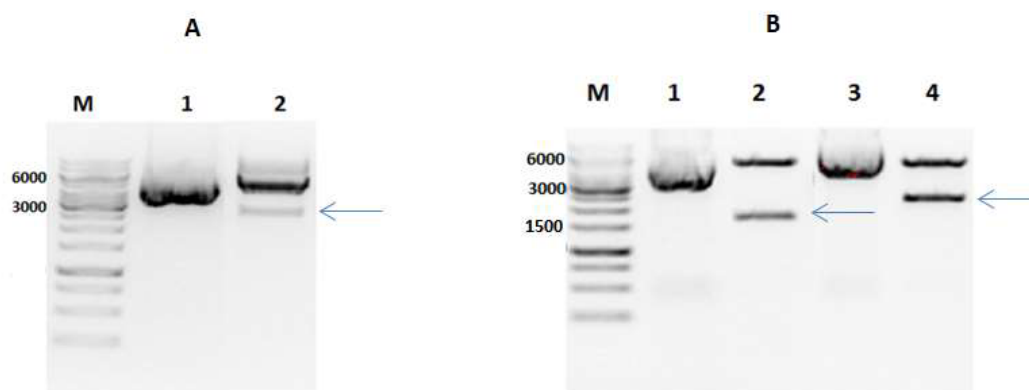
FIGURA 5.4 - Análise em gel de agarose da reação de digestão enzimática dos clones.



Fonte: Própria

Após a digestão dos clones com as enzimas de restrição, os DNAs foram purificados, quantificados e usados em reação de ligação ao vetor pPICZ α A previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para cada construção. A colônia escolhida para cada construção foi crescida em meio LB, overnight, após o qual o DNA plasmidial foi extraído e usado em reação de digestão com enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI* para AsChtII-C2B3 e AsChtII-C5B1, *KpnI* e *SfiI* para AsChtII-C3C4.

FIGURA 5.5 - Análise em gel de agarose da reação de digestão dos clones. **A** - pPICZ α A-C3C4 (3000 pb), **B** - pPICZ α A-C5B1 (1600 pb), e pPICZ α A-C2B3 (2400 pb)



Fonte: Própria

5.3 Análise do sequenciamento dos clones

O domínio catalítico das quitinases pertencentes à classe GH18 tem um enovelamento na forma de um barril (α/β)₈ TIM (*triose-phosphate isomerase*) e é caracterizado por 4 regiões contendo os motivos conservados: KXXXXXGGW, FDGXDLWEYP, MXYDXXG e GXXXWXXDXDD, sendo X um aminoácido não específico. O segundo motivo, FDGXDLWEYP, apresenta o resíduo glutamato (E) atua como o ácido catalítico, doando o próton necessário para a clivagem da ligação glicosídica. Estudos mostram que a substituição do resíduo glutamato por resíduos de glutamina ou por ácido aspártico anula a atividade catalítica das quitinases (SYNSTAD *et al.*, 2004). As funções do primeiro, terceiro e quarto motivos conservados têm sido relacionadas com a ligação da enzima às moléculas de quitina e podem desempenhar um papel na processabilidade e na atividade enzimática em relação à quitina cristalina (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010).

Os domínios de ligação à carboidratos (CBMs) em quitinases de mamíferos e insetos pertencem à família CBM14, possuem entre 40 a 70 resíduos de aminoácidos e estão localizados na região N ou C terminal da proteína (CHEN *et al.*, 2020). São domínios extracelulares que contém seis cisteínas conservadas que formam três ligações dissulfeto (TJOELKER *et al.*, 2000). Possui uma superfície carregada positivamente devido à presença de resíduos básicos de arginina e lisina que podem formar ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila do grupo N-acetil da cadeia de quitina, fortalecendo a interação com o substrato, especialmente com a quitina cristalina (FADEL *et al.*, 2016). Os CBMs podem direcionar as enzimas para diferentes regiões das cadeias de polissacarídeos e aumentar a concentração da enzima nas proximidades do substrato (GEORGELIS *et al.*, 2012).

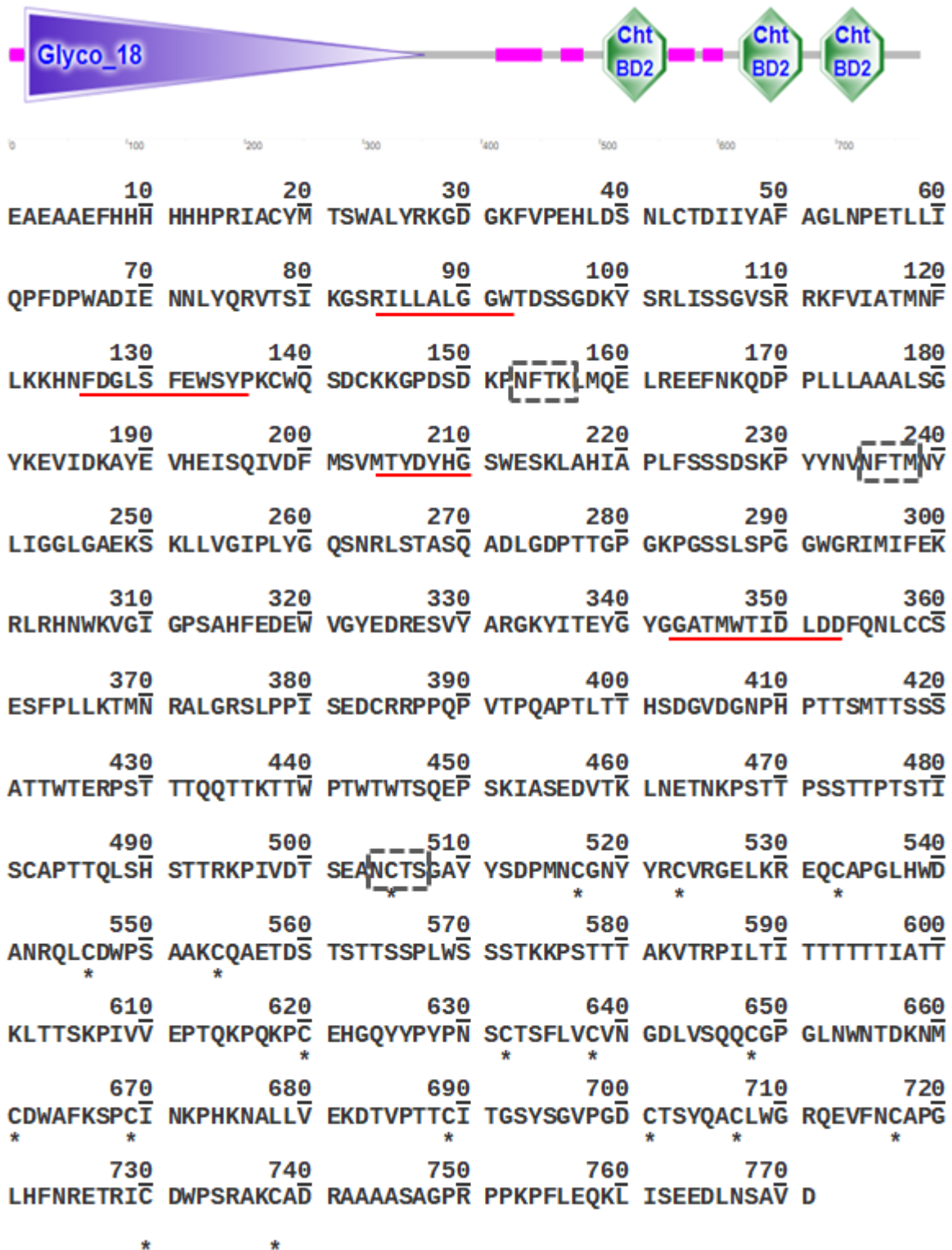
Neste trabalho, para obter as cadeias recombinantes com domínios catalíticos para quitinases e CBMs, foi escolhido o vetor pPICZalphaA. Para a clonagem dos DNAs e expressão das proteínas em *P. pastoris*. O vetor pPICZalphaA permite a expressão da proteína recombinante em fusão com uma sequência na região N-terminal que codifica um peptídeo sinal de secreção (fator-alpha) de *Saccharomyces cerevisiae*, que direciona a expressão da proteína para o meio extracelular. A existência de sítios de clivagem das enzimas Kex2 e Ste13 permitem que o DNA seja clonado de forma que a proteína expressa não apresente o peptídeo sinal, mas dependendo do sítio de restrição escolhido para a clonagem

do DNA, a proteína vai apresentar alguns aminoácidos oriundos do vetor na região N-terminal. Outra característica deste vetor é que o mesmo permite que o C-terminal da proteína recombinante expressa apresente um epítipo *c-myc* e uma cauda de histidinas (Invitrogen).

Os clones obtidos para as 3 construções foram sequenciados e através da ferramenta ExPASy *Translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>) foram obtidas as sequências preditas das três cadeias polipeptídicas AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1, mostradas na discussão a seguir e nas (Figuras 5.6, 5.7 e 5.8). As cores na arquitetura das proteínas nas figuras representam: Caixa roxa, domínio catalítico (Glyco_18); caixa rosa, região de baixa complexidade e caixa verde, domínio de ligação à quitina (CBM).

A enzima AsChtII-C2B3 (Figura 5.6) resulta em 771 resíduos de aminoácidos e o domínio catalítico apresenta 93 % de identidade com a sequência da quitinase de *A. echinator*, usada para desenhar os primers, e 94% de identidade com uma quitinase de *Atta cephalotes* (XM_012206306.1), (Anexo). Análises de predição de sítios de glicosilação indicaram que a AsChtII-C2B3 apresenta 95 sítios para O-glicosilação e 3 sítios para N-glicosilação os quais estão destacados com pontilhado na Figura 5.6. Os motivos conservados na família glicosídeos hidrolase 18 (GH18) das quitinases contendo os aminoácidos (KXXXXXGGW, FDGXDL~~D~~WEYP, MXYDXXG e GXXXWXXDXDD; onde X é um aminoácido não específico estão sublinhados em vermelho. Houve mutação no segundo motivo FDGXDL~~D~~WEYP para FDGLSFE~~W~~SYP. Esta mesma sequência é conservada nas formigas *A.cephalotes* e *A echinator*. No entanto, tem se a presença do aminoácido glutamato (E) o doador de elétrons nessa região. Os preditos sítios para N-glicosilação estão destacados em caixas pontilhadas. Seis resíduos de cisteína presentes na região dos CDBs estão destacados (asterisco preto).

FIGURA 5.6 – Arquitetura e sequência dos aminoácidos da AsChtII-C2B3.



Fonte: Análise feita com o programa SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>.

A construção que originou a proteína AsChtII-C3C4 foi pensada para expressar uma proteína contendo dois domínios catalíticos e nenhum CBM. A

sequência predita para AsChtII-C3C4 apresenta 804 resíduos de aminoácidos e os motivos conservados do domínio catalítico também estão presentes (Figura 5.7).

O domínio catalítico (CAT) C3 possui 98,5 % sequência com o CAT C3 da quitinase de *A. echinator*, usada para desenhar os primers, e 99,3 % de identidade com o CAT C3 da quitinase *Atta cephalotes* (XM_012206306.1), (Anexo). O CAT C4 apresentou 98,84 % de identidade com o CAT C4 da quitinase de *A. echinator* e 98.55 % de identidade com o C4 da quitinase *Atta. cephalotes* (XM_012206306.1),(Anexo). Análises de predição de sítios de glicosilação indicaram que a AsChtII-C3C4 apresenta 14 sítios para O-glicosilação e 5 preditos sítios para N-glicosilação.

Os motivos conservados na família glicosídeos hidrolase 18 (GH18) das quitinases contendo os aminoácidos (KXXXXXGGW, FDGXDLWEYP, MXYDXXG e GXXXWXXDXDD; onde X é um aminoácido não específico estão sublinhados em vermelho. E a presença do aminoácido glutamato (asterisco vermelho) no segundo motivo, considerado o doador de prótons necessário para a clivagem da ligação glicosídica. Os preditos sítios para N-glicosilação os estão destacados em caixas pontilhadas. Seis resíduos de cisteína presentes na região dos CDBs estão destacados (asterisco preto), (Figura 5.7).

FIGURA 5.7 - Arquitetura e sequência dos aminoácidos da AsChtII-C3C4.

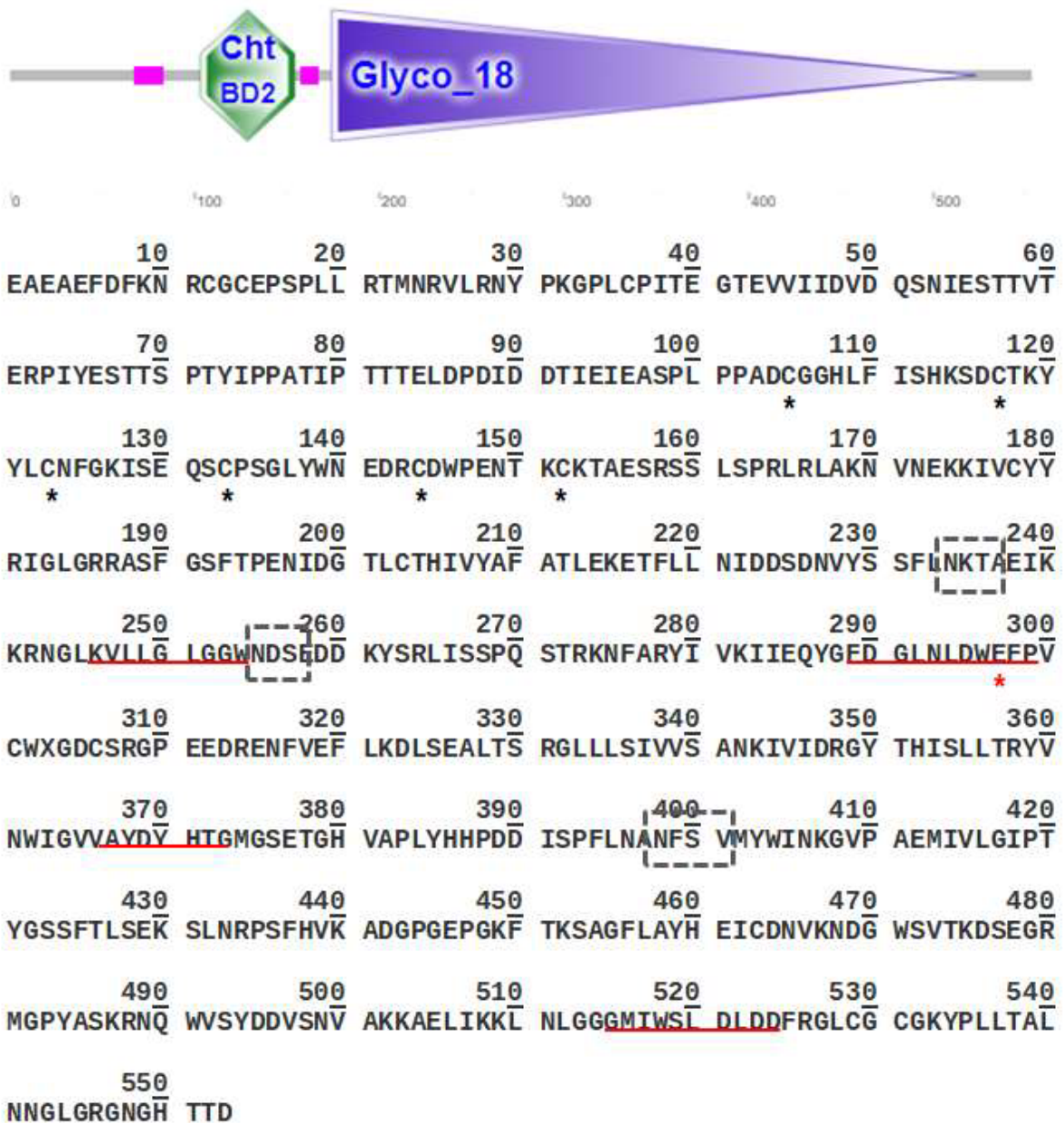


10 20 30 40 50 60
 QPARWRQGN^Y KVCYFTNWA^A WYRRGIGRYL^L PEHIDHTLCT^T HIVYGFVAVLD^D YSEMIIKAHD^D
 70 80 90 100 110 120
 SWADFDNRFY^Y ERVVAYKKRG^G LKVLLALGGW^W [NDSAG^GDKYSR^R] LVN^NNPSS^SRKK^K F^FINHTLQ^QFIK^K
 130 140 150 160 170 180
 KYDFDGLDM^D WEYPVCWQVN^N CNKGPDSDE^E SFAALLRELS^S AEFKPKGLL^L SAAVSPSKV^V
 190 200 210 220 230 240
 IDKGYDVPSL^L AKYLDWIAVM^M AYDYHGQWDK^K RTGHVAPLYY^Y HPDDEFYYFN^N [ANYSINYWIS^S]
 250 260 270 280 290 300
 KGAPPRIVM^M GMPLYGQSFT^T INDPSSGNGL^L NSPASAGNAG^G EFTRAAGFLS^S YYEICDRILN^N
 310 320 330 340 350 360
 RGWTVVQDPE^E GRMGPYAYKG^G SQWVSFDDSE^E MIRRKAQFVR^R DMGLGGMVW^W ALDLD^DDFRGR^R
 370 380 390 400 410 420
 CDNGPHPLMH^H TIQRVLAEP^P KEHDKPLQPP^P SAPSPSITTL^L IVEPTQAIRP^P TNTVDRVTQN^N
 430 440 450 460 470 480
 SFKNDEFKVI^I CYFTNWA^WYR^R QEGGRFVPE^E IDPDLCTHVL^L YGFSVLDGSS^S LTMKSHDPWA^A
 490 500 510 520 530 540
 DIDNKFYDRV^V AAFKAKGLKV^V LMALGGW^WND^DS AGDKYSRLVN^N SPSARRKFIT^T QLLLFIEKYD^D
 550 560 570 580 590 600
 FEGLDLWEY^Y PVCWQVDCNK^K GPESDKQSFA^A ELIKELSDEF^F KPRGLLLSAA^A VSPSKRVIDA^A
 610 620 630 640 650 660
 GYDVPTLSKY^Y LDWISIMTYD^D FHQWQDKKTG^G HVAPLYSLPN^N DWEPTFNANF^F [SIHWIEKGA^A]
 670 680 690 700 710 720
 NPKKLIMGV^V PLYGQSFLAE^E RNVHGLNAPT^T YGGGEAGEAT^T RARGFLSYE^E ICERTLKKGW^W
 730 740 750 760 770 780
 TVVQDKERRI^I GPYAYKGDQW^W VSFDDAQQIK^K LKAELIKKLD^D LGGMIWALD^D LDGTSSRGG^G
 790 800
 QPFWNKNSSQ^Q KRIWNSAVDH^H HHHH

Fonte: Fonte: Análise feita com o programa SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>.

A enzima AsChtII-C5B1 apresenta 553 resíduos e aminoácidos, (Figura 5.8), e os motivos conservados do domínio catalítico de GH18 são encontrados na sequência. O domínio catalítico C5 da AsChtII-C5B1 apresentou 95,71 de identidade com a sequência do CAT C5 da quitinase de *A. echinator*, usada para desenhar os primers, e 90,12 % de identidade com o CAT C5 da quitinase de *Atta cephalotes* (XM_012206306.1), (Anexo). A AsChtII-C5B1 apresenta 22 sítios para O-glicosilação e 3 preditos sítios para N-glicosilação. Os motivos conservados na família glicosídeos hidrolase 18 (GH18) das quitinases contendo os aminoácidos (KXXXXXGGW, FDGXDLWEYP, MXYDXXG e GXXXWXXDXDD; onde X é um aminoácido não específico estão sublinhados em vermelho e a presença do aminoácido glutamato (asterisco vermelho) no segundo motivo, o doador de prótons necessário para a clivagem da ligação glicosídica. Os preditos sítios para N-glicosilação estão destacados em caixas pontilhadas. Seis resíduos de cisteína presentes no CDB estão destacados (asterisco preto), (Figura 5.8).

FIGURA 5.8 - Arquitetura e sequência dos aminoácidos da AsChtII-C5B1.



Fonte: Análise feita com o programa SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>

5.4 Obtenção as proteínas recombinantes

5.4.1 Transformação dos clones em linhagem KM71H de *Pichia pastoris* KM71H

Os clones das 3 construções (e também o vetor pPICZαA vazio, usado como controle) foram transformados em linhagem KM71H de *P. pastoris* por eletroporação. Colônias crescidas na presença do antibiótico foram selecionadas (1 colônia para cada construção) para confirmação da transformação. Para isto, o DNA genômico de cada colônia foi extraído e usado como DNA molde juntamente com os primers 5'-AOX e 3'-AOX do vetor, em reação de amplificação de DNA por PCR. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose, confirmando a amplificação dos fragmentos de DNA de tamanho esperado para cada construção.

A indução da expressão das proteínas foi feita com adição de metanol ao meio de cultura a cada 24h e após o período de 6 dias o meio de cultura foi centrifugado e o *pellet* foi descartado. A primeira etapa de purificação das quitinases foi a precipitação das proteínas recombinantes utilizando sulfato de amônio (80%) seguida de diálise. A solução obtida após diálise, chamada aqui de Extrato Enzimático (EE), foi aplicada em uma coluna contendo 2 mL de resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen). As proteínas eluídas da coluna com imidazol foram dialisadas e aplicadas em uma coluna de exclusão molecular (Superdex 75).

A quitinase AsChtII-C5B1 não se ligou à coluna de níquel, devido a uma mutação no DNA amplificado, que originou um *stop códon* antes de chegar na região contendo as histidinas (6×His) na região C-terminal no vetor pPICZαA. Apesar deste *stop códon* ter provocado a síntese de cadeia polipeptídica menor (com 54 aminoácidos a menos na região C-terminal, este fato não impossibilitou que a proteína tenha atividade catalítica, conforme será descrito a seguir.

As etapas de purificação de cada proteína foram acompanhadas por SDS-PAGE, (Figuras 5.9, 5.10 e 5.11).

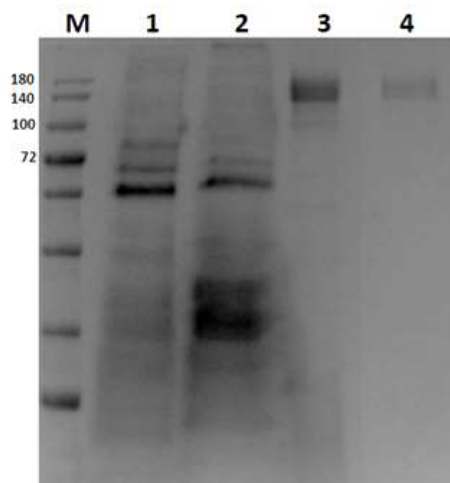
A massa teórica calculada (baseado na sequência de DNA amplificado) para cada quitinase de acordo o programa (<https://web.expasy.org/protparam/>), foi de 85,5 kDa (AsChtII-C2B3), 91,1 kDa (AsChtII-C3C4) e 61,7 kDa. A massa molecular aparente das proteínas, mostrada

nos géis, é maior do que as calculadas: 130 kDa (AsChtII-C2B3), 120 kDa (AsChtII-C3C4) e 70 kDa, o que sugere que essas proteínas sofreram glicosilação, uma modificação comum de *P. pastoris* (RAMLI, *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2008).

A colônia de *P. pastoris* transformada com o vetor pPICZαA vazio também foi submetida aos processos de expressão e purificação, para ter um controle negativo nos experimentos de atividade biológica. Na Figura 5.9 **A** ilustra M: marcador de proteína; 1 – EE do controle negativo (pPICZαA vazio); 2 - EE; 3 – solução eluída da coluna de níquel com 500 mM de imidazol. 4 – Solução eluída da coluna Superdex 75. Na Figura 5.9 **A*** - Sequência de aminoácidos produzidos em *P. pastoris* KM71H. Os potenciais locais de N-glicosilação estão destacados em vermelho.

FIGURA 5.9 – Análise em SDS-PAGE do processo de purificação da AsChtII-C2B3.

A



A*

```

EAEAAEFHHHHHPRIACYMTSWALYRKGDKGFVPEHLD SNLCTDI IYAFAGLNPETLLIQPFDPWADIENNLYQRVTS I
KGSRI LLALGWTDS SGDKY SRLIS SGVSRKRFVIATMNFLKKHNF DGLSFEWSY PKCWQSDCKKGPDS DKPNFTKLMQE
LREEFNKQDP PLLAAALSGYKEVIDKAYEVHEI SQIVDFMSVMTYDYHGSWE SKLAH IAPLFSS SD SKPYYNVNF TMNY
LIGGLGAEKSKLLVGIPLYQSNRLSTASQAD LGDPTTGPGKPGSSLS PGGWGRIMIFEKRLRHWNKVGIGPSAHFEDEW
VGYEDRESVYARGKYITEYGYGGATMWTIDLDDFQNLCCSE SFPLLKTMNRALGRSLPPI SEDCRRFPQPVT PQAPTLTT
HSDGVDGNPHPTT SMTTSSSATTWTERPSTTTQQTTKTTWPTWTWT SQEPSKIAS EDVTKLNE TNKPSTT PSSTTPTSTI
SCAPTQQLSHSTTRKPIVDTSE ANCTS GAYYSDPMNCGNYRVCVRELKREQCAPGLHWDANRQLCDWPSAAKQAE TDS
TSTTSSPLWS SSTKKPSTTTAKVTRPILTITTTTTT IATTKLTT SKPIVVEPTQKPQKPCHEGQYYPN SCTSFLVCVN
GDLVSQQCGPGLNWN TDKNMCDWAFKSPCINKPHKNALLVEKDTVP TTT CITGYSYSGVPGDCTS YQACLWGRQEVFNCAPG
LHFNRETRICDWP SRAKCADRAAAA SAGPRPPKPFLEQKLI SEEDLNSAVD

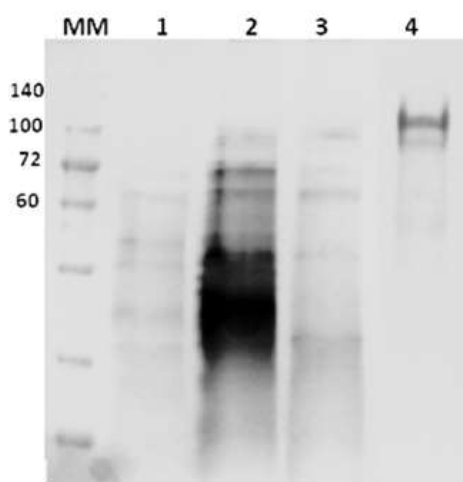
```

Fonte : Própria

Na figura 5.10 **B**, ilustra M: marcador de proteína; 1 – EE do controle negativo (pPICZαA vazio); 2 - EE; 3 – solução eluída da coluna de níquel com 500 mM de imidazol. 4 – Solução eluída da coluna Superdex 75. Na Figura 5.10 **B*** - Sequência de aminoácidos produzidos em *P. pastoris* KM71H. Os potenciais locais de N-glicosilação estão destacados em vermelho.

FIGURA 5.10 - Análise em SDS-PAGE do processo de purificação da AsChtII-C3C4.

B



B*

```

QPARWRQGNKVVVCYFTNWAAYRRGIGRYLPEHIDHTLCTHIVYGFAVLDYSEMIKAHDSWADFDNRFYERVVA YKKRG
LKVLLALGGWNSAGDKYSRLVNNPSSRKKFINHTLQFIKKYDFDGLDMWEYFVCWQVNCNKGPDSDKESFAALLRELS
AEFKPKGLLLSAAVSPSKKVIDKGYDVPSLAKYLDWIAVMAIDYHGQWDKRTGHVAPLYYHPDDEFYYFNANYSINYWIS
KGAPPRSIVMGMPLYGQSFTINDPSSGNGLNSPASAGNAGEFTRAAGFLSYIEICDRI LNRGWTVVQDPEGRMGPYAYKG
SQWVSFDDSEMIRKAQFVRDMGLGGGMVWALDLDLDDFRGRCDNGPHPLMHTIQRVLAEPKEDKPLQPPSAPSPSITTL
IVEPTQAIRPTNTVDRVTQNSFKNDEFKVICYFTNWAAYRQEGGRFVPEIDIDPDLCTHVLYGF SVLDGSSLTMKSHD PWA
DIDNKFYDRVAAFKAKGLKVLALGGWNSAGDKYSRLVNSPSARRKFITQLLLFIEKYDFEGLDLDWEYFVCWQVDCNK
GPE SDKQSFAELIKELSDEFKPRGLLLSAAVSPSKRVIDAGYDVPTLSKYLDWISIMTYDFHGQWDKKTGHVAPLYSLFN
DWEPTFNANSIHYWIEKGANPKKLIMGVPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYIEICERTLKKGW
TVVQDKERRIGPYAYKGDQWVSFDDAQQIKLKAELIKKLDLGGMIWALDLDGTS SRGGRQPFWNKNSQKRIWNSAVDH
HHHH

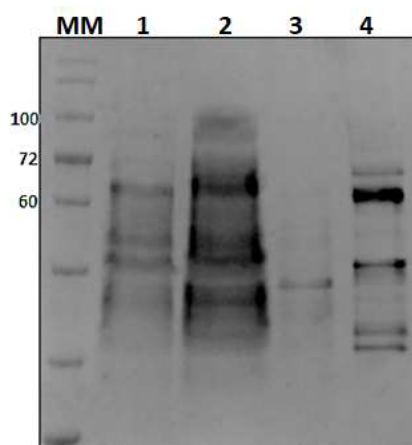
```

Fonte: Própria

Na Figura 5.11**C** ilustra M: marcador de proteína; 1 – EE do controle negativo (pPICZαA vazio); 2 - EE; 3 – solução que não se ligou à coluna de níquel. 4 – Solução eluída da coluna Superdex 75. Na Figura 5.11 **C*** - Sequência de aminoácidos produzidos em *P. pastoris* KM71H. Os potenciais locais de N-glicosilação estão destacados em vermelho.

FIGURA 5.11 - Análise em SDS-PAGE do processo de purificação da AsChtII-C5B1.

C



C*

```

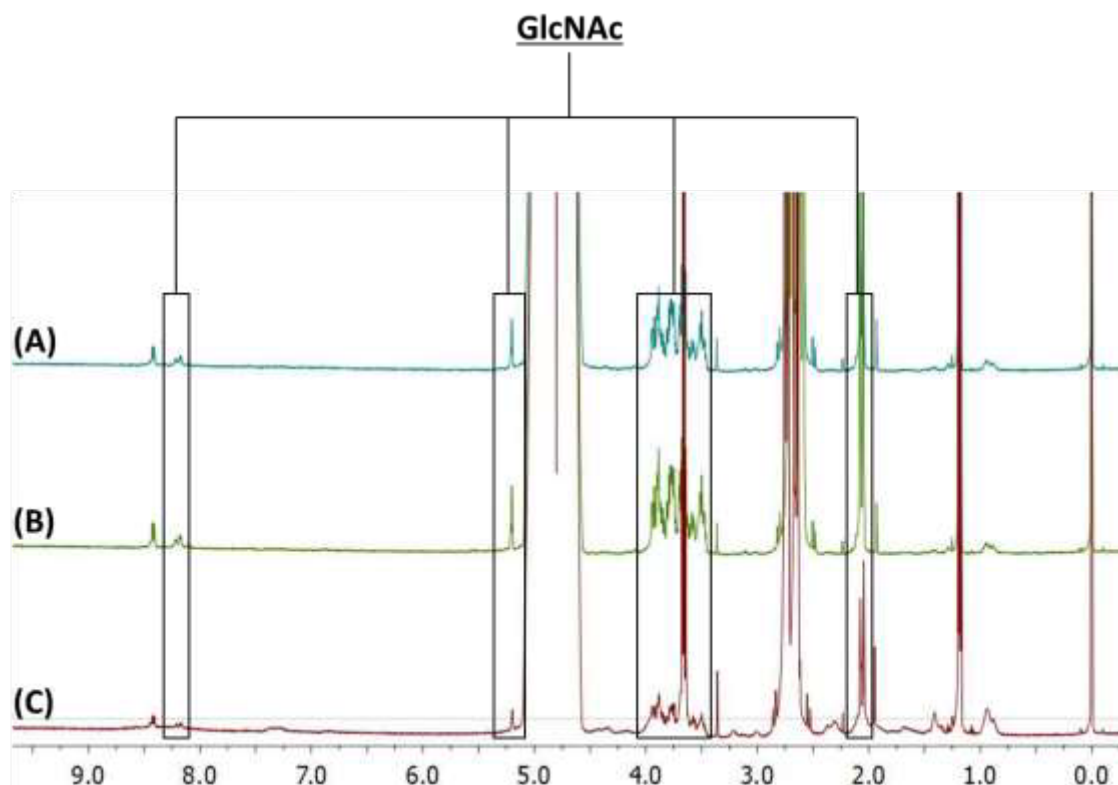
EAEAEFDKFNRCGCEPS PLLRTMNRVLRNYPKGPLCPIFTEGTEVVI IDVDQSNIESTTVTERPIYESTTSPTYIPPATIP
TTTELDPD IDDTIEIEASPLPPADCGGHLFISHKSDCTKYLLCNFGKISEQSCPSGLYWNECDWPENTKCKTAESRS S
LSPRLRLAKNVNEKKIVCYRIRIGLRRASFGSFTPENIDGTLCTHIVYAFATLEKETFLNIDSDNVYS SFLNKTA EIK
KRNLKVLGLGGW NDS EDDKYSRLISSPQSTRKNFARYIVKII EQYGF DGLNLDW EFPVCWXGD CSRGP EEDREN FVEF
LKDLSEALTSRGLLLSIVVSANKIVIDRGYTHISLLTRYVNWIGVVAYDYHTGMGSETGHVAPLYHH PDD IS PFLNANFS
VMYWINKGVPAEMIVLGIPTYGSSFTLSEKSLNRPSFHVKADGPGE PGKFTKSAGFLAYHEICDNVKNKGWSVTKDSEGR
MGPYASKRNQWVS YDDVSNVAKKAE LIKKNLGGGMIWSLDLDDFRGLCGCGKYP LLTALNNGLGRGNHHTD

```

Fonte: Própria

A avaliação e a quantificação da bioprodução de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) utilizando a ação enzimática das quitinases no substrato coloidal α -quitina foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H). Este método pode ser usado para avaliar rapidamente a atividade da quitinase (LIU *et al.*, 2011). O produto gerado da reação, o N-acetilglucosamina, foi atribuído de acordo com os picos em destaque nos espectros de RMN ^1H . Ambos os espectros foram registrados em condições similares, cujas concentrações determinadas foram (A) 0,48; (B) 0,41 e (C) 0,56 mmol L⁻¹, respectivamente. Os sinais para o N-acetilglucosamina estão em destaque na Figura 5.12.

FIGURA 5.12 - Espectros de RMN ^1H das amostras coletadas da reação enzimática das quitinases AsChtII-C2B3(A), AsChtII-C3C4 (B) e AsChtII-C5B1 (C) frente ao substrato coloidal da α -quitina



Fonte: Própria

5.5 Caracterização bioquímica das enzimas

As três cadeias polipeptídicas foram avaliadas quanto à sua atividade frente à quitina coloidal. A detecção da atividade a 540 nm foi determinada pelo método colorimétrico utilizando o DNS 3,5- ácido dinitrosalicílico como medição da extremidade redutora do N-acetilglucosamina (GlcNAc) liberados em solução, como resultado da ação enzimática sobre o substrato. Todas as cadeias apresentaram atividade frente a quitina e, portanto, as melhores condições das reações foram estudadas.

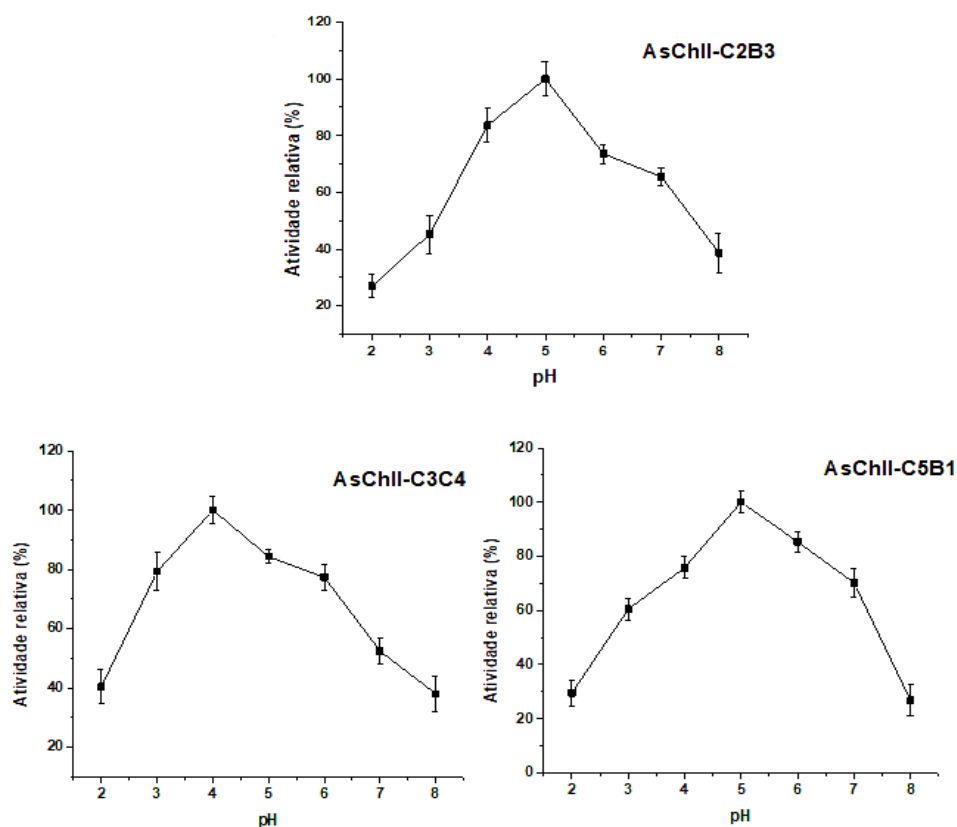
5.6 Efeito do pH nas quitinases

As enzimas foram testadas em um grande intervalo de valores de pH tendo sido determinadas maiores atividades das enzimas AsChtII-C2B3 e AsChtII-C5B1 em pH 5,0 e da AsChtII-C3C4 em pH 4,0 (Figura 5.18). As 3 proteínas

mantêm a atividade aproximada de 80% no intervalo de 1 ponto a menos ou 1 ponto a mais no valor de pH.

Quitinases de insetos possuem ótimo pH entre 4,0 a 8,0 (MATHEW *et al.*, 2021). Exemplos de pH ótimos para quitinase de inseto do subgrupo I são a OfChtI (pH 6,0), OfChi-h (pH 6,5) de *Ostrinia furnacalis* (CHEN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017). Quitinase de EF-Chi (pH 6,0) de *Eisenia fétida*, mas a enzima se manteve estável entre o pH 5,0 a 8,0 (UEDA MITSUHIRO *et al.*, 2017). Três quitinases de diferentes tamanhos e composição de *Manduca sexta* tiveram seus perfis de atividade de pH entre 5,0 a 8,0 (ZHU *et al.*, 2001). As quitinases de insetos do subgrupo II pouco têm sido relatadas na literatura. Estudo recente de 2 módulos ativos OfChtII-C1 e OfChtII-C2 derivado da broca asiática do milho *Ostrinia furnacalis* tiveram suas características enzimáticas e estruturais estudadas, e tiveram os seus ensaios enzimáticos realizados em pH 6,0 (CHEN *et al.*, 2018).

FIGURA 5.13 - Efeito do pH na atividade das enzimas AsChtII-C2B3, AsChtII-C5B1 e AsChtII-C3C4.



Fonte: Elaborada pela autora usando o Origin Pro.

5.7 Efeito da temperatura e termo estabilidade das três proteínas

Nas melhores condições de pH, as 3 proteínas foram estudadas para verificação da melhor temperatura para suas atividades (Figura 5.14 A), tendo-se observado que elas apresentam temperatura ótima muito similares. A quitinase AsChtII-C2B3 apresentou atividade ótima na temperatura de 55 °C, enquanto AsChtII-C3C4 e AsChtII-C5B1 a 50 °C.

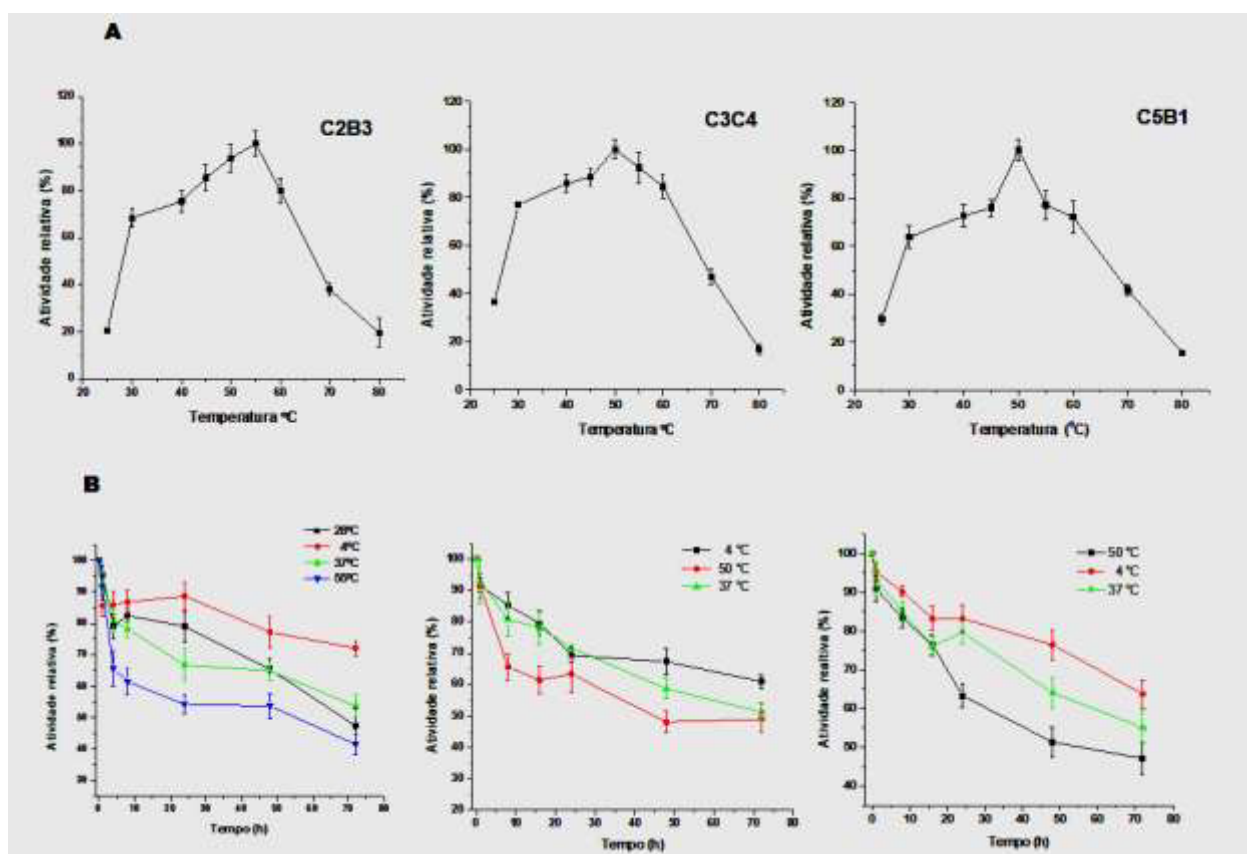
A estabilidade enzimática das quitinases tem sido relatada como importante na aplicação como fungicida (LIU, *et al.*, 2020) e, portanto, as enzimas foram estudadas em relação à sua estabilidade catalítica na presença do substrato, ao longo do tempo em diferentes temperaturas (Figura 5.14 B). Nesse trabalho as quitinases tiveram sua atividade enzimática testada variando a temperatura de 4 °C e 37 °C e na temperatura ótima de cada uma delas por 72 horas

Quando analisamos a termo estabilidade, a quitinase AsChtII-C2B3 a 55 °C, por exemplo, a atividade é reduzida em 20 % em 8 horas de incubação e após 72 horas ainda se mantém ativa com uma porcentagem de 53 % em relação à atividade inicial. O interessante é que para todas as quitinases na temperatura ótima ainda possuem um bom percentual de atividade após 72 horas de incubação.

A quitinase AsChtII-C4B1, produzida no nosso laboratório anteriormente, mostrou ter uma estabilidade longa de 21 dias com atividade variando entre 47 % e 67 % nesse período de incubação na temperaturas de 4 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C e 55 °C. Observou-se também que a enzima se manteve estável a 4 °C durante todo o período de incubação (MICOCCI *et al.*, 2023).

A temperatura ótima das quitinases de *Bombyx mori* 45 °C e a da *Helicoverpa armigera* 50 °C e em termos de termoestabilidade ambas as enzimas tiveram suas atividades enzimáticas testadas a 4 °C e 30 °C. As quitinases apresentaram estabilidade a 4 °C, porém a quitinase de *H. armigera* foi mais termoestável que a quitinase de *B. mori*.(ZHANG *et al.*, 2011). A quitinase de inseto pertencente ao subgrupo I de *Ostrinia furnacalis*, teve a temperatura ótima de 40°C, e a enzima apresentou estabilidade térmica moderada, com perda rápida de atividade em temperaturas acima de 40 °C (WU *et al.*,2013).

FIGURA 5.14 - Efeito da temperatura na (A) atividade enzimática das proteínas e (B) estabilidade térmica.



Fonte: Origin Pro

A TABELA 5.1 mostra as características de cada enzima, incluindo a atividade específica, avaliada nas melhores condições de pH e temperatura tendo como substrato a α -quitina coloidal. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de GlcNAc/min.

Quitinase	pH ótimo	T ($^{\circ}$ C) ótima	GlcNAc formado	Massa molar calculada (kDa)	Atividade (nmol)
AsChtII-C3C4	4,0	50	267 nmol	91,1	88
AsChtII-C2B3	5,0	55	250 nmol	85,5	52
AsChtII-C5B1	5,0	50	350 nmol	61,7	68
AsChtII-C4B1 (MICOCCHI <i>et. al</i> , 2023)	5,0	55	530 nmol	57,8	22

5.8 Atividade antifúngica *in vitro* das quitinases recombinantes

Os fungos infectam bilhões de pessoas todos os anos e as taxas de mortalidade são altas e doenças causadas por fungos matam tanto quanto a tuberculose ou a malária (BRUNKE e HUBE, 2013). Além da patogenicidade em humanos, fungos tem sido um sério problema também na agricultura, onde atacam e produzem doenças que inviabilizam o comércio de frutas, por exemplo, e levando até mesmo a morte da planta.

Neste trabalho, foi avaliada a atividade fungicida das três enzimas em três diferentes fungos/levedura: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* (estudos realizados em colaboração com o Prof Dr. Iran Malavazzi, do DGE da UFSCar) e *Lasiodiplodia theobromae* no nosso laboratório.

5.9 Ensaio de inibição do crescimento de *Candida albicans*

A *C. albicans* é um dos fungos patógenos humano mais prevalente, causando candidíase superficial da mucosa e infecções invasivas. Em circunstâncias normais, *C. albicans* vive como um comensal nas superfícies mucosas humanas, mas pode mudar para um estilo de vida patogênico após a adesão e supercrescimento fúngico, seguido de invasão tecidual e infecção da mucosa (HÖFS *et al.*, 2016). Essas características permitem que as hifas penetrem nos tecidos epiteliais, danifiquem as células endoteliais e provoquem uma resposta inflamatória, tornando a morfogênese das hifas crucial para a virulência de *C. albicans* (GOW *et al.*, 2012).

Para investigar a ação antifúngica das quitinases contra o fungo patogênico *in vitro*, ensaios de inibição foram realizados e cerca de 2.5×10^4 conídios *C. albicans* foram cultivados em 200 μ L de meio mínimo (glicose 1% (v/v), 1 x sais de contendo nitrato e 1 x oligoelementos, pH 6,5), que foram suplementadas com concentrações variáveis das quitinases parcialmente purificadas, chamadas aqui de extrato enzimático, EE (150, 100 e 50 μ g/mL).

O crescimento da cultura foi quantificado após 48 h a 37 °C de incubação na presença das quitinases recombinantes. A inibição do crescimento do

fungo foi medida por densidade ótica em placa de 96 poços, na presença e na ausência de um indutor de estresse da parede celular do fungo, o calcoflúor- CFW (50 ug/mL). O CFW liga se à quitina na parede celular, interrompendo a integridade da parede celular implicando num mecanismo de inibição diferente dos antifúngicos atualmente disponíveis (KINGSBURG *et al.*, 2012).

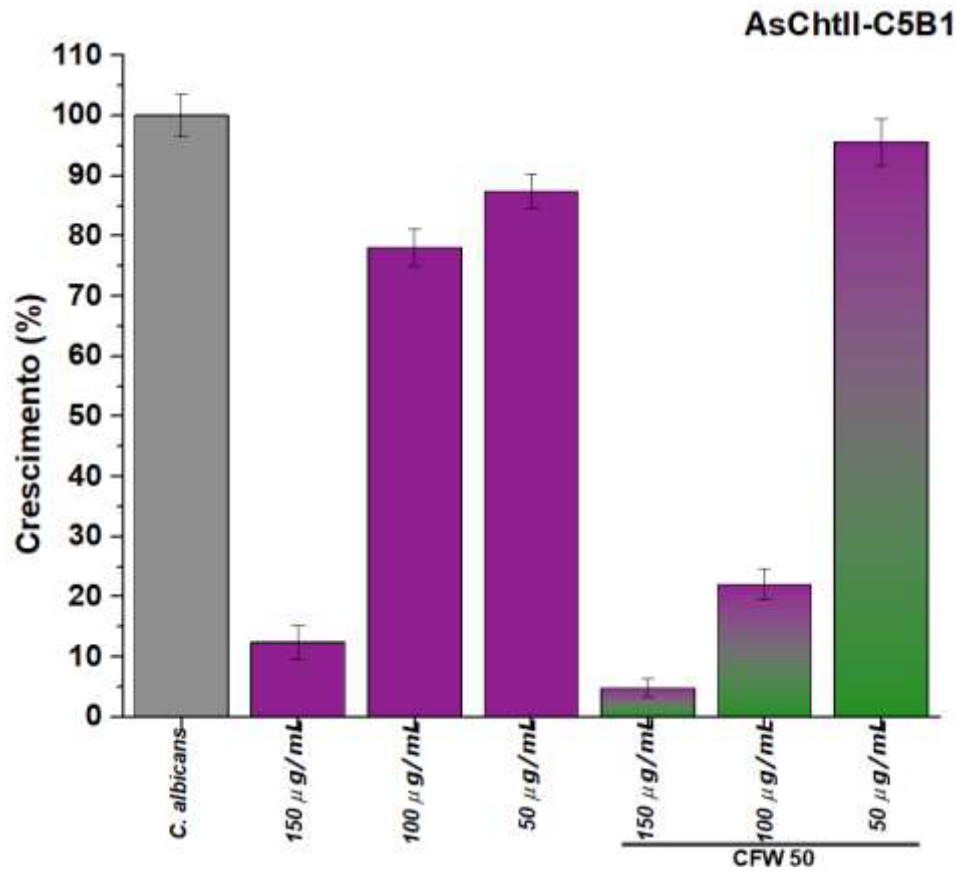
O controle *P.pastoris* KM71H transformado com pPICZ α A vazio foi testado nas mesmas condições e os valores obtidos para cada diluição foram subtraídos dos valores obtidos para as quitinases. Os resultados apresentados foram obtidos da média da quadruplicata para cada amostra, acrescentados dos seus desvios padrão.

As (Figuras 5.15, 5.16 e 5.17) mostram os resultados dos experimentos realizados para as enzimas AsChtII-C5B1, AsChtII-C2B3 e AsChtII-C3C4, respectivamente.

A AsChtII-C5B1 interferiu no crescimento de *C.albicans* de forma dose dependência, sendo que na maior concentração testada, a 150 ug/mL, apresentou 87,6 % de inibição do crescimento do patógeno (Figura 5.15). Quando testada nesta mesma concentração juntamente com o CFW a 50 ug/mL a inibição aumenta para 95,2%, Figura 5.15. Em menores concentrações, a enzima teve pouca interferência no crescimento da *C. Candida*.

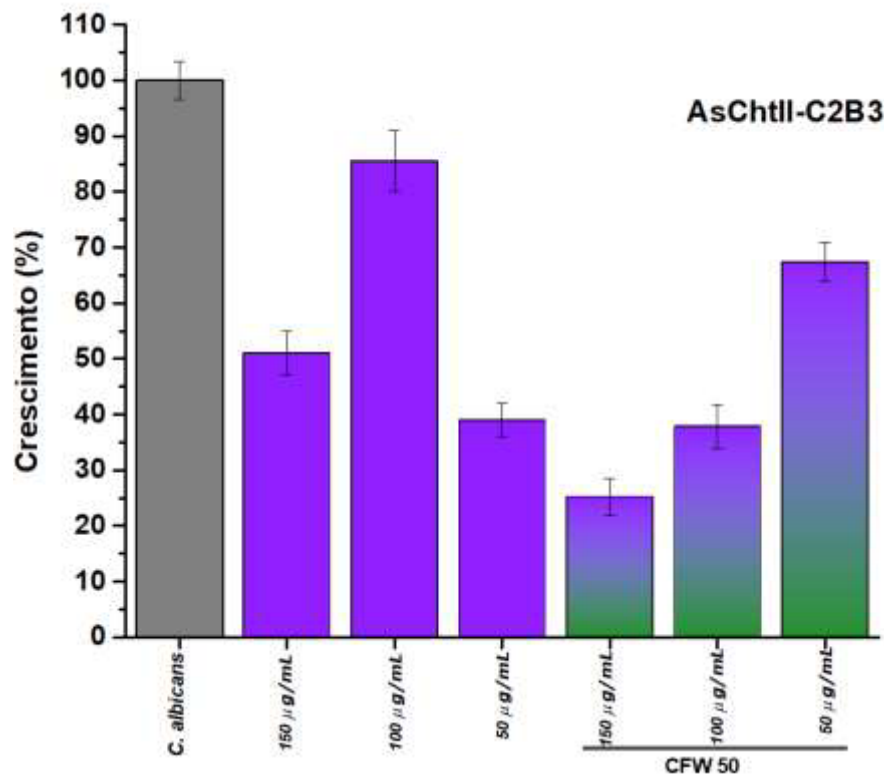
Um comportamento compartilhado pelas enzimas AsChtII-C2B3 e AsChtII-C3C4 (Figuras 5.16 e 5.17) é que a maior inibição foi na menor concentração testada (50 ug/mL), e que na concentração de 100 ug/mL a inibição diminui e depois aumenta, à 150 ug/mL. A AsChtII-C2B3 inibiu 61 % o crescimento da *C. Candida* na menor concentração testada, 50 ug/mL (Figura 5.16). Quando testada nesta concentração na presença de CFW (50 ug/mL) a inibição aumenta para 74,7 %. A AsChtII-C3C4 foi a enzima que apresentou menor inibição da *C. Candida*, chegando a 54,5 % a 50 ug/mL e diminuindo para 45,8 % quando na presença 50 ug/mL de CFW.

FIGURA 5.15 – Interferência da AsChtII-C5B1 no crescimento de *C. albicans* na presença e ausência de CFW.



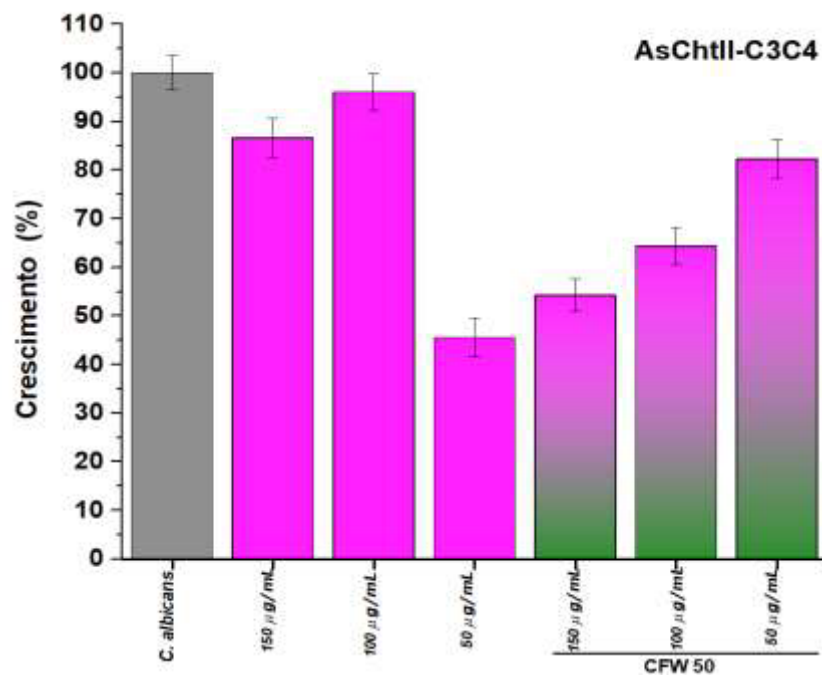
Fonte: Elaborada pela autora utilizando o Origin Pro.

FIGURA 5.16 – Interferência da AsChtII-C2B3 no crescimento de *C. albicans* na presença e ausência de CFW.



Fonte: Elaborada pela autora utilizando o Origin Pro.

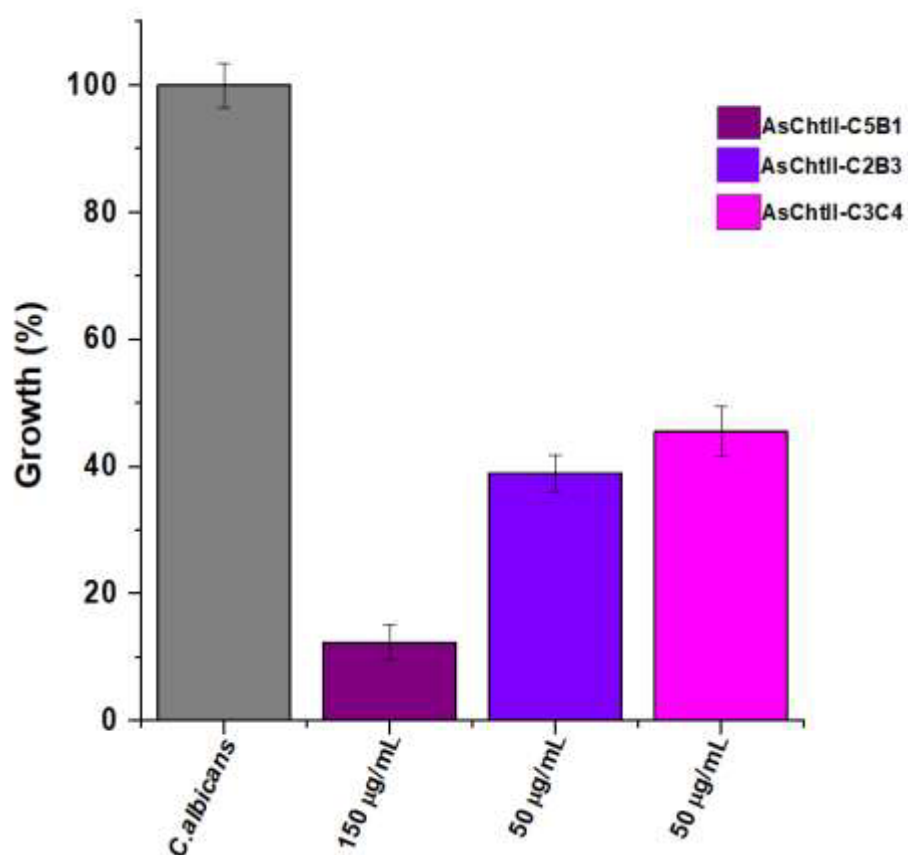
FIGURA 5.17 – Interferência da AsChtII-C3C4 no crescimento de *C. albicans* na presença e ausência de CFW.



Fonte: Elaborada pela autora utilizando o Origin Pro.

Para uma melhor comparação entre as atividades das 3 enzimas, os resultados obtidos na condição de melhor atividade de cada uma das enzimas foram plotados, (Figura 5.18). A enzima com maior atividade inibitória de crescimento de *C. albicans* foi a AsChtII-C5B1 a que apresentou maior inibição (87,6 %), mas foi na maior concentração testada (150 ug/mL). A maior capacidade de inibição das enzimas AsChtII-C2B3 e AsChtII-C3C4 foi na menor concentração testada, 50 ug/mL, e foi de 61 e 54,5 %, respectivamente. A 50 ug/mL a enzima AsChtII-C5B1 pouco inibiu o crescimento de *Candida*.

FIGURA 5.18 – Melhores resultados de interferência das três enzimas no crescimento de *C. albicans*.



Fonte: Elaborada pela autora utilizando o Origin Pro.

Não é uma tarefa muito simples relacionar as atividades inibitórias entre as enzimas, uma vez que elas são constituídas por domínios catalíticos que

não apresentam alta identidade sequencial e, além disso, uma delas tem 2 domínios catalíticos e nenhum CBM (AsChtII-C3C4).

Alinhamentos entre os domínios catalíticos das 3 enzimas foram realizados, (Figura 5.20). Vale lembrar que a enzima AsChtII-C3C4 apresenta 2 domínios catalíticos, chamados de C3 e C4, e nenhum CBM. É interessante verificar que, a despeito da presença dos aminoácidos descritos como conservados nas quitinases da classe II em todos os domínios catalíticos analisados, a identidade sequencial dos domínios não é alta, como pode ser observado no quadro abaixo (Figura 5.19). Cada coluna do quadro mostra a identidade entre as sequencias analisadas. Assim, o domínio catalítico C2 da enzima AsChtII-C2B3 compartilha aproximadamente 36% de identidade com o domínio C5 da AsChtII-C5B1 e 43% com o C3 e 45% com C4 da AsChtII-C3C4. Ou seja, os domínios catalíticos não são muito parecidos em relação à sua estrutura primária, sendo a maior identidade entre os domínios esta entre os C3 e C4, da AsChtII-C3C4, que é aproximadamente 69%.

Uma baixa identidade sequencial entre os domínios catalíticos C2 de AsChtII-C2B3 e C3 e C4 de AsChtII-C3C4 (~45% de identidade) não impediu que as duas enzimas tivessem uma inibição de *C. Candida* semelhante de 61 e 54,5 %, respectivamente. E, de forma, interessante, a presença de 2 domínios catalíticos na enzima AsChtII-C3C4 não aumentou essa atividade, pelo contrário, diminuiu. Além disso, a presença de 3 domínios de ligação à quitina (CBM) na enzima AsChtII-C2B3 parece não ter contribuído para melhoria da atividade de inibição da mesma.

Comparando a ação das quitinases frente ao fungo individualmente e no melhor resultado obtido de cada uma delas, de acordo com a dose utilizada nos experimentos, a quitinase AsChtII-C2B3 inibiu em 61% o crescimento do fungo. Essa quitinase possui 1 CAT na região N terminal e 3 CBM na região C terminal que são domínios de ligação a quitina. Os CBMs podem aumentar a acessibilidade da enzima induzindo a mudança conformacional do substrato, de modo a posicionar o substrato mais próximo do domínio catalítico, no entanto essa característica pode ser melhor notada na quitinase AsChtII-C5B1, com apenas 1 CAT na região C terminal e 1 CBM na região N terminal com uma taxa de (87,6 %) de inibição do fungo. Quando olhamos para a AsChtII-C3C4 (2 CATs), a porcentagem de inibição cai pra (54,5%). Os CATs C3 e C4 estão ligados por uma região de *linker* flexível,

resultando em um posicionamento aleatório e alterável dos CADs em relação ao substrato

FIGURA 5.19 - Identidade sequencial entre os domínios catalíticos das enzimas

1: C2B3	100.00	36.01	43.28	44.94
2: C5B1	36.01	100.00	48.84	47.11
3: C3C4_1	43.28	48.84	100.00	68.99
4: C3C4_2	44.94	47.11	68.99	100.00

FIGURA 5.20- Alinhamento entre os domínios catalíticos das 3.

C2B3	PRIACYMTSWALYRKGDGKFVPEHLDSNLCTDIYAFAGLNPETLLIQPFDPWADIENNL	60
C5B1	KKIVCYRIGLGRRASFGSFTPENIDGTLCTHIVYAFATLEKETFLLNIDDSDNVYSSFL	60
C3C4_1	YKVVCFYFTNWAWYRRGIGRYLPEHIDHTLCTHIVYGFVLDYSEMIIKAHDSWADFDRNF	60
C3C4_2	FKVICYFTNWAWYRQEGGRFVPEDIDPDLCTHVLYGFSVLDGSSLTMKSHDPWADIDNKF	60
	:: ** * * : **:* ***:**:* * : : : * . . :	
C2B3	YQRVTSI--KGSRIILLALGGWTDSSGDKYSRLISSGVSR-RKFVIATMNFLKKNFDGLS	117
C5B1	NKTAEIKKRNGLKVLLGLGGWNDEDDKYSRLISSPQSTRKNFARYIVKIEQYGFDFGLN	120
C3C4_1	YERVVAYKKRGLKVLLALGGWNDSAGDKYSRLVNNPSSR-KKFINHTLQFIKKYDFDFGLD	119
C3C4_2	YDRVAAFKAKGLKVLMLALGGWNDSAGDKYSRLVNSPSAR-RKFITQLLLFIEKYDFEGLD	119
	. . * :*:**:* * ***:**:* . . : : * : : : : : * : * :	
C2B3	FEWSYPCWQSDCKKGPDSKPNFTKLMQELREFNFKQDPPLLLAAALSQYKEVIDKAYE	177
C5B1	LDWEFPVCWQGDSCRGPEEDRENFVEFLKDLSEALTSR--GLLLSIVSANKIVIDRGT	178
C3C4_1	MDWEYPVCWQVNCNKGPDSDKESFAALLRELSAEFKPK--GLLLSAAVSPSKVIDKGYD	177
C3C4_2	LDWEYPVCWQVDCNKGPESDKQSFALIKELSEDFKPR--GLLLSAAVSPSKRVIDAGYD	177
	::*:** * * :*:**:* * . . : : : * : . : * * : : * * * * *	
C2B3	V-HEISQIVDFMSVMTYDYHGSWESKLAHIAPLFSSS-DSKPYYNVNFTMNYLIGGLGAE	235
C5B1	HISLLTRYVNWIGVAVDYHTGMGSETGHVAPLYHHPDDISPFLNANFSVMYWIN-KGVP	237
C3C4_1	V-PSLAKYLDWIAVMAYDYHQWDKRTGHVAPLYYHPDDEFYFNANYSINYWIS-KGAP	235
C3C4_2	V-PTLSKYLDWISIMTYDFHQWDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANFSIHVWIE-KGAN	235
	::: : : : : : : : * * . . * * * * : * * * : : * * *	
C2B3	KSKLLVGIPLYGQSNRLSTASQA--DLGDPTTGPCKPGSSLSPGGWGR-IMIFEKRLRHN	292
C5B1	AEMIVLGIPTYGSSFTLSEKSLNRPSFHVKADGPGEPGKFTKSAGFLAYHEICDNVKNKG	297
C3C4_1	PRSIVMGMPLYGQSFINDPSSGN-GLNSP-ASAGNAGEFTRAAGFLSYEICDRILNRG	293
C3C4_2	PKKLIMGVPLYGQSFSLAERNVH--GLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYEICERTLKKG	293
	::*:** * * * : . . : : * : * * : * * *	
C2B3	WKV-----GIGPSAHFEDEWVGYEDRESVYARGKYITEYGYGATMWTIDL	339
C5B1	WSVTKDSEGRMGPYASKRNQWVSYYDDVSNVAKKAELIKKLNLLGGMIWSDL	350
C3C4_1	WTVVQDPEGRMGPIYAYKGSQWVSFDDSEMIRRAQFVRDMGLGGMVWALDL	346
C3C4_2	WTVVQDKERRIGPIYAYKGDQWVSFDDAQQIKLKAELIKKLDLGGMIWALDL	346
	* * : * * * : * * * : * : : : : * * : * * : * * *	

FONTE: Própria

5.10 Ensaio de inibição do crescimento de *Aspergillus fumigatus*

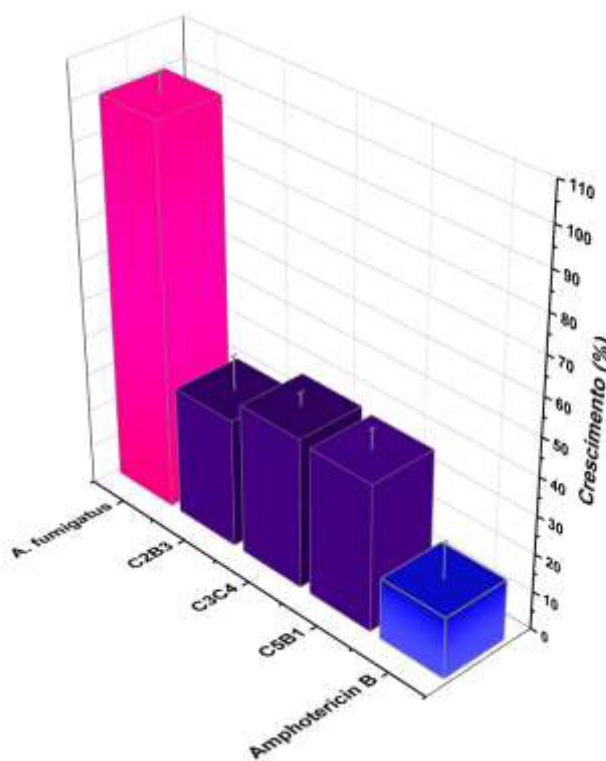
Outro modelo escolhido para ensaios de atividade fungicida foi o *A. fumigatus*, (*wild type*), que é um fungo saprofítico encontrado no solo. Ele cresce em vegetação decadente de latitudes subtropicais e temperadas quentes. A reprodução assexuada e sexuada produz conídios hidrofóbicos e ascósporos, podendo atingir os alvéolos nos pulmões. Há mais de 200.000 infecções por aspergilose documentadas com risco de vida humana anualmente e as infecções humanas causadas pelo fungo podem variar de doenças alérgicas a aspergilose invasiva, dependendo do estado imunológico do hospedeiro (WASSANO *et al.*, 2020).

Neste trabalho, foi usado como controle positivo de atividade fungicida o composto Amphotericin B e as enzimas estudadas foram testadas em diferentes concentrações (100, 50 e 25 ug/mL), assim como o controle negativo, para avaliação da interferência no crescimento de culturas de *Aspergillus*.

Os melhores resultados de inibição para cada enzima estão mostrados na (Figura 5.21), onde se observa que a inibição do crescimento do fungo foi de 66,15 % com 50 ug/mL de AsChtII-C2B3, 60,1% com 25 ug/mL de AsChtII-C3C4 e 61% com 50 ug/mL de AsChtII-C5B1. A AsChtII-C2B3 teve um comportamento semelhante à AsChtII-C4B1 quando analisada a 50 ug/mL, apresentando 66,6% de inibição (MICOCCI *et al.*, 2023). De modo geral, as inibições do crescimento do fungo pelas enzimas não tiveram uma grande diferença, foi entre 60-66 %. No entanto, chama a atenção a atividade da enzima AsChtII-C3C4, que apresentou 61 % de inibição, porém foi com metade da concentração das demais (25 ug/mL). Esta enzima não apresenta o domínio de ligação à quitina, CBM, que tem sido descrito como importante para ancoragem da molécula à quitina para a ação do domínio catalítico. Os resultados mostram que, na enzima estudada, este fato não prevaleceu, ou seja, a enzima não precisou do CBM para se aproximar da quitina sólida da parede celular do fungo, e os dois domínios catalíticos agiram eficientemente.

O fungicida Amphotericin B (2 ug/mL) reduziu o crescimento do fungo em torno de 84%.

FIGURA 5.21 – Interferência no crescimento do fungo *A. fumigatus* pelas quitinases recombinantes.



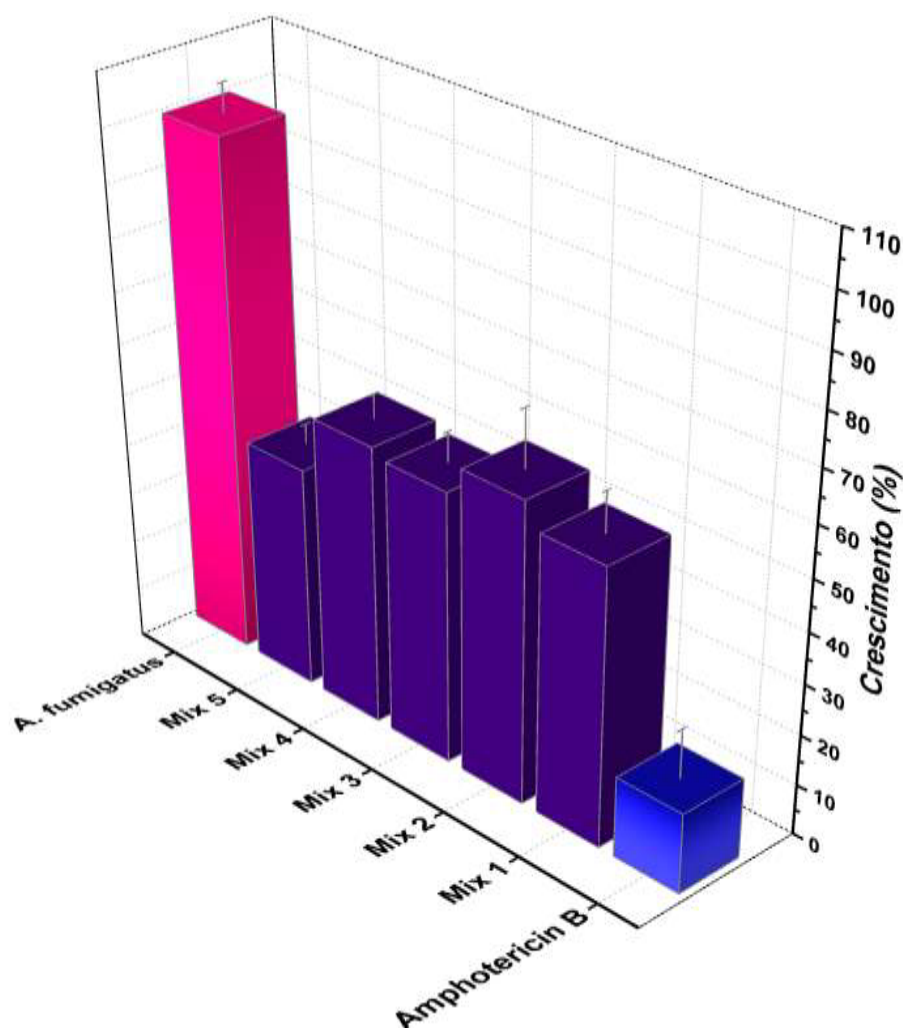
Fonte: Elaborada pela autora utilizando o Origin Pro.

Um possível sinergismo entre as quitinases também foi avaliado em *A. fumigatus*. A concentração escolhida para realização dos ensaios foi a menor testada nos ensaios anteriores, de 25 ug/mL.

Foi nomeado de Mix 1 a solução contendo as 3 quitinases AsChtII- (C2B3 + C3C4 + C4B1), este interferiu no crescimento do *A. fumigatus* em torno de 45,31 %. O mix 2 composto por (C2B3 + C3C4 + C5B1) reduziu em 40,36 %. O Mix 3 composto por (C2B3 + C4B1 + C5B1) interferiu no desenvolvimento do fungo em 46,3 %. O Mix 4 composto (C2B3 + C4B1) interferiu 44,8 %. O Mix 5 composto por (C2B3 + C5B1) foi o que melhor atuou na redução do crescimento do patógeno com uma porcentagem de 56,23 % (Figura 5.22).

Esses experimentos mostram que misturas das enzimas não foram capazes de aumentar a atividade fungicida individual das mesmas.

FIGURA 5.22 – Interferência no crescimento do fungo *A. fumigatus* na presença da combinação entre as quitinasas recombinantes.



Fonte: Elaborada pela autora utilizando o Origin Pro.

As quitinasas podem apresentar diferentes atividades em diferentes fungos, devido à microestrutura da superfície e à proporção de quitina na parede celular do fungo. A maioria dos patógenos fúngicos tem quitina como componente dominante dentro de sua parede celular, que varia na faixa de 5 a 27% em massa seca encontrada principalmente no ciclo da mitose das células fúngicas e na ponta da hifa em crescimento (BAI *et al.*, 2022). Porém, a composição da parede celular dos fungos varia e a resposta à exposição do fungo as quitinasas podem ser diferentes, o que torna difícil uma padronização dos ensaios frente às quitinasas candidatas a fungicidas.

A droga Caspofungin é um antifúngico usado contra a aspergilose pulmonar invasiva, doença grave causada pelo fungo *A. fumigatus* que acomete indivíduos imunossuprimidos. Esta droga atua de forma não competitiva inibindo a sintase da b-1,3-glucana, enzima necessária para a biossíntese de b-1,3-glucano, um carboidrato primário da parede celular fúngica. Em concentrações maiores, o caspofugin induz um fenótipo de tolerância com restabelecimento parcial do crescimento fúngico denominado efeito paradoxal, decorrente de uma alteração na composição da parede celular. Essa remodelação acontece devido à ativação de genes específicos no fungo que remodelam a parede celular após a exposição à droga. A superprodução de quitina, por exemplo, estabiliza a parede celular nos estágios iniciais da exposição à droga, no entanto, esse aumento por si só não confere resistência à droga (RIES *et al.*, 2017; COLABARDINI *et al.*, 2022; PERLIN, 2015).

5.11 Ensaio de inibição do crescimento de *Lasiodiplodia theobromae*

Com ampla distribuição geográfica, *L. theobromae* afeta várias culturas economicamente importantes causando redução da qualidade e a quantidade de commodities agrícolas. É o causador da gomose fúngica do pêssego (substância pegajosa que escorre da infecção) é uma das doenças mais comuns e destrutivas e restringe severamente o crescimento e a produção de pomares de pêssego em todo o sul da China, Estados Unidos e Japão (MENG *et al.*, 2022). Estudos mostram que o fungo *L. theobromae* como o patógeno causador da queima das folhas, câncer do caule e da podridão dos frutos de *Theobroma cacao* na Malásia (HUDA-SHAKIRAH *et al.*, 2022). No Brasil o *L. theobromae* é uma séria ameaça às áreas de cultivo de caju, causador da resinose e da podridão-preta-da-haste (CARDOSO *et al.*, 2009). Imagens de microscopia demonstraram a capacidade e a agressividade com que o fungo colonizar os vasos, raios e células do parênquima, levando ao rompimento das paredes celulares nos cajueiros, (MUNIZ *et al.*, 2011).

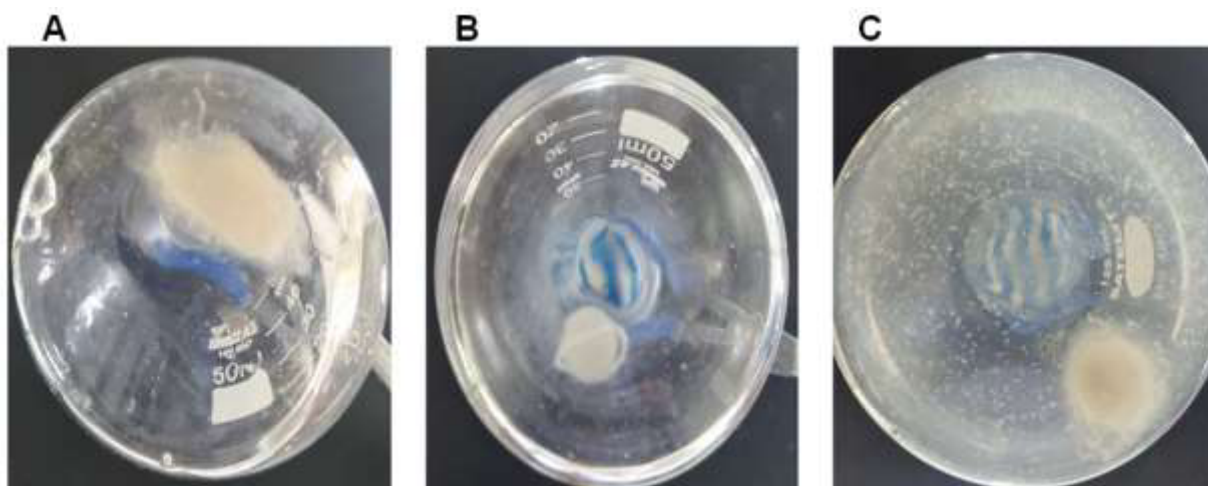
Em humanos a infecção pelo *L. theobromae* é incomum, mas tem sido associada à manifestações clínicas como onicomicose (infecção fúngica das unhas), úlceras de córnea e feohifomicose (micose) relatado em pacientes com

imunodeficiência e um caso mais recente foi relatado de um paciente diabético que apresentou sintomas da rinossinusite, doença causada pelo *L.theobromae* (MAURYA *et al.*, 2023; SAHA *et al.*, 2012).

Neste trabalho, os experimentos de verificação da interferência no crescimento do fungo *L. theobromae*, foram desenvolvidos com a enzima AsChtII-C2B3.

O fungo foi cultivado em placa de Petri, foi retirado uma amostra micelial com tamanho de 8 mm e colocado em 10 mL do meio líquido BD. O meio de cultura foi incubado a 28 °C sob agitação por 72 horas. Em seguida a quitinase purificada AsChtII-C2B3 (coluna Ni-NTA) (0,71 mg/mL) foi adicionada ao meio e a cultura permaneceu por mais 72 horas. Após as 72 horas notou se que o meio no qual o fungo cresceu continua sólidos em suspensão, que poderiam ser pedaços de hifas, e que o centro micelial do fungo estava com o seu tamanho reduzido, Figura 5.23 - **C**. A ação da quitinase AsChtII-C2B3 foi comparado com o fungicida comercial Anphotericin B (2 µg/mL), Figura 5.23.

FIGURA 5.23 - Crescimento do fungo *L. theobromae* **A** e **B** *L. theobromae* tratado com Amphotericin e **C** - Crescimento do fungo *L. theobromae* na presença da enzima AsChtII-C2B3.



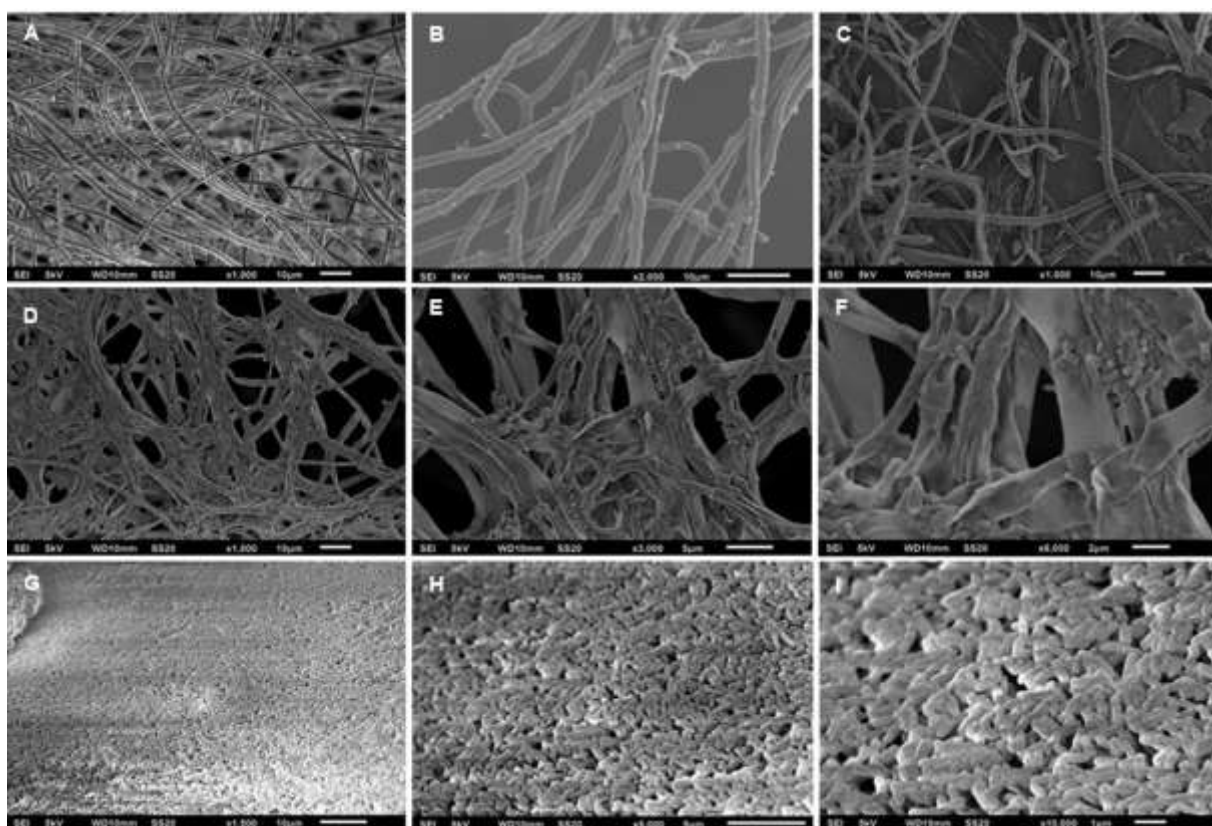
Fonte: Própria

Amostra do meio de cultura contendo as hifas digeridas foram plaqueadas em meio BDA por 72 horas para analisar a viabilidade do fungo. A placa permaneceu por 72 horas a 28 graus e não houve crescimento do fungo na amostra

testada. Estes experimentos mostram que as hifas não estavam viáveis, quando o fungo foi tratado com a enzima (Anexo).

Para obter mais informações sobre o que poderia ter acontecido com o fungo na presença da enzima, amostras do meio de cultura foram analisadas por MEV, (Figura 5.24). Em **A**: Hifas sem tratamento apresenta uma rede densa de estruturas tubulares longas. **B**: Hifas na presença do tampão utilizado. **C**: Hifas tratadas com o fungicida comercial. **D**: Hifas tratadas com a quitinase AsChtII-C2B3, onde se observa estruturas enrugadas e achatadas. As imagens de **E-F**: são imagens mais aproximadas que mostram buracos ao longo das paredes tubulares das hifas e hifas digeridas. As imagens de **G-H** são amostras das hifas retiradas do meio de cultura. Essas imagens mostram pequeninos tubos se assemelhando a hifas digeridas.

FIGURA 5.24- Morfologia das hifas do fungo *L. theobromae* capturadas por MEV.



Fonte: Própria

Devido as quitinases estarem envolvidas no processo de lise da quitina contida na parede celular fúngica, essas enzimas vêm ganhando a atenção, gerando um grande esforço direcionado para a purificação e caracterização. Quitinases de várias fontes têm sido descritas como agentes eficazes contra vários fungos patogênicos.

Observações como obstrução da germinação de esporos, interferência no alongamento do tubo germinativo, inflação e distorções da hifa já foram observadas em fungos sob a ação de quitinase de planta (TAKASHIMA et al., 2021), de bactéria (LIU et al., 2019), de fungo (HONG et al., 2017) e de inseto (LIU et al., 2020; ZHANG et al., 2011).

As quitinases têm sido também utilizadas como suplemento a fungicidas e inseticidas já conhecidos, não só para torná-los mais potente, mas também para minimizar a concentração destes produtos químicos que são prejudiciais tanto para a saúde quanto para o meio ambiente (NAGPURE et al., 2013) e esse efeito sinérgico mostrou ser eficiente na inibição da germinação de conídios do fungo patogênico de planta (HUANG; CHEN, 2008). Um estudo do efeito sinérgico entre quitinase e a β -1,3-glucanase mostrou ser eficiente suprimindo o crescimento micelial dos fungos estudados (ARORA et al., 2007).

Com o intuito de estudar um possível mecanismo para a degradação coordenada da quitina utilizando como substrato a α -quitina insolúvel, uma quitinases ChtII (subgrupo II), ChtI (subgrupo I) e Chi-h (subgrupo h) ambas quitinases de inseto tiveram o efeito sinérgico entre elas avaliado e como resultado foi detectado mais açúcar redutor do que a soma do açúcar redutor gerado pelo enzimas individuais (QU et al., 2021)

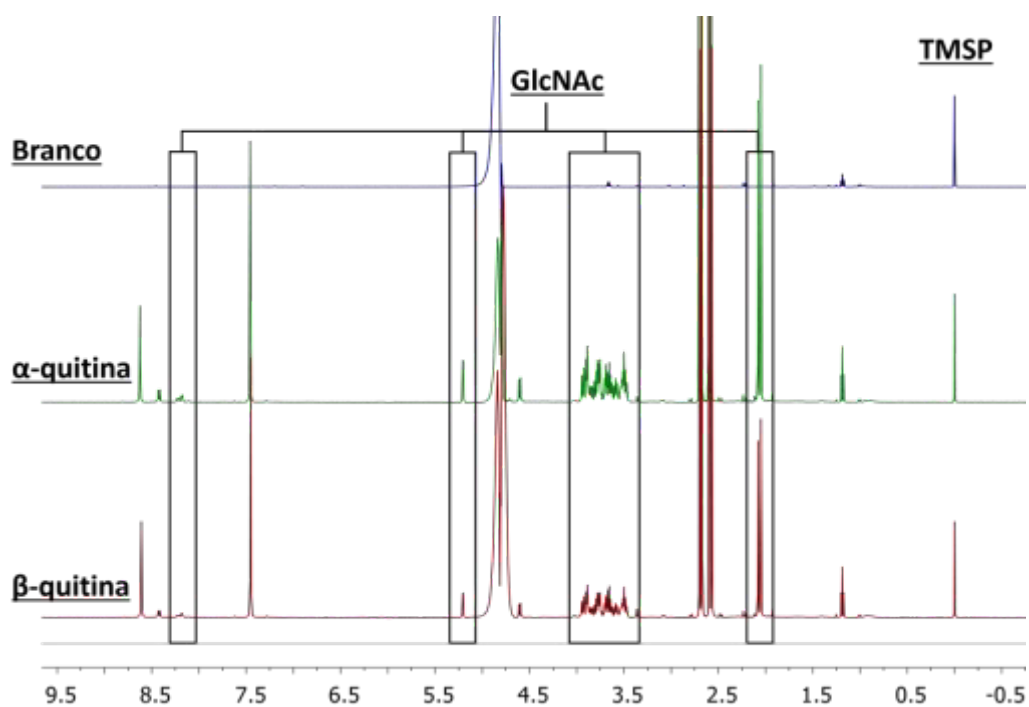
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE II

6.1 Ação da enzima AsChtII-C4B1 sobre diferentes tipos de quitina

Devido às diferenças nas fontes de obtenção e também estruturais de α -quitina e β -quitina foi realizado estudo da atividade da AsChtII-C4B1 nestes compostos, por diferentes abordagens. Inicialmente foram desenvolvidas reações nas condições previamente estabelecidas e descritas nos itens 4.1 e 4.2 e o produto da reação, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), foi analisado através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H) (Figura 6.1).

Em comparação com o método HPLC, a espectroscopia RMN ^1H é simples e rápida e pode ser usado para a análise de produtos hidrolisados de quitina com análise em tempo real, e para quantificar o conteúdo de produtos usando padrões internos sem o uso de curvas de calibração. Este método tem sido usado para avaliar rapidamente a atividade de quitinases (LIU *et al.*, 2011).

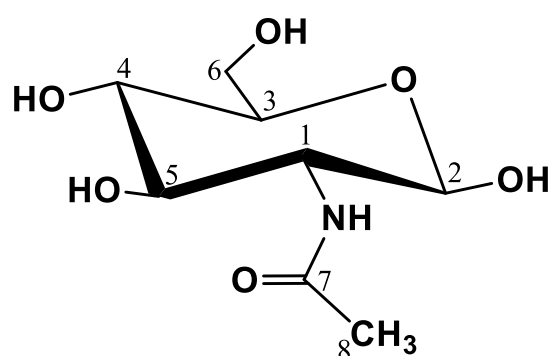
FIGURA 6.1 – Espectros de RMN ^1H das amostras da reação da AsChtII-C4B1 sobre α -quitina e β -quitina coloidal.



Fonte: Própria.

A estrutura química do composto N-acetilglicosamina, está apresentada na (Figura 6.2) e na Tabela 6.1 estão as atribuições dos sinais nos espectros de RMN de ^1H via correlação homonuclear COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ 2D em $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ para o N-acetil- glicosamina. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade.

FIGURA 6.2 – Estrutura química N-acetilglicosamina.



Fonte: Própria.

TABELA 6.1. Atribuições dos sinais nos espectros de RMN de ^1H .

No.	^1H
1'	3.88 (m)
2'	5.19 d (2.8 Hz)
3'	3.40 – 3.95 (m)
4'	3.40 – 3.59 (m)
5'	3.40 – 3.95 (m)
6'	3.40 – 3.95 (m)
NH	8.09 d (8.0 Hz)
7'	-
8'	2.03 s

Fonte: Própria

O produto gerado da reação, N-acetilglicosamina, foi atribuído de acordo com os picos em destaque nos espectros de RMN ^1H . Ambos os espectros

foram registrados em condições similares, cujas concentrações determinadas foram 2,64 mmol L⁻¹ e 2,16 mmol L⁻¹ para α -quitina e β -quitina, respectivamente. A concentração do composto N-acetilglucosamina nas reações foi determinada a partir do sinal do padrão interno.

Para estudar a atividade da enzima sobre substratos sólidos e também avaliar a interferência do tamanho das partículas das quitinas na atividade da enzima, diferentes amostras destes compostos foram estudadas: BQ125 (β -quitina diâmetro < 125 μ m), BQ425 (β -quitina com $d > 0,425 \mu$ m) e AQ (α -quitina sólida). Assim, as reações foram desenvolvidas com os substratos sólidos e o meio reacional foi avaliado através da técnica de viscosimetria capilar.

É possível notar (Tabela 6.2) que houve despolimerização dos substratos sólidos após reação enzimática (agora chamados de BQ125SE, BQ425SE e AQSE), pois os resultados de viscosidade intrínseca $[\eta]$ e das massas moleculares médias viscosimétricas \overline{M}_v obtidos foram menores que os dos substratos sólidos não tratados pela enzima AsChtII-C4B1 (BQ125, BQ425 e AQ-Quitina).

Além disso, esses resultados indicam que a atuação da enzima ocorre de maneira diferente para cada amostra: há uma redução de \overline{M}_v cerca de 4x para a amostra BQ125SE e 2x para BQ425SE após o tratamento enzimático. Isso possivelmente ocorreu devido à amostra BQ125 é formada por grânulos menores (ou seja, maior área superficial disponível), favorecendo a interação entre a superfície dessa amostra com a enzima. Por outro lado, a amostra α -Quitina tratada com a enzima (AQSE) teve redução de cerca de 12x na sua \overline{M}_v , indicando maior afinidade da enzima com esta forma polimorfa da quitina, corroborando os resultados obtidos na análise de N-acetilglucosamina liberado em solução.

Pelos resultados de RMN ¹³C, foram calculados o grau médio de acetilação \overline{GA} das amostras antes e após o tratamento enzimático. De acordo com os resultados obtidos em relação aos substratos sólidos estudados anteriormente sem o tratamento da enzima por (FACCHINATTO *et al.*, 2021), os resultados dos substratos sólidos tratados com a enzima demonstraram que não houve alteração significativa no \overline{GA} apesar dos valores serem > 95 (%), e que o tratamento enzimático na substrato solido promoveu a ruptura nas ligações glicosídicas,

levando a despolimerização refletindo na redução da massa molecular viscosimétrica media.

TABELA 6.2. Resultados de viscosimetria capilar para o meio reacional da enzima frente às diferentes quitinas.

Amostra	$[\eta]$ (mL.mg ⁻¹)	\overline{M}_v (g mol ⁻¹) (x10 ³)	\overline{GP}_v	\overline{GA} (%)
BQ 125	3,30 ± 0,22	996000 ± 92000	6187 ± 581	94,3 ± 4,35
BQ125SE	1,28 ± 0,02	253000 ± 5100	1465 ± 198	>95
BQ425	5,06 ± 0,74	1860000 ± 390000	11546 ± 2400	90,3 ± 3,74
BQ425SE	3,03 ± 0,07	876000 ± 30000	4319 ± 148	>95
AQ	3,18 ± 0,18	943000 ± 76500	5858 ± 474	95,4 ± 5,28
AQ SE	0,57 ± 0,04	79300 ± 7800	492 ± 48	>95

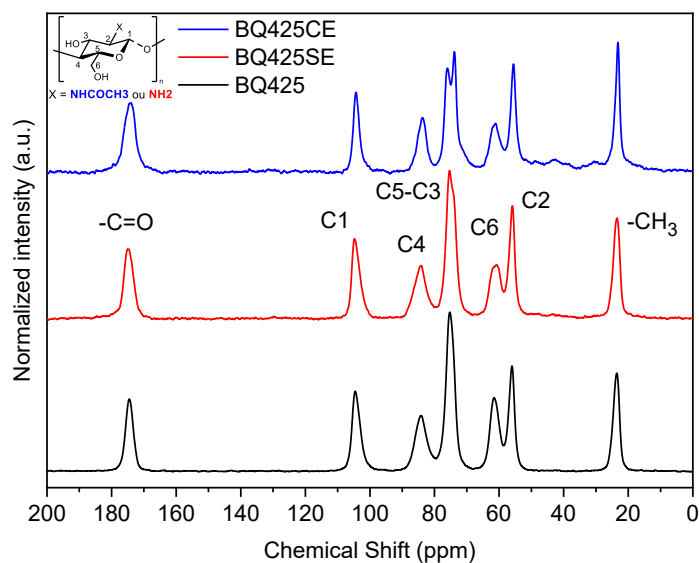
Fonte: Própria

Dando continuidade aos estudos da atividade da enzima sobre os diferentes tipos de quitina, foram desenvolvidos experimentos de análise destes compostos antes e após a reação enzimática através da técnica de RMN ¹³C no estado sólido. É possível observar semelhanças entre os espectros de (BQ425, BQ125) antes e após o tratamento enzimático (BQ425SE e BQ125SE) (Figuras 6.4 e 6.5). Os sinais C5 e C3 são sobrepostos em um único sinal a 77 ppm para o polimorfo β-quitina sugerindo cadeias menos ordenadas.

Estes experimentos também foram feitos com as β-quitinas 125 e 425 pré-tratadas com ácido para formação da quitina coloidal chamadas aqui de (BQ425CE e BQ125CE), observando-se algumas diferenças. A principal delas consiste no desdobramento do pico em ≈ 75 ppm, referente aos sinais dos carbonos C3 e C5. Tipicamente, para amostras de β-quitina, estes sinais são observados como um único pico, ao passo que para a α-quitina, as ligações de hidrogênio intermoleculares conferem ambientes químicos diferentes a esses carbonos, levando a deslocamentos dos sinais do carbono C3. Com isso, há diferenciação entre esses sinais, que podem ser observada por RMN (ABDELMALEK *et al.*, 2017; FOCHER *et al.*, 1992).

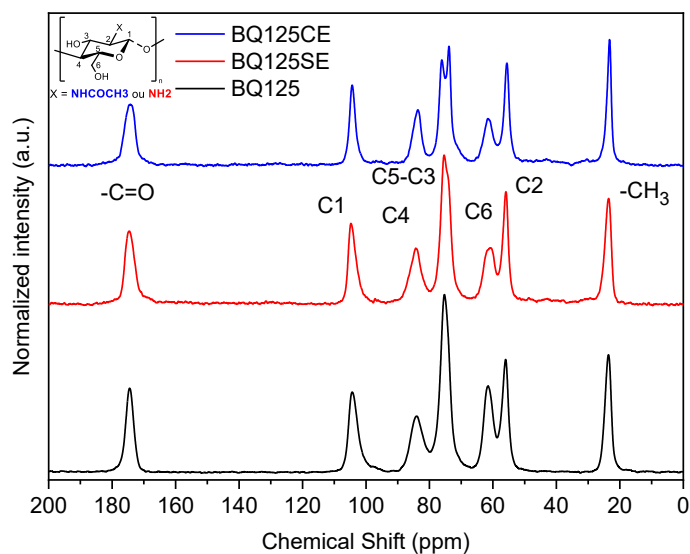
Este efeito é observado nitidamente nos espectros das amostras tratadas quimicamente, indicando a possibilidade de que este tratamento promove alteração nas disposições das cadeias poliméricas de beta-quitina, principalmente na superfície. O tratamento utilizando soluções ácida forte no substrato β -quitina é irreversível, no entanto, após a remoção do ácido, novos cristais de α -quitina são formados, aumentando a sua cristalinidade (CARDOZO *et al.*, 2019; ZENG *et al.*, 2012). É válido destacar que estes espectros estão muito similares aos da α -quitina comercial, QSigma. Os espectros de α -quitina consistem em oito átomos de carbono bem definidas. Os dois picos para C5 e C3 indicam uma maior homogeneidade estrutural, explicada pelo arranjo antiparalelo das cadeias de α -quitina (CARDOZO *et al.*, 2019).

FIGURA 6.3 - Espectros de RMN ^{13}C para as amostras de BQ425.



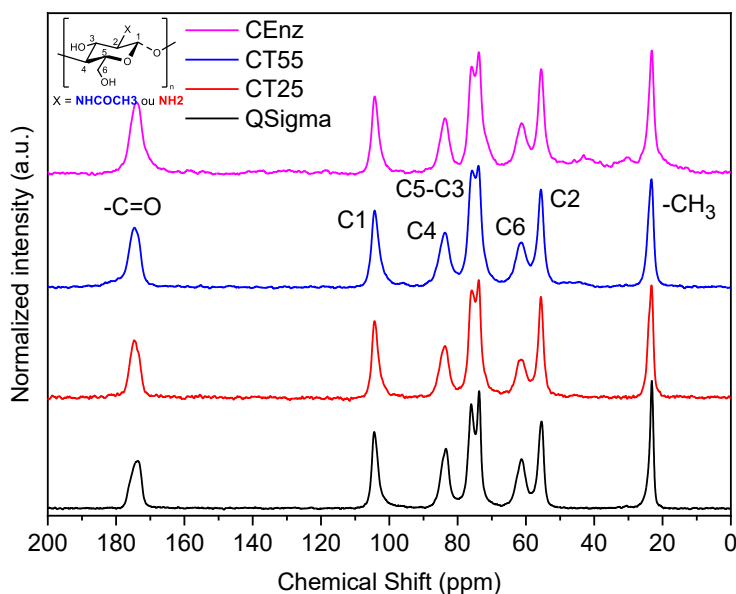
Fonte: Própria

FIGURA 6.4 - Espectros de RMN de ^{13}C para as amostras BQ125.



Fonte: Própria

FIGURA 6.5 - Espectros de RMN de ^{13}C para as amostras QSigma.



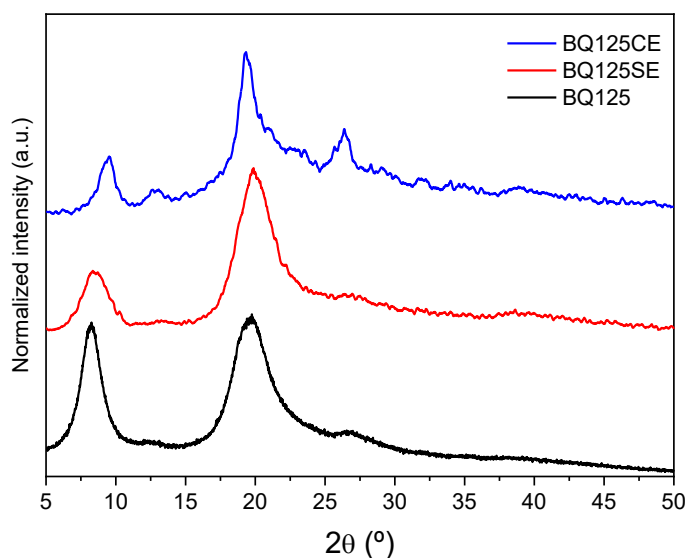
Fonte: Própria

Com o objetivo de uma melhor caracterização dos substratos após a ação da enzima, foi feito um estudo por difração de raios-X destas amostras. Os padrões de difração de raios X (DRX) para as amostras BQ425, BQ125 e QSigma estão representados nas Figuras 6.6, 6.7 e 6.8. Novamente, para as amostras de β -

quitina, são encontradas similaridades nos difratogramas das amostras originais e tratadas enzimaticamente.

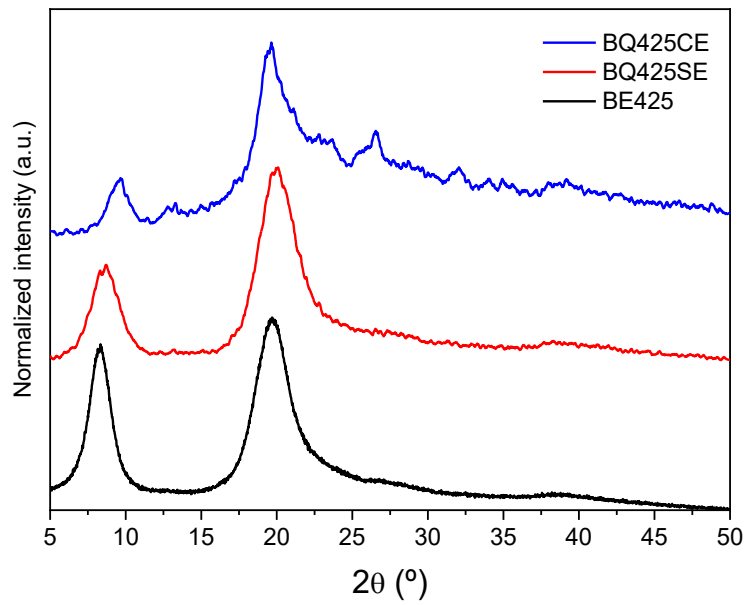
Para as amostras tratadas com HCl, é possível observar mais ruídos e picos menos definidos, indicando mudança significativa nos padrões de difração típicos das amostras. Este mesmo efeito é observado para as amostras de α -quitina (QSigma), na figura abaixo. É importante destacar que tratamentos ácidos têm impacto na cristalinidade das amostras, visto que as ligações glicosídicas são facilmente atacadas por hidrólise ácida, levando a despolimerização e subsequente remoção de fases amorfas.

FIGURA 6.6 - Padrões de difração de raios X par as amostras BQ125.



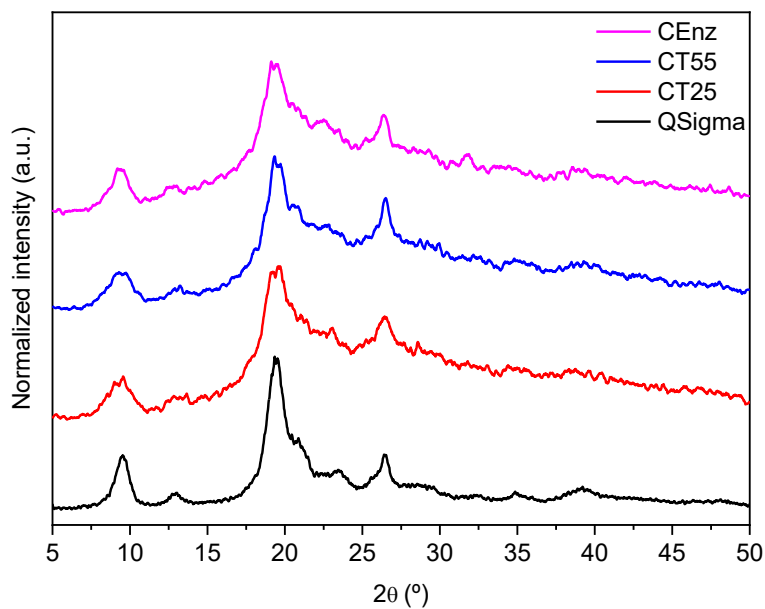
Fonte: Própria

FIGURA 6.7 - Padrões de difração de raios X para as amostras BQ425.



Fonte: Própria

FIGURA 6.8 - Padrões de difração de raios X para as amostras QSigma.



Fonte: Própria

Os índices de cristalinidade IC_{DRX} foram calculados através do método descrito por Osorio Madrazo e colaboradores (2010). Além disso, os

tamanhos dos domínios cristalográficos em relação aos planos (020) e (200) foram calculados utilizando a equação de Scherrer (5), e estão mostrados na Tabela 6.3. Os valores de ICr_{DRX} e ICr_{CP} não são coincidentes, pois os primeiros tratam de interações de maior distância, conseqüentemente mais afetadas pela reação de acidólise, enquanto os últimos refletem interações de curto alcance. No entanto, é interessante destacar que ICr_{DRX} das amostras tratadas enzimaticamente (BQ425SE e BQ125SE) é maior quando comparado com o das demais amostras, indicando maior atividade das enzimas em regiões mais amorfas.

Para as amostras de QSigma, os resultados de ICr obtidos reforçam a hipótese de degradação parcial das amostras, visto que há queda de cristalinidade em todos os casos CT (α -quitina coloidal a temperatura de 25 °C) CT 55 (α -quitina coloidal a temperatura de 55 °C) ambas sem tratamento enzimático e Cenz (α -quitina coloidal tratado com a enzima). Embora os espectros de RMN indiquem um perfil típico de α -quitina, é necessário averiguar a extensão da despolimerização promovida pelo tratamento ácido.

TABELA 6.3. Resultados de cristalinidade obtidos por RMN e DRX.

Amostra	ICr_{DRX} (%)	ICr_{CP} (%)			L_{020} (nm)	L_{200} (nm)
		C4	C6	Média		
BQ425	71,2	85,6	82,1	83,8	4,70	3,43
BQ425SE	66,4	84,7	66,7	79,0	4,30	3,80
BQ125	61,1	81,9	79,5	80,7	4,67	3,19
BQ125SE	61,0	85,4	67,2	76,3	5,92	3,79
QSigma	58,8	86,0	85,5	85,7	8,02	6,03
QCT25	41,9	75,4	81,8	78,6	4,52	5,01
QCT55	43,8	71,4	81,1	76,3	5,16	5,18
QCenz	42,7	72,4	77,8	75,1	7,2	5,11

Fonte: Própria

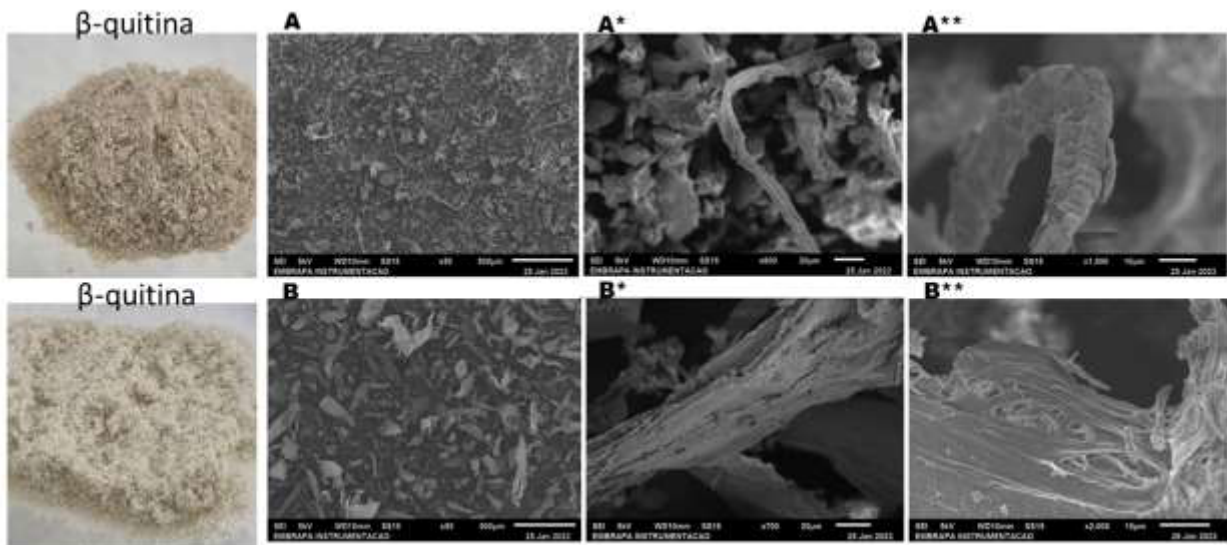
As amostras obtidas no item 4.1 foram liofilizadas e submetidas a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG). As partículas de α -quitina e β -quitina resultantes após a ação enzimática foram preparadas em porta

amostras (*stubs*) e recobertas com uma camada de ouro e/ou platina. As técnicas permitem analisar as possíveis alterações morfológicas nos substratos em escalas manométricas.

Imagens obtidas por MEV e/ou FEG indicaram modificações provocadas pela ação da AsChtII-C4B1 (Figuras 6.9 e 6.10). Nos substratos coloidais tratados com a enzima (Figura 6.9 A* e Figura 6.10 A* e C*) foi observado que o material gerado apresenta porosidade e microfibrilas de quitina sendo liberados do meio compacto do substrato.

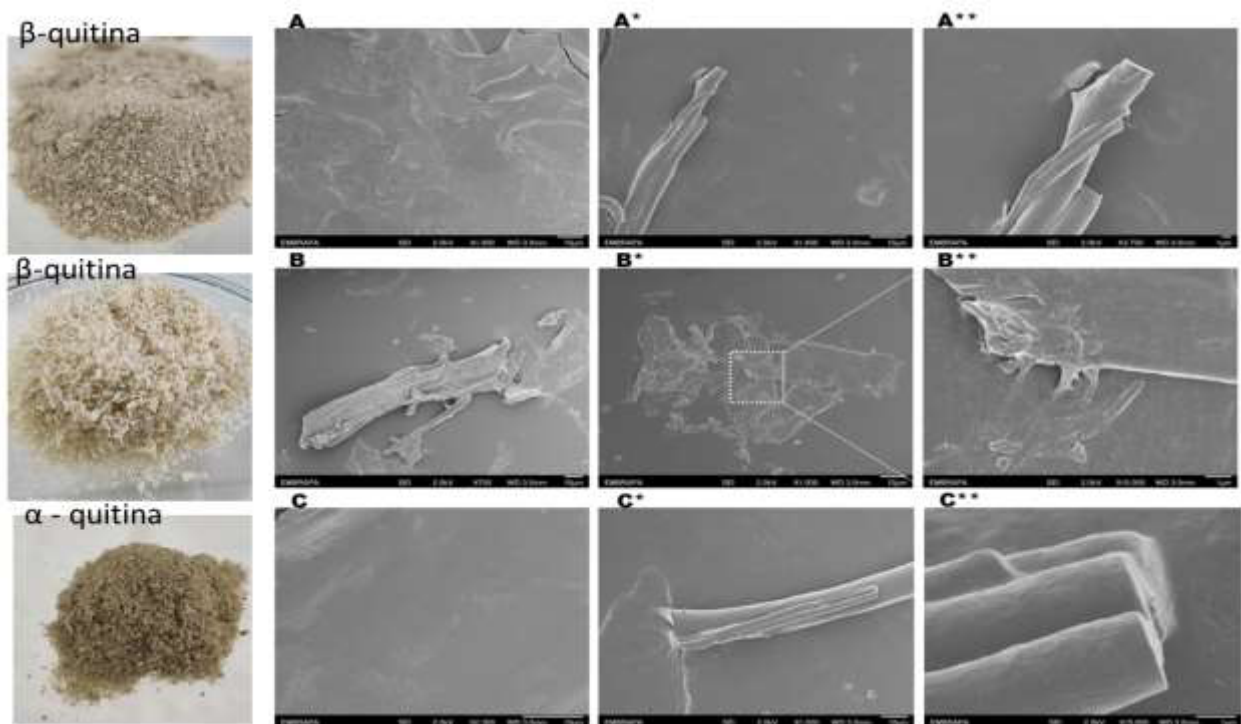
Nos substratos sólido (Figura 6.9 B* e Figura 6.10 B**) também há formação de porosidade e a presença de buracos na superfície morfológica dos substratos analisados. Os substratos coloidais (Figura 6.9 A e Figura 6.10 A) como os sólidos (Figura 6.9 B e Figura 6.10 B) apresentam estruturas mais compactas quando comparadas com os substratos tratados com a enzima (Figura 6.9 A* e Figura 6.10 B*). Nesse experimento o substrato α -quitina sólido não foi analisado, apenas o substrato coloidal. Na Figura 6.9 ilustra - **A** - β -quitina ($d < 125$ nm) – Imagem geral do substrato coloidal. **A*** Substrato coloidal tratado com a enzima e **A**** - Imagem ampliada. **B** – β -quitina ($d < 125$ nm) – Imagem geral do substrato sólido. **B*** - Substrato sólido tratado com a enzima. **B**** - Imagem ampliada. E na Figura 6.10 - **A** - β -quitina ($d > 425$ nm) – Imagem geral do Substrato coloidal. **A*** Substrato coloidal tratado com a enzima, fibras de quitinas liberadas e **A**** - Imagem ampliada da fibra. **B** – β -quitina ($d > 425$ nm) estado sólido não tratado –. **B*** - Substrato tratado pela enzima, fibras liberadas do meio compacto e **B**** - Imagem ampliada. **C** - α -quitina coloidal - **C*** – Fibras de quitina liberadas e **C**** - Imagem ampliada.

FIGURA 6.9 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da BQ125.



Fonte elaborada pela autora. Imagens capturadas por MEV.

FIGURA 6.10 – Microscopia eletrônica de varredura (FEG) da BQ425 e AQ coloidal.



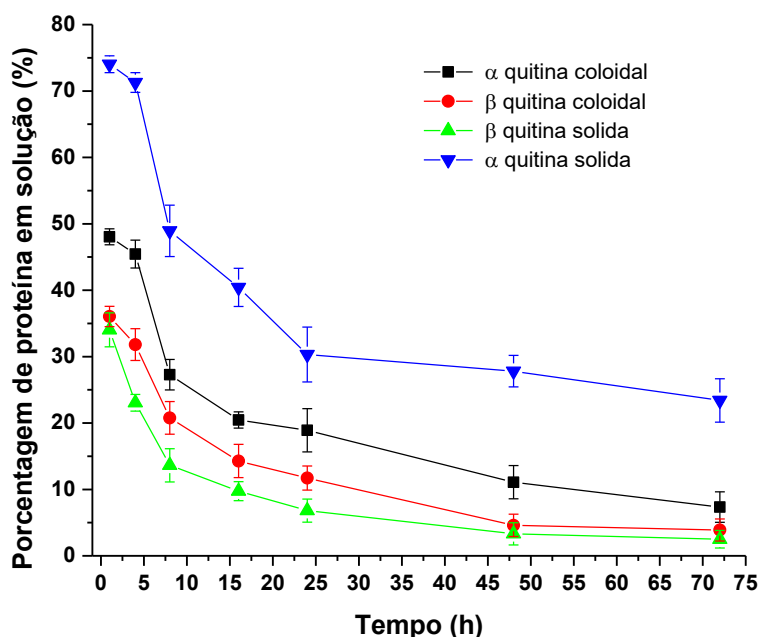
Fonte elaborada pela autora. Imagens capturadas por FEG.

Um estudo da ação enzimática em relação ao substrato foi analisado com o intuito de verificar a atividade hidrolítica e afinidade da enzima em relação ao substrato estudado. Para isso a porcentagem relativa de proteína ligada aos substratos β -quitina, α -quitina coloidal e β -quitina e α -quitina sólida variando o tempo de incubação (1 a 72 horas) a 55°C foi avaliado, sendo a proteína livre em solução medida pelo método Bradford (CHEN *et al.*, 2018).

A AsChtII-C4B1 parece ter mais afinidade pelo substrato β -quitina sólida dada a porcentagem de apenas 34% de enzima em solução após 1 hora de incubação quando comparado com a α -quitina sólida. Esse substrato possui a estrutura mais enfraquecida quando comparada com o substrato α -quitina sólida. Em ambas as estruturas cristalinas estudadas as cadeias de quitina são organizadas em folhas, e as folhas são fortemente mantidas por várias ligações de hidrogênio. Algumas ligações de hidrogênio entre as folhas ocorrem ao longo da célula unitária na α -quitina, mas nenhuma ligação de hidrogênio entre as folhas ocorre para a β -quitina. A β -quitina possui as interações de ligação hidrogênio reduzida em comparação com a α -quitina, formando fibrilas mais macias que são mais suscetíveis à hidrólise em geral (ZENG *et al.*, 2012).

Entre os substratos coloidais a β -quitina mostrou ser mais acessível a hidrólise, com apenas 1 hora de incubação 37 % de enzima se encontrava em solução sugerindo mais disponibilidades de ligações glicosídicas presente no substrato β -quitina quando comparado com o substrato α -quitina coloidal, com 48 % de proteína presente em solução após o mesmo período de incubação.

FIGURA 6.11- Porcentagem de proteína ligada ao substrato β - e α -quitina coloidal e β - e α -quitina sólida, variando o tempo de incubação a 55°C.



Fonte: Própria feita no OriginPro

6.2 Avaliação da atividade da enzima AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo *L. theobromae*

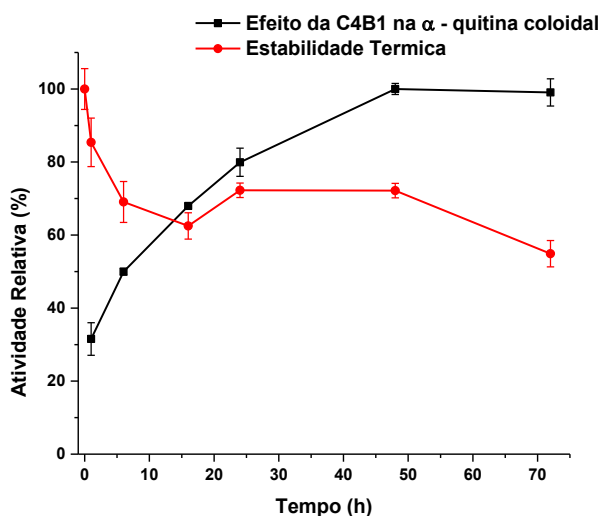
Em estudos prévios a enzima AsChtII-C4B1 mostrou atividade fungicida frente ao fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (MICOCCI *et al.*, 2023) e neste trabalho a enzima foi testada frente ao fungo *L. theobromaeda*. Como este fungo tem o melhor crescimento a 28 ° C a atividade da enzima foi testada nesta temperatura usando como substrato α -quitina coloidal variando o tempo de incubação (Figura 6.12)

A porcentagem relativa da atividade da enzima na presença do substrato aumenta com o período de incubação e após 48 horas de incubação tem se o platô.

A termoestabilidade da AsChtII-C4B1 na mesma temperatura teve uma redução de 42 % de atividade ao longo de 72 horas, ou seja, uma boa porcentagem da enzima permanece estável após o período de incubação

estabelecido. Ensaio com enzima a 25 ° C, 30 ° C e 37 ° C por 48 horas manteve cerca de 50% de sua atividade, próxima da atividade calculada para este ensaio enzimático (MICOCCI *et al.*, 2023).

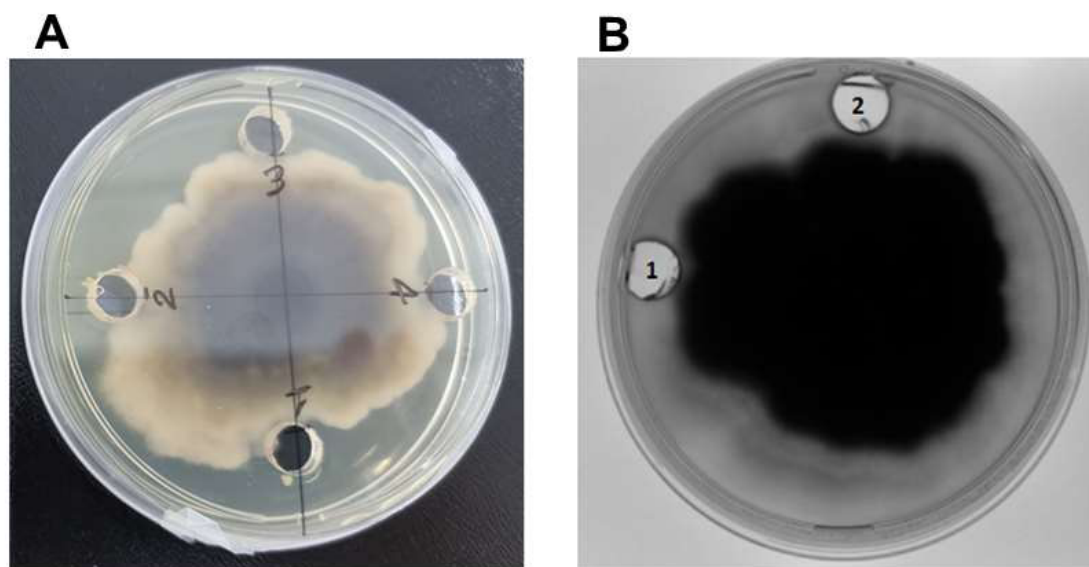
FIGURA 6.12 - Efeito da temperatura a 28 ° C da AsChtII-C4B1 frente ao substrato α -quitina coloidal variando o tempo de incubação e a estabilidade térmica da enzima na mesma temperatura.



Fonte: Própria feita OriginPro

Para avaliar a atividade antifúngica da enzima uma primeira análise foi realizada em placa contra o fungo *L. theobromae*. Na primeira análise, mesmo variando a concentração da enzima, não foi possível observar alguma inibição significativa do crescimento do micélio sendo que um dos motivos pode ser que a enzima perca a atividade em meio sólido (Figura 6.13A). Teste posterior foi realizado aumentando ainda mais a concentração da enzima 0,77 mg/mL, mas sem resultado significativo para inibição do crescimento do fungo (Figura 6.13B). Nestes experimentos foram usados como controles negativos o sobrenadante do meio de cultura obtido de uma linhagem de *P. pastoris* transformada com o vetor pPICZ α vazio e o tampão fosfato. Na Figura 6.13 ilustra o crescimento do fungo, variando a concentração da enzima, **A**: 1 - controle (KM71H contendo pPICZ α vazio), 2 - 0,166 mg/mL, 3 - 0,332 mg/mL, 4 - 0,496 μ g/mL. Crescimento do fungo, **B**: 1 - Controle fosfato de sódio, 2 - AsChtII-C4B1 0,770 mg/mL

FIGURA 6.13 Avaliação da atividade da enzima no crescimento do fungo *L. theobromae* em meio sólido.



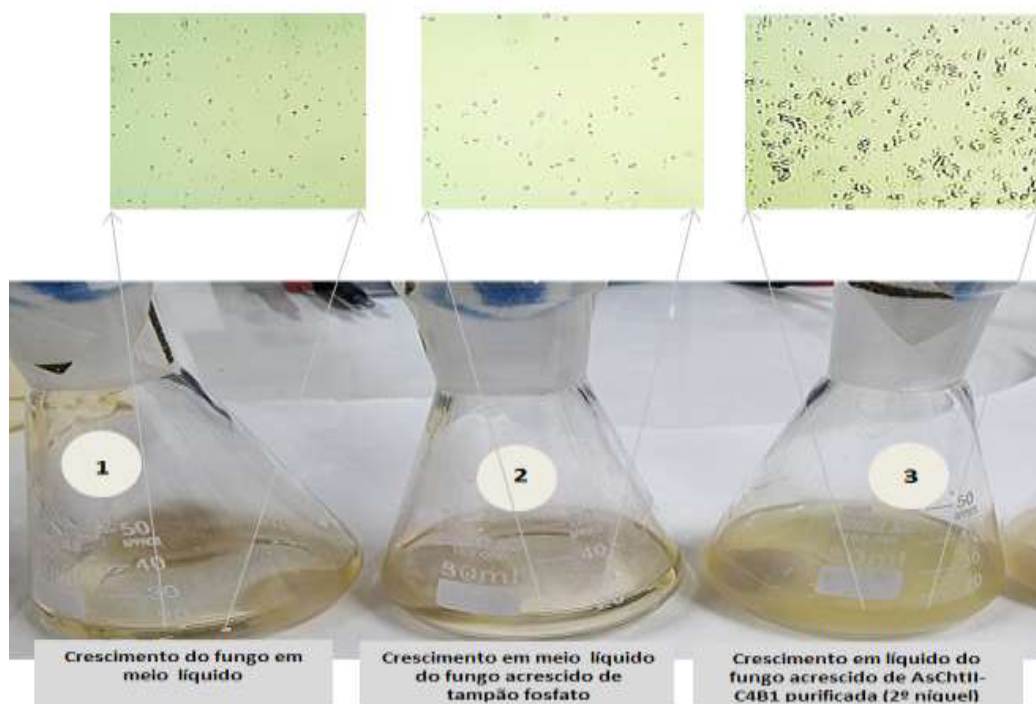
Fonte: Elaborada pela autora.

Foi testada, então, a ação da quitinase purificada (coluna Ni-NTA) (0,770 mg/mL) no crescimento do fungo em meio líquido. Para isto, o meio de cultura foi mantido sob agitação a 150 RPM a 28°C por 72 horas. Após este período, observou-se turbidez nos meios de cultura e a densidade ótica foi lida a 600 nm. No frasco onde houve crescimento somente do fungo ou ao que foi adicionado tampão (como controle) a absorvância lida foi zero. No meio de cultura onde foi adicionada a enzima a absorvância foi 0.458. Estas amostras foram visualizadas em Microscópio Ótico (Figura 6.14), onde observou se estruturas maiores e diferentes no meio líquido quando comparado com o meio sem tratamento com a enzima, sugerindo que o conteúdo poderia ser hifas do fungo digeridas.

As hifas do fungo sob a ação da enzima e na ausência da enzima foram secas e pesadas, observando-se uma perda de peso do micélio após o tratamento com a quitinase, conforme ilustrado na (Figura 6.15). Nas primeiras 24 horas houve uma redução de cerca 20,5 % da massa do micélio, após 48 horas a

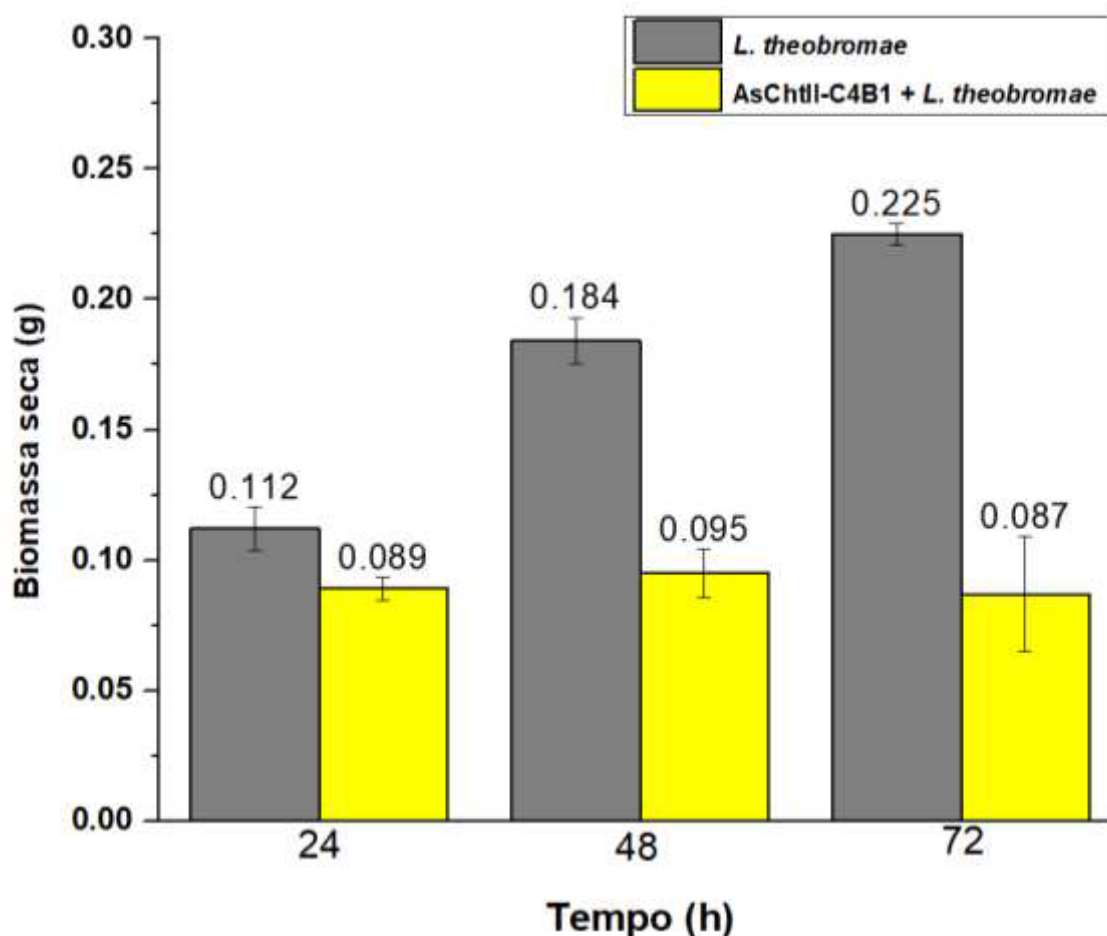
redução foi de 48.15% e após 72 horas a redução foi de 61.3% em comparação com a biomassa seca do fungo sem tratamento.

FIGURA 6.14 - Avaliação da atividade da AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo em meio líquido.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6.15 – Avaliação da massa dos micélios do fungo após ação da enzima.



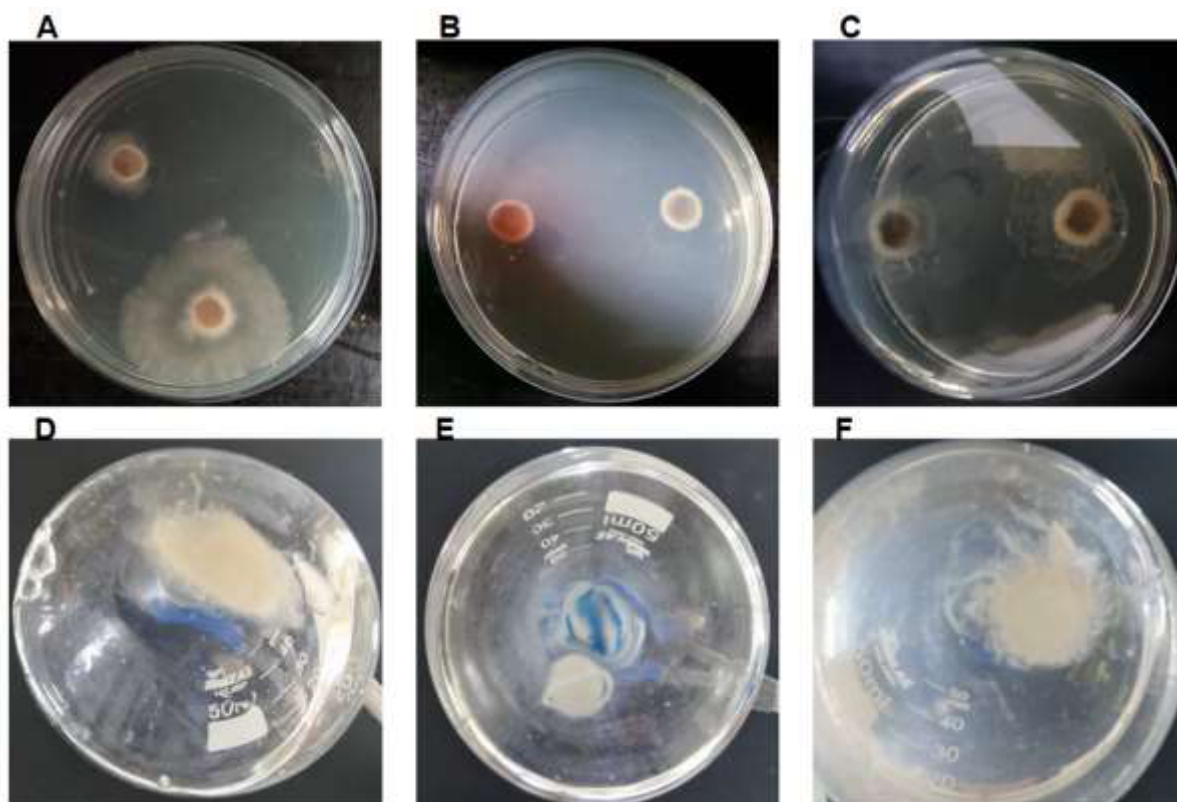
Fonte: Elaborada pela autora.

Devido aos resultados interessantes de perda de massa dos micélios do fungo tratado com a enzima e das imagens de Microscopia Ótica, outros experimentos foram desenvolvidos para tentar mais informações sobre a ação da enzima no crescimento do fungo.

Assim, do fungo cultivado em placa Petri conforme descrito anteriormente foi retirado uma amostra micelial com halo de 8 mm e plaqueado em outra placa de duas maneiras – o micélio voltado para cima na superfície do BDA e um outro em contato direto com o BDA e sobre estes foram gotejadas soluções da enzima na mesma concentração utilizada em todos os experimentos, ou seja 0,771 mg/mL. Nesse experimento foi utilizado o fungicida *Amphotericin* como um padrão positivo de ação fungicida e novos experimentos em meio líquido foram realizados. Na (Figura 6.16) são mostradas as placas e também os meios de cultura líquidos.

Nas (Figuras 6.16A e D) são mostrados a placa e o meio líquido do fungo crescido na ausência da enzima e do fungicida, sendo possível observar o crescimento do fungo ao redor do halo. Nas Figuras 6.16B e E, observa-se que com a presença do composto *Amphotericin*, o fungo praticamente não apresenta crescimento. O crescimento do fungo na presença da enzima AsChtII-C4B1 foi afetado (Figuras 6.16C e F), embora seja observado um crescimento ao redor dos halos. Em meio líquido, a presença da enzima provocou uma dispersão das hifas, sugerindo digestão das mesmas (Figura 6.16F).

FIGURA 6.16 - Avaliação do efeito da AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo em meio sólido e líquido.



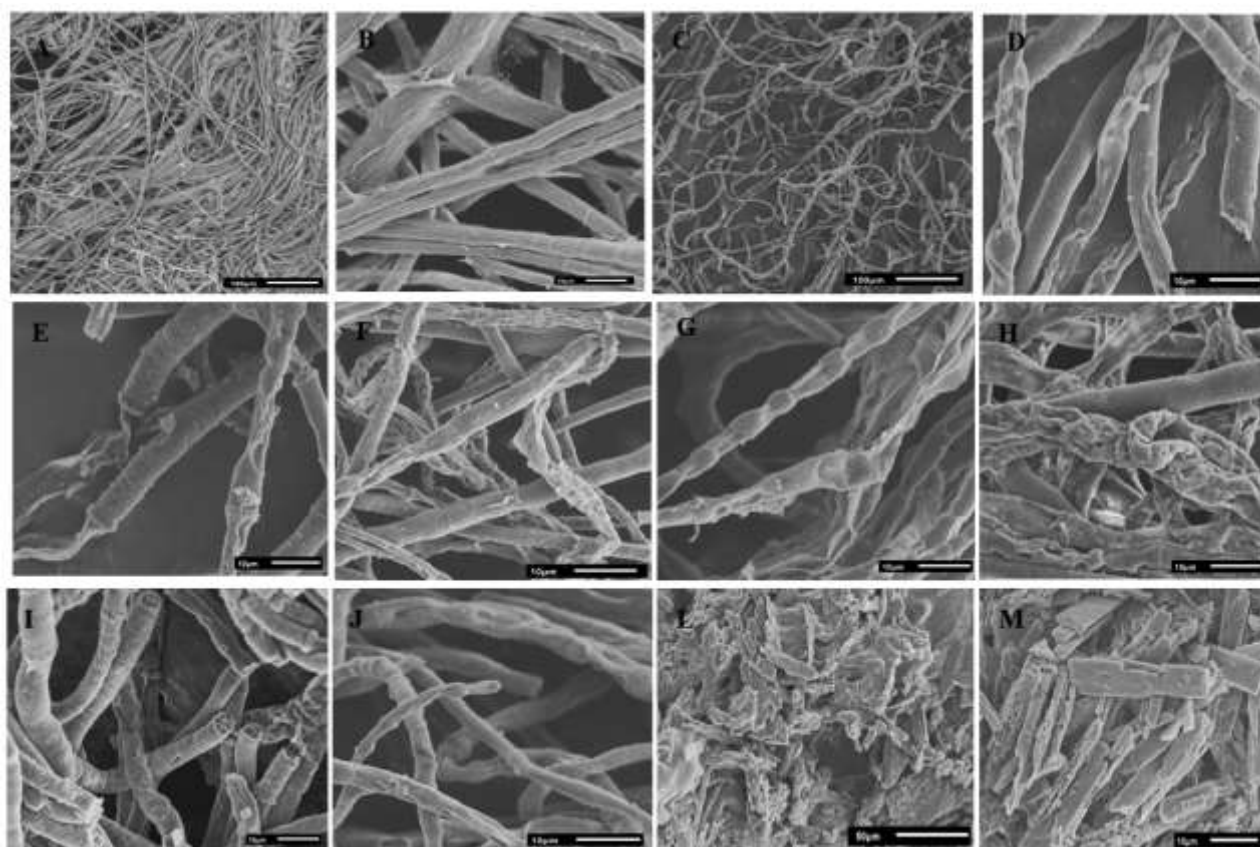
Fonte: Própria

Para investigar o efeito da AsChtII-C4B1 na morfologia da quitina contida na parede celular do fungo, amostras provenientes dos experimentos descritos foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 6.17). As hifas do fungo, na ausência da enzima, apresentam uma rede densa de estruturas tubulares longas de superfície lisa (Figuras 6.17A e B). As hifas do fungo

sob a ação da enzima apresentaram uma rede desordenada (Figura 6.17C). As imagens da Figura 6.17D-M mostram modificação nas hifas, com esmagamento das partes tubulares, ponta longa translúcida e com buracos na superfície, tubos inchados, quebrados e com extremidades arredondadas.

Embora não tenha sido possível quantificar a ação da enzima AsChtII-C4B1 no crescimento do fungo *L. theobromae*, os resultados obtidos nestes experimentos mostram que a enzima apresenta ação sob a quitina da parede celular do fungo e nas hifas conforme ilustram as imagens de MEV, interferindo no crescimento do fungo.

FIGURA 6.17- Alterações morfológicas sobre as hifas do fungo *Lasiodiplodia theobromae* sob ação da enzima, capturadas por MEV.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nosso grupo de pesquisa está estudando a expressão de proteínas quimeras contendo diferentes domínios catalíticos e CBM da formiga cortadeira *Atta sexdens* ('saúva-limão') para contribuir no melhor entendimento das funções da combinação destes domínios e também para avaliar suas potenciais aplicações como fungicida. Assim, baseado na sequência depositada de *Acromyrmex*, primers foram desenhados e usados com o cDNA de *Atta sexdens* para amplificação de DNAs através de PCR.

Os módulos protéicos contendo diferentes domínios catalíticos e CBM foram expressos e caracterizados: AsChtII-C2B3, AsChtII-C3C4e AsChtII-C5B1. Estas cadeias polipeptídicas foram avaliadas sobre o substrato α -quitina coloidal.

A avaliação fungicida das quatro quitinases foi feita usando o modelo culturas de *C. albicans*, e o modelo *A. fumigatus* importantes agentes infecciosos em humanos. Uma observação é que a AsChtII-C4B1 não apresentou atividade contra o fungo *C. albicans*. Os resultados obtidos estão resumidos e ilustrados na tabela abaixo.

Quitinases	Atividade frente α -quitina coloidal (nmol)	% de inibição do crescimento / [Enzima]	
		<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>
AsChtII-C3C4	88	54,5 (50 μ g/mL)	60,1 (25 μ g/mL)
AsChtII-C2B3	52	61,0 (50 μ g/mL)	66,1 (50 μ g/mL)
AsChtII-C5B1	68	87,5 (150 μ g/mL)	61,0 (50 μ g/mL)
AsChtII-C4B1	22	n.d*	66,6 (50 μ g/mL)

*n.d = não detectado

Neste trabalho, também foi verificado a interferência da quitinase AsChtII-C2B3 no crescimento do fungo *L. theobromae*, os resultados obtidos mostram que a enzima apresentou ação sob a quitina da parede celular do fungo gerando modificações morfológicas nas hifas.

Um módulo proteico constituído de um domínio catalítico (CAT) acoplado a um CBM na região C-terminal, nomeado de AsChtII-C4B1 foi expresso em *P. pastoris*, purificado, bioquimicamente caracterizado e apresentou interferência no crescimento do fungo *Aspergillus fumigatus* e no desenvolvimento de larvas de *Spodoptera frugiperda*. AsChtII-C4B1 foi ensaiada também sobre o fungo *Lasiodiplodia theobromae*, um patógeno de plantas causador do apodrecimento e morte na maioria das espécies que infecta. Os testes indicaram digestão das hifas do fungo em meio líquido, o que pode ser verificado por densidade ótica e microscopia ótica e MEV. A atuação da enzima AsChtII-C4B1 nos diferentes tipos de quitina, α -quitina coloidal, β -quitina coloidal e sólida foram estudada através da análise das moléculas de quitinas após tratamento com a enzima. Os resultados obtidos nestes estudos mostraram a atuação da AsChtII-C4B1 ocorre de maneira diferente para cada amostra nas quitinas estudadas.

O conjunto de dados obtidos nas diferentes abordagens do presente estudo mostra que os módulos proteicos recombinantes atuam sobre a quitina e são potenciais agentes fungicida.

Em suma, consideramos que as etapas propostas inicialmente para o projeto foram realizadas com sucesso apesar do período pandêmico pelo qual todos nos passamos, gerando atrasos nos procedimentos experimentais, ainda assim foi possível com muito trabalho obter informações científicas significativa sobre as quitinases.

O trabalho teve colaborações interdisciplinares como o uso da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, Microscopia eletrônica de varredura e também na parte microbiológica, trabalhando com fungos patógenos humanos e de planta, nos proporcionando novos conhecimentos.

As quitinases vêm ganhando atenção no meio científico por demonstrarem estarem envolvidas no processo de lise da quitina contida na parede celular fúngica, atuando sozinhas ou em sinergismo com outras enzimas ou fungicidas já conhecidos, e uma vez que cada fungo reagi de maneira diferente não só a atuação das quitinases mas também a outros fungicidas, não somente pela quantidade de quitina exposta na parede celular mas também o próprio mecanismo de proteção do fungo quanto há qualquer interferência no seu desenvolvimento, estudar possíveis metabolitos gerados pelos fungos induzidos pela ação das

quitinases na quitina da parede celular pode ajudar a ter uma melhor compreensão do mecanismo de ação de defesa dos fungos contra agentes fungicidas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, N.D. ;BRUCK, W.M. ;GARBE, D. ;BRUCK, T.B, Enzymatic modification of Native Chitin and Conversion to Specialty Chemical Products. *Marine Drugs*, v.93, n. 18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md18020093>

A. VELIZ, E.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; M. HIRSCH, A. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 689–705, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.689>

AALTEN, A. D. M. F. Van; KOMANDER, D.; SYNSTAD, B.; GÅSEIDNES, S.; PETER, M. G.; EIJSINK, G. H. Linked references are available on JSTOR for this article : Structural insights into the catalytic mechanism of a β -glucosaminidase. *PNAS*, v. 98, n. 16, p. 8979–8984, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas>.

ABDELMALEK, B. E.; SILA, A.; HADDAR, A.; BOUGATEF, A.; AYADI, M. A. β -Chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 953–962, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.107>

ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 8, p. 1786–1795, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.012>

AHMAD, S. I.; AHMAD, R.; KHAN, M. S.; KANT, R.; SHAHID, S.; GAUTAM, L.; HASAN, G. M.; HASSAN, M. I. Chitin and its derivatives: Structural properties and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 164, p. 526–539, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.098>

ALHASAWI, A.; D. APPANNA, V. Enhanced extracellular chitinase production in *Pseudomonas fluorescens*: biotechnological implications. *AIMS Bioengineering*, v. 4, n. 3, p. 366–375, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/bioeng.2017.3.366>

ALLISON, C. L.; LUTZKE, A.; REYNOLDS, M. M. Identification of low molecular weight degradation products from chitin and chitosan by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, v. 493, n. February, p. 108046, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108046>

ALLONSIUS, C. N.; VANDENHEUVEL, D.; OERLEMANS, E. F. M.; PETROVA, M. I.; DONDEERS, G. G. G.; COS, P.; DELPUTTE, P.; LEBEER, S. Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39625-0>

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n. 2, p. 201–216, 2010 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0161-9>

ARAÚJO, D.; FERREIRA, I. C.; TORRES, C. A. V.; NEVES, L.; FREITAS, F.

Chitinous polymers: extraction from fungal sources, characterization and processing towards value-added applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 95, n. 5, p. 1277–1289, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.6325>

ASPERGILLUS, T.; NICOLAS, L.; RIES, A.; ROCHA, C.; CASTRO, A. De. crossm Synthase Gene Expression during the Caspofungin Paradoxical Effect. v. 8, n. 3, p. 1–15, 2017.

BAI, L.; LIU, L.; ESQUIVEL, M.; TARDY, B. L.; HUAN, S.; NIU, X.; LIU, S.; YANG, G.; FAN, Y.; ROJAS, O. J. Nanochitin: Chemistry, Structure, Assembly, and Applications. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00125>

BECKHAM, G. T.; STÅHLBERG, J.; KNOTT, B. C.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M. F.; SANDGREN, M.; SØRLIE, M.; PAYNE, C. M. Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 96–106, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.002>

BENCKISER, G. Ants and sustainable agriculture. A review. [S. l.]: Springer Nature, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/agro/2009026>

BOULOGNE, I.; OZIER-LAFONTAINE, H.; LORANGER-MERCIRIS, G. Leaf-Cutting Ants, Biology and Control Leaf-Cutting Ants, Biology and Control. n. January 2014, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-00915-5>

BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C.glabrata* infection strategies. *Cellular Microbiology*, v. 15, n. 5, p. 701–708, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12091>

CAMPANA-FILHO, P.; LAVALL, R. L.; ASSIS, O. B. G. b -Chitin from the pens of *Loligo sp.*: Extraction and characterization. v. 98, p. 2465–2472, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.002>

CARDOSO, J. E.; BEZERRA, M. A.; VIANA, F. M. P.; SOUSA, T. R. M. de; CYSNE, A. Q.; FARIAS, F. C. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. *Summa Phytopathologica*, v. 35, n. 4, p. 262–266, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-54052009000400002>

CARDOZO, F. A.; FACCHINATTO, W. M.; COLNAGO, L. A.; CAMPANA-FILHO, S. P.; PESSOA, A. Bioproduction of N-acetyl-glucosamine from colloidal α -chitin using an enzyme cocktail produced by *Aeromonas caviae* CHZ306. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 8, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2694-x>

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, v. 20, n. 1–2, p. 1–6, 1963. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02054872>

CHEN, J. K.; SHEN, C. R.; LIU, C. L. N-acetylglucosamine: Production and applications. *Marine Drugs*, v. 8, n. 9, p. 2493–2516, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md8092493>

CHEN, L.; LIU, T.; ZHOU, Y.; CHEN, Q.; SHEN, X.; YANG, Q. Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 70, n. 4, p. 932–942, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S1399004713033841>

CHEN, W.; JIANG, X.; YANG, Q. Glycoside hydrolase family 18 chitinases: The known and the unknown. *Biotechnology Advances*, v. 43, n. January, p. 107553, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107553>

CHEN, W.; QU, M.; ZHOU, Y.; YANG, Q. Structural analysis of group II chitinase (ChtII) catalysis completes the puzzle of chitin hydrolysis in insects. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 8, p. 2652–2660, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000119>

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. “Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”. *Analytical Biochemistry*, 162(1): 156-159, 1987.

COLABARDINI, A. C. ; WANG, F. ; DONG, Z. ; PARDESHI, L. ; ROCHA, M. C. ; COSTA, J. F. ; REIS, T. F. ; BROWN, A. ; JABER, Q. Z. ; FRIDMAN, M. ; FILL, T. ; ROKAS, A. ; MALAVAZI, I. ; WONG, K. H. GOLDMAN, G. H. Heterogeneity in the transcriptional response of the human pathogen *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent caspofungin. *Genetics*, v. 220, n. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab183>

DA SILVA ARAÚJO, M.; ALVES RODRIGUES, C.; ANTÔNIO DE OLIVEIRA, M.; GONÇALVES DE JESUS, F. Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *atta* spp. *Canthon virens*. *Journal of Neotropical Agriculture*, v. 02, n. 03, p. 9–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.32404/rean.v2i3.273>

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 6, p. 773–782, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7>

DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*, v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.3660>

DHOLE, N. P.; DAR, M. A.; PANDIT, R. S. Recent advances in the bioprospection and applications of chitinolytic bacteria for valorization of waste chitin. *Archives of Microbiology*, v. 203, n. 5, p. 1953–1969, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02234-5>

DIONISI, M.; OZIER-LAFONTAINE, H.; LAPLACE, D. Control of Amazonian Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae): A Multi-criteria Analysis. *Journal of economic entomology*, v. 114, n. 2, p. 493–504, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/toaa331>

EL KNIDRI, H.; BELAABED, R.; ADDAOU, A.; LAAJEB, A.; LAHSINI, A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 1181–1189, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>

FACCHINATTO, W. M.; DOS SANTOS, D. M.; DE LACERDA BUKZEM, A.; MORAES, T. B.; HABITZREUTER, F.; DE AZEVEDO, E. R.; COLNAGO, L. A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Insight into morphological, physicochemical and spectroscopic properties of β -chitin nanocrystalline structures. *Carbohydrate Polymers*, v. 273, n. August, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118563>

FACCHINATTO, W. M.; SANTOS, D. M. dos; FIAMINGO, A.; BERNARDES-FILHO, R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; AZEVEDO, E. R. de; COLNAGO, L. A. Evaluation of chitosan crystallinity: A high-resolution solid-state NMR spectroscopy approach. *Carbohydrate Polymers*, v. 250, n. June, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116891>

FADEL, F.; ZHAO, Y.; COUSIDO-SIAH, A.; RUIZ, F. X.; MITSCHLER, A.; PODJARNY, A. X-Ray crystal structure of the full length human chitotriosidase (CHIT1) reveals features of its chitin binding domain. [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154190>

FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M. Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions-evidence from CP-MAS ^{13}C -NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 17, n. 2, p. 97–102, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(92\)90101-U](https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90101-U)

GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. The structure of native cellulose. *Biopolymers*, v. 13, n. 10, p. 1975–2001, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bip.1974.360131005>

GEORGELIS, N.; YENNAWAR, N. H.; COSGROVE, D. J. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 37, p. 14830–14835, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1213200109>

GOW, N. A. R.; LATGE, J.; MUNRO, C. A.; GROUP, A. F.; KINGDOM, U.; GROUP, A. F.; KINGDOM, U. *The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function*. v. 5, n. 3, p. 1–38, 2016.

GOW, N. A. R.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol* v. 5, p. 3376-3385, 1985.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, v.11, n.8, p.905-910, 1993

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>

HANAHAN, D. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid". *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580, 1983

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0>

HOU, F.; GONG, Z.; JIA, F.; CUI, W.; SONG, S.; ZHANG, J.; WANG, Y.; WANG, W. Insights into the relationships of modifying methods, structure, functional properties and applications of chitin: A review. *Food Chemistry*, v. 409, n. December 2022, p. 135336, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135336>

HOU, F.; HE, L.; MA, X.; WANG, D.; DING, T.; YE, X. Ultrasonics - Sonochemistry Ultrasound enhanced the binding ability of chitinase onto chitin: From an AFM insight. *Ultrasonics - Sonochemistry*, v. 67, n. January, p. 105117, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105117>

HUANG, Q. S.; XIE, X. L.; LIANG, G.; GONG, F.; WANG, Y.; WEI, X. Q.; WANG, Q.; JI, Z. L.; CHEN, Q. X. The GH18 family of chitinases: Their domain architectures, functions and evolutions. *Glycobiology*, v. 22, n. 1, p. 23–34, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr092>

HUDA-SHAKIRAH, A. R.; MOHAMED NOR, N. M. I.; ZAKARIA, L.; LEONG, Y. H.; MOHD, M. H. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13057-9>

HUGGINS, M. L. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *Journal of the American Chemical Society*, v. 64, n. 11, p. 2716–2718, 1942. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja01263a056>

IQBAL, R. K. Chitinases Potential as Bio-Control. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, v. 14, n. 5, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.14.002629>

JAFARI, H.; DELPORTE, C.; BERNAERTS, K. V.; DE LEENER, G.; LUHMER, M.; NIE, L.; SHAVANDI, A. Development of marine oligosaccharides for potential wound healing biomaterials engineering. *Chemical Engineering Journal Advances*, v. 7, n. January, p. 100113, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.100113>

KABIR, K. E.; SUGIMOTO, H.; TADO, H.; ENDO, K.; YAMANAKA, A.; TANAKA, S.; KOGA, D. Effect of *Bombyx mori* Chitinase against Japanese Pine Sawyer (*Monochamus alternatus*) Adults as a Biopesticide . *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, n. 1, p. 219–229, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.70.219>

KAYA, M.; MUJTABA, M.; EHRLICH, H.; SALABERRIA, A. M.; BARAN, T.; AMEMIYA, C. T.; GALLI, R.; AKYUZ, L.; SARGIN, I.; LABIDI, J. On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*, v. 176, p. 177–186, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.076>

KIDIBULE, P. E.; SANTOS-MORIANO, P.; PLOU, F. J.; FERNÁNDEZ-LOBATO, M. Endo-chitinase Chit33 specificity on different chitinolytic materials allows the production of unexplored chitooligosaccharides with antioxidant activity. *Biotechnology Reports*, v. 27, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00500>

KINGSBURY, J.M. ; HEITMAN, J. ; Calcofluor White Combination Antifungal Treatments for *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. *PLoS ONE*, v. 7, n.7: e39405, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039405>

KNAUL, J. Z.; BUI, V. T.; CREBER, K. A. M.; KASAAI, M. R. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 76, n. 11, p. 1699–1706, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjc-76-11-1699>

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 27, n. 11, p. 887–900, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00078-7)

KROLICKA, M.; HINZ, S. W. A.; KOETSIER, M. J.; JOOSTEN, R.; EGGINK, G.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; BOERIU, C. G. Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a Thermostable Enzyme for Chitin and Chitosan Depolymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 7, p. 1658–1669, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04032>

KUMAR, A.; KUMAR, D.; GEORGE, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 109, p. 263–272, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.024>

KUMAR, M.; DANGAYACH, P.; PAREEK, N. Enhanced glucosamine production through synergistic action of *Aspergillus terreus* chitozymes. *Journal of Cleaner Production*, v. 262, p. 121363, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121363>

GUNAMALAI, L. ; DUANIS-ASSAF, D. ; SHARIR, T. ; MAURER, D. ; FEYGENBERG, O. ; SELA, N. ; ALKAN, N. ; 2023. Comparative characterization of virulent and less virulent *Lasiodiplodia theobromae* isolates. *Mol Plant Microbe Interact*, p. 1-53, 2023.

Disponível em: doi: 10.1094/MPMI-11-22-0234-R

LE, B.; YANG, S. H. Characterization of a chitinase from *Salinivibrio* sp. BAO-1801 as an antifungal activity and a biocatalyst for producing chitobiose. *Journal of Basic Microbiology*, v. 58, n. 10, p. 848–856, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800256>

LE, B.; YANG, S. H. Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 9, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2721-y>

LI, C.; LI, X.; BAI, C.; ZHANG, Y.; WANG, Z. A chitinase with antifungal activity from naked oat (*Avena chinensis*) seeds. n. September, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12713>

LI, D.; ZHANG, J.; WANG, Y.; LIU, X.; MA, E.; SUN, Y.; LI, S.; ZHU, K. Y.; ZHANG, J. Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria*: Molecular characteristics and functional differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 58, p. 46–54, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.004>

LI, F.; YOU, X.; LI, Q.; QIN, D.; WANG, M.; YUAN, S.; CHEN, X.; BI, S. Homogeneous deacetylation and degradation of chitin in NaOH/urea dissolution system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 189, n. August, p. 391–397, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.126>

LIU, F. C.; SU, C. R.; WU, T. Y.; SU, S. G.; YANG, H. L.; LIN, J. H. Y.; WU, T. S. Efficient ¹H-NMR quantitation and investigation of N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and N,N'-diacetylchitobiose (GlcNAc)₂ from chitin. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 9, p. 5828–5843, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms12095828>

LIU, J.; NANGONG, Z.; ZHANG, J.; SONG, P.; TANG, Y.; GAO, Y.; WANG, Q. Expression and characterization of two chitinases with synergistic effect and antifungal activity from *Xenorhabdus nematophila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 7, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2670-5>

LIU, T.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; JIANG, X.; DUAN, Y.; YANG, Q. Structure, catalysis, and inhibition of OfChi-h, the lepidoptera-exclusive insect chitinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 6, p. 2080–2088, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755330>

LIU, T.; GUO, X.; BU, Y.; ZHOU, Y.; DUAN, Y.; YANG, Q. Structural and biochemical insights into an insect gut-specific chitinase with antifungal activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, p. 103326, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103326>

LOOSER, V.; *et al.* Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, p. 1177-1193, 2015

MARION M. BRADFORD. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, v. 72, p.

248–254, 1976.

MANDEL S, M. ; WEBER, J. ; The Production of Cellulases, v.7 n. 2, p. 55-143, 1991.

MAURYA, A. K.; KUMARI, S.; BEHERA, G.; BHADADE, A.; TADEPALLI, K. Rhino sinusitis caused by *Lasiodiplodia theobromae* in a diabetic patient. *Medical Mycology Case Reports*, v. 40, n. November 2022, p. 22–24, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2023.02.002>

MCILVAINE, T. C. a Buffer Solution for Colorimetric Comparison. *Journal of Biological Chemistry*, v. 49, n. 1, p. 183–186, 1921. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)86000-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)86000-8)

MEIYAN LIU, YING GONG, HOUJUN SUN, JIAN ZHANG, LIMING ZHANG, JIAN SUNYONGHUA HAN, JINJIN HUANG, QIAN WU, CHENGLING ZHANG, and zongyun li. Agricultural and Environmental Chemistry Characterization of a novel chitinase from sweet potato and its fungicidal effect against *Ceratocystis fimbriata*. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01813>

MENG, J.; ZHANG, D.; PAN, J.; WANG, X.; ZENG, C.; ZHU, K.; WANG, F.; LIU, J.; LI, G. High-Quality Genome Sequence Resource of *Lasiodiplodia theobromae* JMB122, a Fungal Pathogen Causing Peach Gummosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 35, n. 10, p. 938–940, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-22-0013-A>

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases : a review. p. 1–15, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0005-3>

MICOCCI, K. C.; MOREIRA, A. C.; SANCHEZ, A. D.; PETTINATTI, J. L.; ROCHA, M. C.; DIONIZIO, B. S.; CORREA, K. C. S.; MALAVAZI, I.; WOUTERS, F. C.; BUENO, O. C.; SOUZA, D. H. F. Identification, cloning, and characterization of a novel chitinase from leaf-cutting ant *Atta sexdens*: An enzyme with antifungal and insecticidal activity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1867, n. 1, p. 130249, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130249>

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α -chitin. *Journal of Molecular Biology*, v. 120, n. 2, p. 167–181, 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90063-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90063-3)

MONTEIRO, M. C. *et al.* A new approach to drug discovery: High-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 17, n. 4, p. 542–549, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1087057111433459>

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; COOKE, P.; WOOD, D.; GUEDES, M. I. F. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia*

theobromae: Microscopical features. *Micron*, v. 42, n. 5, p. 419–428, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.12.003>

MUTHUKRISHNAN, S.; MERZENDORFER, H. Chitin Organizing and Modifying Enzymes and Proteins Involved In Remodeling of the Insect Cuticle. [S. l.]: Springer Singapore, 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3>

NAGPURE, A.; CHOUDHARY, B.; GUPTA, R. K. Chitinases: in agriculture and human healthcare. v. 8551, p. 1–18, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.790874>

NUNES, C. S.; PHILIPPS-WIEMANN, P. Chitinases. Elsevier Inc., 2018. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00018-6>

OSORIO-MADRAZO, A.; DAVID, L.; TROMBOTTO, S.; LUCAS, J. M.; PENICHE-COVAS, C.; DOMARD, A. Kinetics study of the solid-state acid hydrolysis of chitosan: Evolution of the crystallinity and macromolecular structure. *Biomacromolecules*, v. 11, n. 5, p. 1376–1386, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm1001685>

OYELEYE, A.; NORMI, Y. M. Chitinase: Diversity, limitations, and trends in Engineering for suitable applications. *Bioscience Reports*, v. 38, n. 4, p. 1–21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20180323>

PAN, Y.; LÜ, P.; WANG, Y.; YIN, L.; MA, H.; MA, G.; CHEN, K.; HE, Y. In silico identification of novel chitinase-like proteins in the silkworm, *Bombyx mori*, genome. *Journal of Insect Science*, v. 12, p. 1–14, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1673/031.012.15001>

PANWAR, P.; CUI, H.; O'DONOGHUE, A. J.; CRAIK, C. S.; SHARMA, V.; BRÖMME, D.; GUIDO, R. V. C. Structural requirements for the collagenase and elastase activity of cathepsin K and its selective inhibition by an exosite inhibitor. *Biochemical Journal*, v. 465, n. 1, p. 163–173, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj20140809>

PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance, v.1354, n.1, p 1-11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nyas.12831>

PETER, S.; LYCZKO, N.; GOPAKUMAR, D.; MARIA, H. J.; NZIHO, A.; THOMAS, S. Chitin and Chitosan Based Composites for Energy and Environmental Applications: A Review. *Waste and Biomass Valorization*, v. 12, n. 9, p. 4777–4804, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01244-6>

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, v. 76, p. 51–167, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3114/sim0021>

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>

PINTEAC, R.; MONTALBAN, X.; COMABELLA, M. Chitinases and chitinase-like proteins as biomarkers in neurologic disorders. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, v. 8, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000921>

PORIA, V.; RANA, A.; KUMARI, A.; GREWAL, J.; PRANAW, K.; SINGH, S. Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. *Biology*, v. 10, n. 12, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology10121319>

POSHINA, D. N.; RAIK, S. V.; POSHIN, A. N.; SKORIK, Y. A. Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. *Polymer Degradation and Stability*, v. 156, p. 269–278, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.09.005>

QUENTIN, M.; EBBELAAR, M.; DERKSEN, J.; MARIANI, C.; VAN DER VALK, H. Description of a cellulose-binding domain and a linker sequence from *Aspergillus* fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 5, p. 658–662, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0937-4>

RAM, A. F. J.; KLIS, F. M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, p. 2253–2256, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.397>

RAMLIA.N.M.; MAHADI, N. M. ; RABU, A. ; MURAD, A. M. A. ; BKAR,F.D.A. ; ILLIAS,R.M . Molecular cloning, expression and biochemical characterisation of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *glaciozyma antarctica* PI12. *Microbial Cell Factories*, 2011.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Research*, v. 2015, p. 1–9, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/791907>

RATTANAKIT, N.; YANO, S.; PLIKOMOL, A.; WAKAYAMA, M.; TACHIKI, T. Purification of *Aspergillus* sp. S1-13 chitinases and their role in saccharification of chitin in mash of solid-state culture with shellfish waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103, n. 6, p. 535–541, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/jbb.103.535>

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion . *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 15, p. 281–285, 1993.

SAHA, S.; SENGUPTA, J.; BANERJEE, D.; KHETAN, A. *Lasiodiplodia theobromae* Keratitis: A Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia*, v. 174, n. 4, p. 335–339, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9546-7>

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: "A laboratory manual. 3^o ed.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

SÁNCHEZ; MENGÍBAR, M.; RIVERA-RODRÍGUEZ, G.; MOERCHBACHER, B.; ACOSTA, N.; HERAS, A. The effect of preparation processes on the physicochemical characteristics and antibacterial activity of chitooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 251–257, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.055>

SANTOS CORREA, K. C.; MOREIRA, A. C.; ABD EL-RAHEEM IBRAHIM, A. G.; RAMOS DE JESUS, H. C.; MICOCCI, K. C.; CRIZÓSTOMO KOCK, F. V.; BUENO, O. C.; VENÂNCIO, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOUZA, D. H. F. Identification and characterization of a recombinant cysteine peptidase (AsCathL) from leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Formicidae). *Protein Expression and Purification*, v. 201, n. September 2022, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106174>

SASSE, C.; MORSCHHÄUSER, J. *Host-Fungus Interactions*. v. 845, p. 3–17, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8>

SCUDILLIO, T.; CAMARGO, R. da S.; MOTA FILHO, T. M. M.; DE MATOS, C. A. O.; ZANUNCIO, J. C.; SABATTINI, J. A.; FORTI, L. C. Contamination and mortality of leaf-cutting ant workers by the quinone inside inhibitor fungicide after social interactions. *Scientific reports*, v. 13, n. 1, p. 6169, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32796-x>

SHARMA, A.; ARYA, S. K.; SINGH, J.; KAPOOR, B.; BHATTI, J. S.; SUTTEE, A.; SINGH, G. Prospects of chitinase in sustainable farming and modern biotechnology : an update on recent progress and challenges. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 00, n. 00, p. 1–31, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2183593>

SINGH, G.; KUMAR, S. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Antifungal and insecticidal potential of chitinases : A credible choice for the eco-friendly farming. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 20, n. August, p. 101289, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101289>

SØRLIE, M.; HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V. G. H. Using chitosan to understand chitinases and the role of processivity in the degradation of recalcitrant polysaccharides. *Reactive and Functional Polymers*, v. 148, n. December 2019, p. 104488, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104488>

SOUZA, C. P.; BURBANO-ROSETO, E. M.; ALMEIDA, B. C.; MARTINS, G. G.; ALBERTINI, L. S.; RIVERA, I. N. G. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 11, p. 2079–2082, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0098-z>

SU, C.; TU, G.; HUANG, S.; YANG, Q.; SHAHZAD, M. F.; LI, F. Genome-wide analysis of chitinase genes and their varied functions in larval moult, pupation and

eclosion in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis*. *Insect Molecular Biology*, v. 25, n. 4, p. 401–412, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imb.12227>

SUBRAMANYAM, B.; DUSTHACKEER, A.; REHMAN, F.; SEKAR, G.; SIVARAMAKRISHNAN, G. N.; KUMAR, V. An alternative sputum processing method using chitin for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 523–526, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0201-5>

SUEN, G. *et al.* The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. *PLoS Genetics*, v. 7, n. 2, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002007>

SWIONTEK BRZEZINSKA, M.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 71–81, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4>

SYNSTAD, B.; GÅSEIDNES, S.; VAN AALTEN, D. M. F.; VRIEND, G.; NIELSEN, J. E.; EIJSINK, V. G. H. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, v. 271, n. 2, p. 253–262, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03923.x>

TERBOJEVICH, M.; CARRARO, C.; COSANI, A.; MARSANO, E. Solution studies of the chitin-lithium chloride-N,N-di-methylacetamide system. *Carbohydrate Research*, v. 180, n. 1, p. 73–86, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80065-X](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80065-X)

TETREAU, G.; CAO, X.; CHEN, Y. R.; MUTHUKRISHNAN, S.; JIANG, H.; BLISSARD, G. W.; KANOST, M. R.; WANG, P. Overview of chitin metabolism enzymes in *Manduca sexta*: Identification, domain organization, phylogenetic analysis and gene expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 62, p. 114–126, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.006>

TJOELKER, I.W. ; GOSTIN, L. ; FREY, S. ; HUNTERS, C.L. ; TRONG, H. L. ; STEINER, H. B. ; GRAY, P.W. Structural and Functional Definition of the Human Chitinase Chitin-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 1, p.514-520, 2000.

UEDA, M. ; SHIOYAMA, T. ; NAKADOI, K. ; CNAKAZAWA, M. ; SAKAMOTO, T. ; IWAMOTO, T. ; SAKAGUCHI, M. Cloning and expression of a chitinase gene from *Eisenia fetida*. *International Journal of Biological macromolecules*, 104, p, 1648-1655, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.140>

VANNELLA, K. M. *et al.* Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes. *Nature Immunology*, v. 17, n. 5, p. 538–544, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.3417>

VERONIQUE ROYER, STEPHANE FRAICHARD, H. B. Regulation During Metamorphosis. *Society*, v. 928, p. 921–928, 2002

VICENT, J.F.V. The Journal of Adhesion. if its tanned it must dry,p 755-769, 2009
Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0021846090321296>.

WASSANO, N. S.; GOLDMAN, G. H.; DAMASIO, A. *Aspergillus fumigatus*. Trends in Microbiology, v. 28, n. 7, p. 594–595, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.013>

WU, Q.; LIU, T.; YANG, Q. Cloning, expression and biocharacterization of OfCht5, the chitinase from the insect *Ostrinia furnacalis*. Insect Science, v. 20, n. 2, p. 147–157, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01512.x>

XU, K.; BUI, M. P. N.; FANG, A.; ABBAS, A. Plasmonic cell nanocoating: a new concept for rapid microbial screening. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 409, n. 27, p. 6305–6314, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0612-3>

YADAV, M.; GOSWAMI, P.; PARITOSH, K.; KUMAR, M.; PAREEK, N.; VIVEKANAND, V. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. Bioresources and Bioprocessing, v. 6, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0243-y>

YANG, X. Q. Structural dissection reveals a general mechanistic principle for group II chitinase (ChtII) inhibition. v. 294, p. 9358–9364, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007812>

YI, H.; WU, L. Q.; BENTLEY, W. E.; GHODSSI, R.; RUBLOFF, G. W.; CULVER, J. N.; PAYNE, G. F. Biofabrication with chitosan. Biomacromolecules, v. 6, n. 6, p. 2881–2894, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm050410l>

ZENG, J. B.; HE, Y. S.; LI, S. L.; WANG, Y. Z. Chitin whiskers: An overview. Biomacromolecules, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm201564a>

ZHANG, H. Bin; LIU, M. Y.; TIAN, Y. J.; HU, X. Q. Comparative Characterization of Chitinases from Silkworm (*Bombyx mori*) and Bollworm (*Helicoverpa armigera*). Cell Biochemistry and Biophysics, v. 61, n. 2, p. 267–275, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9196-2>

ZHANG, X.; YUAN, J.; LI, F.; XIANG, J. Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View and Application. Marine Drugs, v. 19, n. 3, p. 1–23, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MD19030153>

ZHU, Q.; ARAKANE, Y.; BANERJEE, D.; BEEMAN, R. W.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 38, n. 4, p. 452–466, 2008 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.06.010>

ZHU, Q.; ARAKANE, Y.; BEEMAN, R. W.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster*

and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 4, p. 467–477, 2008 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.06.011>

ZHU, Q.; ARAKANE, Y.; BEEMAN, R. W.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 18, p. 6650–6655, 2008 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0800739105>

ZHU, X.; ZHANG, H.; FUKAMIZO, T.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J. Properties of *Manduca sexta* chitinase and its C-terminal deletions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, n. 12, p. 1221–1230, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00070-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00070-4)

ZUHAIKRAH ZAINUDDIN, S.; ABDUL HAMID, K. Chitosan-Based Oral Drug Delivery System for Peptide, Protein and Vaccine Delivery. *Chitin and Chitosan - Physicochemical Properties and Industrial Applications [Working Title]*, n. March, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.95771>

ANEXOS

Alinhamento entre os CAT da C2B3 das formigas cortadeiras

```

sexdens      PRIACYMTSWALYRKGDGKVFPEHLDSNLCTDIIYAFAGLNPETLLIQPFDPWADIENNL 60
acromyr      PRIACYMTSWALYRKGDGKVFPEHLDSNLCTDIIYAFAGLNPETLLIQPFDPWADIENNL 60
cephalotes   PRIACYMTSWALYRKGDGKVFPEHLDSNLCTDIIYAFAGLNPETLLIQPFDPWADIENNL 60
*****.*****

sexdens      YQRVTSIKGSRILLALGGWTDSSGDKYSRLISSGVSRRKFVIATMNFLKKNHFDGLSFEW 120
acromyr      YQRVTSIKGSRILLALGGWTDSSGDKYSRLISSGVSRRKFVIATMNFLKKNHFDGLSFEW 120
cephalotes   YQRVTSIKGSRILLALGGWTDSSGDKYSRLISSGVSRRKFVIATMNFLKKNHFDGLSFEW 120
*****

sexdens      SYFKCWQSDCKKGPDSDKPNFTKLMQELREEFNKQDPPLLLAAALSGYKEVIDKAYEVHE 180
acromyr      SYFKCWQSDCKKGPDSDKPNFTKLMQELREEFNKQDPPLLLAAALSGYKEVIDKAYEVRE 180
cephalotes   SYFKCWQSDCKKGPDSDKPNFTKLMQELREEFNKQDPPLLLAAALSGYKEVIDKAYEVHE 180
*****.*

sexdens      ISQIVDFMSVMTYDYHGWSWESKLAHIAPLFSS-SDSKPYYNVNFTMNYLIGGLGAEKSKL 239
acromyr      ISRVVDFMSVMTYDYHGWSWESKLAHIAPLFGSPSDSKPYYNVNFTMNYLV-GLGAEKSKL 239
cephalotes   ISQIVDFMSVMTYDYHGWSWESKLAHIAPLFGSSSDSKPYYNVNFTMNYLV-GLGAEKSKL 239
**:*:*****.* *****

sexdens      LVGIPLYGQSNRLSTASQADLGDPTTGPGKPGSSLS-PGGWGRIMI FEKRLRHNWKVGIG 298
acromyr      LVGIPLYGQSYRLSTASQADLGDPTTGPGKPGEFTKQPGMLAYYE ICERIKRHNWKVGIG 299
cephalotes   LVGIPLYGQSYRLSTASQADLGDPTTGPGKPGEFTKQPGMLAYYE ICERIKRHNWKVGIG 299
***** . * . * * : *****

sexdens      PSAHFEDEWVGIEDRESVYARGKYITEYGYGGATMWTIDLL 339
acromyr      PSAHFEDEWVGIEDRESVYAKGKYITGNGYGGATMWTIDLD 340
cephalotes   PSAHFEDEWVGIEDRESVYAKGKYITGNGYGGATMWTIDLE 340
*****:*****

```

1: sexdens	100.00	92.90	94.08
2: acromyr	92.90	100.00	98.53
3: cephalotes	94.08	98.53	100.00

Alinhamento entre os CAT da C3 das formigas cortadeiras

```

Acromyr      YKVVCYFTNWAWYRRGIGRYLPEHIDHTLCTHIVYGFAVL DYSEMI IKAHDSWADFNR 60
sexdens      YKVVCYFTNWAWYRRGIGRYLPEHIDHTLCTHIVYGFAVL DYSEMI IKAHDSWADFNR 60
Cephalote    YKVVCYFTNWAWYRRGIGRYLPEHIDHTLCTHIVYGFAVL DYSEMI IKAHDSWADFNR 60
*****

Acromyr      YERVVAYKKRGLK VLLALGGW NDSAGDKYSRLVNSPSARKKFIDHVLQFIQKYD FDGLDM 120
sexdens      YERVVAYKKRGLK VLLALGGW NDSAGDKYSRLVNNPSSRKKFINHTLQFIKKYD FDGLDM 120
Cephalote    YERVVAYKKRGLK VLLALGGW NDSAGDKYSRLVNNPSSRKKFINHTLQFIKKYD FDGLDM 120
*****

Acromyr      DWEYFVVCWQVNCNKGPDSDKESFAALLRELSAEFKPKG LLLSAAVSPSKKVIDKGYDVPS 180
sexdens      DWEYFVVCWQVNCNKGPDSDKESFAALLRELSAEFKPKG LLLSAAVSPSKKVIDKGYDVPS 180
Cephalote    DWEYFVVCWQVNCNKGPDSDKESFAALLRELSAEFKPKG LLLSAAVSPSKKVIDKGYDVPS 180
*****

Acromyr      LAKYLDWIAVMA YDYHG QWDKRTGHVAPLYYHPDDEFY YFNANYSINYWISKGAPPRSIV 240
sexdens      LAKYLDWIAVMA YDYHG QWDKRTGHVAPLYYHPDDEFY YFNANYSINYWISKGAPPRSIV 240
Cephalote    LAKNLDWIAVMA YDYHG QWDKRTGHVAPLYYHPDDEFY YFNANYSINYWISKGAPPRSIV 240
***

Acromyr      MGMPLYGQSFTINDPSSGNGLNSPASAGNAGEFTRAAG FLSYYEICDRI LNRGWTVVQDP 300
sexdens      MGMPLYGQSFTINDPSSGNGLNSPASAGNAGEFTRAAG FLSYYEICDRI LNRGWTVVQDP 300
Cephalote    MGMPLYGQSFTINDPSSGTDLNSPASAGNAGEFTRAAG FLSYYEICDRI LNRGWTVVQDP 300
*****

Acromyr      EGRMGPYAYKGSQWVSFDDSEMI RRKAQFVRDMGLG GGMVWALDLD 346
sexdens      EGRMGPYAYKGSQWVSFDDSEMI RRKAQFVRDMGLG GGMVWALDLD 346
Cephalote    EGRMGPYAYKGSQWVSFDDSEMI RRKAQFVRDMGLG GGMVWALDLD 346
*****

```

1: Acromyr	100.00	98.55	97.69
2: sexdens	98.55	100.00	99.13
3: Cephalote	97.69	99.13	100.00

Alinhamento entre os CAT da C4 das formigas cortadeiras

```

Cephalotes      FKVICYFTNWAAYRQEGGRFVPEDIDPDLCTHVLYGFSILDGSSSLTMKSHDPWADIDNKF 60
Sexdens         FKVICYFTNWAAYRQEGGRFVPEDIDPDLCTHVLYGFSVLDGSSSLTMKSHDPWADIDNKF 60
Acromyr         FKVICYFTNWAAYRQEGGRFVPEDIDPDLCTHVLYGFSVLDGSSSLTMKSHDPWADIDNKF 60
*****:*****:*****

Cephalotes      YDRVAAFKAKGLKVLMLALGGWNDSAGDKYSRLVNSPSARRRFITQLLLFIEKYDFEGLDL 120
Sexdens         YDRVAAFKAKGLKVLMLALGGWNDSAGDKYSRLVNSPSARRRFITQLLLFIEKYDFEGLDL 120
Acromyr         YDRVAAFKAKGLKVLMLALGGWNDSAGDKYSRLVNSPSARRRFITQLLLFIEKYDFEGLDL 120
*****:*****:*****

Cephalotes      DWEYPVCWQVDCNKGPESEDKQSFAELIKELSDEFKPRGLLSAAVSPSKRVIDAGYDVPT 180
Sexdens         DWEYPVCWQVDCNKGPESEDKQSFAELIKELSDEFKPRGLLSAAVSPSKRVIDAGYDVPT 180
Acromyr         DWEYPVCWQVDCNKGPESEDKQSFAELIKELSDEFKPRGLLSAAVSPSKRVIDAGYDVPT 180
*****:*****:*****

Cephalotes      LSKYLDWISIMTYDFHQWQDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANFSIHYWIEKGANPKKLI 240
Sexdens         LSKYLDWISIMTYDFHQWQDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANFSIHYWIEKGANPKKLI 240
Acromyr         LSKYLDWISIMTYDFHQWQDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANFSIHYWIEKGANPKKLI 240
*****:*****:*****

Cephalotes      MGVPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYYEICERTLKKGWTVIQDK 300
Sexdens         MGVPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYYEICERTLKKGWTVVQDK 300
Acromyr         MGAPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYYEICERTLKKGWTVVQDK 300
**.******:***

Cephalotes      ERRIGPYAYKGDQWVSFDDAQQIKLKAELIKKLGGLGGMIWALDLD 346
Sexdens         ERRIGPYAYKGDQWVSFDDAQQIKLKAELIKKLDLGGMIWALDLD 346
Acromyr         ERRIGPYAYKGDQWVSFDDAQQIKLKAELIKKLGGLGGMIWALDLD 346
*****:*****

```

1: Cephalotes	100.00	98.55	97.98
2: Sexdens	98.55	100.00	98.84
3: Acromyr	97.98	98.84	100.00

Alinhamento entre os CAT da C4 das formigas cortadeiras

```

Cephalotes      KKIVCYYTNWAWRRTSFGSFTPKNIDGTLCTHIVYAFATLEETFLLNIDDSDNVYKSFL 60
Sexdens         KKIVCYYRIGLGRRASFGSFTPENIDGTLCTHIVYAFATLEKETFLLNIDDSDNVYSSFL 60
Acromyr         KKIVCYYTNWAWRRTSFGSFTPENIDGTLCTHIVYAFATLEKETFLLNIDDSDNVYSSFL 60
*****          *:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Cephalotes      NKTAEIKRRNGVKVMLGLGGWNSDEDDKYSRLISSPQSTRKNFTRYVVRVRIIEQYGFFDGLN 120
Sexdens         NKTAEIKRRNGLKVLLGLGGWNSDEDDKYSRLISSPQSTRKNFARYIVKIIEQYGFFDGLN 120
Acromyr         NKTAEIKRRNGLKVLLGLGGWNSDEDDKYSRLISSPQSTRKNFARYIVKIIEQYGFFDGLN 120
*****          *:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Cephalotes      LDWEPVCWQGDCSRGPEEDRENFVEFLKDLSEALTSRGLLLSIVVSANKIVIDRGYTHI 180
Sexdens         LDWEPVCWXGDCSRGPEEDRENFVEFLKDLSEALTSRGLLLSIVVSANKIVIDRGYTHI 180
Acromyr         LDWEPVCWQGDCSRGPEKDRNFVEFLKDLSEALTSRGLLLSIVVSANKIVIDRGYTHI 180
*****          *****:*****:*****:*****:*****:*****

Cephalotes      SLLTRYVNWIGVVAYDYHTMGSETGHVAPLYHHPNDISPFLNANFSVTYWINKGVPAEM 240
Sexdens         SLLTRYVNWIGVVAYDYHTMGSETGHVAPLYHHPDDISPFLNANFSVMYWINKGVPAEM 240
Acromyr         PLLTRYVNWIGVVAYDYHTMGSETGHIAPLYHHPDDISPFLNANFSVTYWINKGVPAEM 240
*****          *****:*****:*****:*****:*****

Cephalotes      IVLGIPTYGSSFTLSEKSLNRP SFHVKADGPGEPGKFTKSAGFLAYHEICDNVKNDGWSV 300
Sexdens         IVLGIPTYGSSFTLSEKSLNRP SFHVKADGPGEPGKFTKSAGFLAYHEICDNVKNDGWSV 300
Acromyr         IVLGIPTYGSSFTLSEKSLNRP GFHVKADGPGEPGKFTKSAGFLAYHEICDNVKNNWSV 300
*****          *****:*****:*****:*****:*****

Cephalotes      TKDSEGRVGPYASKRDQWVS YDDVSNVAKKIYACTLPLYARCL-----N 344
Sexdens         TKDSEGRMGPYASKRNQWVS YDDVSNVAKKAE LIKKLNLG GGMIWSLDLD 350
Acromyr         TKDSEGRVGPYASKRDQWVS YDDVSNVAKKAE LIKKLNLG GGMIWSLDLD 350
*****          *****:*****:*****:*****:*****

```

1: Cephalotes	100.00	90.12	90.99
2: Sexdens	90.12	100.00	95.71
3: Acromyr	90.99	95.71	100.00

Viabilidade do fungo após a ação da quitinase AsChtII-C2B3 após 72 horas de ser plaqueado a 28 graus, temperatura de crescimento do fungo *L. theobromae* .



Viabilidade do fungo após a ação da quitinase AsChtII-C5B1 após 72 horas de ser plaqueado a 28 graus, temperatura de crescimento do fungo. A Placa 1 fungo *L. theobromae* e a placa 2 fungo sob a ação da quitinase AsChtII-C5B1.

