

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

**“Obtenção de uma quitinase mutante recombinante e  
avaliação da sua interferência no crescimento do fungo  
*R. stolonifer*”**

**Larissa Verri Volpe\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientador(a): Dulce Helena Ferreira de Souza**

**\* Bolsista Capes**

**São Carlos – SP  
2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Larissa Verri Volpe, realizada em 22/02/2024.

**Comissão Julgadora:**

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

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Lemma (UNIARA)

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

À minha família por todo incentivo e apoio, em especial minha irmã, Aline, e meu pai, Marcelo.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE) por compartilharem seus ensinamentos e principalmente pelos ótimos momentos que passamos juntos.

À Embrapa Instrumentação, Joana Dias Bresolin, Prof. Dr. Marcos David Ferreira e Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago pela colaboração.

Aos meus amigos Lullie, Kátia, Izabella, Eduarda, Wallace, Philipe e Laiane que estiveram comigo nos bons e nos maus momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de São Carlos.

À Capes pelo auxílio financeiro.

## LISTA DE ABREVIATURAS

*A. echinator: Acromyrmex echinator*

*A. sexdens: Atta sexdens*

BDA: Ágar Batata Dextrose (Amido de batata + Glucose + Ágar)

BMGY: *Buffered Glycerol-complex Medium*

BMMY: *Buffered Methanol-complex Medium*

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxiribonucleic acid*)

DNS: Ácido dinitrosalissílico

dNTP: Desoxinucleosídeos trifosfatos

*E. coli: Escherichia coli*

g: Unidade de força rotocentrífuga (gravidade)

kb: Kilobase

kDa: Quilodalton(s), unidade de massa molecular

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MM: Massa Molecular

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

*P. pastoris: Pichia pastoris*

*R. stolonifer: Rhizopus stolonifer*

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

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

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

YPD: *yeast extract peptone dextrose*

YPDS: *sorbitol yeast extract peptone dextrose sorbitol*

YNB: *Yeast Nitrogen Base*

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. <i>Primers</i> utilizados para amplificar o DNA que codifica a quitinase .....	15
TABELA 4.1. Atividade específica das quitinases.....	38
TABELA 4.2. Atividade antifúngica das quitinases em 24h.....	42
TABELA 4.3. Contagem de esporos do fungo <i>R. stolonifer</i> submetido a diferentes tratamentos em 24h .....	44

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estrutura da quitina .....	1
FIGURA 1.2. Formas cristalinas da quitina.....	2
FIGURA 1.3. Aplicações de quitina e biomateriais derivados de quitina.....	4
FIGURA 1.4. Padrões de clivagem da quitina.....	5
FIGURA 1.5. Quitinases da família GH18: distribuição, classificação, arquitetura de domínio e função.....	7
FIGURA 1.6. Arquitetura de domínios de quitinases de inseto GH18.....	10
FIGURA 1.7. Mecanismo catalítico proposto no texto para quitinases GH18.. .....	11
FIGURA 1.8. Arquitetura de domínio predita para quitinases da formiga cortadeira <i>A. echinator</i> .....	13
FIGURA 4.1. Análise em gel de agarose 1 % do produto de PCR .....	25
FIGURA 4.2. Gel de agarose 1% da reação de análise de restrição do pPICZ $\alpha$ A_AsChtII-C4 .....	26
FIGURA 4.3. Sequência traduzida de aminoácidos da AsChtII-C4B1-1.....	27
FIGURA 4.4. Alinhamento entre as sequencias de AsChtII-C4B1 e AsChtII- C4B1-1 .....	28
FIGURA 4.5. Arquitetura do domínio para a quitinase do grupo II de <i>Atta sexdense</i> . AsChtII-C4B1-1 .....	29
FIGURA 4.6. Vetor pPICZ $\alpha$ A .....	30
FIGURA 4.7. FIGURA 4.7. Alinhamento entre o <i>primer reverse</i> utilizado e a região final do pPICZ $\alpha$ A.....	31
FIGURA 4.8. Gel de agarose 1% do produto de PCR através de DNA gnômico de <i>P. pastoris</i> .....	32
FIGURA 4.9. Análise em SDS-PAGE 12% e <i>Immunblotting</i> da proteína expressa .....	33

FIGURA 4.10. Atividade relativa da enzima em função do pH após reação com $\alpha$ -quitina coloidal pelo método DNS. ....	34
FIGURA 4.11. Atividade relativa da enzima em função da temperatura após reação com $\alpha$ -quitina coloidal pelo método DNS .....	35
FIGURA 4.12. Atividade relativa da enzima AsChtII-C4B1-1 (a) em função de sua estabilidade em 4°C, 28°C e 60°C e (b) AsChtII-C4B1 em diferentes temperaturas após reação com $\alpha$ -quitina coloidal pelo método DNS.....	36
FIGURA 4.13. Fungo <i>Rhizopus stolonifer</i> e ensaios de atividade antifúngica em placa contendo meio BDA .....	39
FIGURA 4.14. Medição do crescimento micelial do fungo <i>R. stolonifer</i> submetido a diferentes tratamentos.....	40
FIGURA 4.15. Modelo 3D do domínio catalítico da enzima AsChtII-C4B1-1 construído baseado na estrutura de uma quitinase de <i>O. furnicalis</i> .....	43
FIGURA 4.16. Estruturas dos aminoácidos serina <b>(a)</b> e asparagina <b>(b)</b> .....	44
FIGURA 4.17. Modelo 3D da enzima AsChtII-C4B1-1 construído baseado na estrutura de uma quitotriosidase humana.....	45

## RESUMO

OBTENÇÃO DE UMA QUITINASE MUTANTE RECOMBINANTE E AVALIAÇÃO DA SUA INTERFERÊNCIA NO CRESCIMENTO DO FUNGO *R. STOLONIFER*. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza e sua estrutura é formada por unidades de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina unidas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Diferentes organismos possuem quitina como crustáceos, insetos e fungos. As enzimas que hidrolisam quitina, chamadas de quitinases, pertencem à classe das glicosil hidrolases e são produzidas por diversos organismos. Aplicações biotecnológicas de quitinases incluem biocontrole de fungos e insetos. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de uma quitinase recombinante da formiga cortadeira *Atta sexdens* (AsChtII-C4B1-1) e avaliação de sua interferência no crescimento do fungo *Rhizopus stolonifer*. A AsChtII-C4B1-1 apresenta 99,8% de identidade com a enzima AsChtII-C4B1, podendo ser consideradas, portanto, isoformas. Ambas as enzimas apresentam um domínio catalítico para quitinase em um domínio de ligação à quitina (CBM). AsChtII-C4B1-1 apresenta maior atividade em pH 6,0 e a 60°C. Frente ao substrato quitina coloidal a enzima AsChtII-C4B1 apresenta maior atividade, sendo necessários 15,8% menos AsChtII-C4B1 para liberar 1 $\mu$ mol de *N*-Ac do que AsChtII-C4B1-1. As duas enzimas foram capazes de interferir no crescimento de *R. stolonifer*, importante fungo na agricultura. AsChtII-C4B1 e AsChtII-C4B1-1 reduziram em 57% e 53% o crescimento, respectivamente. Modelo 3D da enzima AsChtII-C4B1-1 sugere que as diferenças sequenciais entre as enzimas podem estar relacionadas aos diferentes valores de pH e temperatura ótimos encontrados e também na diferença na atividade biológica.

Palavras-chave: quitinase de insetos; interferência no crescimento; quitina; quitinase mutante.

## ABSTRACT

OBTAINING A RECOMBINANT MUTANT CHITINASE AND EVALUATING ITS INTERFERENCE ON THE GROWTH OF THE FUNGUS *R. STOLONIFER*. Chitin is the second most abundant biopolymer in nature and its structure is formed by *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine units linked through  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds. Different organisms have chitin such as crustaceans, insects and fungi. The enzymes that hydrolyze chitin, called chitinases, belong to the class of glycosyl hydrolases and are produced by several organisms. Biotechnological applications of chitinases include biocontrol of fungi and insects. The objective of this work was to obtain a recombinant chitinase from the leaf-cutter ant *Atta sexdens* (AsChtII-C4B1-1) and evaluate its interference with the growth of the fungus *Rhizopus stolonifer*. AsChtII-C4B1-1 shows 99.8% identity with the AsChtII-C4B1 enzyme and can therefore be considered isoforms. Both enzymes present a catalytic domain for chitinase in a chitin-binding domain (CBM). AsChtII-C4B1-1 shows greater activity at pH 6.0 and 60°C. Against the colloidal chitin substrate, the AsChtII-C4B1 enzyme shows greater activity, requiring 15.8% less AsChtII-C4B1 to release 1  $\mu$ mol of *N*-Ac than AsChtII-C4B1-1. The two enzymes were able to interfere with the growth of *R. stolonifer*, an important fungus in agriculture. AsChtII-C4B1 and AsChtII-C4B1-1 reduced 57% and 53% growth, respectively. The 3D Model of the AsChtII-C4B1-1 enzyme suggests that the sequential differences between the enzymes may be related to the different optimal pH and temperature values found and also to the difference in biological activity.

Keywords: insect chitinase; interference with growth; chitin; mutant chitinase.

## Sumário

1. Introdução .....	1
1.1. Quitina .....	1
1.2. Quitinases .....	4
1.3. Glicosil hidrolases e quitinases de formigas .....	6
1.4. Aplicações de quitinases: quitinases recombinantes da formiga cortadeira <i>Atta sexdens</i> (saúva) .....	12
2. Objetivos .....	14
3. Metodologia .....	15
3.1. Amplificação da sequência que codifica a quitinase AsChtII-C4 .....	15
3.2. Clonagem do DNA no vetor pPICZ $\alpha$ A .....	16
3.3. Sequenciamento do clone pPICZ $\alpha$ A_AsChtII-C4B1-1.....	17
3.4. Transformação na linhagem KM71H (Mut <sup>S</sup> ) de <i>Pichia pastoris</i> .....	17
3.5. Expressão da proteína recombinante .....	19
3.6. Purificação da quitinase .....	20
3.7. Identificação da proteína por <i>Immunoblotting</i> .....	21
3.8. Caracterização da atividade enzimática .....	22
3.9. Estabilidade térmica da enzima .....	23
3.10. Ensaio para verificar a interferência das enzimas fungo <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	23
4. Resultados e Discussões .....	25
4.1. Amplificação e clonagem do DNA.....	25
4.2. Análise da sequência do clone .....	26

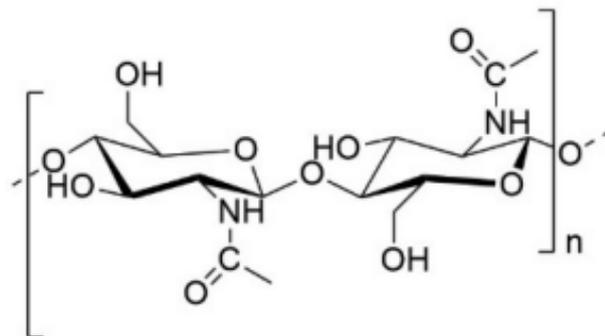
4.3. Obtenção da quitinase recombinante .....	31
4.4. Análise da interferência do pH e temperatura na atividade da enzima .....	34
4.5. Análise da estabilidade térmica .....	36
4.6. Análise da interferência das quitinases no crescimento do fungo.....	38
4.7. Modelagem molecular por homologia.....	42
5. Conclusões e perspectivas futuras .....	47
Referências Bibliográficas.....	48
ANEXOS .....	52

## 1. Introdução

### 1.1. Quitina

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, após a celulose e sua estrutura (Figura 1.1) é formada por unidades de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (VAGHELA *et al.*, 2022).

FIGURA 1.1. Estrutura da quitina.



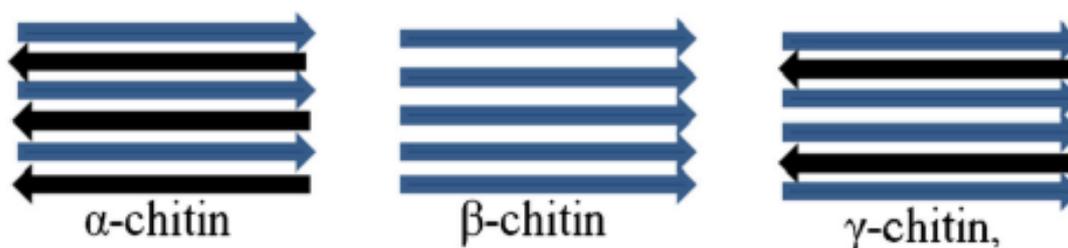
Fonte: SHAMSHINA *et al.*, 2019.

Diferentes organismos possuem quitina em sua composição estrutural, estando presente na parede celular de fungos, cartilagens de moluscos, membrana peritrófica de insetos e exoesqueleto de artrópodes (JIRAN *et al.*, 2023; VAGHELA *et al.*, 2022; ZARGAR, ASGHARI e DASHTI, 2015; TSURKAN *et al.*, 2021). Crustáceos como camarões e caranguejos são a principal fonte comercial da quitina devido ao alto percentual em seus exoesqueletos (HOSSIN *et al.*, 2021).

A quitina é um polímero polimórfico, podendo existir em três formas cristalinas distintas sendo elas:  $\alpha$ -quitina,  $\beta$ -quitina e  $\gamma$ -quitina (Figura 1.2) (ZARGAR, ASGHARI e DASHTI, 2015). As formas polimórficas da quitina se diferem principalmente em seu arranjo, o que acarreta em algumas diferenças em suas propriedades físicas e químicas (TSURKAN *et al.*, 2021). A  $\alpha$ -quitina é a forma mais abundante encontrada, obtida principalmente das cascas de camarão

caranguejo. Trata-se também, da forma cristalina mais estável devido as interações entre as cadeias do polímero que interagem entre si no arranjo antiparalelo. A  $\beta$ -quitina é menos abundante e menos estável que a  $\alpha$ -quitina, e isto se deve ao seu arranjo paralelo que faz com que as interações intermoleculares sejam mais fracas. Essa forma de quitina é obtida principalmente de moluscos, currais de lulas e espinhos de diatomáceas (FILHO *et al.*, 2020; HAHN *et al.*, 2020; HOSSIN *et al.*, 2021; KHOUSHAB e YAMABHAI, 2015). Já a  $\gamma$ -quitina consiste em uma mistura de arranjos paralelos e antiparalelos do polímero, ocorrendo durante a metamorfose do organismo, e combina as propriedades de ambas as formas ( $\alpha$  e  $\beta$ -quitina) (HAHN *et al.*, 2020; TSURKAN *et al.*, 2021).

FIGURA 1.2. Formas cristalinas da quitina.



Fonte: HOSSIN *et al.*, 2021.

A quitina é insolúvel em água e na maioria dos solventes (orgânicos e inorgânicos) devido às ligações de hidrogênio entre suas cadeias. Existem exceções entre os solventes que conseguem quebrar as ligações de hidrogênio da estrutura da quitina, contudo, a maioria não é degradável, o que leva a busca por novos solventes ecologicamente corretos para a obtenção da quitina (HOSSIN *et al.*, 2021).

A extração da quitina do organismo é feita através de tratamentos utilizados para remover proteínas e minerais, visto que as maiores fontes desse polímero são camarões e caranguejos. Comumente é extraída por métodos físicos, químicos, biológicos simples ou combinados, para auxiliar na extração. Os métodos químicos são os mais utilizados em indústrias por serem eficazes e

econômicos, entretanto, apresenta impactos negativos ao meio ambiente devido ao alto consumo de ácidos e bases (JIRAN *et al.*, 2023). Outras técnicas podem ser utilizadas para extrair quitina, como por exemplo, ultrassom e micro-ondas, campo elétrico pulsado, assistida por enzimas e entre outros (MUTHU *et al.*, 2021). Visando alternativas para minimizar o impacto ambiental, técnicas de extração verde e métodos biológicos, como a hidrólise enzimática, tem sido explorado. O tratamento com solventes tem sido pesquisado buscando maiores rendimentos na extração de quitina (JIRAN *et al.*, 2023; MUTHU *et al.*, 2021).

É estimada a produção de 10 bilhões de toneladas de quitina por ano (MUTHU *et al.*, 2021). Em setores que trabalham com frutos do mar, esse polímero é o principal subproduto e é descartado em aterros sanitários e costas oceânicas como resíduo (MUSHI, 2021). A quitina possui uma extensa biodisponibilidade e características notáveis devido à sua biodegradabilidade, bioabsorvibilidade, biocompatibilidade, propriedades antibacterianas e capacidade cicatrizante. Essas características conferem à quitina amplas aplicações no campo biomédico (KHOUSHAB e YAMABHAI, 2015) porém, o fato de ser insolúvel na maioria dos solventes limita sua aplicação (FILHO *et al.*, 2020). Biomateriais derivados desse polímero mostram melhorias em suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, aumento na resistência química e mecânica (HAHN *et al.*, 2020; JIRAN *et al.*, 2023). A quitosana, polímero desacetilado de quitina, é o principal derivado solúvel da quitina e amplia a sua aplicação (HAHN *et al.*, 2020).

Na indústria, a quitina e os biomateriais derivados dela tem seu uso amplamente difundido em diferentes campos. Está presente no desenvolvimento de alimentos funcionais (auxiliando na regulação gastrointestinal e perda de peso) e atuando como anticancerígeno. Pode ser empregado em materiais biomédicos biodegradáveis, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas, e também, como ferramenta de diagnóstico de doenças. Tem sido descrito também, o uso de quitina e seus biomateriais na área ambiental devido às suas

propriedades de adsorção, bem como, aplicação em energia verde (JIRAN *et al.*, 2023). A Figura 1.3 ilustra a aplicações de quitina e derivados de quitina.

FIGURA 1.3. Aplicações de quitina e biomateriais derivados de quitina.

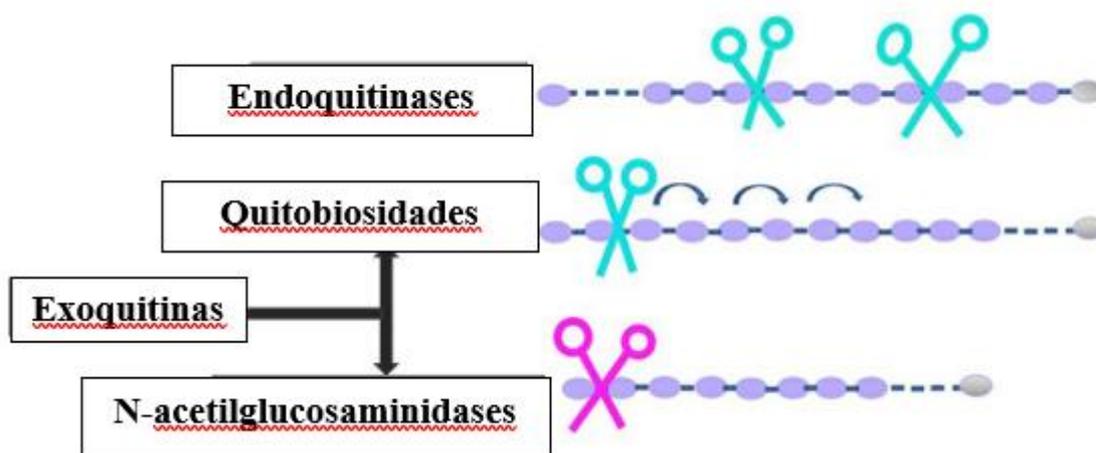


Fonte: adaptada de JIRAN *et al.*, 2023

## 1.2. Quitinases

As quitinases (EC 3.2.1.14), são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 do polímero da quitina (VAGHELA *et al.*, 2022). Essas enzimas podem ser divididas em endoquitinases (EC 2.2.1.14) e exoquitinases (EC 3.2.1.52) dependendo do seu mecanismo catalítico, conforme mostra a Figura 1.4. Endoquitinases hidrolisam aleatoriamente a quitina ao longo de sua cadeia polimérica, produzindo produtos mistos (oligômeros) solúveis de *N*-acetilglucosamina (LE e YANG, 2019; XUAN *et al.*, 2024). Já as exoquitinases são divididas em dois subgrupos: quitobiosidases e *N*-acetilglucosaminidases. As quitobiosidases atuam na extremidade não redutora da quitina liberando diacetilquitobiose e *N*-acetilglucosaminidases geram monômeros de  $\beta$ -1, 4-*N*-acetilglucosamina (HAMID *et al.*, 2013; LE e YANG, 2019).

FIGURA 1.4. Padrões de clivagem da quitina por quitinasas.



Fonte: DUKARIYA e KUMAR, 2020.

Diversos seres vivos produzem quitinasas incluindo bactérias, fungos, vírus, insetos, plantas e animais como artrópodes e mamíferos. As quitinasas estão envolvidas na digestão, defesa imunológica e patogenicidade (ARAKANE e MUTHUKRISHINAN, 2010). Nos microrganismos, por exemplo, a hidrólise da quitina, através da ação de quitinasas, não apenas serve para obter nutrientes na forma de carbono e nitrogênio, mas também desempenha o papel de possibilitar o parasitismo em fungos ou ovos de nematóides (LE e YANG, 2019). Em plantas, quitinasas e quitooligossacarídeos atuam em seu desenvolvimento como morfogênio ou reguladores. Em insetos, as quitinasas podem auxiliar na digestão em dietas a base de alimentos com quitina e na defesa imunológica (ARAKANE e MUTHUKRISHINAN, 2010; CHEN *et al.*, 2020).

Os quito-oligossacarídeos obtidos da hidrólise de quitina também possuem diversas propriedades interessantes como por exemplo antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumorais, inibidores da enzima que converte angiotensina I e interferem até na capacidade do organismo em absorver ferro e cálcio (PORIA *et al.*, 2021). A *N*-acetilglucosamina, produto final da hidrólise de quitina, tem sido objeto de interesse destacado no contexto do tratamento da osteoartrite (HAMID *et al.*, 2013).

Além da função nos seres vivos, as quitinases também possuem aplicações industriais e biológicas. Levando em consideração a alta formação de resíduos quitinosos, o uso de enzimas capazes de hidrolisar a quitina, se faz uma alternativa promissora para a gestão de resíduos e geração de produtos (PORIA *et al.*, 2021). Porém, o uso de quitinases se destaca especialmente no biocontrole de patógenos, oferecendo uma alternativa mais segura aos produtos químicos sintéticos prejudiciais ao meio ambiente e seres vivos (HAMID *et al.*, 2013; VAGHELA *et al.*, 2022).

### **1.3. Glicosil hidrolases e quitinases de formigas**

As quitinases são glicosil hidrolases que ocorrem principalmente nas famílias GH18 e GH19, mas sua atividade também é atribuída em GH23 e GH48 de acordo com o banco de dados de enzimas ativas em carboidratos (CAZy) (CHEN *et al.*, 2020). Essas enzimas variam de tamanhos entre 20 kDa a cerca de 90 kDa (HAMID *et al.*, 2013).

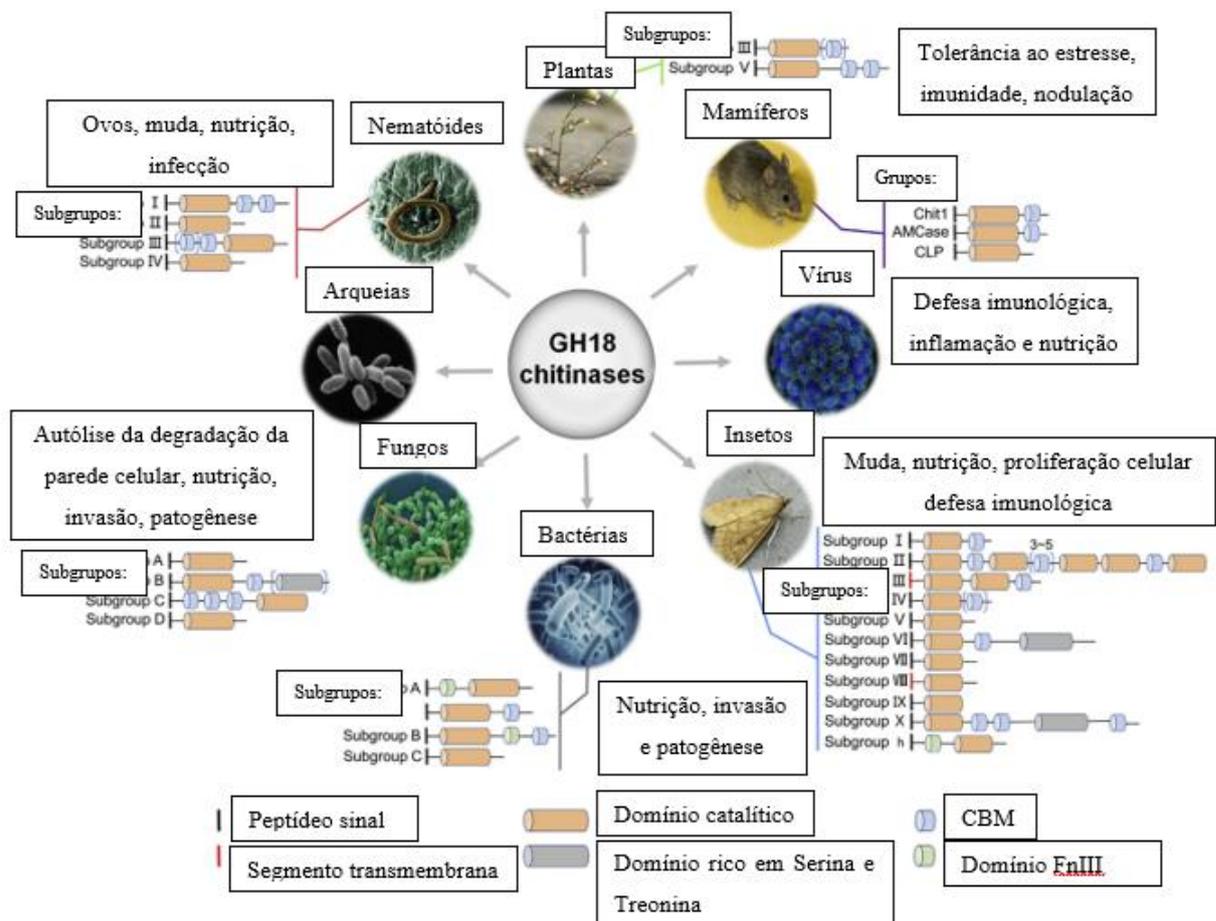
As quitinases pertencentes às famílias GH18 e GH19 são expressas por diferentes organismos, como fungos, insetos e bactérias, mas também por aqueles que não produzem quitina, como plantas e mamíferos (CHEN *et al.*, 2020; RAFIEI *et al.*, 2021). As quitinases têm participação em diversas funções nos seres vivos, incluindo a degradação de tecidos, regulação do desenvolvimento, patogenicidade e defesa imunológica. Apesar de a principal função das quitinases GH18 ser a quebra da quitina endógena em organismos que a possuem, muitos microrganismos produzem quitinases GH18 para utilizar a quitina como fonte de nutrição (CHEN *et al.*, 2020) (Figura 1.5).

A maioria das quitinases de insetos pertence à família das GH18 (FUKAMIZO e KRAMER, 1985)

Muitas quitinases são compostas por módulos proteicos, que, além do domínio catalítico, incluem domínios auxiliares como o CBM (módulo de ligação a carboidratos, *Carbohydrate-binding module*), que facilita a atividade da

enzima favorecendo a ancoragem ao substrato, rompendo a estrutura cristalina deste e favorecendo a hidrólise (ADRANGI e FARAMARZI, 2013). Acredita-se que a presença do domínio CBM intensifique a afinidade da enzima pelo substrato, o que resulta em uma maior eficácia na hidrólise da quitina do que nos quitina-oligossacarídeos. Esses módulos são amplamente distribuídos, podendo ser identificados em proteínas da matriz peritrófica intestinal de insetos (MERZENDORFER, 2013).

FIGURA 1.5. Quitinasas da família GH18: distribuição, classificação, arquitetura de domínio e função.



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2020.

Em quitinasas pertencentes à família GH18, o domínio catalítico tem como marca estrutural um enovelamento na forma de um barril  $(\alpha/\beta)_8$  TIM (triose-phosphate isomerase) e a presença de 4 motivos sequenciais altamente

conservados: KXXXXXXGGW na cadeia  $\beta$ -3, FDGXDL $\underline{W}$ EYYP em  $\beta$ -4, MXYDXXG em  $\beta$ -6 e GXXXWXXDXDD em  $\beta$ -8, onde X é um aminoácido não específico (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN, 2010; MERZENDORFER, 2013). A presença do glutamato no segundo motivo conservado, FDGXDL $\underline{W}$ EYYP, é descrito como importante para a clivagem da ligação glicosídica, atuando como o doador de prótons necessário para a reação (CHEN et al., 2018). A substituição do resíduo glutamato por ácido aspártico mostrou a perda da atividade da enzima sobre o substrato (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN, 2010). Acredita-se também que determinadas partes protuberantes do barril TIM formem uma fenda extensa e estreita no qual se liga o substrato, permitindo assim, a união de pelo menos cinco unidades de açúcar (MERZENDORFER, 2013).

Os domínios catalíticos e os domínios de ligação ao substrato podem ser conectados por regiões ricas em serina e treonina. Essa região, também chamada de *linker*, tem como função ser um sítio para glicosilação, o que aumenta a estabilidade da enzima contra proteases (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN, 2010; MERZENDORFER, 2013).

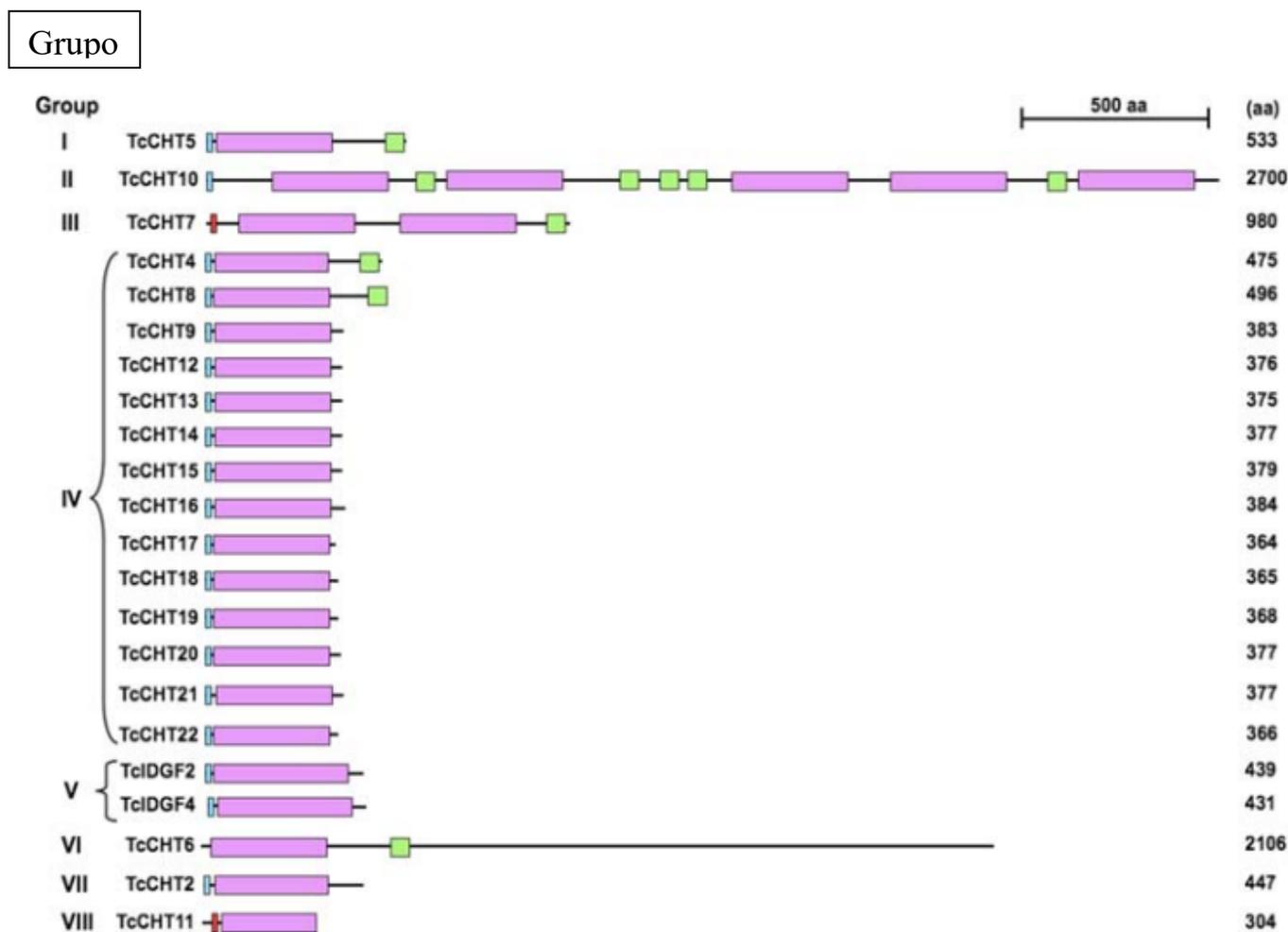
A maioria dos organismos possui genomas que codificam múltiplas quitinases GH18 (CHEN et al., 2020). Baseado na arquitetura de domínios, as quitinases GH18 de insetos têm sido classificadas em oito grupos distintos denominados I-VIII, conforme mostra a Figura 1.6 (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010).

As quitinases do Grupo I são caracterizadas na maioria dos insetos pela presença de um domínio catalítico N-terminal conectada ao domínio CBM pela região rica em serina e treonina (CHEN *et al.*, 2020). As quitinases do Grupo II possuem a maior quantidade de domínios catalíticos e domínios de ligação à quitina desta família, com cerca de 4–5 domínios catalíticos e 4–7 domínios de ligação à quitina (CHEN *et al.*, 2018). As enzimas do grupo III são formadas por um segmento transmembrana em N-terminal, por domínios catalíticos com grande

similaridade e a presença de um único domínio CBM (CHEN *et al.*, 2020). Já as quitinases do Grupo IV são o maior grupo, possuem um peptídeo sinal e um único domínio catalítico, podendo ou não ter um domínio CBM. O Grupo V possui quitinases com a presença de um único domínio catalítico, peptídeo sinal e ausência de CBM. As enzimas do Grupo VI são maiores que as do grupo I, porém com semelhanças. Diferem-se pela presença de um longo trecho em C-terminal que contem cerca de 1000-2500 aminoácidos e se assemelham pela presença de um peptídeo sinal, um único domínio catalítico em N-terminal e um CBM (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN, 2010). As quitinases do Grupo VII apresentam somente um domínio catalítico e um peptídeo sinal e enzimas do Grupo VIII, um segmento transmembrana e um domínio catalítico. Ambos os grupos não possuem CBM (CHEN *et al.*, 2020).

Em insetos, a quitina é encontrada nas cutículas do exoesqueleto, matriz peritrófica do intestino médio e matrizes extracelulares. Sendo assim, muitas quitinases GH18 são codificadas nos genomas dos insetos, tendo como principal objetivo promover a degradação e remodelação da quitina durante o processo de muda e renovação da matriz celular que contém quitina (CHEN *et al.*, 2020; MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003), processos diretamente relacionados ao crescimento e desenvolvimento do inseto. Como estas enzimas possuem papel significativo no metabolismo dos insetos, são expressas de maneira diferenciada em vários estágios da metamorfose. Diferentes genes relacionados a essas enzimas foram identificadas, incluindo a possibilidade de *splicing* alternativo na codificação de quitinases distintas (RATHORE e GUPTA, 2015).

FIGURA 1.6. Arquitetura de domínios de quitinases de inseto GH18. Caixa azul, peptídeo sinal; caixa rosa, domínio catalítico; caixa verde, domínio de ligação de quitina, CBM; caixa vermelha, região transmembrana; linha, região de *linker*.

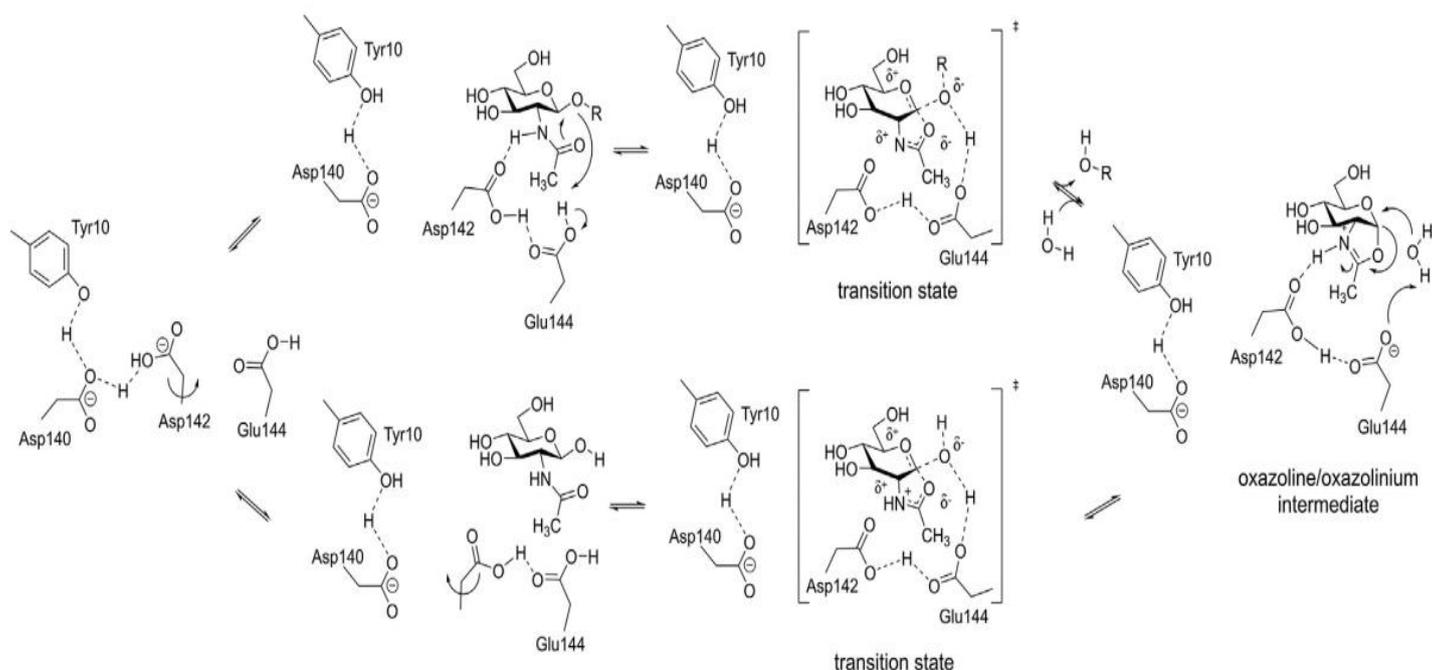


Fonte: ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010.

As quitinases produzidas por insetos são multigênicas quando comparadas com outros organismos (CHEN *et al.*, 2020). Entretanto, apesar das quitinases serem estudadas e caracterizadas desde a década de 1970, a primeira clonagem bem sucedida aconteceu após 2 décadas (ARAKANE e MUTHUKRISHNAN, 2010). As quitinases mais estudadas são as de fungos, plantas e bactérias, o que faz com que existam poucas informações sobre as estruturas das quitinases de insetos (SINGH e KUMAR, 2019).

A reação teórica entre uma quitinase bacteriana smchib do modelo *Serratia marcescens* relatada por AALTEN *et al.*, (2016), conforme citado por CHEN *et al.* (2020) é apresentada na Figura 1.7. Os aminoácidos aspárticos (asp 140 e 142) e glutâmico (glu 144) são conservados na maioria das quitinases da família GH18 durante estágios da catálise. Durante o enovelamento da proteína, a tirosina 10 e o aspártico 140 interagem entre si. O aspártico 142 e o glutâmico 144 também interagem entre si e com um monômero de *N-Ac*. O glutamato passa a interagir com o oxigênio do carbono 1 e doa o próton necessário para a clivagem da ligação glicosídica. Deste modo, no estado de transição, ocorre a deformação da cadeia e a ligação entre o carbono 1 e o oxigênio é enfraquecida levando a perda do monômero de *N-Ac*. O intermediário do íon oxazolinio é hidrolisado, levando a protonação do glutâmico novamente, e assim, a reação se repete (AALTEN *et al.*, (2016; CHEN *et al.*, 2020).

FIGURA 1.7. Mecanismo catalítico proposto.



Fonte: AALTEN *et al.* 2016 apud CHEN *et al.*, 2020.

#### 1.4. Aplicações de quitinases: quitinases recombinantes da formiga cortadeira *Atta sexdens* (saúva)

As quitinases apresentam diferentes funções entre os seres vivos que as produzem, que vão desde remodelação e degradação de quitina em estágios de desenvolvimento, uso da mesma como fonte de nutrição, e também, como mecanismo de defesa contra patógenos invasores contendo quitina (CHEN *et al.*, 2020). Além disso, desempenha importantes aplicações biológicas e industriais, como uma alternativa promissora na gestão de resíduos quitinosos, por exemplo (PORIA *et al.*, 2021). Entretanto, seu potencial tem sido destacado principalmente no biocontrole de patógenos (VAGHELA *et al.*, 2022).

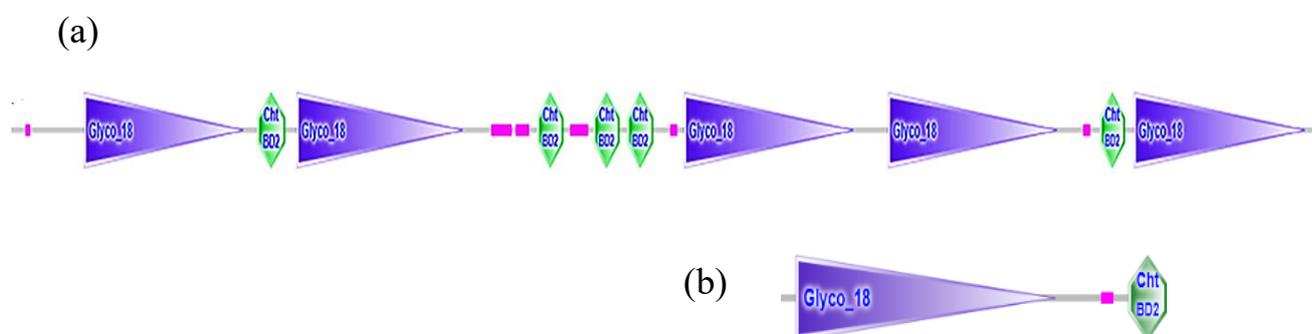
Um estudo realizado por Mahmood *et al.* (2020) com uma quitinase de *Xenorhabdus nematophilus* apresentou atividade larvicida, dificultando o desenvolvimento e crescimento de larvas de *Helicoverpa armigera*. Uma quitinase de *Ostrinia furnacalis* pertencente ao grupo IV apresentou atividade fungicida sobre patógenos que acometem trigo, arroz, milho e soja (CHEN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). Uma quitinase isolada de *Bombyx mori* demonstrou atividade contra o inseto *Monochamus alternatus* que se alimenta de pinheiros (KABIR *et al.*, 2006).

Pesquisas envolvendo a obtenção de quitinases recombinantes de *Atta sexdens* (formigas cortadeiras, formiga saúva) têm sido desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE) do Departamento de Química da UFSCar. As enzimas têm sido expressas em sistema eucarioto, em *Pichia pastoris* e têm sido avaliadas quanto à sua interferência no crescimento de fungos e atividade larvicida (MICOCCI *et al.*, 2023; CORREA, 2023). Uma vez que o genoma da *A. sexdens* não é conhecido para obter as proteínas recombinantes, oligonucleotídeos *sense* e *reverse* foram desenhados baseados em uma sequência de nucleotídeos depositada no *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sob o número XP\_011065639, que prediz uma quitinase do grupo II das GH18 (Figura 1.7A) da formiga cortadeira

*Acromyrmex echinator*. A partir da sequência XP\_011065639 diferentes construções foram desenvolvidas, obtendo-se módulos proteicos diferentes como descrito na literatura (CORREA, 2023).

Uma destas construções permitiu a expressão da enzima denominada AsChtII-C4B1, constituída por um domínio catalítico e um CBM (Figura 1.7B) que apresentou atividade larvicida em cultura de *Spodoptera frugiperda* e atividade fungicida em cultura de *Aspergillus fumigatus*, fungo patogênico humano (MICOCCI *et al.*, 2023). Recentemente, AsChtII-C4B1 mostrou interferência no crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, com redução de aproximadamente 61% de seu micélio. A quitinase recombinante também foi avaliada sobre dois substratos coloidais ( $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina), e observou-se maior atividade da enzima frente a  $\alpha$ -quitina (CORREA *et al.*, 2024). Estes resultados levaram ao questionamento do papel do domínio de ligação à quitina (CBM) nas atividades biológicas da AsChtII-C4B1 e, assim, a expressão da cadeia polipeptídica sem a presença do CBM pode dar informações interessantes sobre o papel do CBM.

FIGURA 1.8. Arquitetura da quitinase predita formiga cortadeira *A. echinator*, (a) e a cadeia polipeptídica da AsChtII-C4B1 (b). Em azul: domínio catalítico; Em verde: domínio de ligação ao substrato (CBM), Linha cinza: região rica em serina e treonina (região de *linker*).



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

## 2. Objetivos

O objetivo deste projeto é a avaliar a função do CBM na atividade biológica da enzima AsChtII-C4B1. Para atingir este objetivo *primer reverse* será desenhado de modo a permitir a expressão de uma cadeia contendo somente o domínio catalítico 4 (e a enzima será chamada AsChtII-C4), e a enzima será estudada quanto às suas propriedades físico-químicas e interferência no crescimento do fungo estudado.

Objetivos específicos:

- Amplificação do DNA que codifica a síntese da quitinase AsChtII-C4;
- Clonagem do DNA no vetor pPICZ $\alpha$ A
- Expressão em sistema de *P. pastoris*;
- Purificação da proteína;
- Caracterização da sua atividade enzimática frente a  $\alpha$ -quitina coloidal e comparação com AsChtII-C4B1;
- Ensaios para avaliar sua interferência no crescimento do fungo *Rhizopus stolonifer* e comparação com AsChtII-C4B1.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Amplificação da sequência que codifica a quitinase AsChtII-C4

O DNA da AsChtII-C4B1-1 foi amplificado utilizando como molécula molde o clone pPICZ $\alpha$ A\_ AsChtII-C4B1 na reação de polimerização em cadeia (PCR). *Primers* utilizados (Tabela 3.1) foram previamente desenhados com a base no genoma da formiga cortadeira *Acromyrmex echinator* (XP\_011065639) depositada no banco de dados *National Center for Biotechnology information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), tendo em vista que o genoma da formiga *Atta sexdens* ainda não foi sequenciado.

TABELA 3.1. *Primers* utilizados para amplificar o DNA que codifica a quitinase.

<b><i>Primer Forward</i></b>	CAGGACTCGAGAAAAGAGAGTTTAAAGTCATCTG ( <i>Xho I</i> )
<b><i>Primer Reverse</i></b>	TCTAGAATTGGAGGTAGTGGGCTGGCTTC ( <i>Xba I</i> )

Programa de amplificação utilizado: 1 ciclo de 1min à 98°C seguido por 30 ciclos de 98°C por 15s, 70°C por 45s, 72°C por 2 min para anelamento e 1 ciclo de 72°C por 10min (Micocci *et al.*, 2023).

Para amplificação do DNA de interesse foram feitas reações contendo 0,25 $\mu$ L Phusion™ High Fidelity DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific), 5  $\mu$ l de Phusion Buffer 10X, 0,5 $\mu$ L de dNTPs (10  $\mu$ M), 1 $\mu$ L de cada *primer*, 1  $\mu$ L do DNA molde e água ultrapura, totalizando um volume final de reação de 25  $\mu$ L.

O produto obtido no PCR foi analisado em gel de agarose 1 % contendo 0,025  $\mu$ g/mL de brometo de etídio em tampão TAE (80 mM Tris-HCl, 40 mM ácido acético glacial, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) adicionando 5 $\mu$ L. O DNA foi purificado (Gel and Purification Kit – Cellco Biotec) e posteriormente digerido utilizando-se as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI* (Thermo Fisher Scientific – Fast Digest) à 37°C, 250rpm por 30min, conforme as orientações do fabricante. O

DNA linearizado e purificado foi quantificado através da leitura da absorbância a 280/260nm no equipamento BioSpec-nano (Shimadzu). O mesmo procedimento de digestão enzimática foi utilizado para o vetor de clonagem pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen) com posterior purificação e quantificação.

### 3.2. Clonagem do DNA no vetor pPICZ $\alpha$ A

A reação de ligação entre o produto de PCR e pPICZ $\alpha$ A linearizados foi feita em reações seguindo a relação de 5:1 (5 de inserto para 1 de vetor). O volume final da reação de ligação foi de 20  $\mu$ L, no qual: 0,3  $\mu$ L T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) (5 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L de Buffer T4 DNA ligase (10x), vetor e inserto digeridos (115,85ng/ $\mu$ L e 55,35ng/ $\mu$ L respectivamente) e 13,2  $\mu$ L de água ultrapura. A reação foi submetida à 22°C graus e 250 rpm por 10 minutos.

O produto da ligação, chamado pPICZ $\alpha$ A\_AsChtII-C4B1-1, foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  para propagação. Assim, 5  $\mu$ L da solução de plasmídeo (produto da reação de ligação) foram misturados com 30  $\mu$ L de cultura de *E. coli* competente, e a mistura permaneceu por 30 minutos no gelo, 2 minutos à 42°C sob agitação de 250rpm e 2 minutos no gelo. À mistura foram adicionados 270  $\mu$ L de meio SOC previamente aquecido, em seguida a mistura foi incubada durante 1 hora à 30°C. Após este período, 60  $\mu$ L da mistura foram plaqueados em placas Petri contendo meio LB Low Salt Agar e Zeocina (25  $\mu$ g/mL). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas à 37°C por 16 horas. Em paralelo, o mesmo procedimento foi realizado para o vetor pUC para controle positivo do processo de transformação, utilizando-se Ampicilina (100  $\mu$ g/mL) para seleção de colônias transformantes.

Cada colônia selecionada foi inoculada em 10 mL de meio LB Low Salt acrescido de Zeocina (25  $\mu$ g/mL), que permaneceu sob agitação *overnight* a 37°C. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit Fast-n-Easy Plasmid *Mini-Prep Kit* - Cellco Biotec. Para confirmar a clonagem, foi feita a análise de restrição com as mesmas enzimas de restrição e condições

anteriormente descritas. O produto da reação foi analisado 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).

### 3.3. Sequenciamento do clone pPICZαA\_AsChtII-C4B1-1

Três amostras foram preparadas contendo 125 ng/µL do clone pPICZαA\_AsChtII-C4B1-1. Em uma delas, foi adicionado 5 µM do *primer* interno *forward*, na segunda 5 µM do *primer* da AOX *forward* e 5 µM do *primer* AOX *reverse* na terceira amostra, totalizando um volume de 7,5 µL em cada uma. O Sequenciamento foi realizado pelo Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células tronco Instituto de biociências – USP – Setor de sequenciamento de DNA na Universidade de São Paulo (USP – *campus* São Paulo). Os dados obtidos foram analisados e tratados a partir do programa UGene e informações contidas no EasySelect™ PichiaExpression kit” (Invitrogen - K1740-01).

### 3.4. Transformação na linhagem KM71H (Mut<sup>S</sup>) de *Pichia pastoris*

O clone pPICZαA\_AsChtII-C4B1-1 foi linearizado com a enzima *SacI* (Thermo Fisher Scientific - FastDigest) em uma reação contendo 10000ng do clone, 10 µL de *SacI*, Buffer Green *SacI* 10x e água ultrapura em um volume final de 200µL. A reação foi submetida à 37°C e 250 rpm por 30 minutos.

Posteriormente, o DNA linearizado foi precipitado para ser utilizado na eletroporação em *P. pastoris*. O procedimento envolveu a adição do mesmo volume de clorofórmio sob agitação de alguns minutos, centrifugação a 15000g por 2 minutos formando duas fases. A fase superior (20µL) foi transferida para outro tubo com adição de acetato de sódio 3M em 1:10 (acetato de sódio/ DNA) e homogeneizada. Um volume de 55 µL de etanol 100% gelado foi adicionado e a solução foi armazenada *overnight* a -20°C. Em seguida, o DNA precipitado foi centrifugado à 15000g à 4°C por 20 minutos. Ao *pellet* formado foi feita a adição

de 1  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado, seguido de uma nova centrifugação nas mesmas condições. O *pellet* foi seco em estufa à 37°C por aproximadamente 30 minutos e ressuspensionado em 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

A transformação do DNA linearizado foi feita em células KM71H de *P. pastoris* eletrocompetentes, preparadas de acordo com o protocolo estabelecido em “EasySelect™ PichiaExpression kit” (Invitrogen - K1740-01).

O DNA linearizado (10 $\mu\text{L}$ ) foi adicionado à 80  $\mu\text{L}$  de células em cubetas de eletroporação de 0,2cm previamente deixadas no gelo por 5 minutos. A eletroporação foi feita no equipamento GenePulser (BioRad) seguindo os seguintes parâmetros: 2.500 V, 200  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$  e 5 milissegundos. Uma solução de sorbitol 1M foi preparada e 1mL da mesma foi adicionada à cubeta após o choque, homogeneizando a mistura com cuidado. Em seguida, a amostra foi transferida para tubos estéreis de 15mL e armazenada à 30°C por 90 minutos sem agitação.

Placas de Petri foram preparadas em triplicata contendo o meio YPDS ágar com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Zeocina, às quais foram adicionados 40  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$  e 80  $\mu\text{L}$  das células transformadas. As placas foram armazenadas em estufa à 30°C por 3 dias. Após o período de crescimento das células, foi realizada uma seleção de colônias que foram replaqueadas em meio YPDS ágar com 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Zeocina, para triagem de qualidade conforme estabelecido em “EasySelect™ PichiaExpression kit” (Invitrogen - K1740-01). Esta placa foi armazenada nas mesmas condições descritas por 3 dias.

Para confirmar a transformação das células foi feita a extração do DNA genômico das colônias, que serviu de DNA molde para uma nova reação de cadeia polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* para amplificação do DNA de AsChtII-C4. Para isso, a colônia obtida foi homogeneizada em 600  $\mu\text{L}$  de solução tampão (NaCl 0,5M, EDTA 0,05M, Tris 0,1M e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%), no qual foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de SDS 20%. A mistura foi agitada por 1 minuto e incubada à 60°C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  da solução de acetato de potássio (5M) sob agitação por 1 minuto e posterior centrifugação a

13200g por 10 minutos. 840  $\mu$ L do sobrenadante foi transferido para outro *ependorf* ao qual foi adicionado 840  $\mu$ L de isopropanol com agitação breve, seguido de centrifugação nas mesmas condições. Uma solução de etanol 70% (500  $\mu$ L) foi adicionada ao *pellet* formado seguido por uma nova centrifugação à 13200g por 5 minutos e armazenado em estufa à 60°C por 15 minutos. Após o *pellet* secar, o mesmo foi ressuscitado em 50  $\mu$ L de água ultrapura.

A reação de amplificação por PCR foi preparada nas mesmas condições de amplificação da região que codifica a quitinase de interesse, agora utilizando o DNA genômico como molde. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% contendo 0,025  $\mu$ g/mL de brometo de etídio em tampão TAE (80 mM Tris-HCl, 40 mM ácido acético glacial, 2,5 mM EDTA, pH 8,3).

### **3.5. Expressão da proteína recombinante**

Para a expressão da quitinase AsChtII-C4B1-1 partiu-se de uma colônia selecionada e inoculada em 10mL de meio BMGY contendo 25 $\mu$ g/mL de Zeocina. O crescimento da cultura ocorreu a 29°C e 250 rpm por 24 horas. Em seguida, o inóculo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 2L contendo 500mL de meio BMGY, que foi mantido sob agitação de 250 rpm a 29°C por mais 24 horas. O meio de cultura resultante foi centrifugado a 1500g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado com 100mL de meio BMMY. Essa mistura reacional foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 1L e incubada a 29°C com agitação de 250 rpm. A cada 24 horas e durante 144 horas, 1% de metanol foi adicionado para induzir a expressão da proteína no meio reacional.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi centrifugado a 3500g e 4°C por 8 minutos. O *pellet* foi descartado, e o sobrenadante, chamado de extrato bruto (EB), foi armazenado a -20°C.

O mesmo procedimento foi feito em paralelo para o pPICZ $\alpha$ A vazio que foi transformado na linhagem KM71H para ser utilizado como controle negativo da expressão da quitinase.

### 3.6. Purificação da quitinase

A primeira etapa de purificação da proteína foi precipitação com sulfato de amônio, processo que serviu também para concentrar a amostra. Assim, os aproximadamente 100 mL de extrato bruto foram utilizados para precipitação com 80 % de sal, que foi adicionado lentamente sob agitação. Em seguida, o meio foi mantido em repouso por 45 minutos à temperatura ambiente, e depois centrifugado a 10000g a 4°C por 45 minutos.

O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuscitado em aproximadamente 4 mL de tampão fosfato de sódio 50mM e pH 6.0. A amostra foi adicionada a uma membrana SnakeSkin (3.5K MWCO), que foi vedada e presa a um béquer de 400mL. Essa membrana foi submersa em 400 mL de tampão fosfato de sódio 50mM e pH 6.0 e mantida sob agitação a 4°C. Durante a dialise, houve três trocas de tampão a cada 30 minutos e 1 hora. O mesmo procedimento foi feito para o controle negativo.

O extrato enzimático, amostra após a precipitação e diálise, foi aplicado em uma coluna de afinidade (Ni-NTA) de 2 mL, que foi previamente lavada com água ultrapura e equilibrada com o tampão fosfato de sódio 50mM pH 6.0. A resina com a amostra ligada a ela foi incubada *overnight* a 4°C. No dia seguinte, o *void* (fração que não se ligou à coluna) foi coletado, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão fosfato de sódio e a eluição foi feita com imidazol a 10mM, 50mM, 100mM, 200mM, 300mM e 500mM. Após a eluição, as amostras foram submetidas a uma nova etapa de diálise de 2 horas, com trocas de tampão fosfato de sódio 50mM e pH 6.0 a cada 1 hora, para remover o imidazol.

Após realizar a eluição com imidazol, foi definida que as próximas purificações seriam realizadas seguindo o mesmo protocolo, contudo, com

eluições a partir de tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 5.9 com 500mM de imidazol. A proteína eluída da coluna foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *immunoblotting* usando o anticorpo anti-His-tag e a quantificação foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976; RENART, REISER e STARK, 1979).

### **3.7. Identificação da proteína por *Immunoblotting***

A proteína recombinante purificada foi analisada por reação com o anti corpo anti His-tag, através do ensaio de *immunoblotting*. Para realizar a transferência das bandas das proteínas contidas no gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% utilizou-se um tampão de transferência (200mM de Tris, 50mM de Glicina e 15% de metanol) ao qual foram mergulhadas duas esponjas. Em cima de uma das esponjas foi posicionada uma membrana de nitrocelulose de 0,2 µm, o gel de poliacrilamida e a outra esponja, de modo a formar um “sanduiche”. O equipamento Trans-Blot Turbo system (Bio-rad) foi utilizado com os seguintes parâmetros: 150V (85 a 160mA) em um ciclo de 30 minutos, seguido por outro ciclo de 7 min nas mesmas condições. Finalizando essa etapa, adicionou-se uma solução de Ponceau (0,5% de ponceau e 0,1% de ácido acético) sob a membrana que ficou em agitação por 30 minutos, para verificar a eficiência da transferência. Lavou-se brevemente com água ultrapura e incubou-se a membrana com uma solução de bloqueio (5% de leite mólico desnatado em TBS 1x (preparado a partir de TBS 10x contendo 1M de Tris e 1M de NaCl pH 7,5) por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada novamente com água ultrapura e 3 lavagens com TBS 1x contendo *tween*. A cada lavagem, a membrana foi submetida a agitação por 5 minutos. O anticorpo conjugado (Anti-His) utilizado foi diluído em TBX 1x (1:4000) e aplicado sobre a membrana, ao qual ficou sobre agitação por 1h30. Após o período estabelecido, o anticorpo foi removido com água ultrapura e repetiu-se as mesmas 3 lavagens com TBS 1x com *tween* (RENART, REISER e STARK,

1979). Como revelador foi utilizada a pastilha *alkaline phosphatase substrate* (Sigmafast™ BCIP®/NBT) diluída em água ultrapura e adicionada à membrana (coberta) até o aparecimento de bandas.

### **3.8. Caracterização da atividade enzimática**

No presente trabalho utilizou-se  $\alpha$ -quitina coloidal como substrato, preparada a partir de 5g de  $\alpha$ -quitina (Sigma-Aldrich) adicionados a 60 mL de HCl concentrado sob agitação por 1 hora, conforme descrito por Skujins *et al.* (1965). Após a formação do precipitado, ele foi lavado com etanol 50% e água ultrapura até atingir pH 7.0 e armazenado em  $-20^{\circ}\text{C}$ . O tampão citrato-fosfato (0,1M de ácido cítrico e 0,2M de fosfato de sódio bibásico), conforme descrito por McIlvaine (1921), é usado com 5% de  $\alpha$ -quitina no pH desejado.

A atividade enzimática foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959), que permite medir a concentração de açúcares redutores após a ação da enzima sobre o substrato. Uma curva padrão foi criada com diferentes concentrações de *N*-acetilglicosamina e a absorbância foi avaliada a 540 nm.

Para avaliar o pH ao qual a enzima apresenta maior atividade, foram preparados tampões citrato-fosfato em pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Inicialmente o volume total da reação foi de 400 $\mu\text{L}$  contendo 60  $\mu\text{L}$  de enzima, 140  $\mu\text{L}$  de tampão citrato-fosfato e 200  $\mu\text{L}$  de quitina coloidal diluída em cada faixa de pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8). As reações foram incubadas à  $50^{\circ}\text{C}$ , sob agitação de 250 rpm por 1 hora. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de ácido dinitrosalicílico (1%) (400 $\mu\text{L}$ ) às reações, que foram aquecidas ( $100^{\circ}\text{C}$ ) por 10 minutos. Posteriormente, as mesmas foram resfriadas a  $-20^{\circ}$  por 5 minutos e centrifugadas 10000g por 5 minutos. A leitura de absorbância das amostras foi realizada em um espectrômetro ultravioleta visível (UV-Vis) à 540nm. Como controle negativo foi preparada uma mistura contendo 200  $\mu\text{L}$  de tampão citrato-fosfato e 200  $\mu\text{L}$  de quitina em cada faixa de pH.

Os procedimentos foram feitos em triplicatas biológicas e experimentais para cada faixa de pH.

Após definir o pH ótimo da enzima, procedimento semelhante foi realizado para avaliar a temperatura no qual a enzima apresenta maior atividade. Para isto, a reação foi desenvolvida em 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C e 80°C. Os experimentos foram feitos em triplicata experimental e biológica e os resultados são dados como a média.

### **3.9. Estabilidade térmica da enzima**

Tendo em vista os ensaios que seriam realizados para verificar a potencial interferência das quitinases no crescimento do fungo, foi feito um estudo para determinar a estabilidade térmica da enzima em comparação com os estudos da AsChtII-C4B1.

Para analisar a estabilidade térmica, amostras da quitinase recombinante purificada foram submetidas às temperaturas de 4°C, 28°C e 60°C. Em intervalos de 3h, 6h, 24h, 48h e 72h amostras da proteína foram avaliadas quanto à atividade conforme descrito anteriormente nas melhores condições de pH e temperatura para a enzima. Os experimentos foram feitos em triplicata experimental e biológica e os resultados foram dados como a média dos dados obtidos.

### **3.10. Ensaio para verificar a interferência das enzimas fungo *Rhizopus stolonifer***

Os ensaios com a enzima obtida e AsChtII-C4B1 foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago, Prof. Dr. Marcos David Ferreira e Joana Dias Bresolin, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) com o fungo *Rhizopus stolonifer* (CCT 06T6 NRRL 1478).

A avaliação da interferência das enzimas no crescimento do fungo foi feita em meio sólido e em meio líquido. Nos experimentos em meio sólido uma suspensão de esporos do fungo *R. stolonifer* ( $1,3 \times 10^6$  esporos/mL em uma solução salina contendo NaCl 0,9% e Tween 0,1%) foi misturada com solução com enzima purificada (50 $\mu$ g) e aplicada no centro da placa de Petri preparada com meio BDA (batata dextrose ágar).

O primeiro deles foi realizado em placas de Petri contendo meio BDA (batata dextrose ágar) no qual foi adicionada uma suspensão de esporos do fungo *R. stolonifer* ( $1,3 \times 10^6$  esporos/mL em uma solução salina contendo NaCl 0,9% e Tween 0,1%) em uma mistura com: 50 $\mu$ g de cada enzima, tampão fosfato de sódio (50mM e pH 6,0) e solução salina como controle negativo.

A medição do crescimento micelial foi feita a cada 24h durante 48h e a interferência no crescimento do fungo foi calculada pela fórmula de Abbott, conforme a equação [1] abaixo (MEDEIROS et al., 2006):

$$\text{Redução no crescimento (\%)} = 100 - \left[ \frac{(100CG)}{C} \right] \quad [1]$$

Onde:

CG: crescimento pelo tratamento

C: crescimento por tratamento com controle negativo (branco).

Para a avaliação da interferência das enzimas no crescimento do fungo em meio líquido, 100  $\mu$ g de enzima foi adicionada à suspensão de esporos ( $6,5 \times 10^5$  esporos/mL). As amostras foram mantidas à 28°C sob agitação de 120rpm. Após 24h foi feita uma contagem de esporos na câmara de Neubauer utilizando a equação [2] para determinar o crescimento do fungo:

$$n^{\circ} \frac{\text{de esporos}}{\text{mL}} = (n^{\circ} \text{ médio de esporos em c}) \times (2,5 \times 10^5) \quad [2]$$

## 4. Resultados e Discussões

### 4.1. Amplificação e clonagem do DNA

A partir dos *primers* desenhados previamente e o clone pPICZ $\alpha$ A\_AsChtII-C4B1 previamente obtido no grupo como molécula molde, foi possível amplificar um DNA com massa molecular aparente entre 1400 e 2000 pb (Figura 4.1). O DNA que codificou a síntese da enzima AsChtII-C4B1 possui 1485 pb sendo 1326 pb referente ao domínio catalítico e 156 pb referentes ao CBM (MICOCCI et al., 2023). Assim, o DNA amplificado deveria apresentar 1326 pb, mas apresentou massa um pouco maior.

FIGURA 4.1. Análise em gel de agarose 1 % do produto de PCR.

MM- Marcador de massa molecular O'GeneRuler Express 5000pb DNA ladder (Thermo Scientific), 1 fragmento de DNA amplificado por PCR.



O DNA amplificado por PCR foi clonado no vetor pPICZ $\alpha$ A (3593 pb) para permitir a expressão da enzima em *P. pastoris* e sendo expressa para o meio extra celular. A clonagem foi verificada através de uma análise de restrição resultando em um fragmento de DNA entre 1500 e 2000pb conforme mostra a Figura 4.2.

FIGURA 4.2. Gel de agarose 1% da reação de análise de restrição do pPICZ $\alpha$ A\_AsChtII-C4.

MM – Marcador de peso molecular O'GeneRuler Express 5000pb DNA ladder (Thermo Scientific). 1. clone e 2. Reação de digestão



## 4.2. Análise da sequência do clone

O sequenciamento do clone foi feito com os *primers* da AOX *forward* e *reverse* e também com um *primer* interno *forward*. As primeiras amostras enviadas para o sequenciamento não produziram resultados confiáveis e foi somente após descarte dos *primers* e uso de novas soluções dos mesmos é que foi possível obter um eletroferograma bom. A sequência do clone mostrou a presença de nucleotídeos referentes ao domínio catalítico e também do CBM, sendo um resultado não esperado visto que foi usado *primer reverse* que este deveria ter se anelado em uma região que permitisse a expressão da enzima somente com o domínio catalítico. Portanto, como o DNA contém nucleotídeos referentes ao domínio catalítico e CBM, a enzima expressa seria a própria AsChtII-C4B1 já estudada no LBFE.

A sequência de nucleotídeos obtida permitiu que esta fosse traduzida teoricamente para a sequência de aminoácidos (Figura 4.3). Em quitinases que pertencem a família GH18 o domínio catalítico apresenta 4 motivos sequenciais altamente conservados: KXXXXXGGW, FDGXDLWEYP, MXYDXXG e

GXXXWXXDXDD, onde X é um aminoácido não específico (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN, 2010; MERZENDORFER, 2013). A presença glutamato no segundo motivo conservado, FDGXDLDWEYP, está associado com a atividade catalítica da quitinase, atuando como o doador do próton necessário para clivar a ligação glicosídica (CHEN *et al.*, 2018). Todos os 4 motivos foram encontrados na sequência traduzida da enzima aqui estudada.

FIGURA 4.3. Sequência traduzida de aminoácidos da AsChtII-C4B1-1.

Sublinhado: Aminoácidos conservados no domínio catalítico. Em vermelho: Glutamato doador de elétrons da reação.

```

      10      20      30      40      50      60
EFKVICYFTN WAWYRQEGGK FVPEDIDPDL CTHVLYGFSV LDGSSLTMKS HDPWADIDNK

      70      80      90      100     110     120
FYDRVAAFKA KGLKVLMALG GWNDSAGDKY SRLVNSPSAR RRFITQLLLF IEKYDFEGLD

      130     140     150     160     170     180
LDWYPVCWQ VDCNKGPESD KQSFAELIKE LRDEFKPRGL LLSAAVSPSK RVIDAGYDVP

      190     200     210     220     230     240
TLSKYLDWIS IMTYDFHGQW DKKTGHVAPL YSLPNDWEPT FNANFSIHYW IEKGANPKKL

      250     260     270     280     290     300
IMGVPLYGQS FSLAERNVHG LNAPTYGGGE AGEATRARGF LSYYEICERT LKKGWTVVQD

      310     320     330     340     350     360
KERRIGPYAY KGDQWVSFDD AQQIKLKAEL IKKLDLGGGM IWALDLDDFK NRCGCEPSPL

      370     380     390     400     410     420
LRTMNRVLRN YPKGPLCPIT EGTEVVIIDV DQSNIESTTV TERPIYESTT SPTYIPPATI

      430     440     450     460     470     480
PTTTELDPDI DDTIEIEASP LPPADCGGHL FISHKSDCTK YYLCNFGKIS EQSCPSGLYW

      490     500     510     520
NEDRCDWPEÑ TKCKTAEALE QKLISEEDLN SAVDHHHHHH

```

Fonte: Análise feita no programa Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Um alinhamento entre a sequência obtida deste trabalho e referente à AsChtII-C4B1 (Figura 4.4.) mostrou uma mutação envolvendo a troca de uma serina em AsChtII-C4B1 por uma arginina além de uma inserção de dois aminoácidos da sequência deste trabalho (Figura 4.4), que podem ter ocorrido devido a amplificação do DNA por reação de cadeia polimerase (PCR). A enzima expressa neste presente trabalho foi chamada AsChtII-C4B1-1, e pode ser pensada como uma isoforma da AsChtII-C4B1.

FIGURA 4.4. Alinhamento entre as sequencias de AsChtII-C4B1 e AsChtII-C4B1-1.

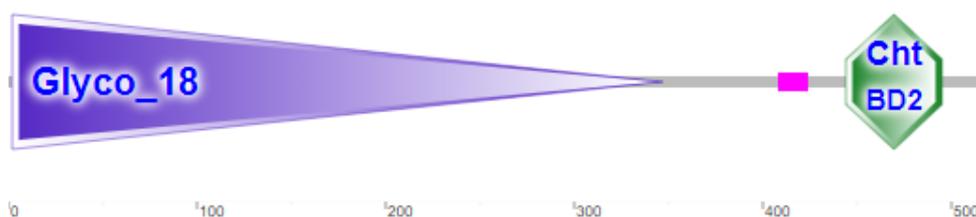
Em azul: mutação observada.

C4B1	EFKVICYFTNWAAYRQEGGKFPEDIDPDLCTHVLYGFSVLDGSSSLTMKSHDPWADIDNK	60
C4B1-1	EFKVICYFTNWAAYRQEGGKFPEDIDPDLCTHVLYGFSVLDGSSSLTMKSHDPWADIDNK	60
	*****	
C4B1	FYDRVAAFKAKGLKVLMLALGGWNSAGDKYSRLVNSPSARRRFITQLLLFIEKYDFEGLD	120
C4B1-1	FYDRVAAFKAKGLKVLMLALGGWNSAGDKYSRLVNSPSARRRFITQLLLFIEKYDFEGLD	120
	*****	
C4B1	LDWEYPVCWQVDCNKGPEQSDKQSF AELIKEL SDEFKPRGLLSAAVSPSKRVIDAGYDVP	180
C4B1-1	LDWEYPVCWQVDCNKGPEQSDKQSF AELIKEL <span style="background-color: #e0f0ff;">R</span> DEFKPRGLLSAAVSPSKRVIDAGYDVP	180
	*****	
C4B1	TLSKYLDWISIMTYDFHGQWDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANFSIHYWIEKGANPKKL	240
C4B1-1	TLSKYLDWISIMTYDFHGQWDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANFSIHYWIEKGANPKKL	240
	*****	
C4B1	IMGVPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYEICERTLKKGWTVVQD	300
C4B1-1	IMGVPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYEICERTLKKGWTVVQD	300
	*****	
C4B1	KERRIGPYAYKGDQWVSFDDAQI KLKAE L IKKLDLGGMIWALDLD DFKNRCGCEPSPL	360
C4B1-1	KERRIGPYAYKGDQWVSFDDAQI KLKAE L IKKLDLGGMIWALDLD DFKNRCGCEPSPL	360
	*****	
C4B1	LRTMNRVLRNYPKGPLCPITEGTEVVIIDVDQSNIESTTVTERPIYESTTSPTYIPPATI	420
C4B1-1	LRTMNRVLRNYPKGPLCPITEGTEVVIIDVDQSNIESTTVTERPIYESTTSPTYIPPATI	420
	*****	
C4B1	PTTTELDPIDDDTIEIEASPLPPADCGGHLFISHKSDCTKYLLCNFGKISEQSCPSGLYW	480
C4B1-1	PTTTELDPIDDDTIEIEASPLPPADCGGHLFISHKSDCTKYLLCNFGKISEQSCPSGLYW	480
	*****	
C4B1	NEDRCDWENTKCKTA--LEQKLI SEEDLNSAVDHHHHHH	518
C4B1-1	NEDRCDWENTKCKTAEALEQKLI SEEDLNSAVDHHHHHH	520
	*****	

Fonte: análise feita no programa Clustal ômega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).

De acordo com o sequenciamento, a arquitetura do domínio AsChtII-C4B1-1 foi obtida no programa Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) como mostra a Figura 4.5. A quitinase recombinante apresenta 520 aminoácidos e massa de 59kDa segundo o programa Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>). A partir do sequenciamento também foi determinado 2 sítios de N-glicosilação de acordo com NetNGlyc 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) e 22 sítios de O-glicosilação de acordo com NetOGlyc 4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>).

FIGURA 4.5. Arquitetura do domínio para a quitinase do grupo II de *Atta sexdens*. AsChtII-C4B1-1.



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

A quitinase AsChtII-C4B1-1 apresentou 99,8% de identidade com a quitinase AsChtII-C4B1 e 97,3% com o respectivo domínio catalítico e CBM da formiga *A. echinator*.

Para tentar entender o que teria acontecido para que o DNA amplificado contivesse a região referente ao CBM, já que o *primer reverse* foi sintetizado baseado na sequência depositada de uma quitinase da formiga *A. echinator* para amplificar uma quitinase contendo somente o domínio catalítico que chamamos de C4, analisamos os nucleotídeos presentes no vetor pPICZαAEasySelect™ PichiaExpression kit™ -Invitrogen - K1740-01) (Figura 4.6). O alinhamento feito com o programa Clustal ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) entre a sequência do *primer reverse* e a sequência complemento do final do vetor pPICZαA, mostrou que há

possibilidade de anelamento do *primer*, mesmo que não seja 100% (em destaque em vermelho na Figura 4.7).

Assumindo que o *primer reverse* (TCTAGAATTGGAGGTAGT GGGTGGCTTC) tenha se anelado à região do pPICZ $\alpha$ A, conforme a Figura 4.7, o DNA amplificado teria 1781 pb, o que explicaria também o fragmento observado nos géis de agarose 1% (Figuras 4.1 e 4.2) entre 1500 e 2000 pb.

FIGURA 4.6. Vetor pPICZ $\alpha$ A

```

                    5' end of AOX1 mRNA
                    |
                    v
811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA
                    |
                    v
                    5' AOX1 priming site
                    |
                    v
871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT
                    |
                    v
931 ATTCGAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
                    Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala
                    |
                    v
983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
                    Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala
                    |
                    v
                     $\alpha$ -factor signal sequence
                    |
                    v
1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
                    Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
                    |
                    v
1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
                    Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
                    |
                    v
                    Xho I*
                    |
                    v
1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
                    Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Lys Glu Glu Val Ser Leu
                    |
                    v
                    Kex2 signal cleavage
                    |
                    v
1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC G GAATTCAC GTGGCCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT
                    Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala
                    |
                    v
                    Ste13 signal cleavage
                    |
                    v
                    Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I
                    |
                    v
1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
                    Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
                    |
                    v
                    c-myc epitope
                    |
                    v
                    polyhistidine tag
                    |
                    v
1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC
                    Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***
                    |
                    v
1351 TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GCACTTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA
                    |
                    v
                    3' AOX1 priming site
                    |
                    v
1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT
                    |
                    v
                    3' polyadenylation site
                    |
                    v
1471 ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT

```

\*To express your protein with a native N-terminus, you must use PCR and utilize the Xho I site upstream of the Kex2 cleavage site to clone your gene flush with the Kex2 cleavage site (see page 4 for more details).

Fonte: adaptado de EasySelect™ PichiaExpression kit” (Invitrogen - K1740-01).

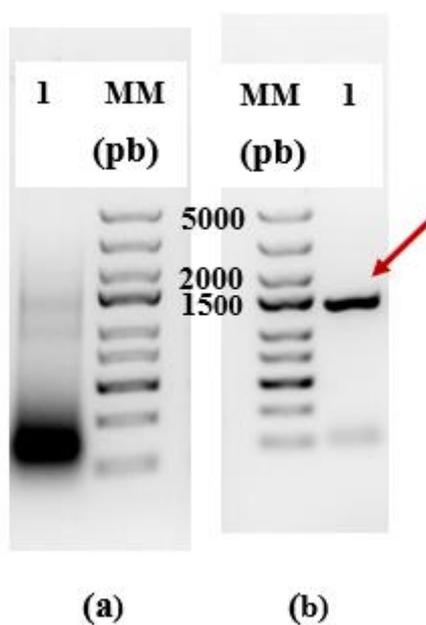


Após a transformação do clone em células de *P. pastoris*, DNA genômico da colônia obtida foi extraído e utilizado como molécula molde em PCR para confirmação da transformação (verificação de colônias transformantes).

O produto da reação foi analisado em gel de agarose, no qual foi possível observar um fragmento de DNA amplificado entre 1500 e 2000pb (Figura 4.8), confirmando a obtenção de uma colônia transformante.

FIGURA 4.8. Gel de agarose 1% do produto de PCR através de DNA gnômico de *P. pastoris*.

(a) DNA genômico; (b) Produto de PCR - Fragmento de DNA. MM - Marcador de massa molecular 5000pb DNA ladder (Thermo Scientific).



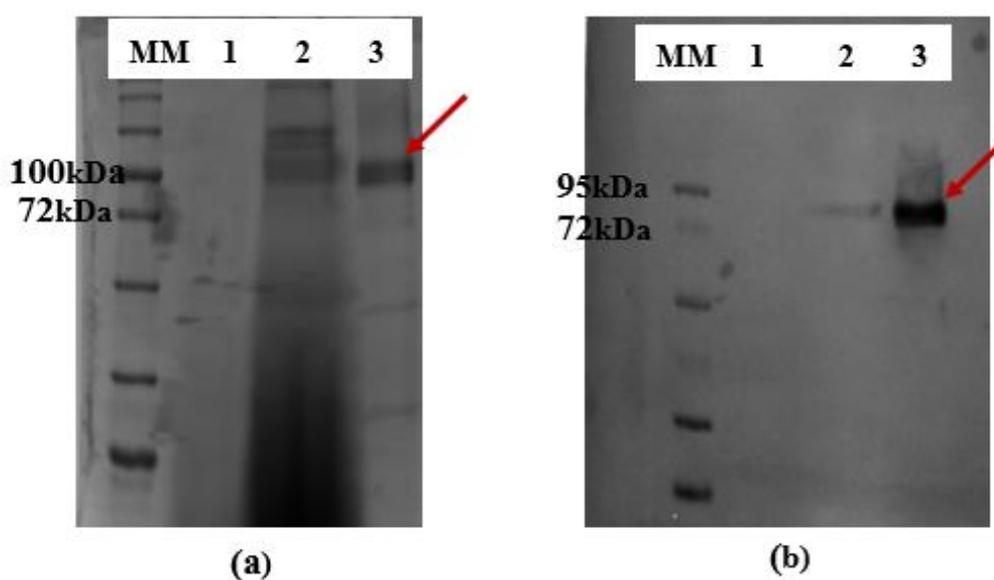
Após a confirmação da transformação, expressões foram preparadas com indução de metanol 1%. O meio de cultura, chamado de extrato bruto (EB), foi submetido precipitação com 80% de sulfato de amônio seguido de diálise e coluna de afinidade em resina de níquel (Figura 4.9). A amostra após precipitação e diálise foi chamada de extrato enzimático (EE). Os experimentos com o vetor pPICZ $\alpha$ A vazio permitiram uma melhor análise da expressão da enzima estudada, sendo visto na Figura 4.9, poço 1 o EB deste experimento. Após a purificação em

resina de afinidade (poço 3) a enzima apresentou um bom grau de pureza (aproximadamente 80%). A reação positiva com o anti corpo anti-His (Figura 4.9B) mostrou que a banda de cerca de 80 kDa é referente à AsChtII-C4B1-1. A massa molecular esperada para a AsChtII-C4B1-1 é de aproximadamente 59 kDa, e a diferença observada deve ser devido à glicosilação da molécula.

A *P. pastoris* é um organismo eucarioto utilizado para a produção de proteínas heterólogas, capaz de realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação ligadas a N ou O. Possui alto teor de manoses ligados a N. Para algumas proteínas, a presença desses carboidratos ligados à sua estrutura permite maior estabilidade, atividade biológica adequada e até solubilidade (KARBALAEI et al., 2020).

FIGURA 4.9. Análise em SDS-PAGE 12% e *Immunoblotting* da proteína expressa.

**(a)** - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com coomassie blue MM. Padrão de peso molecular 180kDa. 1. pPICZ $\alpha$ A vazio, 2. Extrato enzimático – diálise, 3. Amostra eluida com 500mM de imidazol. **(b)** - *Immunoblotting* - MM. Padrão de peso molecular 260kDa, 1. pPICZ $\alpha$ A vazio, 2. Amostra dialisada, 3. Amostra eluida com 500mM de imidazol.



#### 4.4. Análise da interferência do pH e temperatura na atividade da enzima

A atividade da quitinase AsChtII-C4B1-1 foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) a partir de triplicatas biológicas e experimentais utilizando quitina coloidal como substrato. Para determinar o pH e a temperatura no qual a enzima apresenta maior atividade, variou-se as condições às quais a enzima foi submetida. O valor de pH no qual a AsChtII-C4B1-1 apresenta maior atividade é 6,0, enquanto que a AsChtII-C4B1 apresenta pH ótimo igual a 5,0 (Figura 4.10). As melhores temperaturas para a atividade das enzimas AsChtII-C4B1 e AsChtII-C4B1-1 são 55°C e 60 °C, respectivamente (Figura 4.11).

Assim, a quitinase AsChtII-C4B1-1 mostrou diferenças em suas propriedades físico-químicas em comparação com a AsChtII-C4B1 relatada por Micocci et al. (2023) e, como elas apresentam alta identidade sequencial, as diferenças observadas em suas propriedades físico-químicas devem ser devido a mutação e inserções de aminoácidos encontrados na quitinase AsChtII-C4B1-1.

FIGURA 4.10. Atividade relativa da enzima em função do pH com  $\alpha$ -quitina coloidal pelo método DNS.

(a) AsChtII-C4B1-1 e (b) AsChtII-C4B1 (Fonte: MICOCCI *et al.*, 2023).

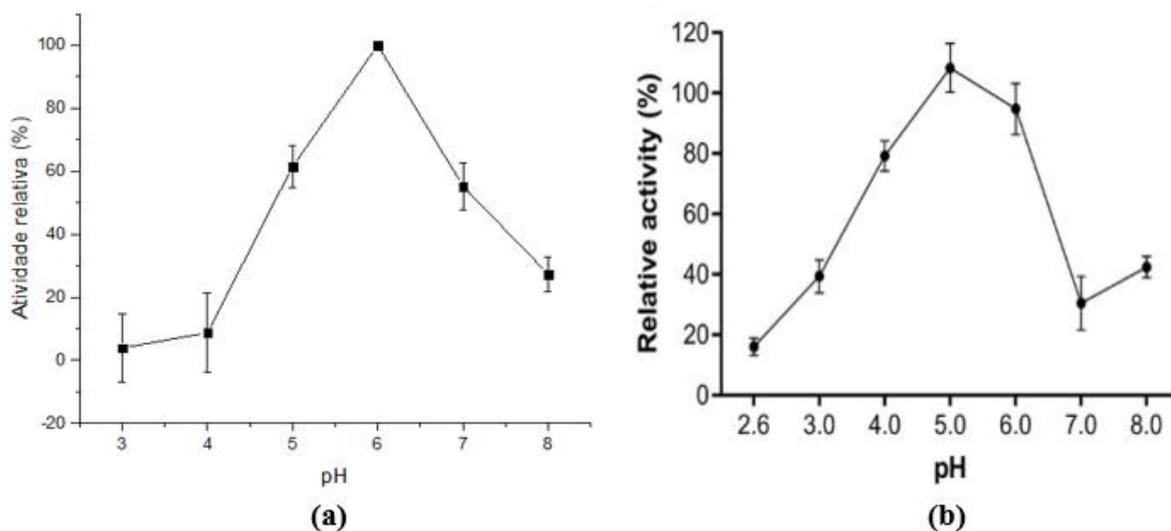
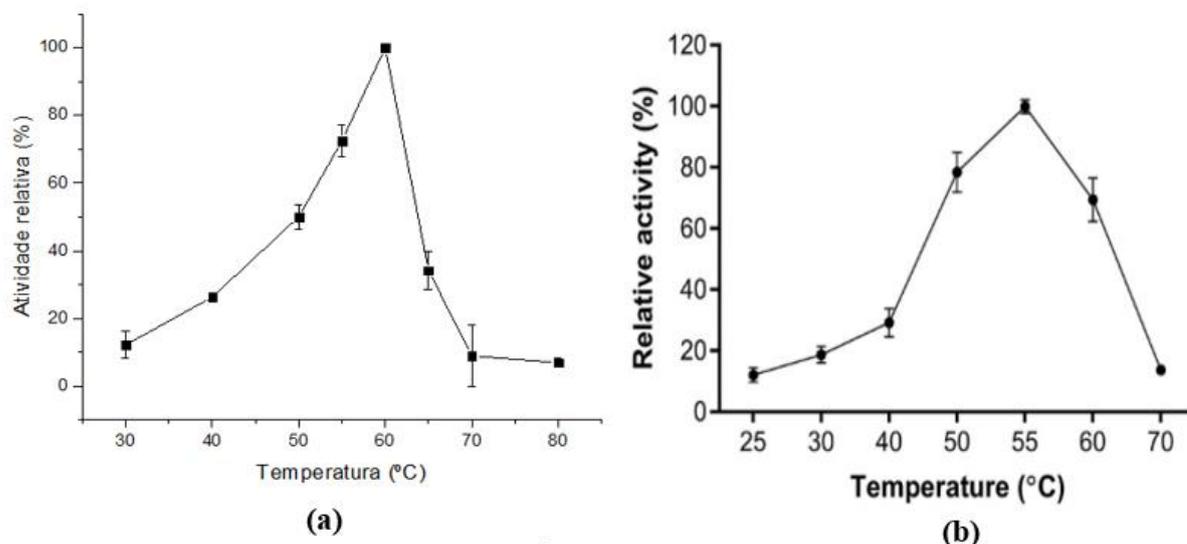


FIGURA 4.11. Atividade relativa da enzima em função da temperatura com  $\alpha$ -quitina coloidal pelo método DNS.



Fonte: (b) MICOCCI *et al.*, 2023.

Nas melhores condições de pH e temperatura para cada enzima, foi possível determinar a atividade específica de cada quitinase (Tabela 4.1). Podemos definir a atividade específica como sendo a quantidade em mols de enzima que são necessários para liberar  $1\mu\text{mol}$  de *N-Ac* por minuto.

TABELA 4.1. Atividade específica das quitinases

	<i>N-Ac</i> liberados (mol)	Concentração da enzima (mg/ $\mu\text{mol}$ )	Atividade (nmol de enzima)
AsChtII-C4B1	$1,60 \times 10^{-7}$	$375,4 \times 10^{-3}$	$109,2 \times 10^{-3}$
AsChtII-C4B1-1	$1,63 \times 10^{-7}$	$433,6 \times 10^{-3}$	$125 \times 10^{-3}$

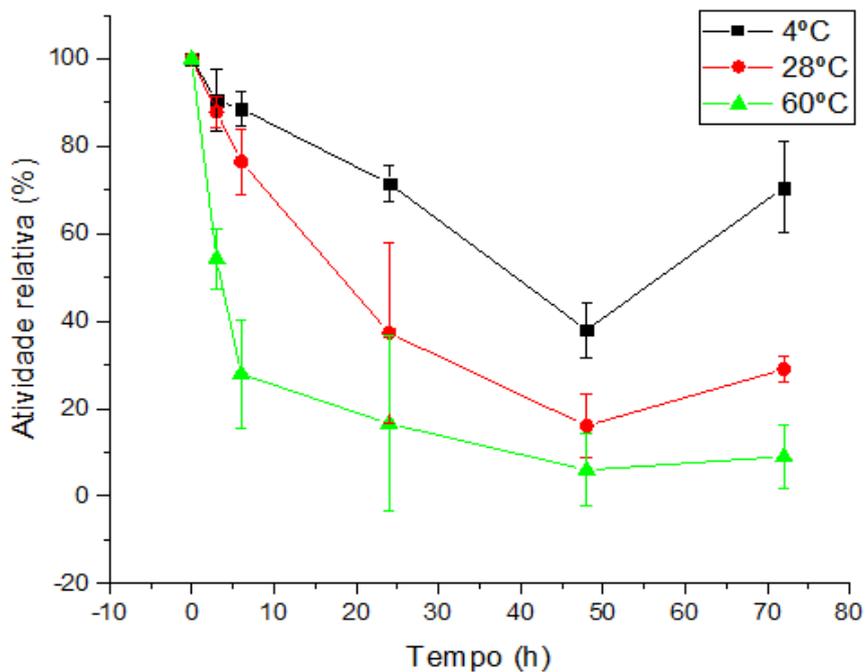
Assim, verificou-se que é necessário 15,8% menos da quitinase AsChtII-C4B1 para liberar  $1\mu\text{mol}$  de *N-Ac* por minuto em comparação com AsChtII-C4B1-1, tendo a primeira maior atividade. Estes dados mostram, novamente, que embora tenham poucas diferenças, as enzimas AsChtII-C4B1 e

AsChtII-C4B1-1 se comportam de forma um tanto diferentes tanto em relação à suas propriedades físico-químicas quanto de atividade.

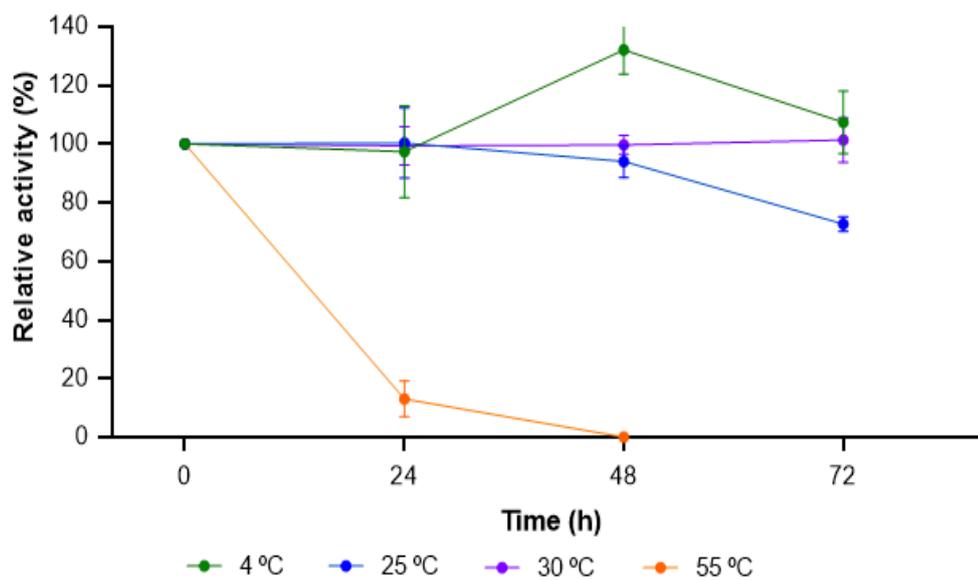
#### 4.5. Análise da estabilidade térmica

A estabilidade da enzima AsChtII-C4B1-1 foi avaliada incubando-a na ausência do substrato a 4°C, 28° e 60°C durante 3 dias. Após intervalos estipulados (0h, 3h, 6h, 24h, 48h e 72h), testes de atividade foram realizados nas melhores condições observadas para essa quitinase. Os dados obtidos através das triplicatas biológicas e experimentais foram plotados em termos de atividade relativa da enzima em função do tempo, como mostra a Figura 4.12A.

FIGURA 4.12. Atividade relativa da enzima AsChtII-C4B1-1 (a) em função de sua estabilidade em 4°C, 28°C e 60°C e (b) AsChtII-C4B1 em diferentes temperaturas após reação com  $\alpha$ -quitina coloidal pelo método DNS.



(a)



(b)

Fonte: (b) Micocci *et al.*, 2023 (editado).

Após ser submetida a temperatura de 60°C na ausência do substrato, a enzima perdeu cerca de 80% da sua atividade em 6h. É observado também, que após 48h sua atividade é praticamente nula. A temperatura ótima para o crescimento do fungo *Rhizopus stolonifer* é 28°C, o que nos levou ao interesse de avaliar a estabilidade da enzima nessa temperatura, visto que será aplicada em ensaios para verificar sua interferência no crescimento do fungo. Houve uma queda na atividade da quitinase em 28°C com o passar do tempo de armazenamento. Nas primeiras 24h, observou-se uma redução em cerca de 60% em sua atividade e 80% em 72h. Esse fato pode vir a interferir na ação da enzima sobre a quitina sólida presente nos esporos e parede celular do fungo. Além disso, observa-se que a enzima se manteve mais estável em 4°C, com perda de 20% de sua atividade em 24h e 30% em 72h, o que favorece o armazenamento da mesma no período analisado. Sendo assim, na ausência do substrato, quanto maior a temperatura e tempo analisado, menor a estabilidade da enzima estudada.

Micocci *et al.*, (2023) também avaliou a estabilidade térmica da quitinase AsChtII-C4B1-1 em diferentes faixas de temperatura por 504h como mostra a Figura 4.1.2B. O comportamento da enzima se mostrou similar a AsChtII-C4B1 em 4°C, mantendo-se estável em até 72h. O estudo realizado não informou a estabilidade da enzima em 28° e 60°C, porém, apresenta dados em 25, 30 e 55°C. Tanto em 25° como em 30°C é observado uma queda gradativa na atividade relativa de AsChtII-C4B1-1, como redução de 30% em sua atividade em 72h a 30°C. Em 55°C a atividade da enzima caiu drasticamente, com redução de cerca de 90% nas primeiras 24h encerrando a análise em 48h. Sendo assim, AsChtII-C4B1 também mostrou menor estabilidade na ausência do substrato nos ensaios envolvendo temperaturas mais altas, diminuindo sua atividade com o período analisado.

#### **4.6. Análise da interferência das quitinases no crescimento do fungo**

O fungo *Rhizopus stolonifer* foi escolhido tendo em vista que se trata de um patógeno importante na agricultura que acomete frutos e vegetais maduros através de feridas na casca, com relatos de até 50% de perda de produções de frutos pós colheita. É um fungo considerado resistente, com crescimento rápido em altas temperaturas e humidade relativa acima de 75% produzindo esporos e micélios que são fontes secundárias de infecção. Seus esporos também são resistentes e podem ser encontrados dispersos no ar e no solo por vários meses (OLIVEIRA e FILHO, 2007). Fungos da ordem *Mucorales* como *Rhizopus* apresentam cerca de 40% de quitina em seus esporos e hifas, sendo que essa proporção pode variar de acordo com as espécies e formas de esporos e hifas (LECOINTE et al., 2019). Além disso, fungos apresentam quitina em sua parede celular (JIRAN et al, 2023; VAGHELA et al., 2022; ZARGAR, ASGHARI e DASHTI, 2015; TSURKAN et al., 2021).

Os ensaios de atividade antifúngica envolvendo as enzimas AsChtII-C4B1-1 e AsChtII-C4B1 foram conduzidos nas instalações da Empresa Brasileira

de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), utilizando o fungo *R.stolonifer* em dois diferentes experimentos. O primeiro teste foi realizado em placas contendo meio BDA (batata dextrose ágar), nas quais uma suspensão de esporos do fungo *R. stolonifer* ( $1,3 \times 10^6$  esporos/mL em solução salina com NaCl 0,9% e Tween 0,1%) foi adicionada. Essa suspensão foi submetida a diferentes tratamentos, sendo eles com 50µg de cada enzima, tampão fosfato de sódio (50mM e pH 6,0), e uma solução salina para o controle negativo. Cada mistura foi aplicada no centro das placas, em triplicata, e armazenada por um período de 48 horas (Figura 4.13).

O crescimento micelial foi medido a cada 24h (Figura 4.14) e a redução no crescimento foi calculada (Tabela 4.2).

FIGURA 4.13. Fungo *R. stolonifer* e ensaios de atividade antifúngica em placa contendo meio BDA.

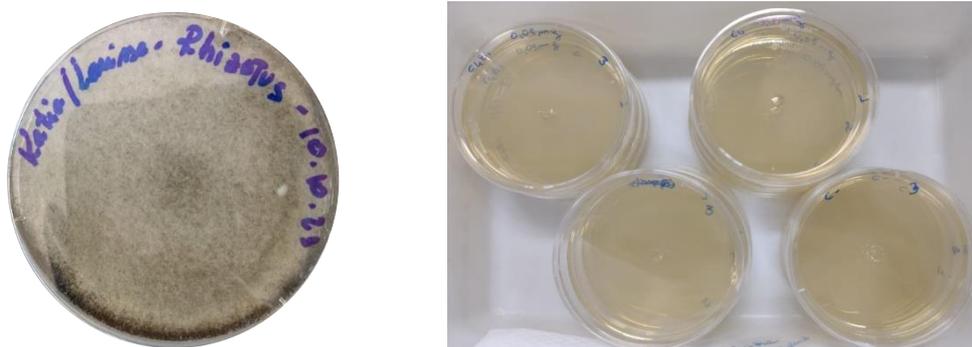


TABELA 4.2. Atividade antifúngica das quitinases em 24h.

Fungo	<i>R. stolonifer</i>	
	Diâmetro	Redução no crescimento (%)
Tampão	3,87±0,07	7,4
C4B1	4,10±0,27	1,9
C4B1-1	4,13±0,31	1,1

Em 24h é observado que a redução no crescimento do fungo *R. stolonifer* por ambas as quitinases é de menos de 2% em relação ao controle

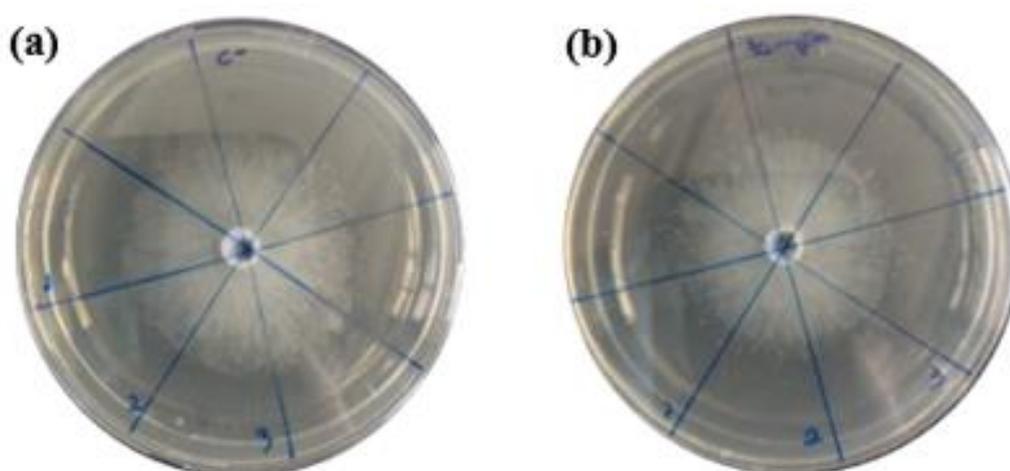
negativo e em 48h a placa foi coberta pelo fungo em todos os tratamentos no qual foi submetido.

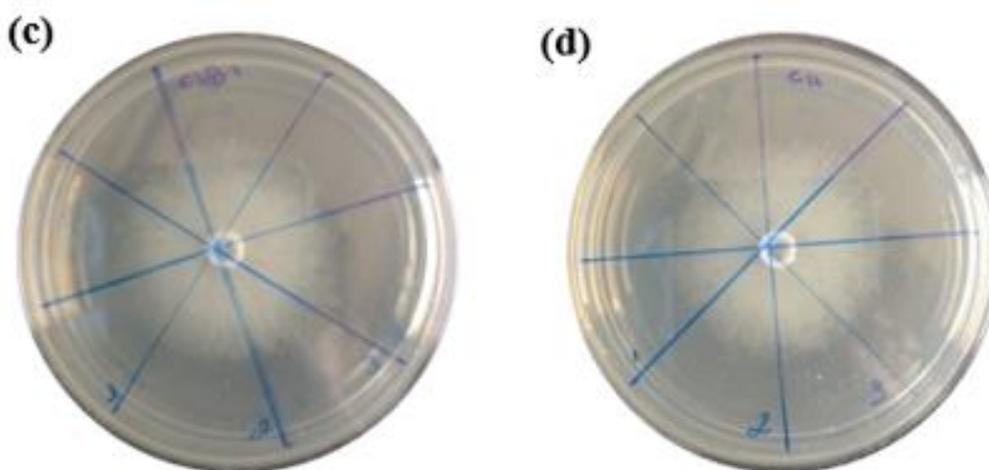
Uma quitinase de arroz recombinante foi relada com atividade fungicida sobre diferentes fungos, incluindo *R. stolonifer*. A interferência da quitinase no crescimento dos fungos foi avaliada em placas contendo meio BDA e a medição do crescimento micelial foi realizado após 48h. Em paralelo foram feitos testes determinando a perda de micélio dos fungos, e assim, confirmando a inibição do fungo (YAN et al., 2008).

Sendo assim, o teste preliminar realizado com as quitinases recombinantes de *Atta sexdens* não foi eficaz em meio BDA. Porém, levando em consideração a potencial inibição do fungo pela quitinase de arroz relatada na literatura, novos testes poderiam ser realizados em outras condições.

FIGURA 4.14. Crescimento micelial do fungo *R. stolonifer* submetido a diferentes tratamentos.

(a) controle negativo, (b) tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,0, (c) AsChtII-C4B1 e (d) AsChtII-C4B1-1.





O efeito das enzimas no crescimento do fungo foi também avaliado em meio líquido e para isto, enzimas foram aplicadas em ensaios em meio líquido contendo suspensão de esporos do fungo em solução salina para avaliar as melhores condições para os testes. Foram utilizados 100 $\mu$ g de cada enzima em  $6,5 \times 10^5$  esporos/mL, e também, foram preparados dois controles negativos sendo eles: solução salina e tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,0. As amostras em duplicata foram adicionadas em estufa à 28°C e agitação de 120rpm. Após 24h foi feita uma nova contagem de esporos na câmara de Neubauer para determinar o crescimento do fungo como mostra a Tabela 4.3.

TABELA 4.3. Contagem de esporos do fungo *R. stolonifer* submetido a diferentes tratamentos em 24h.

<b>Tratamento</b>	<b>Esporos/mL</b>
Solução salina	$7,5 \times 10^5$
Tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,0	$8,0 \times 10^5$
AsChtII-C4B1	$3,25 \times 10^5$
AsChtII-C4B1-1	$3,5 \times 10^5$

Os resultados mostram que as enzimas retardam o crescimento do fungo em mais de 50%, sendo redução de 57% pela enzima AsChtII-C4B1 e 53%

com AsChtII-C4B1-1. Este resultado é bastante promissor e pode ser melhorado com experimentos para otimização das condições como concentração das enzimas e tempo de atuação das mesmas, por exemplo.

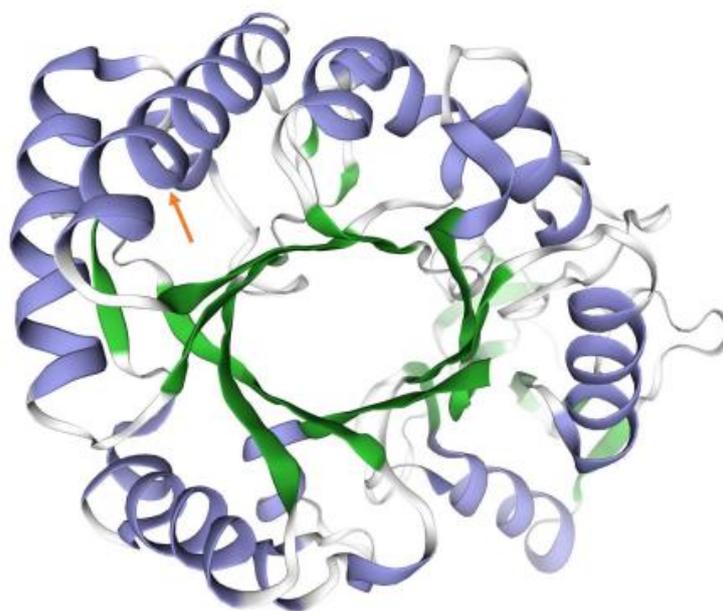
#### **4.7. Modelagem molecular por homologia**

Modelagem Molecular por Homologia é uma metodologia que permite a construção de modelos tridimensionais (estruturas teóricas) de proteínas cujas estruturas não foram determinadas experimentalmente. A metodologia assume que moléculas que apresentam alta identidade sequencial devem apresentar alta semelhança nas estruturas secundárias e terciárias. Assim, a partir da estrutura 3D conhecida de uma proteína (molécula molde) o programa constrói o modelo 3D da molécula de interesse e quanto maior a identidade entre as moléculas mais confiável é o modelo construído (GROMIHA, NAGARAJAN e SELVARAJ, 2019). Diferentes programas têm sido desenvolvidos para a construção de modelos estruturais baseado em Modelagem Molecular por Homologia e o SWISS-MODEL é um dos mais utilizados (SCHWEDES *et al.*, 2003) por ser bem simples de usar não havendo necessidade de baixar o programa no computador. O arquivo de entrada para o programa é a sequência de aminoácidos da proteína a ter sua estrutura construída e o programa faz busca por sequências com similaridade (com a ferramenta BLAST) de proteínas cuja estrutura 3D esteja depositada em banco de dados e usa métodos computacionais para construir o modelo 3D. No SWISS-MODEL o usuário pode selecionar a opção de busca por moléculas com similaridade e depois escolher qual molécula quer usar para construir o modelo ou então já seleciona a opção para o programa construir o modelo com a molécula molde que o programa escolher. Geralmente o programa constrói vários modelos, a partir de diferentes estruturas depositadas e o usuário pode analisar a lista de saída e verificar qual é o melhor.

Para construir o modelo 3D da enzima AsChtII-C4B1-1, o arquivo de entrada do programa foi a sequência da enzima optando-se para que o programa

selecionasse as moléculas moldes e criasse o(s) modelo(s). Na primeira estrutura 3D modelada para a AsChtII-C4B1-1 a sequência de somente o domínio catalítico foi usado, visto que este domínio é encontrado em muitas estruturas 3D determinadas e depositadas de diferentes quitinases. Foi construído o modelo baseado na estrutura de uma quitinase do grupo II de *Ostrinia furnicalis* (PDB 5y29), com 64,93% de identidade com o domínio catalítico da AsChtII-C4B1-1 (Figura 4.15). O modelo apresentou bons parâmetros de comprimento de ligação e ângulos, como avaliado por gráfico de Ramachandran (o próprio SWISS-MODEL já faz esta análise, não mostrada aqui). A estrutura do domínio catalítico da AsChtII-C4B1-1 adota o enovelamento barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> conservado nas enzimas da família 18 das glicosil hidrolases, GH18 (Figura 4.15).

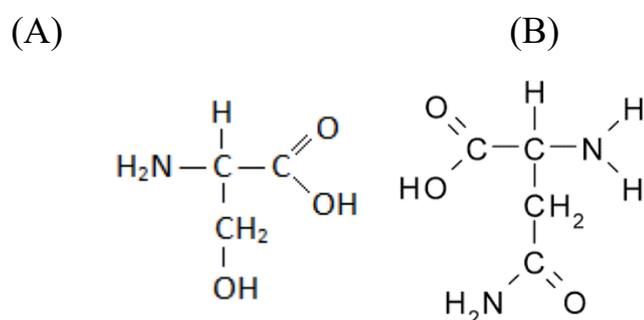
FIGURA 4.15. Modelo 3D do domínio catalítico da enzima AsChtII-C4B1-1 construído baseado na estrutura de uma quitinase de *O. furnicalis*.



O resíduo de aminoácido mutado na posição 51 em AsChtII-C4B1-1, uma arginina no lugar de uma serina em AsChtII-C4B1, encontra-se em uma das alpha-hélices (indicado pela seta na Figura 4.15). Os aminoácidos serina e arginina são classificados como contendo o grupo R polares não carregado (Figura

4.16), sendo que o grupo R da arginina apresenta um grupo  $-NH_2$  a mais. Considerando que este aminoácido está voltado para a superfície da molécula e não muito próximo ao sítio catalítico (indicado com a seta vermelha na Figura 4.15), sua presença poderia interferir, tanto devido ao seu maior tamanho quanto por polaridade, nas interações intermoleculares da enzima o que pode explicar as diferenças nos valores de pH e temperatura ótimos entre as enzimas.

FIGURA 4.16. Estruturas dos aminoácidos serina (a) e asparagina (b).

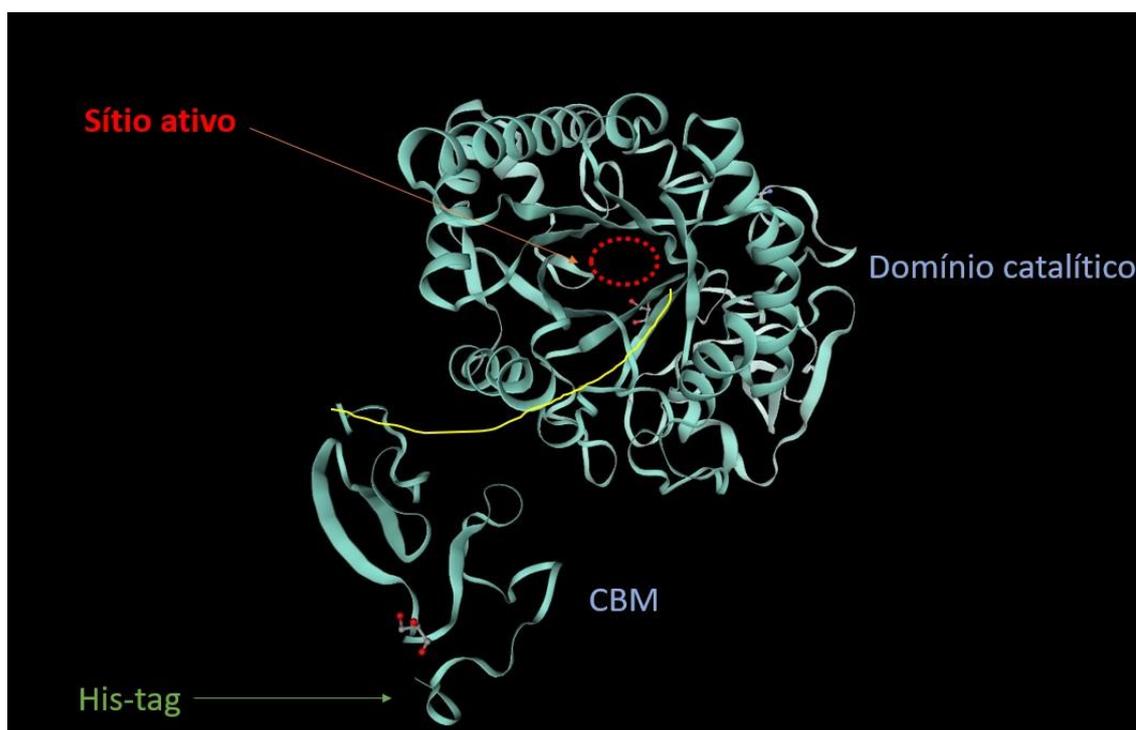


Ao usar a sequência completa da AsChtII-C4B1-1 (com domínio catalítico e CBM) para construir o modelo 3D, foram construídos 4 modelos 3D, sendo o melhor deles baseado na estrutura cristalográfica de uma Quitotriosidade humana (PDB 5HBF- FADEL *et al.*, 2016) cuja identidade com a AsChtII-C4B1-1 é de 76% (Figura 4.17). Quitotriosidases são quitinases humanas compostas por um domínio catalítico GH18 unido a um CBM, que estão envolvidas na resposta imune inata contra patógenos que contém quitinas humana ativas (FADEL *et al.*, 2016).

O sítio ativo do domínio catalítico está apontado pela seta vermelha na Figura 4.17. Os dois domínios, catalítico e CBM, encontram-se desconectados pois a estrutura depositada não apresentou densidade eletrônica para a completa determinação da estrutura, então o modelo também foi construído sem a região de ligação entre os dois domínios. Geralmente, regiões de alta mobilidade e movimentação não apresentam densidade eletrônica definida nos mapas de

densidade obtidos nos experimentos de difração de raios-X e este fato foi justificado para a falta de densidade eletrônica na estrutura da quitotriosidase. A linha em amarelo na Figura 4.18 indica qual aminoácido do domínio catalítico se conectaria com o CBM.

FIGURA 4.18. Modelo 3D da enzima AsChtII-C4B1-1 construído baseado na estrutura de uma quitotriosidase humana.



Nossos experimentos mostram que a enzima AsChtII-C4B1 tem aproximadamente 15,8% mais atividade do que AsChtII-C4B1-1 frente a quitina coloidal e atividade inibitória do crescimento do fungo estudado 4% maior do que AsChtII-C4B1-1. A inserção de 2 aminoácidos na região C-terminal da proteína AsChtII-C4B1-1, uma região de baixo enovelamento e flexível, poderia ou não interferir nas interações que a molécula faz com substrato, mas considerando nossos resultados podemos inferir que as mutações (substituição de uma serina por arginina e inserção de 2 aminoácidos na região C-terminal) podem ser responsáveis pelas diferenças nas propriedades e atividades das enzimas.

Ambas as enzimas interferiram em mais de 50% no crescimento do fungo nos experimentos realizados, demonstrando que são moléculas com potencial, podendo ser avaliadas frente a outros fungos e em outras condições experimentais.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

Apesar de o objetivo inicial do trabalho ter sido alterado, foi possível obter uma quitinase recombinante (AsChtII-C4B1-1) da formiga cortadeira *A. sexdens*, caracterizar sua atividade enzimática e determinar sua interferência no crescimento do fungo estudado. A enzima apresenta-se como uma quitinase mutante da AsChtII-C4B1, anteriormente estudada no LBFEE. Apesar da alta identidade as enzimas apresentam pH e temperatura ótimos diferentes. Os resultados mostram também que apesar de se tratar de enzimas com o mesmo domínio catalítico e CBM, são necessários 15,8% menos da quitinase AsChtII-C4B1 para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *N-Ac* em comparação com AsChtII-C4B1-1, ou seja, frente ao substrato quitina coloidal a AsChtII-C4B1 é mais ativa. Os ensaios biológicos realizados mostraram que as quitinases estudadas retardam em mais de 50% o crescimento do fungo *R. stolonifer* em meio líquido no período analisado. Estes resultados indicam que os experimentos podem ser otimizados para encontrar as melhores condições para uso das enzimas contra fungos.

## Referências Bibliográficas

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 chitinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 98, n. 16, p. 8979–8984, 2016.

ADRANGI S.; FARAMARZI M.A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 1786–1795, 2013.

ARAKANE Y.; MUTHUKRISHINAN S. “Insect chitinase and chitinase-like proteins”. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 67, pg. 201–216, 2010.

BRADFORD M. M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

CHEN, W. *et al.* “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.

CHEN, W.; JIANG, X.; YANG, Q. “Glycoside hydrolase family 18 chitinases: The known and the unknown”. *Biotechnology Advances*, v. 43, p. 107553, 2020.

CORREA, K. C. S. “Activity of a Recombinant Chitinase of the *Atta sexdens* Ant on Different Forms of Chitin and Its Fungicidal Effect against *Lasiodiplodia theobromae*”. *Polymers*, v. 16, p. 529, 2024.

CORREA, K. C. S. “Obtenção e Aplicação Biológica de Quitinasas Recombinantes da Formiga Cortadeira *Atta sexdens*”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar, 2023. Tese de doutorado.

DUKARIYA G.; KUMAR A. “Distribution and Biotechnological Applications of Chitinase: A Review”. *International Journal of Biochemistry and Biophysics*, v. 8 p. 17-29, 2020.

FADEL, F. *et al.* “X-Ray Crystal Structure of the Full Length Human Chitotriosidase (CHIT1) Reveals Features of Its Chitin Binding Domain”. *Plos One*, 2016.

FILHO S. H. A. *et al.* “Physical and chemical properties, biological activities and results obtained after medical use of chitosan and its derivatives”. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n.12, p. 95250-95270, 2020.

FUKAMIZO T.; KRAMER K. J. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochem.* v. 15, p. 141–145, 1985.

GROMIHA M. M.; NAGARAJAN R.; SELVARAJ S. “Protein Structural Bioinformatics: An Overview”. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, v. 2, p. 445-459, 2019.

HAHN T. *et al.* “Current state of chitin purification and chitosan production from insects”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 95, p. 2775-2795, 2020.

HAMID R. *et al.* “Chitinases: An update”. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, v. 5, p.21-29, 2013.

HOSSIN M. A. *et al.* “A review of polymeric chitin extraction, characterization, and applications”. *Arabian Journal of Geosciences*, v. 14, n.1870, 2021.

JIRAN L. *et al.* “Chitin and chitin-based biomaterials: A review of advances in processing and food applications”. *Carbohydrate Polymers*, v. 299, 2023.

KABIR, K.E. *et al.* Effect of *Bombyx mori* Chitinase against Japanese Pine Sawyer (*Monochamus alternatus*). Adults as a Biopesticide, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, p. 219-229, 2006.

KARBALAEI M.; REZAEI S. A.; FARSIANI H. “*Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins”. *Journal of Cellular Physiology*, p. 1-15, 2020.

KHOUSHAB F.; YAMABHAI M. “Chitin Research Revisited”. *Marine Drugs*, v. 8, n. 7, p. 1988-2012, 2010.

LE B.; YANG S. H. “Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p.144, 2019.

LECOINTE K.; *et al.* “Polysaccharides Cell Wall Architecture of Mucorales”. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019.

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.

MAHMOOD S. *et al.* “Novel insecticidal chitinase from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*”. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 159, p. 394-401, 2020.

MCILVAINE T. C. “A Buffer solution for colorimetric comparison”. *Journal of Biological Chemistry*, v. 49, p. 183–186, 1921.

MEDEIROS, E. V. *et al.* Eficiência de fungicidas no controle “in vitro” de *Monosporascus cannonballus*. *Caatinga*, v. 19, p. 360-368, 2006.

MERZENDORFER H. “Insect-Derived Chitinases”. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v.136, p. 19–50, 2013.

MERZENDORFER. H. & ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol*, v. 206, p. 4393–4412, 2003.

MICOCCI K. C.; *et al.* “Identification, cloning, and characterization of a novel chitinase from leaf-cutting ant *Atta sexdens* An enzyme with antifungal and insecticidal activity”. *BBA – General subjects*, 1867, 2023.

MILLER G. L. “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar”. *Analytical Chemistry*, v. 31, p 426–428, 1959.

MUSHI N. E. “A review on native well-preserved chitin nanofibrils for materials of high mechanical performance”. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 178, p. 591-606, 2021.

MUTHU M. *et al.* “Crustacean Waste-Derived Chitosan: Antioxidant Properties and Future Perspective”. *Antioxidants*, v. 10, 2021.

PORIA V.; *et al.* “Current Perspectives on Chitinolytic Enzymes and Their Agro-Industrial Applications”. *Biology*, v. 10, p. 1319, 2021.

RAFIEI V.; VELEZ H.; TZELEPIS G. “The Role of Glycoside Hydrolases in Phytopathogenic Fungi and Oomycetes Virulence”. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 17, p. 9359, 2021.

RATHORE, A.S.; GUPTA, R.D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Research*, v. 2015, p. 1-8, 2015.

RENART, J.; REISER, J.; STARK, G.R. “Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.76, p. 3116-3120, 1979.

SCHWEDE, T. *et al.* “MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server”. *Nucleic Acids Res*, v. 31, p 3381-3385, 2003.

SHAMSHINA J. L.; BERTON P. Julia L.; ROGERS R. D. “Advances in Functional Chitin Materials: A Review”. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 7, p. 6444–6457, 2019.

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, p. 101289, 2019.

SKUJINS J. J.; *et al.* “Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and  $\beta$ -(1→3) glucanase”. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 111, p. 358-364, 1965.

TSURKAN M. V. “Progress in chitin analytics”. *Carbohydrate Polymers*, v. 252, 2021.

VAGHELA B.; *et al.* “Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 159, 2022.

XUAN C. *et al.* “Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Chitinase Genes in Watermelon under Abiotic Stimuli and *Fusarium oxysporum* Infection”. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 1, p. 638, 2024.

YAN *et al.* In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology*, v. 48, p. 293-301, 2008

ZARGAR V.; ASGHARI M.; DASHTI A. “A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives and Applications”. *ChemBioEng Rev*, v. 2, p. 204–226, 2015.

## ANEXOS

### Alinhamento entre AsChtII-C4B1-2 e domínios catalítico e CBM da formiga *Acromyrmex echinator* feito no Clustal ômega.

```

Acromyrmex      -fkviccyftnwawyrqeggrfvpedidpdlcthvlygfsvldgssltmkshdpwadidnk 59
C4B1-1          EFKVICYFTNWAWYRQEGGKFPEDIDPDLCTHVLYGFSVLDGSSLTMKSHDPWADIDNK 60
                *****:*****

Acromyrmex      fydrvaafkakglkvlmalggwnsagdkysrlvnsparrkfitqlllfiekygfegld 119
C4B1-1          FYDRVAAFKAKGLKVLMALGGWNDSAGDKYSRLVNSPARRRFITQLLLFIEKYDFEGLD 120
                *****:*****

Acromyrmex      ldweypvcwqvdcnkqpesdkqsfaelikelrdefkprglllsaavspkrvidagydv 179
C4B1-1          LDWEYPVCWQVDCNKGPEQSDKQSF AELIKELRDEFKPRGLLLSAAVSPKRVIDAGYDVP 180
                *****

Acromyrmex      tlskyldwisvmtfydfhgqwdkktghvaplyslpndweptfnanfsihywiekganpkl 239
C4B1-1          TLSKYLDWISIMTYDFHGQWDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANFSIHYWIEKGANPKKL 240
                *****:*****

Acromyrmex      imgaplygqsfslaernvhglnaptygggeageatrargflsyyeicertlkkgwtvvqd 299
C4B1-1          IMGVPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYYEICERTLKKGWTVVQD 300
                ***.*****

Acromyrmex      kerrigpyaykgdqwvsfddaqqiklkaelikkklglgggmiwaldlddfknrcgcepspl 359
C4B1-1          KERRIGPYAYKGDQWVSFDDAQQIKLKAELIKKLDLGGGMIWALDLDDFKNRCGCEPSPL 360
                *****

Acromyrmex      lrtmnrvlrnypkgplcpitegtevviidvdqsniestts-----prptyippati 410
C4B1-1          LRTMNRVLRNYPKGPLCPITEGTEVVIIDVDQSNIESTTVTERPIYESTTSPTYIPPATI 420
                *****:*****

Acromyrmex      ptttelnpdiddtieieasplppadcgghlfishksdctkyylcnfgkiseqscppglyw 470
C4B1-1          PTTTELDPDIDDTIEIEASPLPPADCGGHLFISHKSDCTKYLLCNFGKISEQSCPSGLYW 480
                *****:*****

Acromyrmex      nedrcdwpentkckt---          485
C4B1-1          NEDRCDWPENTKCKTAEA          498
                *****

```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

```

1: Acromyrmex  100.00   97.32
2: C4B1-1      97.32   100.00

```

## N-Glicosilação

Asn-Xaa-Ser/Thr sequons in the sequence output below are highlighted in **blue**.  
Asparagines predicted to be N-glycosylated are highlighted in **red**.

```

Name: Sequence          Length: 520
EFKVICYFTNWAAYRQEGGKFVPEDIDPDLCTHVLYGFSVLDGSSLTMKSHDPWADIDNKFYDRVAAFKAKGLKV
LMALG          80
GWNDSAGDKYSRLVNSPSARRRFITQLLLFIEKYDFEGLDLDWEYPVCWQVDCNKGPESDKQSFAELIKELRDEF
KPRGL          160
LLSAAVSPSKRVIDAGYDVPTLSKYLDWISIMTYDFHGQWDKKTGHVAPLYSLPNDWEPTFNANSIHYWIEKGA
NPKKL          240
IMGVPLYGQSFSLAERNVHGLNAPTYGGGEAGEATRARGFLSYEICERTLKKGWTVVQDKERRIGPYAYKGDQW
VSFDD          320
AQQIKLKAELIKKLDLGGMIWALDLDLDFKNRCGCEPSPLLRTMNRVLRNYPKGPLCPITEGTEVVIIDVDQSNI
ESTTV          400
TERPIYESTTSPTYIPPATIPTTTELDPDIDDTIEIEASPLPPADCGGHLFISHKSDCTKYYLCNFGKISEQSCP
SGLYW          480
NEDRCDWPENTKCKTAEALEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH
.....
.....          80
..N.....
.....          160
.....N.....
.....          240
.....          320
.....          400
.....          480
.....
560

```

## O-glicosiação

```

##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 24-2-5
##Type Protein
#seqname      source  feature start  end    score  strand  frame
  comment
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  9      9
0.0812034    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  32     32
0.00496124  .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  39     39
0.0611832   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  44     44
0.0200246   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  45     45
0.0275852   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  47     47
0.0169361   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  50     50
0.147123    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  85     85
0.0474274   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  91     91
0.101944    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  96     96
0.297879    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  98     98
0.429628    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  105    105
0.0475441   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  139    139
0.0912286   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  143    143
0.0880571   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  163    163
0.115512    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  167    167
0.233528    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  169    169
0.289726    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  181    181
0.0378183   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  183    183
0.0138628   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  190    190
0.0290076   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  193    193
0.0155802   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  204    204
0.128478    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  212    212
0.292085    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  220    220
0.14727     .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  226    226
0.0329908   .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  250    250
0.124291    .      .
SEQUENCE      netOGlyc-4.0.0.13  CARBOHYD  252    252
0.0497256   .      .

```

SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	265	265
	0.787287 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	275	275
	0.444001 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	282	282
	0.110257 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	290	290
	0.0705848 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	296	296
	0.0529141 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	317	317
	0.0218644 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	358	358
	0.110133 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	363	363
	0.465836 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	380	380
	0.451643 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	383	383
	0.519238 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	393	393
	0.814701 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	397	397
	0.924965 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	398	398
	0.898729 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	399	399
	0.783616 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	401	401
	0.970932 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	408	408
	0.97608 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	409	409
	0.98036 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	410	410
	0.879736 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	411	411
	0.890003 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	413	413
	0.952479 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	419	419
	0.980964 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	422	422
	0.835655 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	423	423
	0.841721 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	424	424
	0.833718 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	433	433
	0.444226 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	439	439
	0.85365 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	453	453
	0.610853 . .	#POSITIVE		
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	456	456
	0.150203 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	459	459
	0.0601071 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	470	470
	0.0966275 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	473	473
	0.185512 . .			

SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	476	476
	0.096423 . .			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	491	491
	0.56106 . . #POSITIVE			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	495	495
	0.681938 . . #POSITIVE			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	505	505
	0.743493 . . #POSITIVE			
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	511	511
	0.657424 . . #POSITIVE			

---