

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

**“CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASES EXPRESSAS EM  
DIFERENTES ESTÁGIOS DE  
DESENVOLVIMENTO DA FORMIGA CORTADEIRA *ATTA  
SEXDENS*”**

**Izabella Rodrigues Fonseca da Silva\***

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

**Orientador(a): Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza**

**\* bolsista CNPq**

**São Carlos - SP  
2025**



# 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 Izabella Rodrigues Fonseca da Silva, realizada em 25/08/2025.


### Comissão Julgadora:


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

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda Canduri (USP)

Documento assinado digitalmente  
 **DULCE HELENA FERREIRA DE SOUZA**  
Data: 18/11/2025 15:54:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
 **FELIPE CHRISTOFF WOUTERS**  
Data: 11/11/2025 12:04:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
 **FERNANDA CANDURI**  
Data: 13/11/2025 10:39:26-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar e capacitar para seguir nesta jornada tão árdua.

À minha família, especialmente meu pai e minha irmã, que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

À minha orientadora, professora Dulce, pela orientação, suporte, atenção e paciência.

Ao professor Odair da UNESP, pelo fornecimento das formigas e pupas.

Aos professores Felipe Wouters e Fernanda Canduri por contribuírem com tanto entusiasmo para o aperfeiçoamento do trabalho.

Aos meus amigos, especialmente a Larissa, Lullie, Victória, Cecília e Lulliana, que trouxeram graça, leveza e companheirismo aos meus dias em São Carlos.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar, pelo conhecimento transmitido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a conclusão desta dissertação.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Características gerais dos grupos de quitinases da família GH18. .....	11
TABELA 1.2 – Lista de quitinases secretadas em diferentes organismos e suas possíveis aplicações.....	13
TABELA 3.1 – Soluções utilizadas para a obtenção do extrato bruto da Quit- ASOA. ....	21
TABELA 4.1 – Avaliação da atividade da Quit-ASOA em diferentes condições de extração. ....	29
TABELA 4.2 – Fator de purificação e rendimento obtidos com a purificação da Quit-ASOA.....	35
TABELA 4.3 – Atividade específica dos picos P1, P2 e P3 resultantes da purificação parcial da Quit-ASP .....	41
TABELA 4.4 – Parâmetros termodinâmicos para a desativação térmica da Quit- ASOA. ....	49
TABELA 4.5 – Peptídeos identificados na estrutura primária da Quit-ASOA na análise por espectrometria de massas.....	52

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura da quitina. ....	3
FIGURA 1.2 – Representação das formas polimórficas da quitina.....	4
FIGURA 1.3 - Representação das estruturas das quitinases GH18 e GH19.....	6
FIGURA 1.4 – Mecanismos gerais de hidrólise ácida enzimática de quitina pelo mecanismo de retenção da estereoquímica, característico das quitinases GH18, e de inversão, característico de quitinases GH19. ....	8
FIGURA 1.5 – Mecanismo de hidrólise enzimática da quitina com retenção da estereoquímica, realizado pelas quitinases da família GH18.....	9
FIGURA 1.6 – Análise das sequências através do programa SMART.. ....	16
FIGURA 4.1 – Cromatograma relativo à cromatografia em coluna DEAE-FF do EE-ASOA.....	32
FIGURA 4.2 – Cromatograma relativo à cromatografia de exclusão molecular da Quit-ASOA utilizando a coluna Superdex 200. ....	33
FIGURA 4.3 – Análise em SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da Quit-ASOA.....	34
FIGURA 4.4 – Perfis de eluição das amostras Quit-ASOA e BSA 1 mg/mL da coluna Superdex 200. ....	36
FIGURA 4.5 – Estrutura tridimensional da quitinase de <i>T. suis</i> . Em destaque, a ligação dissulfeto formada pela cisteína na posição 180 que estabiliza a formação do dímero (A.1), e o domínio catalítico dessa enzima (A.2). ....	37
FIGURA 4.6 – Análise em SDS-PAGE 8% das amostras de Quit-ASOA na presença e ausência de $\beta$ -mercaptoetanol, poços 2 e 3, respectivamente; M: marcador de peso molecular (kDa). ....	38
FIGURA 4.7 – Análise em SDS-PAGE 12% das amostras de Quit-ASP. M: Marcador de peso molecular (kDa); Poço 2: Extrato bruto das pupas; Poço 3: EE-ASP e Poço 4: <i>pellet</i> obtido com a precipitação com sulfato de amônio .....	39

FIGURA 4.8 – Cromatograma relativo à cromatografia de exclusão molecular do EE-ASP utilizando a coluna Superdex 200.....	40
FIGURA 4.9 – Análise em SDS-PAGE 8% das amostras de Quit-ASP após o uso da Superdex 200. Poço 1: Frações correspondentes ao P1; Poço 2: Frações correspondentes ao P2; Poço 3: Frações correspondentes ao P3; M: Marcador de peso molecular (kDa). .....	41
FIGURA 4.10 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da Quit-ASOA e estabilidade em diferentes pHs.....	42
FIGURA 4.11 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da Quit-ASP e estabilidade em diferentes pHs.....	43
FIGURA 4.12 – Efeito de íons metálicos sobre a atividade da Quit-ASOA, onde o controle (reação sem adição de metais) representa 100% de atividade. As barras de erro representam o desvio padrão.....	46
FIGURA 4.13 – Efeito de íons metálicos sobre a atividade da Quit-ASP, onde o controle (reação sem adição de metais) representa 100% de atividade. As barras de erro representam o desvio padrão.....	46
FIGURA 4.14 – Comportamento cinético da Quit-ASOA frente ao substrato quitina coloidal. A velocidade é dada em função da liberação de <i>N</i> -acetilglicosamina na reação (expressa em mg/mL/min). A linha pontilhada vermelha representa o ajuste ao modelo de Michaelis-Menten.....	47
FIGURA 4.15 – Estabilidade térmica da Quit-ASOA em diferentes temperaturas (60, 70, 80 e 90 °C). A atividade da amostra controle (tempo 0) foi definida como 100% de atividade. ....	49
FIGURA 4.16 – Alinhamento entre as três sequências molde dos domínios de ligação à quitina do tipo 2 (CBD2) de quitinases de artrópodes do banco de dados usado na análise de dados MS-MS da Quit-ASOA. As sequências correspondem ao CBD2 de <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>Hermetia illucens</i> e de <i>Orchesella cincta</i> . ....	54

FIGURA 4.17 – Alinhamento de três peptídeos identificados na sequência da Quit-ASOA com as sequências do CBD2 de quitinases de *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hermetia illucens* e de *Orchesella cincta*..... 54

## RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE QUITINASES EXPRESSAS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DA FORMIGA CORTADEIRA *ATTA SEXDENS*. Quitinases (E.C.3.2.1.14) são enzimas que degradam a quitina, um homopolissacarídeo encontrado na parede celular de fungos, no exoesqueleto de insetos e em outros organismos eucarióticos inferiores. Devido ao seu papel enzimático na hidrólise da quitina, as quitinases de insetos desempenham funções essenciais durante a muda, proliferação celular, defesa imune e também na obtenção de nutrientes. Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar quitinases expressas pela formiga cortadeira *Atta sexdens* em dois estágios distintos do ciclo de vida: pupa (Quit-ASP) e adulta/operária (Quit-ASOA). A extração das quitinases foi realizada por maceração de 400 mg de formigas em 2 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo 0,1% de Tween 20. Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido a três etapas de purificação: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia por troca aniônica e exclusão molecular. O pH e a temperatura ótimos de atividade foram determinados utilizando quitina coloidal como substrato. A Quit-ASOA, que apresentou massa molecular aparente de 70 kDa por SDS-PAGE, demonstrou alta estabilidade térmica. Além disso, demonstrou atividade ótima em pH 6,0 e temperatura ótima de 50 °C. A Quit-ASP, por sua vez, apresentou pH ótimo de 9,0 e temperatura ótima de 55 °C. Ambas as quitinases tiveram sua atividade aumentada na presença de certos íons metálicos. A análise por espectrometria de massas da estrutura primária da Quit-ASOA indicou a presença de domínio de ligação a quitina. Este estudo demonstrou que *A. sexdens* expressa diferentes quitinases na fase pupal e adulta.

**Palavras-chave:** Quitinase, *Atta sexdens*, operária, pupa

## ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF CHITINASES EXPRESSED AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT IN THE LEAF-CUTTING ANT *ATTA SEXDENS*. Chitinases (E.C.3.2.1.14) are enzymes that break down the chitin, a homopolysaccharide found in the cell walls of fungi, exoskeletons of insect, and in other lower eukaryotic organisms. Because of their enzymatic role in chitin hydrolyzation, insect chitinases have essential functions in molting, cell proliferation, immune defense, and providing nutrition. This study aimed to isolate and characterize chitinases expressed by the leaf-cutting ant *Atta sexdens* at two distinct stages of its life cycle: pupa (Chi-ASP) and adult/worker (Chi-ASOA). Chitinases were extracted by macerating 400 mg of ants in 2 mL of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1% Tween 20. After centrifugation, the supernatant was subjected to three purification steps: ammonium sulfate precipitation, anion-exchange chromatography, and size-exclusion chromatography. The optimal pH and temperature for activity were determined using colloidal chitin as the substrate. Chi-ASOA, which displayed an apparent molecular mass of 70 kDa by SDS-PAGE, showed high thermal stability, with optimal activity at pH 6.0 and an optimal temperature of 50 °C. Chi-ASP, in contrast, exhibited an optimal pH of 9.0 and an optimal temperature of 55 °C. Both chitinases had their activity enhanced in the presence of certain divalent metal ions. Mass spectrometry analysis of the Chi-ASOA primary structure indicated the presence of a chitin-binding domain. This study demonstrated that *A. sexdens* expresses distinct chitinases during the pupal and adult stages.

**Key Words:** Chitinase, *Atta sexdens*, worker ant, pupa

## Sumário

1 -	Introdução .....	1
1.1 -	Desenvolvimento e organização social da espécie <i>Atta sexdens</i> .....	1
1.2 -	Quitina: estrutura e função .....	2
1.3 -	Quitinases .....	5
1.3.1 -	Mecanismos de hidrólise enzimática da quitina .....	7
1.3.1 -	Quitinases de insetos .....	9
1.4 -	Aplicações de quitinases .....	12
1.5 -	Estudos com enzimas recombinantes envolvidas no metabolismo de quitina de <i>A. sexdens</i> .....	14
2 -	Objetivos .....	18
2.1 -	Objetivos específicos .....	18
3 -	Materiais e métodos .....	19
3.1 -	Obtenção e armazenamento dos insetos .....	19
3.2 -	Preparo da quitina coloidal .....	19
3.3 -	Ensaio para determinação de atividade quitinolítica .....	19
3.4 -	Obtenção das quitinases nativas de <i>A. sexdens</i> .....	20
3.4.1 -	Precipitação com sulfato de amônio .....	21
3.4.2 -	Purificação da quitinase de operária (Quit-ASOA) .....	22
3.4.2.1 -	Cromatografia em coluna de troca iônica .....	22
3.4.2.2 -	Cromatografia em coluna de exclusão molecular .....	23
3.4.3 -	Purificação da quitinase de pupa (Quit-ASP) .....	23
3.4.3.1 -	Cromatografia em coluna de exclusão molecular .....	23
3.5 -	Dosagem de proteínas totais .....	24
3.6 -	Caracterização bioquímica das quitinases .....	24
3.6.1 -	Interferência do pH e temperatura na atividade quitinolítica .....	24
3.6.2 -	Influência de íons metálicos .....	25
3.6.3 -	Determinação dos parâmetros cinéticos .....	25
3.6.4 -	Determinação dos parâmetros termodinâmicos .....	25

3.7 -	Análise da Quit-ASOA por espectrometria de massas .....	26
3.8 -	Estudo teórico .....	27
4 -	Resultados e discussão.....	29
4.1 -	Avaliação de diferentes tampões e aditivos na eficiência da extração enzimática da Quit-ASOA .....	29
4.2 -	Purificação da Quit-ASOA .....	30
4.3 -	Avaliação da massa molecular da Quit-ASOA nativa .....	36
4.4 -	Purificação parcial da Quit-ASP .....	39
4.5 -	Caracterização bioquímica das quitinases .....	41
4.5.1 -	Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática.....	41
4.5.2 -	Influência de íons metálicos .....	45
4.5.3 -	Análise cinética da Quit-ASOA .....	47
4.5.4 -	Análise da estabilidade térmica da Quit-ASOA.....	48
4.6 -	Análise da sequência da Quit-ASOA.....	50
5 -	Conclusões .....	55
6 -	Referências bibliográficas .....	57

## 1 - Introdução

### 1.1 - Desenvolvimento e organização social da espécie *Atta sexdens*

As formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera e família Formicidae, sendo um dos grupos animais mais abundantes e ecologicamente dominantes nos ecossistemas tropicais. Dentro desse grupo, as formigas cortadeiras representam aproximadamente 15% da tribo Attini, um clado especializado de formigas que praticam o cultivo de fungos. Esse subgrupo é caracterizado por uma elevada complexidade comportamental e por uma relação simbiótica altamente especializada. Dentre as cortadeiras, destacam-se os gêneros *Atta* (popularmente conhecidas como saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), ambos amplamente distribuídos na América do Sul. Esses insetos mantêm uma relação de mutualismo obrigatório com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, que cultivam em câmaras subterrâneas a partir de material vegetal fresco cortado pelas operárias. O fungo simbiote, por sua vez, constitui a principal fonte de alimento para a colônia, especialmente para as formas jovens e reprodutivas (BARRERA et al., 2022; FILHO, 2022; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A importância ecológica das formigas é amplamente reconhecida, uma vez que esses insetos desempenham funções essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas. Elas influenciam diretamente as propriedades físicas e químicas do solo, promovem sua aeração, contribuem para o acúmulo e a ciclagem de nutrientes, além de atuarem na polinização e dispersão de sementes (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). No entanto, apesar de seus benefícios ecológicos, algumas espécies podem assumir o papel de pragas, principalmente na agricultura. No Brasil, destaca-se a subespécie *Atta sexdens rubropilosa*, amplamente distribuída e considerada uma das principais responsáveis por prejuízos econômicos nesse setor. Diante desse cenário, intensificam-se os estudos voltados à biologia e fisiologia dessa formiga, especialmente porque ainda não se dispõe de métodos de controle que sejam, ao mesmo tempo, eficazes, seletivos e ambientalmente seguros (MARICONI, 1970). No entanto, ainda existem muitas limitações, pois *Atta cephalotes* e *Atta colombica* são as únicas espécies do gênero *Atta* que apresentam seus genomas sequenciados e depositados em bancos de dados públicos, restringindo o acesso a informações moleculares comparativas para outras espécies do grupo (MOREIRA, 2023).

Durante o desenvolvimento de uma nova colônia de *Atta sexdens*, o estágio inicial é a fundação do ninho, quando a rainha, após o voo nupcial, escava uma câmara subterrânea e introduz fragmentos do fungo simbiote oriundo do ninho original. Esse fungo é essencial para a sobrevivência da colônia, sendo cultivado desde os primeiros dias como fonte primária de alimento (AUGUSTIN et al., 2011). A rainha põe ovos que passam por quatro instares larvais, durante os quais as larvas crescem progressivamente e são alimentadas pelas operárias com secreções e fragmentos do fungo. A diferenciação em castas ocorre ainda no estágio larval e é influenciada por fatores nutricionais, hormonais e possivelmente epigenéticos. Após os estágios larvais, as formigas entram na fase de pupa, durante a qual ocorre a metamorfose completa e a formação das características morfológicas adultas (SOLIS et al., 2012).

Nas colônias de formigas cortadeiras, as operárias são responsáveis por uma ampla gama de tarefas, incluindo forrageamento, cuidado com a prole, manutenção da rainha, cultivo do fungo simbiote e defesa da colônia. Além disso, há atividades relacionadas à higiene, como o transporte de resíduos para áreas específicas do ninho e a reorganização do lixo nas pilhas de descarte, prevenindo a disseminação de patógenos (LACERDA et al., 2020).

A sociedade de *Atta sexdens* apresenta uma organização social altamente estratificada, com divisão de trabalho baseada tanto na idade das operárias (polietismo etário) quanto em seu tamanho corporal (polimorfismo). Segundo WILSON (1980), as operárias de *A. sexdens* são distribuídas em quatro castas físicas distintas, que executam até 29 tarefas diferentes. As operárias de tamanho médio, por exemplo, são especialmente eficientes nas atividades relacionadas ao corte, transporte e carregamento de material vegetal, sendo componentes-chave no processo de forrageamento (LACERDA et al., 2020; WILSON, 1980).

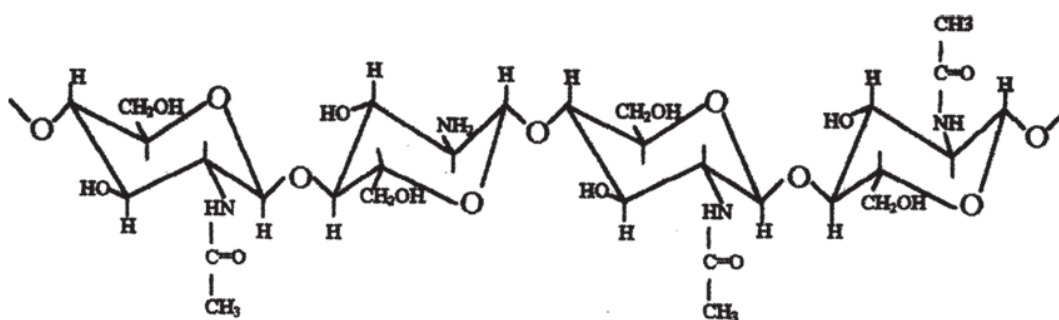
## **1.2 - Quitina: estrutura e função**

A quitina é o segundo biopolímero de ocorrência natural mais abundante no planeta, atrás da celulose, tendo sido isolada pela primeira vez em 1811 por Bradconnot a partir de cogumelos (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; PAZ; SANTOS, 2024). A quitina é amplamente distribuída em animais, particularmente em crustáceos, moluscos e insetos, constituindo-se como um dos principais componentes de seus exoesqueletos, e em certos fungos como o

principal polímero fibrilar na parede celular. Os artrópodes são particularmente especializados na síntese de quitina, produzindo concentrações elevadas de mais de 85% desse material (THARANATHAN; KITTUR, 2003). No reino vegetal, entretanto, sua ocorrência é bastante rara, tendo em vista que a maioria das plantas fotossintéticas utiliza polissacarídeos isentos de nitrogênio, como a celulose, para a constituição de suas estruturas de suporte. Ainda assim, a quitina também foi identificada em algumas algas verdes inferiores, como as clorofíceas. Além disso, a quitina desempenha um papel importante na interação entre fungos e plantas, sendo capaz de ativar mecanismos de defesa nas plantas hospedeiras (EGUSA et al., 2015; MALERBA; CERANA, 2019).

A quitina é um polímero linear natural composto por unidades repetidas de *N*-acetil-D-glicosamina (2-acetamido-2-desoxi-glicose, abreviado como NAc-Glc), unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; ROBERTS, 1992) (Figura 1.1). Na natureza, ocorre predominantemente em estado cristalino e insolúvel, podendo se apresentar sob três formas polimórficas distintas:  $\alpha$ -quitina,  $\beta$ -quitina e  $\gamma$ -quitina. Essas variações estruturais se diferenciam principalmente pela orientação das cadeias poliméricas de NAc-Glc, pela simetria das células unitárias, pelo grau de hidratação, pelo tamanho da unidade celular e pelo número de cadeias por célula unitária (GALANTE, 2008; RATHORE; GUPTA, 2015; WEI et al., 2021).

FIGURA 1.1 - Estrutura da quitina.

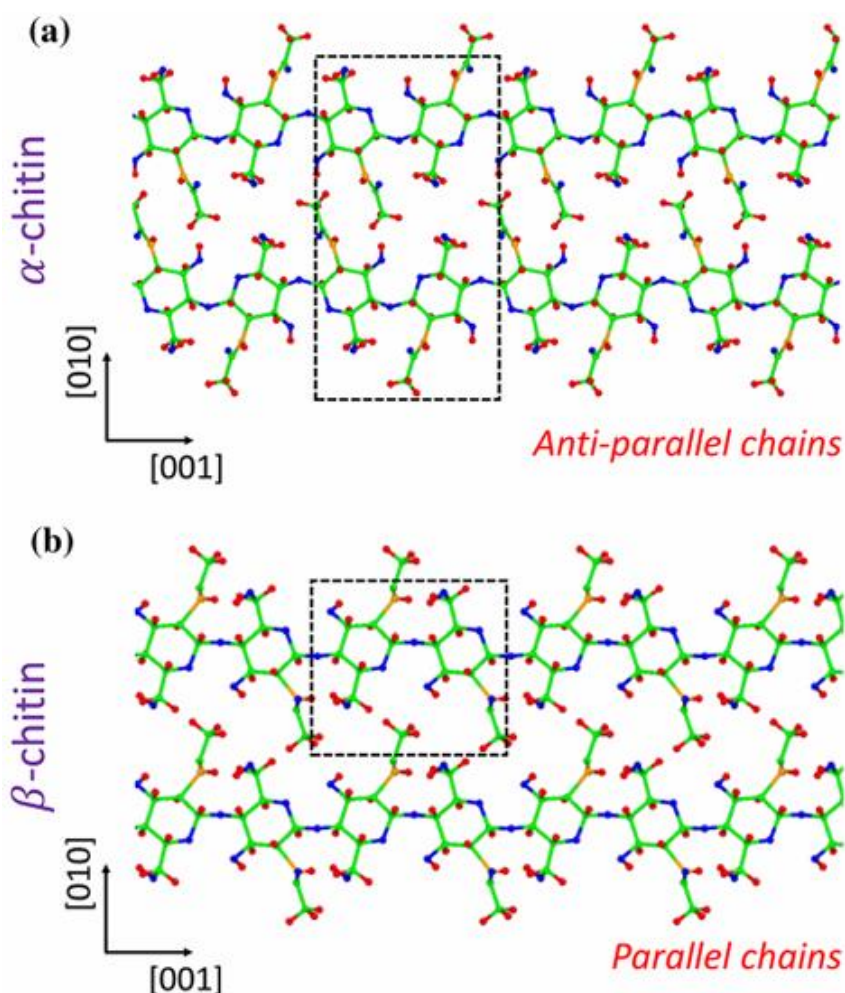


Fonte: (THARANATHAN; KITTUR, 2003).

A  $\alpha$ -quitina é a forma mais abundante, encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos e na cutícula de insetos. Sua célula unitária contém duas cadeias dispostas em orientação antiparalela, o que favorece a formação de

fortes ligações de hidrogênio contribuindo para sua alta estabilidade e cristalização, sendo altamente compacta (RATHORE; GUPTA, 2015) (Figura 1.2 a). A  $\beta$ -quitina, por sua vez, apresenta todas as cadeias orientadas paralelamente (Figura 1.2 b), o que leva a interações intermoleculares mais fracas, conferindo-lhe uma estrutura mais flexível e menos compacta; é tipicamente encontrada na pena (gládio) de lulas. Já a  $\gamma$ -quitina possui uma estrutura híbrida, composta por duas fitas paralelas alternadas com uma fita antiparalela, sendo identificada em estruturas específicas como os casulos de certos insetos (WEI et al., 2021).

FIGURA 1.2 – Representação das formas polimórficas da quitina. (a) cadeias antiparalelas da  $\alpha$ -quitina e (b) cadeias paralelas da  $\beta$ -quitina.



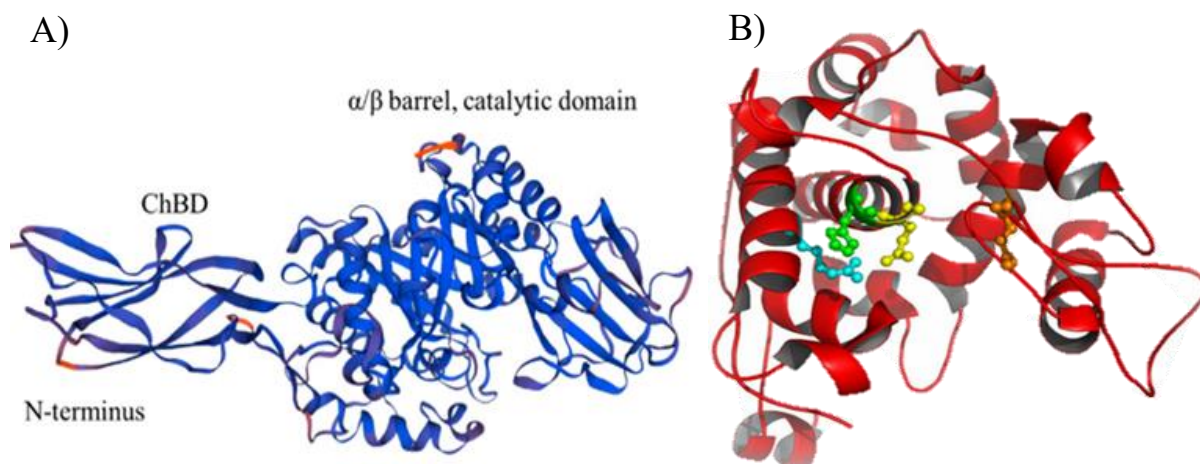
Fonte: (WEI et al., 2021).

### 1.3 - Quitinases

Quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas da classe das glicosil hidrolases (GH) responsáveis pela hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 entre unidades de *N*-acetil-D-glicosamina nas cadeias poliméricas de quitina (HAMID et al., 2013). De modo geral, quitinases se distinguem por sua preferência pela posição de clivagem na cadeia de quitina. As endoquitinases atuam aleatoriamente em regiões internas do polímero, gerando oligossacarídeos de baixo peso molecular, como chitotriose, chitobiose e diacetilchitobiose. Já as exoquitinases processam os produtos liberados pelas endoquitinases, promovendo a liberação sequencial de monômeros de NAc-Glc (*N*-acetilglicosaminidases), ou dímeros, a partir das extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia (chitobiosidases) (RATHORE; GUPTA, 2015).

Além da classificação com base na especificidade de substrato, as quitinases são agrupadas em diferentes famílias conforme a similaridade da sequência de aminoácidos, o que deu origem a três famílias de glicosil hidrolases: GH18, GH19 e GH20 (HAMID et al., 2013; RATHORE; GUPTA, 2015). As quitinases da família GH18 estão presentes em uma ampla variedade de organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, insetos, vertebrados e em certas plantas. Essas quitinases atuam por um mecanismo catalítico de retenção da configuração anomérica, e sua estrutura típica apresenta domínio catalítico do tipo barril  $\alpha/\beta$ , formado por oito hélices- $\alpha$  e oito folhas- $\beta$ , com resíduos catalíticos altamente conservados, além de domínios não catalíticos de ligação à quitina (CBD) (RATHORE; GUPTA, 2015; THIMOTEO, 2015) (Figura 1.3 a).

FIGURA 1.3 - Representação das estruturas das quitinases GH18 e GH19. (A) Chi18C de *Aeromonas sp.* SK15. Domínio catalítico da família 18 das glicosil hidrolases (GH18) formado pela estrutura de barril com hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$ . Domínio de ligação à quitina (ChBD); (B) Quitinase de mamão [PDB-id: 2BAA]. Domínio catalítico da família 19 das glicosil hidrolases (GH19) formado principalmente por hélices- $\alpha$



Fonte: Adaptado de (KIM et al., 2021; UDAYA PRAKASH et al., 2010).

As quitinases da família GH19, por sua vez, são encontradas predominantemente em plantas, com ocorrência limitada em algumas actinobactérias. Apresentam um mecanismo de inversão da configuração anomérica e estrutura rica em hélices alfa, estando frequentemente envolvidas em mecanismos de defesa vegetal contra fungos patogênicos. As quitinases das famílias GH18 e GH19 não apresentam similaridade significativa nas sequências de aminoácidos, e exibem estruturas tridimensionais (Figura 1.3 b) e mecanismos catalíticos distintos — indicativos de que essas enzimas evoluíram a partir de ancestrais diferentes, caracterizando um caso de evolução convergente. Já a família GH20 envolve as  $\beta$ -*N*-acetil-hexosaminidases de bactérias, certos fungos e humanos (RATHORE; GUPTA, 2015; THIMOTEO, 2015).

Devido à natureza altamente cristalina da quitina, a acessibilidade ao substrato é energeticamente desfavorável, tornando a associação inicial da enzima à cadeia polimérica um dos passos limitantes da hidrólise. Por essa razão, além do domínio catalítico, a presença de domínios adicionais de ligação ao substrato facilita a interação com a quitina, promovendo seu desprendimento parcial da

matriz cristalina e aumentando sua disponibilidade para o ataque enzimático (WATANABE et al., 1994).

Enzimas processivas como as quitinases geralmente apresentam fendas catalíticas longas e profundas, capazes de acomodar o substrato de maneira estável. Um alinhamento estratégico de resíduos aromáticos forma um caminho que conduz a cadeia polimérica do domínio de ligação até o domínio catalítico. Esses resíduos aromáticos desempenham papel fundamental no deslizamento da cadeia de quitina durante a ação processiva, estabelecendo interações hidrofóbicas não específicas com as superfícies dos anéis de piranose (ZAKARIASSEN et al., 2009). Esse tipo de interação garante uma ligação forte, porém dinâmica, permitindo que o substrato seja continuamente guiado para o sítio ativo. Embora a alta processividade reduza a quantidade de energia gasta na associação da enzima ao substrato, ela também pode limitar a taxa de hidrólise global (HORN et al., 2006; THIMOTEO, 2015).

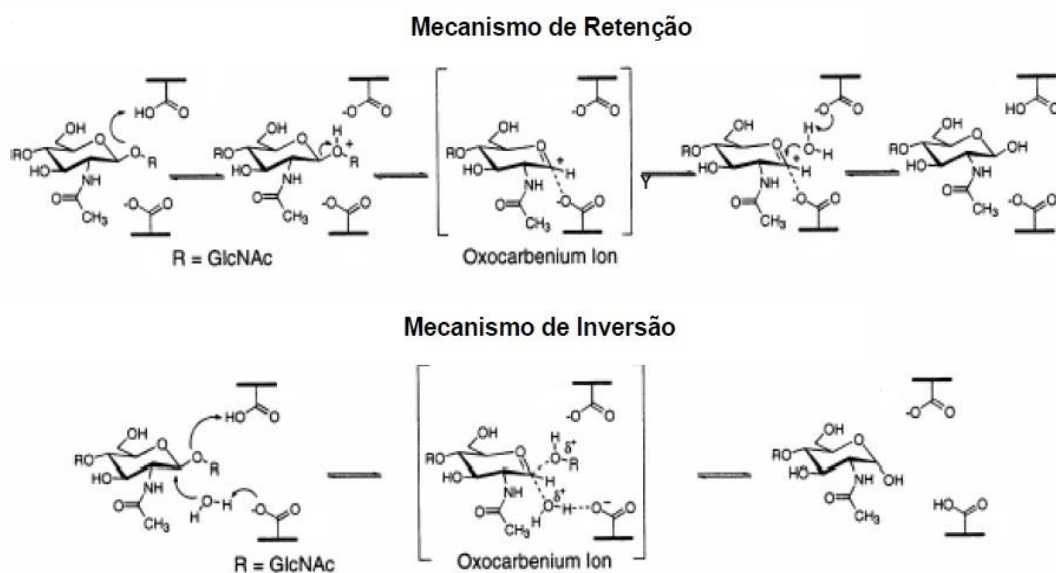
As quitinases desempenham diferentes funções fisiológicas a depender do organismo em que estão presentes. Em vertebrados, estão associadas à digestão de quitina no trato gastrointestinal; em insetos e crustáceos, participam da degradação parcial da cutícula durante processos de muda; em plantas, atuam como parte do sistema de defesa contra patógenos fúngicos; e em fungos, estão envolvidas em mecanismos de autólise e remodelamento da parede celular (GALANTE, 2008).

Tendo em vista que a quitina pode estar fortemente associada a pigmentos lipídicos, proteínas ou minerais em seu estado natural, o processamento desses materiais quitinosos envolve processos dispendiosos de desmineralização e desproteíntização pela ação de ácidos e bases fortes, que resultam em baixo rendimento e problemas de corrosão. Nesse contexto, o uso de quitinases e outras enzimas quitinolíticas são uma importante estratégia no tratamento de resíduos quitinosos, à medida que são enzimas biodegradáveis e de baixo custo (WEI et al., 2021).

### **1.3.1 - Mecanismos de hidrólise enzimática da quitina**

Existem dois mecanismos gerais de catálise ácida empregados por glicosil hidrolases na clivagem da quitina, resultando na retenção ou inversão da estereoquímica do carbono anomérico (C-1) do resíduo de NAc-Glc (Figura 1.4).

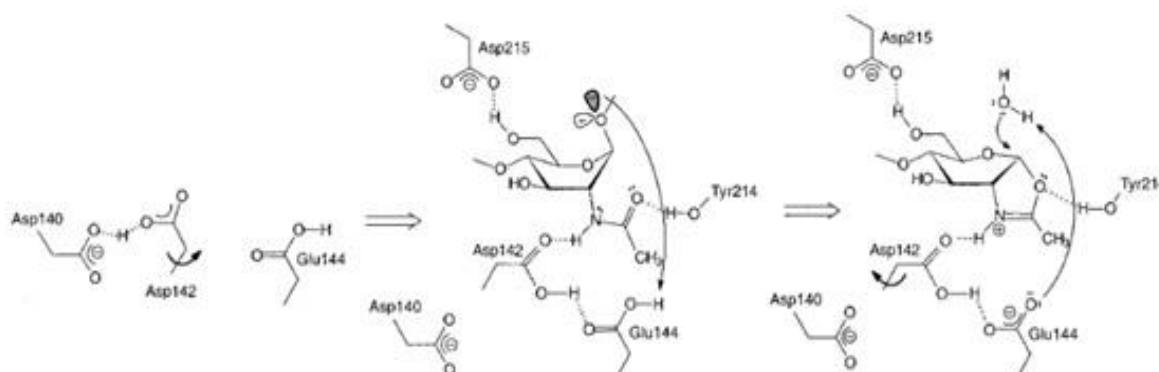
FIGURA 1.4 – Mecanismos gerais de hidrólise ácida enzimática de quitina pelo mecanismo de retenção da estereoquímica, característico das quitinases GH18, e de inversão, característico de quitinases GH19.



Fonte: (GALANTE, 2008).

No mecanismo de retenção da configuração, típico das quitinases da família GH18, o oxigênio glicosídico é protonado formando um intermediário iônico oxocarbenio estabilizado. Em seguida um segundo carboxilato promove o ataque nucleofílico nessa posição, ligando-se direta e temporariamente ao resíduo GlcNAc. Por último, uma molécula de água promove o segundo ataque nucleofílico, deslocando o grupo carboxilato e restaurando a configuração anomérica inicial (DAHIYA et al., 2006). Estudos mostraram que as quitinases GH18 possuem um mecanismo de catálise assistido pelo substrato, onde o intermediário oxocarbenio é estabilizado pelo grupo *N*-acetil adjacente, que pode ocorrer por interação eletrostática entre o C-1 e o oxigênio da carbonila ou por ligação covalente (Figura 1.5). Nesse mecanismo, não há participação do segundo carboxilato (FUKAMIZO, 2000; VAN AALTEN et al., 2001).

FIGURA 1.5 – Mecanismo de hidrólise enzimática da quitina com retenção da estereoquímica, realizado pelas quitinases da família GH18.



Fonte: (VAN AALTEN et al., 2001).

Por outro lado, no mecanismo de inversão da configuração anomérica, observado em quitinases da família GH19, o oxigênio glicosídico também é protonado, mas o ataque nucleofílico da molécula de água ocorre de forma simultânea, levando à formação do intermediário oxocarbênio. A estrutura cristalográfica dessas enzimas sugere que o segundo resíduo carboxilato catalítico encontra-se posicionado de maneira a coordenar eficientemente a molécula de água, viabilizando o ataque nucleofílico direto. Esse arranjo estrutural é compatível com um mecanismo de deslocamento simples, promovendo a inversão da estereoquímica no C-1 do açúcar clivado (DAHIYA et al., 2006).

### 1.3.1 - Quitinases de insetos

As quitinases de insetos, classificadas principalmente na família GH18, atuam quase exclusivamente como endoquitinases e estão envolvidas na degradação de matrizes extracelulares contendo quitina, como a cutícula e a matriz peritrófica, especialmente durante o processo de muda. Em algumas espécies, essas enzimas também desempenham função digestiva, particularmente quando a dieta inclui quitina. Diversos estudos relataram a presença de quitinases em fluidos de muda, venenos, glândulas e intestinos médios de insetos; no entanto, apenas as enzimas originadas dos dois primeiros — fluidos de muda e venenos — foram caracterizadas de maneira mais aprofundada (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997).

Insetos passam por mudas periódicas, nas quais descartam o exoesqueleto antigo, e também eliminam, de forma contínua ou periódica, suas membranas peritróficas, que são subsequentemente renovadas. Esse processo é mediado pela secreção de quitinases no fluido de muda, que se acumula no espaço entre a cutícula antiga e a epiderme, bem como nos tecidos do intestino. Os produtos de hidrólise contendo NAc-Glc são, em grande parte, reciclados para a biossíntese de uma nova cutícula. Frequentemente, as larvas ingerem e digerem a cutícula descartada (exúvia), cujos componentes também são reaproveitados. Esse comportamento ocorre simultaneamente ao período de expressão das quitinases no intestino. Dessa forma, as quitinases intestinais parecem exercer não apenas o papel de degradação da quitina presente no revestimento do intestino ou na membrana peritrófica, mas também uma função digestiva associada à reciclagem da exúvia (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997).

As quitinases da família GH18 apresentam uma organização estrutural multidomínio, composta por 1 a 5 domínios catalíticos do tipo GH18, 0 a 7 domínios de ligação à quitina ricos em cisteína (domínio peritrofina-A/CBM14) e regiões conectoras ricas em serina e treonina, que podem apresentar elevada glicosilação. Os domínios catalíticos de quitinases de inseto possuem quatro motivos altamente conservados: KXXXXXGGW, FDGXDLWEYP, MXYDXXG e GXXXWXXDXDD, onde X são aminoácidos não específicos. O resíduo de glutamato (E) no segundo motivo é mais importante devido ao seu papel como doador de prótons na clivagem da ligação glicosídica (ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010). Múltiplos domínios catalíticos podem funcionar de forma sinérgica para aumentar a atividade catalítica no processamento de exoesqueletos ou paredes celulares, os quais contêm grande quantidade de quitina, no entanto alguns dos domínios catalíticos podem ser inativos devido à substituição do resíduo aspártico por histidina ou serina (MICOCCI et al., 2023).

Os domínios de ligação à quitina em quitinases de artrópodes são do tipo 2, que contêm seis resíduos de cisteína conservados (HUANG et al., 2012). Além disso, a maioria, senão todas as quitinases possui um peptídeo sinal ou um domínio transmembrana, uma vez que são direcionadas ao espaço extracelular ou incorporadas à membrana plasmática, interagindo, em ambos os casos, com carboidratos presentes na matriz extracelular (ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010). Diante disso, as quitinases GH18 foram classificadas em dez grupos de acordo com análises filogenéticas e de domínios conservados (RABADIYA; BEHR, 2024). A tabela 1.1 apresenta as principais características dos oito primeiros grupos.

TABELA 1.1 – Características gerais dos grupos de quitinases da família GH18.

<b>Grupo</b>	<b>Nome típico / gene</b>	<b>Domínios principais</b>	<b>Função proposta</b>	<b>Localização / expressão</b>	<b>Características distintas</b>
<b>I</b>	Cht5	GH18 + CBD	Degradação da cutícula na muda	Fluido de muda, epiderme	Altamente conservado; induzido durante ecdise
<b>II</b>	Cht10	GH18 (múltiplos domínios), CBDs	Corte profundo da cutícula espessa	Epiderme, fluido de muda	Contém até 5 domínios GH18; enzima de grande porte
<b>III</b>	Cht7	GH18 + domínios transmembrana	Remodelamento da cutícula	Epiderme, tecidos anexos	Ligado à membrana; não secretado
<b>IV</b>	Cht12	GH18	Função incerta	Variável	Presente em apenas alguns táxons
<b>V</b>	Idgf	GH18 (inativo)	Sinalização / crescimento	Hemolinfa, tecidos em desenvolvimento	Cataliticamente inativas; ligadas ao crescimento de discos imaginários
<b>VI</b>	Cht6	GH18 + CBD	Desconhecida	Diversos tecidos	Estrutura modular semelhante à de outros grupos, porém pouco expressa
<b>VII</b>	Cht11	GH18	Remodelamento ou imunidade	Intestino, epiderme	Presente em alguns insetos com desenvolvimento incompleto
<b>VIII</b>	Cht8	GH18 + peptídeo sinal	Digestão intestinal	Intestino médio	Enzima secretada, rica em resíduos polares

GH18: glicosil transferase da família 18; CBD: domínio de ligação à quitina.

Fonte: (RABADIYA; BEHR, 2024).

## 1.4 - Aplicações de quitinases

Quitinases são úteis em diversas áreas da indústria, desde a biodegradação de quitina para a obtenção de produtos com maior valor agregado, assim como no desenvolvimento de agentes de biocontrole, na produção de agentes medicinais e tratamento de água (DUKARIYA; KUMAR, 2020; OYELEYE; NORMI, 2018). Compreender a relação entre as diversas características das quitinases e suas funções específicas é fundamental para o desenvolvimento de quitinases funcionais, projetadas para atender a aplicações biotecnológicas específicas (OYELEYE; NORMI, 2018). A Tabela 1.2 apresenta as principais propriedades relevantes e aplicações de quitinases extraídas de diferentes microrganismos.

Assim como a celulose, a quitina é considerada como um subproduto em muitas áreas da indústria, o que reforça a busca por estratégias de reaproveitamento desse biopolímero com o uso de quitinases. Nesse contexto, Inokuma et al. (2013) reportaram a maior eficiência do uso de monômeros de quitina (NAc-Glc) na produção de bioetanol em contraste com o uso direto de quitina (sólida ou coloidal) (INOKUMA et al., 2013). Além disso, a NAc-Glc é utilizada na produção de intermediários químicos e farmacêuticos e em produtos alimentares como adoçantes e fatores de crescimento (THIMOTEO, 2015).

O emprego de quitinases no biocontrole de microrganismos fitopatogênicos e entomopatogênicos fundamenta-se no fato de a quitina ser um componente estrutural essencial de suas paredes celulares. Assim, esses polímeros atuam como alvos para a ação de agentes biológicos, seja por meio de quitinases que promovem sua degradação, de inibidores da síntese de quitina ou pela atuação de microrganismos antagonistas (ISLAM; DATTA, 2015). Nesse contexto, existem relatos da ação única de quitinases ou combinada com fungicidas e inseticidas, sendo que nesse último caso a enzima ajudou a potencializar o efeito do agente químico, diminuindo sua concentração e efeitos tóxicos no meio ambiente (THIMOTEO, 2015). Um estudo demonstrou a atividade larvicida de endoquitinases do fungo *Myrothecium verrucaria* contra larvas de *Aedes aegypti*, reduzindo o tempo de sobrevivência desses organismos (MENDONSA et al., 1996). As quitinases de inseto também têm sido amplamente exploradas quanto ao seu potencial biopesticida (LIU et al., 2020). Além disso, na área de controle biológico, sabe-se que as plantas possuem um sistema de defesa complexo para se protegerem contra o ataque de fungos, no qual se destacam elementos importantes como quitinases. Com base nesse princípio, foram desenvolvidas

plantas transgênicas de tabaco contendo tanto suas próprias quitinases quanto um gene de quitinase proveniente do inhame, conferindo-lhes maior resistência a fitopatógenos (ISLAM; DATTA, 2015).

As quitinases também desempenham papéis importantes na regulação das respostas imunológicas celulares. Sabe-se que alérgenos e helmintos induzem a produção da quitinase ácida de mamíferos (AMCase), a qual atua como um elemento essencial para iniciar respostas imunes do tipo 2, responsáveis pela proteção contra nematoides intestinais. Em um experimento com camundongos deficientes em AMCase, observou-se que, quando infectados com os nematoides gastrointestinais contendo quitina, *Nippostrongylus brasiliensis* e *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, não houve o desenvolvimento de resposta imune do tipo 2 (VANNELLA et al., 2016).

TABELA 1.2 – Lista de quitinases secretadas em diferentes organismos e suas possíveis aplicações.

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte</b>	<b>Propriedade da quitinase</b>	<b>Possíveis aplicações</b>
<i>Paenibacillus sp.</i> e <i>Enterobacter sp.</i>	Sedimento de água doce	Alto peso molecular	Antifúngica
<i>Paenibacillus elgii</i> HOA73	Solo agrícola	Estável em ampla faixa de pH	Agricultura (agente antifúngico)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3	Solo	Estável em ampla faixa de pH e T < 55°C	Síntese de N-acetilglicosamina
<i>Bacillus pumilus</i> JUBCH08	Sedimento de praia	Termoestável e tolerante a álcalis	Biocontrole de fitopatógenos
<i>Aspergillus awamori</i>	Mel	Halotolerante	Aplicações industriais (imobilizada)
<i>Pseudoalteromonas sp.</i> DXK012	Sedimentos marinhos profundos	Termoestável	Aplicação industrial

<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Planta de amendoim	Estável em ampla faixa de pH e temperatura	Agricultura
<i>Ostrinia furnacalis</i>	Intestino médio	Estável em pH alto	Antifúngica

Fonte: Adaptado de (DUKARIYA; KUMAR, 2020).

### 1.5 - Estudos com enzimas recombinantes envolvidas no metabolismo de quitina de *A. sexdens*

Embora os insetos apresentem um número de quitinases superior ao de qualquer outro organismo (OYELEYE; NORMI, 2018), os estudos sobre essas enzimas ainda são consideravelmente menos numerosos que aqueles voltados para quitinases de bactérias e fungos. Essa discrepância decorre de desafios metodológicos relacionados à expressão e/ou purificação dessas proteínas, bem como da complexidade fisiológica dos insetos, incluindo a presença de múltiplas isoformas (ADRANGI; FARAMARZI, 2013). Essa lacuna de conhecimento limita a compreensão do papel funcional dessas enzimas em condições fisiológicas naturais e, conseqüentemente, não acessa seu potencial para aplicações em controle biológico e em diferentes processos biotecnológicos.

Em nosso grupo de pesquisa foram realizados diversos estudos bioquímicos relacionados ao metabolismo de quitina em formiga cortadeira *A. sexdens* (formiga saúva). O genoma dessa espécie ainda não foi sequenciado, no entanto, para amplificar sequências de interesse foram desenvolvidos *primers* baseados em uma espécie próxima, *Acromyrmex echinator* (formiga quenquém), que também é uma formiga cortadeira, já que essas regiões são altamente conservadas nesses insetos. MOREIRA et al. (2020) investigaram a expressão de sintases de quitina (CHS), enzimas essenciais na síntese de quitina, durante as fases de desenvolvimento dessa formiga. Foram identificados dois transcritos do gene CHS produzidos por *splicing* alternativo (AsCHS-A1 e AsCHS-A2) que apresentaram níveis de expressão mais altos em larvas e pupas, do que em operárias adultas. Neste estudo foi realizado o silenciamento gênico, através da técnica de interferência de RNA, tendo sido detectada uma pequena diminuição (18%) nos níveis do transcrito CHS em pupas o que acarretou em mudanças

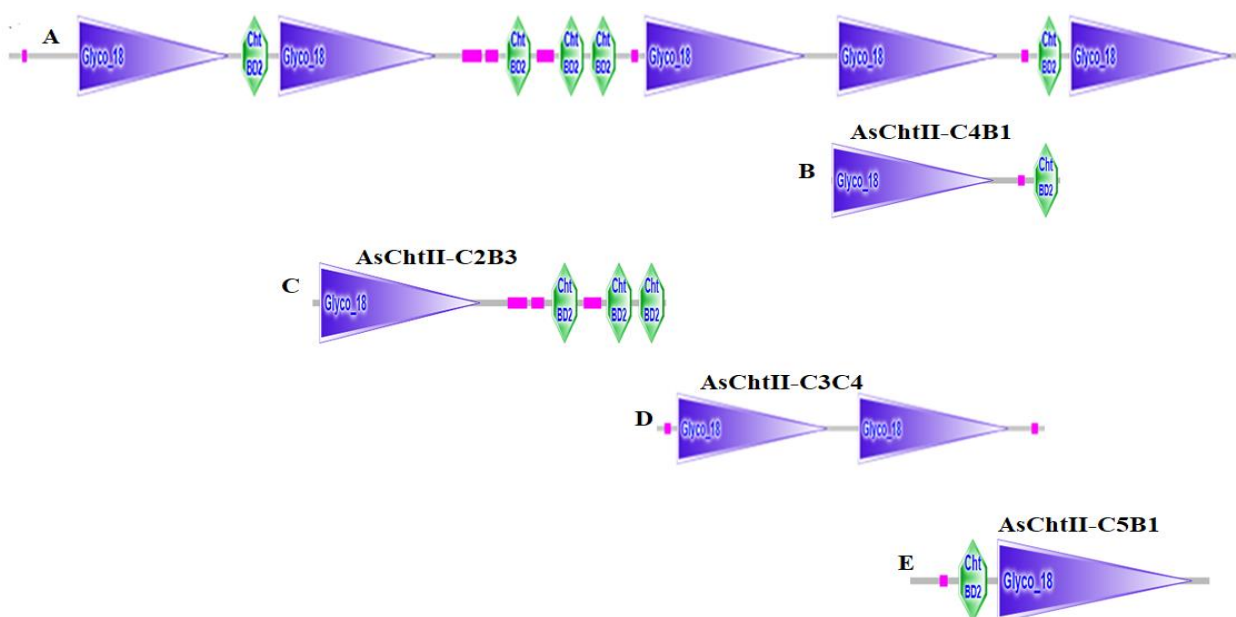
morfológicas no exoesqueleto, comprometendo o processo de endurecimento (esclerotização) da cutícula (MOREIRA et al., 2020).

Considerando a importância das quitinases no metabolismo da quitina, nosso grupo de pesquisa iniciou estudos para obtenção de quitinases recombinantes de *A. sexdens*. Assim, *primers* baseados na sequência provável de uma quitinase do tipo 2 de *A. echinator* (Figura 1.6, A) foram construídos para amplificar as regiões C4 e B1 de quitinase de *A. sexdens* (AsChtII-C4B1, Figura 1.6, B), a partir do RNA total extraído de formigas operárias médias. Com isso, uma quitinase de *A. sexdens* foi identificada (sequência depositada no GenBank com número de acesso OM994355) contendo 1623 bp, que apresentou 95,7% de similaridade com a mesma região da sequência do genoma de *A. echinator*. A AsChtII-C4B1, expressa em *P. pastoris*, apresentou massa molecular aparente de 72 kDa, valor que excedeu em 13 kDa a massa molecular teórica (57,8 kDa, com 511 aminoácidos). Foi detectado, por ensaio com a enzima de deglicosilação EndoH, que a enzima se encontra glicosilada justificando o maior valor de massa molecular. Com a caracterização bioquímica da AsChtII-C4B1 determinou-se o seu pH e temperatura ótimos utilizando quitina coloidal como substrato, que ocorreram em pH 5 e 55 °C, sendo que a enzima manteve mais de 80% da atividade máxima em pH 4 – 6 e temperaturas entre 50 – 60 °C. Além disso, o potencial inseticida da AsChtII-C4B1 também foi avaliado frente a larvas e pupas de *S. frugiperda*, um inseto que é considerado como uma importante praga nas Américas, provocando grandes prejuízos econômicos na agricultura. A AsChtII-C4B1 foi introduzida na dieta desses indivíduos, provocando um aumento na mortalidade, principalmente dos estágios iniciais das pupas, sugerindo que a enzima pode interferir na regulação das enzimas quitinolíticas que participam da muda durante a transição larva – pupa. A AsChtII-C4B1 também apresentou atividade antifúngica contra *A. fumigatus*, causando a perturbação das paredes celulares (MICOCCI et al., 2023).

Além da C4B1, outras sequências parciais de quitinases de *A. sexdens* foram obtidas a partir da amplificação de regiões específicas do RNA total de pupas, e avaliadas quanto à atividade quitinolítica. A AsChtII-C2B3 contém o domínio catalítico 2 e três CBDs no C-terminal; a AsChtII-C3C4 contém os domínios catalíticos 3 e 4 e a AsChtII-C5B1 contém o domínio catalítico 5 e um CBD no N-terminal (Figura 1.6, C, D, E). A AsChtII-C2B3 e a AsChtII-C5B1 exibiram atividade ótima em pH 5, nas temperaturas de 55 e 50 °C, respectivamente. Já a AsChtII-C3C4 foi mais ativa em pH 4 e 50 °C. As atividades específicas dessas quitinases frente à quitina coloidal foram de 52, 68 e 88 nmol

de enzima (quantidade necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de NAc-Glc por minuto), para a C2B3, C5B1 e C3C4, respectivamente. Em contraste, a C4B1 apresentou atividade específica de 22 nmol de enzima. Esses resultados mostraram que a presença de dois domínios catalíticos (C3C4), mas sem CBD, provocou a menor atividade específica observada, no entanto a presença de três CBDs (C2B3) além do domínio catalítico também não contribuíram significativamente para a atividade específica. As três quitinases também exibiram diferentes níveis de atividade antifúngica, com a C5B1 atingindo a maior porcentagem de inibição de *C. albicans* (87,6%), e a C2B3 contra *A. fumigatus* (66%) (CORRÊA, 2023).

FIGURA 1.6 – Análise das sequências através do programa SMART. A – Sequência prevista da quitinase do grupo 2 de *A. echinator*; B – Construção correspondente à AsChtII-C4B1; C – Construção correspondente à AsChtII-C2B3; D – Construção correspondente à AsChtII-C3C4; E – Construção correspondente à AsChtII-C5B1. As caixas roxas representam domínios catalíticos (GH18), as rosas representam regiões de baixa complexidade e as verdes representam os domínios de ligação à quitina (CBD).



Fonte: (CORRÊA, 2023).

Esses estudos demonstraram que as formigas cortadeiras *A. sexdens* possuem um sistema altamente regulado de metabolismo de quitina durante suas fases de desenvolvimento (MOREIRA et al., 2020). Além disso, quitinases com diferentes composições estruturais foram amplificadas a partir do gene de formigas operárias médias e pupas, baseando-se em uma sequência previamente

determinada para uma espécie próxima, demonstrando propriedades bioquímicas distintas e potencial biopesticida (CORRÊA, 2023; MICOCCI et al., 2023). Esses resultados instigam investigações sobre o sistema quitinolítico intrínseco da espécie, com a finalidade de analisar como essas enzimas são expressas durante as fases de desenvolvimento do inseto, e quais as suas funções e propriedades.

## 2 - Objetivos

Identificar e isolar a(s) possível(eis) quitinase(s) produzida(s) pela formiga cortadeira *Atta sexdens* em diferentes estágios de vida e caracterizá-las do ponto de vista físico-químico e estrutural.

### 2.1 - Objetivos específicos

- A – Desenvolver protocolo de purificação para as quitinases encontradas em formigas operárias e pupa;
- B – Realizar a caracterização bioquímica e biofísica das quitinases isoladas;
- C – Anotar os peptídeos das quitinases isoladas por meio de Espectrometria de Massas para comprovar a identidade quitinase.

### **3 - Materiais e métodos**

#### **3.1 - Obtenção e armazenamento dos insetos**

Operárias e pupas de formiga cortadeira *Atta sexdens* (formiga saúva) foram coletadas de ninhos artificiais do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), do Instituto de Química da Universidade Estadual de São Paulo – Campus Rio Claro, em colaboração com o Prof. Dr. Odair Correa e em seguida armazenadas a -80 °C.

#### **3.2 - Preparo da quitina coloidal**

O preparo da quitina coloidal, utilizada como substrato nos ensaios de atividade enzimática, foi feito de acordo com a metodologia de SUJINS *et al.* (SKUJINS *et al.*, 1965). Cinco gramas de  $\alpha$ -quitina proveniente de casca de caranguejo (Sigma-Aldrich) foram adicionadas gradualmente a 60 mL de ácido clorídrico concentrado (37%), sob agitação vigorosa em temperatura ambiente, dentro de capela de exaustão. A mistura foi mantida sob agitação por 1 hora, até que apresentasse redução significativa na viscosidade. Em seguida, a mistura foi filtrada utilizando lã de vidro, e o filtrado obtido foi adicionado, sob agitação vigorosa, a 200 mL de solução de etanol a 50% (v/v), previamente resfriada. O precipitado foi transferido para um funil de buchner com papel de filtro e lavado com água mili Q (aproximadamente 7L) até a quitina coloidal apresentar pH 6 (medido com a fita de pH). A quitina coloidal retida no papel de filtro foi retirada com auxílio de uma espátula, pesada e armazenada em falcon protegido da luz na câmara fria. Esse procedimento levou a um rendimento de 26,40 g de quitina coloidal.

#### **3.3 - Ensaio para determinação de atividade quitinolítica**

A atividade quitinolítica foi avaliada com base no método descrito por MILLER (MILLER, 1959) para detecção de açúcares redutores., utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível modelo BioMate 160 (termo scientific). Este método emprega o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que reage com açúcares

redutores em meio alcalino e aquecimento resultando na formação de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que apresenta máxima absorvância a 540 nm. Neste projeto, os açúcares redutores são os produtos formados na reação de quitinase sobre o substrato quitina coloidal, *N*-acetilglicosamina (NAc-Glc) e oligossacarídeos.

A solução reacional (volume final de 400  $\mu$ L) era constituída por 100  $\mu$ L de solução enzimática (quitinase), 100  $\mu$ L de solução tampão e 200  $\mu$ L de substrato quitina coloidal 5% (m/v) preparada previamente em tampão citrato-fosfato (composto por 0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato dissódico) (MCILVAINE, 1921) ou em tampão Tris-HCl 0,5 M, a depender do pH desejado.

Para a quantificação, foi construída uma curva padrão com concentrações crescentes de *N*-acetilglicosamina (0,1 – 1 mg/mL), cujas absorvâncias também foram medidas a 540 nm em um espectrofotômetro UV-visível modelo BioMate 160 (Termo Scientific). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de NAc-Glc por minuto, de acordo com a Equação 3.1.

$$UA = \frac{[NAc - Glc](\mu\text{mol/mL}) \times V_{\text{reação}}(\text{mL})}{t(\text{min})} \quad (\text{Equação 3.1})$$

### 3.4 - Obtenção das quitinases nativas de *A. sexdens*

A obtenção do extrato bruto das formigas operárias foi realizada em diferentes condições, como mostra a Tabela 3.1, visando analisar o impacto de diferentes tampões e aditivos sobre a atividade enzimática, estabilidade e rendimento da extração. O coquetel de inibidor de proteases (Sigma P2714) utilizado nas condições 3, 4, 7 e 8, composto por AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina e EDTA, foi diluído para 100 mL antes do uso.

TABELA 3.1 – Soluções utilizadas para a obtenção do extrato bruto da Quit-ASOA.

Condição	Tampão	pH	Aditivos
1	Fosfato de sódio 50 mM	7,0	-
2	Fosfato de sódio 50 mM	7,0	Tween 20 0,1% (V/V)
3	Fosfato de sódio 50 mM	7,0	Coquetel inibidor de proteases 1% (V/V)
4	Acetato de sódio 50 mM	5,0	Tween 20 0,1% (V/V) + coquetel inibidor de proteases 1% (V/V)
5	Acetato de sódio 50 mM	5,0	-
6	Acetato de sódio 50 mM	5,0	Tween 20 0,1% (V/V)
7	Acetato de sódio 50 mM	5,0	Coquetel inibidor de proteases 1% (V/V)
8	Acetato de sódio 50 mM	5,0	Tween 20 0,1% (V/V) + Coquetel inibidor de proteases 1% (V/V)

Após definir a melhor condição de extração da Quit-ASOA, o mesmo protocolo foi empregado na extração da Quit-ASP. Inicialmente, foram pesados 400 mg de formigas adultas operárias médias ou pupas utilizando uma balança analítica. Os indivíduos foram então macerados manualmente em cadinho de porcelana, à temperatura ambiente, na presença de 2 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), suplementado com 0,1% (v/v) de Tween 20 (tampão A). O extrato bruto obtido foi submetido à centrifugação a  $10.000 \times g$ , por 35 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi então coletado e armazenado a 10 °C por 24 horas antes das etapas subsequentes de purificação.

### 3.4.1 - Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação com sulfato de amônio  $[(NH_4)_2SO_4]$  foi inicialmente padronizada a partir de extratos brutos obtidos pela homogeneização de 800 mg

de formigas ou pupas em 4 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), contendo 0,1% (v/v) de Tween 20. Para a definição das condições ideais de precipitação, foram testadas diferentes saturações de sal: 40%, 50%, 55% e 60% para o extrato de pupa; e 50%, 55% e 60% para o extrato de formiga. Para cada condição, 1 mL do extrato foi submetido à adição lenta de sulfato de amônio, sob agitação suave à temperatura ambiente, seguido de incubação com agitação por 15 minutos e repouso por mais 45 minutos. As amostras foram então centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a 4 °C, resultando na separação entre o precipitado e o sobrenadante. Ambas as frações foram ressuspensas (precipitado) ou mantidas no mesmo tampão (sobrenadante), dialisadas e avaliadas quanto à atividade quitinolítica.

Com as condições otimizadas, a precipitação foi realizada com 3 mL do extrato bruto, utilizando a saturação de sal correspondente a cada tipo de amostra (operária ou pupa). Após a incubação e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, o sobrenadante foi separado e submetido à diálise em tampão A, utilizando membrana de celulose com poro de exclusão de 14 kDa. A diálise foi conduzida sob refrigeração, com três trocas de tampão: a primeira de 15 minutos e as duas subsequentes de 30 minutos cada. Os extratos resultantes foram denominados EE-ASO (extrato enzimático proveniente do extrato da formiga) e EE-ASP (extrato enzimático proveniente do extrato da pupa), e avaliados quanto à atividade enzimática (item 3.3) e por SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970).

### **3.4.2 - Purificação da quitinase de operária (Quit-ASOA)**

#### **3.4.2.1 - Cromatografia em coluna de troca iônica**

Após a etapa de precipitação com sulfato de amônio do extrato da formiga, a amostra EE-ASO foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna GE HiTrap DEAE-FF (1 mL), acoplada a um sistema AKTA FPLC™ (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão A (acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo 0,1% de Tween 20), e a eluição foi realizada por gradiente linear de 0% a 100% de tampão B (tampão A suplementado com 1 M de NaCl), em fluxo constante de 1 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas e avaliadas quanto à atividade quitinolítica. As frações ativas foram reunidas e concentradas em dispositivos de ultrafiltração Amicon® Ultra (Millipore), por

centrifugação a  $2.000 \times g$ , a  $4^\circ\text{C}$ , durante 7 minutos, até atingir volume final de 1,5 mL. As amostras concentradas foram então analisadas quanto à atividade enzimática e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%.

### **3.4.2.2 - Cromatografia em coluna de exclusão molecular**

As amostras concentradas foram submetidas à purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna GE Superdex 200 16/600 (120 mL), acoplada ao sistema AKTA FPLC™. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 suplementado com 150 mM de NaCl. Um volume de 1 mL da amostra foi aplicado na coluna, e a eluição foi conduzida com fluxo constante de 1 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas ao longo dos picos observados no cromatograma, sendo posteriormente analisadas quanto à atividade quitinolítica e por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%. As frações que apresentaram atividade quitinolítica foram reunidas e utilizadas nos experimentos de caracterização enzimática da Quit-ASOA. Para estimativa da massa molecular aproximada da Quit-ASOA, a albumina sérica bovina (BSA) foi aplicada à coluna sob as mesmas condições experimentais.

## **3.4.3 - Purificação da quitinase de pupa (Quit-ASP)**

### **3.4.3.1 - Cromatografia em coluna de exclusão molecular**

Após a etapa de precipitação com sulfato de amônio do extrato pupal, a amostra EE-ASP foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em coluna GE Superdex 200 16/600 (120 mL), acoplada ao sistema AKTA FPLC™. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 suplementado com 150 mM de NaCl. Um volume de 1 mL da amostra foi aplicado, e a eluição foi conduzida com fluxo constante de 1 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas ao longo dos picos observados no cromatograma, sendo posteriormente analisadas quanto à atividade quitinolítica e por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%. As frações que apresentaram atividade foram reunidas e utilizadas nos experimentos de caracterização enzimática da Quit-ASP.

### **3.5 - Dosagem de proteínas totais**

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada segundo o método de BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma) como padrão. O reagente comercial de Bradford (Sigma), composto pelo corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em meio ácido, foi diluído 5 vezes antes do uso em água mili Q. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  das amostras proteicas, previamente dialisadas para remoção do Tween, foram misturadas a 800  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a absorbância foi medida a 595 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### **3.6 - Caracterização bioquímica das quitinases**

#### **3.6.1 - Interferência do pH e temperatura na atividade quitinolítica**

Para a determinação do pH ótimo das enzimas, foram utilizados tampões citrato-fosfato nas faixas de pH 3,0 a 7,0 e Tris-HCl nas faixas de pH 8,0 a 10,0. As reações, desenvolvidas conforme descrito no item 3.2) foram incubadas por 1 hora, sob agitação de 250 rpm, a 40 °C. Após a incubação, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de solução de DNS a cada solução reacional, que foi imediatamente aquecida a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas, centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 5 minutos, e a absorbância da solução foi medida a 540 nm. Como branco foi preparada uma mistura contendo 300  $\mu\text{L}$  de tampão e 100  $\mu\text{L}$  da amostra em cada faixa de pH. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas biológicas e duplicatas experimentais para cada faixa de pH avaliada.

Após a definição do pH ótimo, procedeu-se à análise da temperatura ótima de atividade enzimática. As reações foram conduzidas nas temperaturas de 30, 40, 50, 55 e 60 °C, utilizando o mesmo protocolo descrito acima. Os experimentos foram igualmente realizados em triplicata biológica e em duplicata experimental, e os resultados apresentados como média dos valores obtidos.

### 3.6.2 - Influência de íons metálicos

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade das quitinases foi avaliado após a incubação das amostras com  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\text{NiCl}_2$ ),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuCl}_2$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{CoCl}_2$ ) e  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, a atividade enzimática residual foi determinada nas condições ótimas de pH e temperatura previamente estabelecidas para cada quitinase, utilizando-se uma concentração final de 5 mM de cada íon metálico na reação.

### 3.6.3 - Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten foram determinados nas condições ótimas de temperatura e pH pré-estabelecidas utilizando-se amostras de bom grau de pureza, variando a concentração de quitina coloidal em 1,25%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15% e 20% (m/V). Os ensaios foram realizados em duplicatas experimentais e triplicatas biológicas e os parâmetros cinéticos velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foram avaliados utilizando curvas de regressão não linear de acordo com a equação de Michaelis-Menten.

### 3.6.4 - Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Para determinar os parâmetros termodinâmicos de estabilidade térmica da Quit-ASOA, empregou-se a metodologia descrita por KUMARI *et al.* (KUMARI et al., 2024). Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  das amostras puras foram incubadas em diferentes temperaturas por intervalos de tempo fixos, e a atividade residual foi medida nas condições de pH e temperatura ótima de ambas. As temperaturas estudadas foram 60, 70, 80 e 90 °C, em intervalos de 45, 75, 120 e 150 minutos para 60 e 70 °C, e acrescentou-se os intervalos de 210 e 300 minutos para 80 e 90 °C. A atividade residual foi medida de acordo com o método padrão, mantendo a reação por 30 minutos a 250 rpm, na temperatura ótima das enzimas. Ao final de cada intervalo, as amostras foram resfriadas. Foi feita uma reação controle com a amostra não submetida à incubação térmica, representando 100% da atividade enzimática inicial.

A partir da quantificação de *N*-acetilglucosamina liberada nas reações, calculou-se a atividade residual (%At) de acordo com a Equação 3.2:

$$\%At = \left( \frac{\text{Atividade medida}}{\text{Atividade controle}} \right) \times 100 \text{ (Equação 3.2)}$$

O declive ( $-E_{a,d}/R$ ) da curva de Arrhenius ( $\ln k_d$  vs  $1/T$ ) foi utilizada para determinar a Energia de ativação da desnaturação ( $E_{a,d}$ ). A energia livre de Gibbs ( $\Delta G_d$ ), entalpia ( $\Delta H_d$ ), entropia ( $\Delta S_d$ ) e a meia vida da Quit-ASOA foram avaliadas conforme as Equações 3.3 a 3.6.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_d} \text{ (Equação 3.3)}$$

$$\Delta G_d = RT \ln \left( \frac{k_d h}{k_B T} \right) \text{ (Equação 3.4)}$$

$$\Delta H_d = E_{a,d} - RT \text{ (Equação 3.5)}$$

$$\Delta S_d = \frac{\Delta H_d - \Delta G_d}{T} \text{ (Equação 3.6)}$$

Onde  $k_d$  representa a constante de reação de primeira ordem (constante de desativação térmica) em várias temperaturas, calculada através do declive da curva  $\ln$  (%At) vs tempo.  $R$ ,  $h$ ,  $k_B$  simbolizam as constantes de gás ( $8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), Planck ( $6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$ ) e Boltzmann ( $1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ), e  $T$  representa a temperatura absoluta (K).

### 3.7 - Análise da Quit-ASOA por espectrometria de massas

Uma amostra da enzima Quit-ASOA purificada foi enviada para análise por espectrometria de massas à empresa Veritas Life Sciences. A amostra foi seca em estufa após a purificação (300  $\mu\text{g}$ ) e ressuspensa em 100  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 150 mM (pH 8,8) contendo 8 M de ureia e 0,5% de octilglucopiranosídeo (OG). Para a precipitação, 50  $\mu\text{L}$  da amostra foram tratados com 300  $\mu\text{L}$  de acetona gelada, incubados por 3 h a  $-20^\circ\text{C}$  e centrifugados a

12.000 × g por 10 min a 4 °C. O *pellet* obtido foi seco a 37 °C por 5 minutos e ressuspenso em 100 µL do mesmo tampão.

A preparação da amostra envolveu três etapas: (i) redução com 50 µg de DTT a 37 °C por 1 h, seguida de (ii) alquilação com 250 µg de iodoacetamida por 1 h à temperatura ambiente no escuro, e (iii) diluição 1:8 com Tris-HCl 50 mM (pH 8,8). A digestão enzimática foi realizada durante a noite a 37 °C, com tripsina (Promega, V511A) e quimotripsina (Sigma) na proporção 1:200. Para limpeza (“clean-up”) e dessalinização, utilizou-se a coluna OASIS HLB (1 cc, Waters), conforme instruções do fabricante. O material foi eluído com acetonitrila 50% em ácido fórmico 0,1% e posteriormente seco em SpeedVac.

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas Orbitrap Eclipse (ThermoFisher), acoplado ao sistema Nano LC-MS/MS Dionex Ultimate 3000 RLSCnano. Aproximadamente 1 µg de peptídeo foi injetado e separado em coluna Nanoease MZ Peptide BEH C18 (75 µm × 250 mm, 1.7 µm, 130 Å, Waters), com fluxo de 300 nL/min e gradiente de acetonitrila de 4–50% por 90 min. A aquisição MS1 foi realizada na faixa m/z 375–1500, resolução de 120.000, AGC target 1E6 e tempo máximo de injeção de 100 ms. Os íons mais abundantes foram selecionados para MS/MS com energia de colisão de 30%, janela de isolamento de 1,2 m/z, AGC target 1E5 e resolução de 15.000.

A análise dos dados obtidos foi conduzida com um banco de dados de quitinases de artrópodes. Peptídeos identificados com FDR ≤ 3% (Peptide Prophet) foram quantificados com o algoritmo Xpress. As intensidades peptídicas foram agrupadas por *scripts* em linguagem R para quantificação da proteína.

### 3.8 - Estudo teórico

Para o estudo estrutural da quitinase Quit-ASOA, foram utilizadas sequências de peptídeos obtidas por espectrometria de massas (MS/MS) e identificadas por similaridade com quitinases de artrópodes. As sequências proteicas completas correspondentes às proteínas de referência foram obtidas a partir da base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), no formato FASTA. A escolha das sequências foi baseada na alta cobertura e na elevada probabilidade de identificação em relação à amostra analisada.

As proteínas selecionadas foram submetidas à análise de domínios conservados utilizando a ferramenta SMART (Simple Modular Architecture

Research Tool), com o objetivo de identificar regiões funcionais típicas de quitinases, como o domínio catalítico tipo GH18 (glycosyl hydrolase family 18) e possíveis domínios acessórios (como CBM – carbohydrate-binding modules). Esta análise permitiu validar as sequências e orientar o mapeamento dos peptídeos identificados por espectrometria dentro das regiões conservadas.

Em seguida, foi realizado um alinhamento múltiplo entre as sequências de referência e os peptídeos obtidos experimentalmente utilizando o programa MultAlin. O alinhamento permitiu inferir a localização aproximada dos peptídeos na estrutura completa da quitinase de referência, possibilitando associá-los às regiões catalíticas ou estruturais da enzima.

## 4 - Resultados e discussão

### 4.1 - Avaliação de diferentes tampões e aditivos na eficiência da extração enzimática da Quit-ASOA

As condições de extração da Quit-ASOA apresentadas na Tabela 3.1 foram avaliadas quanto ao rendimento e atividade quitinolítica dos extratos, e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 4.1

TABELA 4.1 – Avaliação da atividade da Quit-ASOA em diferentes condições de extração.

Condição	UA ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Proteínas totais ( $\text{mg}/\text{mL}$ )	Atividade específica
1	0,0022	4,364	0,005
2	0,0048	3,791	0,013
3	0,0082	3,574	0,023
4	0,0047	3,420	0,014
5	0,0090	1,326	0,068
6	0,0087	0,992	0,088
7	0,0079	1,087	0,073
8	0,0079	1,295	0,061

Observou-se que os extratos obtidos com tampão fosfato (condições 1 a 4) apresentaram maior concentração total de proteínas. No entanto, essas condições resultaram em baixa atividade específica, sugerindo a extração de quantidades elevadas de proteínas mas não relacionadas à atividade quitinolítica.

Os melhores resultados para a extração da quitinase de formigas operárias foram obtidos com o tampão acetato de sódio pH 5 (condições 5 a 8), que proporcionou índices mais elevados de atividade específica. Nessas condições, os extratos apresentaram menor turbidez. Além disso, foi observada precipitação espontânea de proteínas contaminantes após a extração, o que contribuiu para a purificação parcial da quitinase.

Também foi avaliada a estabilidade dos extratos enzimáticos após 24 e 48 horas da extração. Observou-se que os extratos preparados em tampão fosfato apresentaram maior perda de atividade quitinolítica ao longo do tempo, em comparação aos extratos obtidos com tampão acetato de sódio. Neste último a enzima mostrou maior estabilidade, possivelmente devido à precipitação espontânea de proteínas contaminantes, o que pode ter reduzido a interferência de proteases e facilitado a conservação da enzima ativa.

A adição de um coquetel de inibidores de proteases resultou em um aumento da atividade inicial dos extratos, no entanto, os mesmos apresentaram maior perda de atividade ao longo do tempo quando comparados àqueles preparados com Tween 20. Isso sugere que, embora os inibidores protejam a enzima inicialmente, a presença do detergente não iônico pode contribuir de forma mais eficaz para a estabilidade da quitinase, possivelmente ao manter a enzima solúvel e em conformação funcional.

Na condição 6 (tampão acetato de sódio pH 5 suplementado com Tween 20) houve a detecção de maior atividade específica entre todos os extratos testados, com valor de 0,09 U/mg de proteína. A presença do detergente não iônico Tween 20 pode ter favorecido a solubilização da quitinase, facilitando sua liberação das estruturas celulares e reduzindo a coextração de proteínas hidrofóbicas ou agregadas. Este resultado está de acordo com estudos prévios que demonstram o efeito positivo desse surfactante sobre a estabilidade de quitinases (CABRAL et al., 2020; LIANG et al., 2014). Essa condição de extração foi estabelecida para a extração da quitinase das formigas operárias. O macerado de formigas na presença de tampão acetato de sódio pH 5,0 suplementado com Tween 20 foi denominado extrato bruto (EB).

## **4.2 - Purificação da Quit-ASOA**

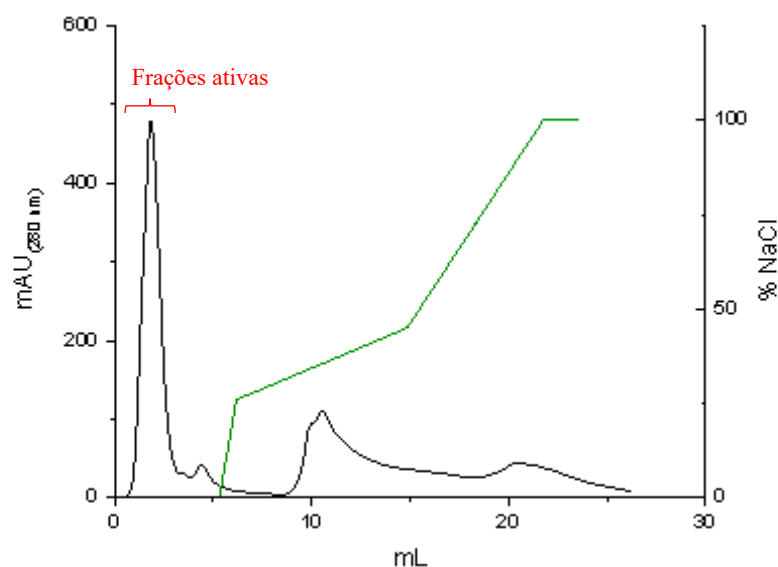
A primeira etapa do processo de purificação da quitinase de operárias (Quit-ASOA) consistiu na precipitação com sulfato de amônio, sendo que a análise da atividade quitinolítica dos precipitados e sobrenadantes obtidos em cada condição demonstrou que a maior parte da atividade enzimática estava presente na fração solúvel (sobrenadante), enquanto o precipitado continha predominantemente proteínas contaminantes ou inativas. Assim, a precipitação foi utilizada como etapa de clarificação, removendo componentes indesejáveis e concentrando a enzima de interesse na fase solúvel. A saturação de 55% foi

estabelecida como ideal para o extrato de formigas operárias. Além disso, observou-se que a realização da precipitação com sulfato de amônio após 24 horas da extração resultou em maior conservação da atividade quitinolítica na fração solúvel, além de uma remoção mais eficiente de proteínas contaminantes. Esse comportamento pode ser atribuído à precipitação espontânea de proteínas instáveis ou agregadas durante o período de repouso, o que facilita a separação da quitinase ainda solúvel e funcional.

Diferentes concentrações de saturação salina (50%, 55% e 60%) foram testadas, calculadas com base na equação de GREEN e HUGHES (1955) para 25 °C. Entre essas, a saturação de 55% foi a que resultou na maior atividade quitinolítica na fração solúvel. A amostra com atividade quitinolítica após precipitação com sulfato de amônio e dialisada contra tampão foi denominada Extrato Enzimático (EE).

Foram avaliadas diferentes técnicas cromatográficas como etapas intermediárias de purificação do extrato enzimático, incluindo colunas de troca iônica (catiônicas e aniônicas), cromatografia de interação hidrofóbica e exclusão por tamanho. Dentre essas, a coluna aniônica HiTrap DEAE-FF apresentou o melhor desempenho em termos de separação e remoção de contaminantes. Embora as frações com maior atividade quitinolítica não tenham apresentado afinidade significativa com a matriz aniônica, sendo eluídas no fluxo inicial (antes do início do gradiente salino), o uso da DEAE-FF permitiu a remoção efetiva de outras proteínas, contribuindo para a purificação parcial do extrato enzimático (Figura 4.1). Essa etapa, portanto, foi importante para aumentar a pureza relativa da enzima mesmo sem sua retenção direta na coluna.

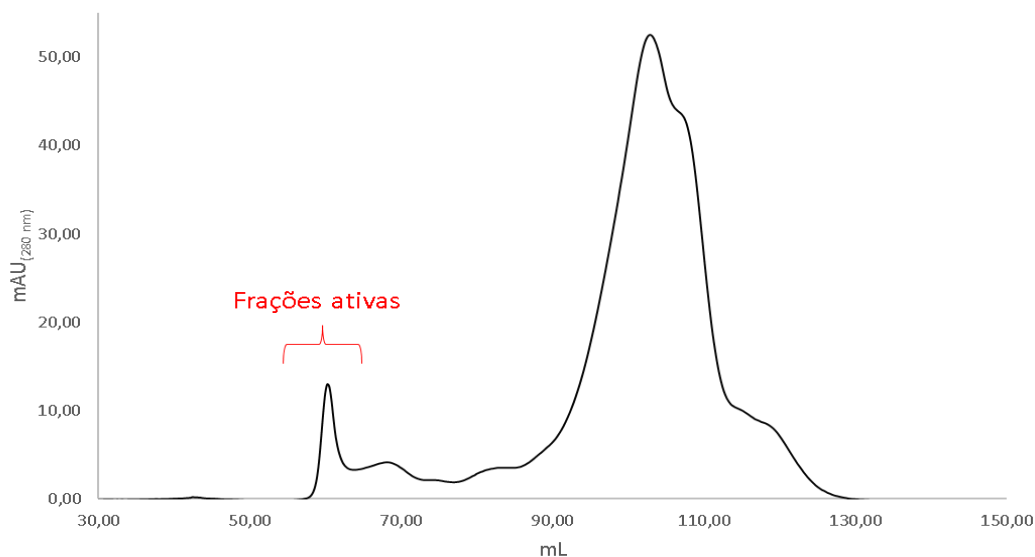
FIGURA 4.1 – Cromatograma relativo à cromatografia em coluna DEAE-FF do EE-ASOA.



Resultados semelhantes foram observados em trabalhos com quitinases de plantas. SPANÒ *et al.* (2015) purificaram uma quitinase de *Euphorbia characias* utilizando a coluna DEAE-cellulose, e notaram que a enzima não se ligou fortemente à coluna, sendo eluída na fase inicial, ainda assim auxiliando na separação de contaminantes. Da mesma forma, KABIR *et al.* (2016) conduziram a purificação de quitinases vegetais usando uma coluna QA-cellulose, outra resina aniônica, e também relataram ausência de retenção da quitinase, mas com benefício na remoção de proteínas indesejadas.

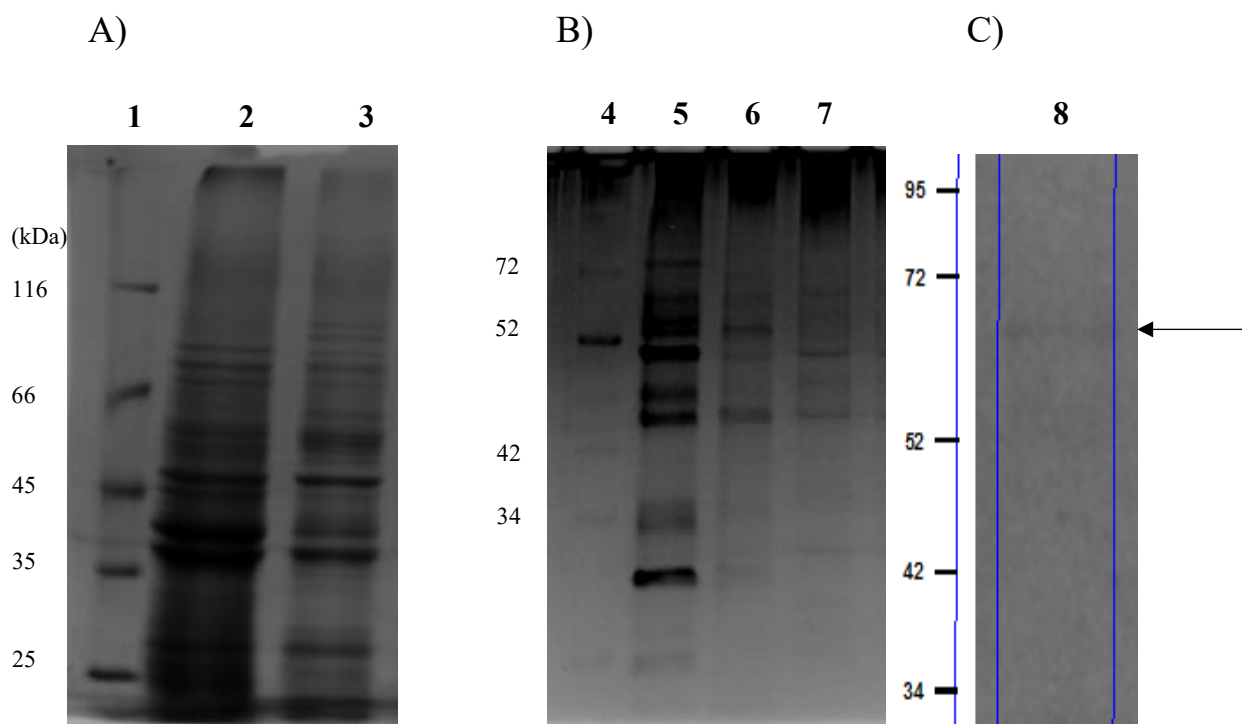
Como etapa de refinamento da purificação da Quit-ASOA, foi empregada a cromatografia de exclusão por tamanho utilizando a coluna Superdex 200, a qual permite a separação das proteínas com base no seu peso molecular. Durante a eluição, observaram-se três principais picos de absorbância a 280 nm. Amostras foram coletadas nos intervalos das frações 55–70 e 80–110 para posterior avaliação da atividade enzimática. Os resultados demonstraram que a atividade quitinolítica esteve concentrada apenas nas frações 55–65, correspondentes ao primeiro pico do cromatograma (Figura 4.2).

FIGURA 4.2 – Cromatograma relativo à cromatografia de exclusão molecular da Quit-ASOA utilizando a coluna Superdex 200.



A eficiência das etapas de purificação da Quit-ASOA foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), com coloração por prata (Figura 4.3). Observou-se uma redução progressiva no número de bandas ao longo das etapas, indicando remoção de proteínas contaminantes. As frações com atividade quitinolítica eluídas da coluna Superdex 200 apresentaram uma banda menos intensa, o que sugere uma baixa concentração proteica, possivelmente em decorrência da diluição do material durante a cromatografia de exclusão por tamanho. Ainda assim, a presença de atividade enzimática confirma a eficiência da separação e a manutenção da funcionalidade da quitinase na fração final.

FIGURA 4.3 – Análise em SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da Quit-ASOA. A) poço 1: marcador de peso molecular, poço 2: EB no dia da extração, poço 3: EB após 24 horas em repouso. B) poço 4: marcador de peso molecular, poço 5: EB, poço 6: EE-ASOA, poço 7: pool das frações com atividade quitinolítica eluídas da coluna DEAE. C) poço 8: Pool das frações com atividade quitinolítica obtidas da coluna Superdex 200.



A análise eletroforética da Quit-ASOA por SDS-PAGE indicou uma massa molecular aparente de aproximadamente 70 kDa, valor compatível com os tamanhos comumente observados para quitinases de insetos, que variam entre 40 – 85 kDa. Diversos estudos relatam quitinases nativas com massas moleculares semelhantes, como as de *Manduca sexta* (~49 e 60 kDa) (ZHU et al., 2001), *Spodoptera frugiperda* (~62 kDa) (BOLOGNESI et al., 2005), *Bombyx mori* (~88 kDa) (KOGA et al., 1997) e *Stomoxys calcitrans* (~48 kDa) (CHEN et al., 1982), demonstrando uma variação entre diferentes espécies e tipos de quitinase. A presença de domínios catalíticos e de ligação à quitina (CBDs), frequentemente encontrados nessas enzimas, também contribui para os valores de massa molecular observados. Além disso, o nível de glicosilação da enzima também é um fator que pode influenciar na massa molecular, uma vez que quitinases de insetos podem ser extensivamente glicosiladas. (ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010; KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997). MICOCCI *et al.* (MICOCCI et al., 2023) obtiveram uma quitinase recombinante

de *A. sexdens* (AsChtII-C4B1) contendo um domínio catalítico e um CBD, que apresentou massa molecular de aproximadamente 72 kDa como indicado por análise de SDS-PAGE. A massa molecular da AsChtII-C4B1 observada no gel foi quase 13 kDa superior à massa teórica, e isso foi atribuído à glicosilação da enzima devido ao uso de um vetor de expressão eucarionte, que foi em *P. pastoris*, capaz de realizar modificações pós-traducionais. Através de ensaio com a enzima EndoH, que atua na deglicosilação de proteínas, ficou constatado que a AsChtII-C4B1 é glicosilada. Dessa forma, o tamanho estimado para a Quit-ASOA é compatível com os dados previamente descritos na literatura para quitinases de origem entomológica.

Os dados sobre o fator de purificação e rendimento de Quit-ASOA obtidos com o processo de purificação estão sumarizados na Tabela 4.2.

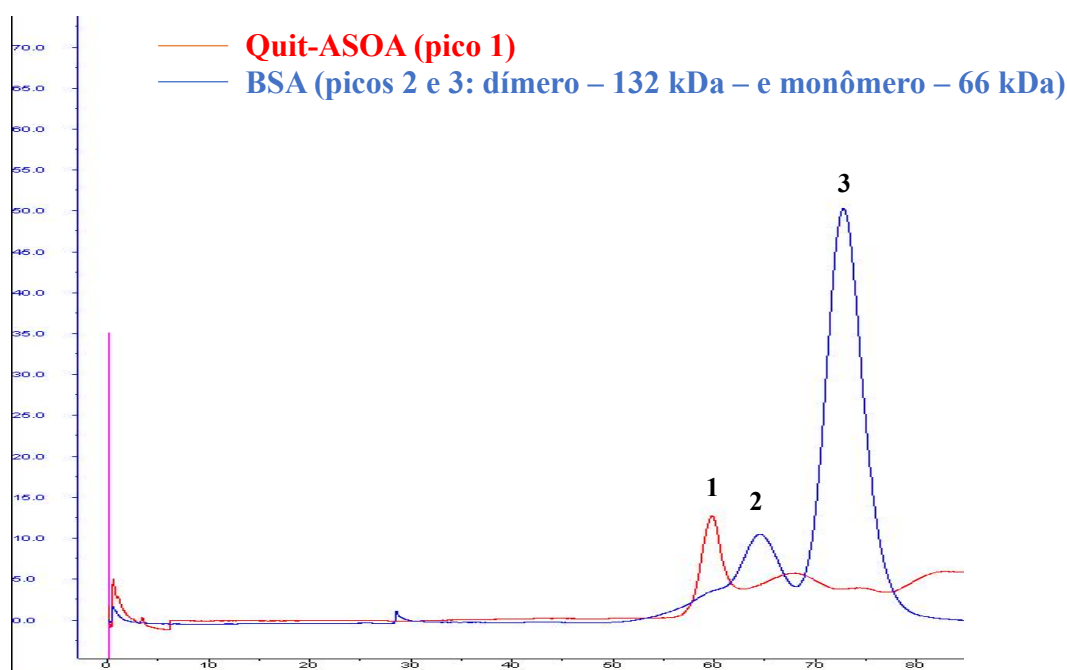
TABELA 4.2 – Fator de purificação e rendimento obtidos com a purificação da Quit-ASOA

<b>Amostra</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>GlcNAc liberado (mg/mL)</b>	<b>Atividade específica (U/mg)</b>	<b>Fator purificação</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>EB</b>	2,688	0,341	0,46	1,00	100,0
<b>EE-ASOA</b>	0,632	0,183	1,05	2,29	53,6
<b>Pré-superdex</b>	0,210	0,163	1,87	4,09	47,8
<b>Quit-ASOA purificada</b>	0,193	0,122	2,29	4,99	35,8

### 4.3 - Avaliação da massa molecular da Quit-ASOA nativa

Para estimar a massa molecular aparente da Quit-ASOA na forma nativa, realizou-se cromatografia de exclusão por tamanho na coluna Superdex 200 utilizando-se uma solução padrão de albumina bovina (BSA) a 1 mg/mL. A cromatografia foi conduzida sob as mesmas condições aplicadas à amostra enzimática (volume de injeção, tampão de eluição, fluxo e temperatura). Uma parte do perfil cromatográfico, contendo os picos de interesse, está representado na Figura 4.4. Observa-se que o pico 1, correspondente ao intervalo de eluição da Quit-ASOA, ocorre antes do pico 2, correspondente ao dímero da BSA (132 kDa), indicando que a enzima apresenta um peso molecular superior a esse valor. Considerando que a Quit-ASOA apresentou massa molecular aparente de aproximadamente 70 kDa por SDS-PAGE, os dados sugerem que a enzima se encontra na forma de um dímero funcional em solução.

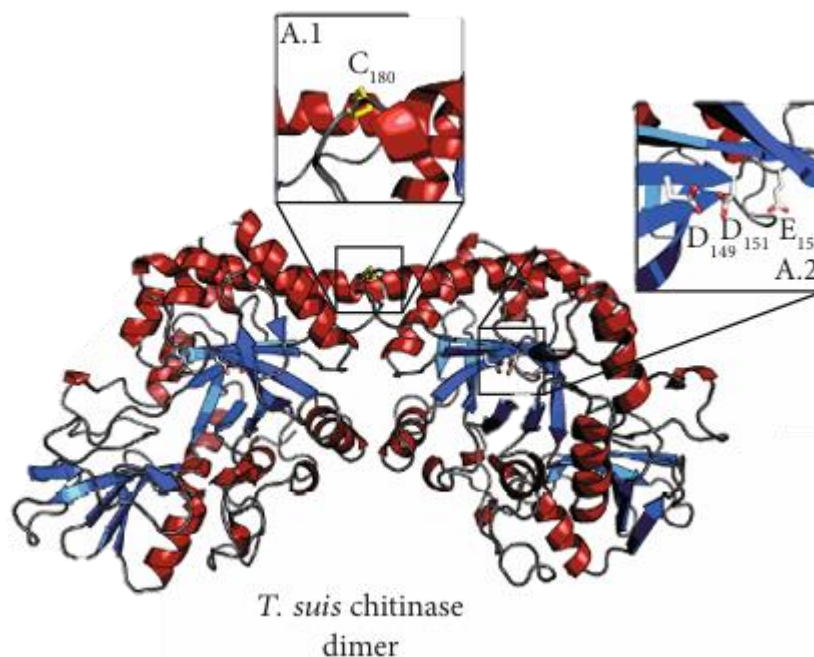
FIGURA 4.4 – Perfis de eluição das amostras Quit-ASOA e BSA 1 mg/mL da coluna Superdex 200.



EBNER *et al.* (2021) caracterizaram uma quitinase recombinante do helminto *Trichuris suis*, cuja estrutura cristalográfica revelou uma forma dimérica da enzima, estabilizada por uma ponte dissulfeto intermolecular formada por uma cisteína na posição 180 (Figura 4.5). De maneira semelhante, GAO *et al.* (2015)

isolaram uma quitinase nativa da bactéria *Chitinibacter* sp. GC72 e demonstraram a presença de uma forma dimérica ativa por meio de eletroforese em gel nativo (native PAGE), que revelou uma banda com massa molecular aparente de 130 kDa, em contraste com a massa de 65 kDa observada por SDS-PAGE. Em outro estudo, uma quitinase recombinante do arqueano *Sulfolobus tokodaii* também exibiu um padrão compatível com estrutura dimérica funcional, apresentando massa molecular de 130 kDa por native PAGE, enquanto o SDS-PAGE indicou uma massa de 77 kDa (STAUFENBERGER et al., 2012). Esses achados reforçam a hipótese de que a formação de dímeros está associada à atividade funcional de quitinases em diversos organismos, incluindo helmintos, bactérias e arqueias.

FIGURA 4.5 – Estrutura tridimensional da quitinase de *T. suis*. Em destaque, a ligação dissulfeto formada pela cisteína na posição 180 que estabiliza a formação do dímero (A.1), e o domínio catalítico dessa enzima (A.2).

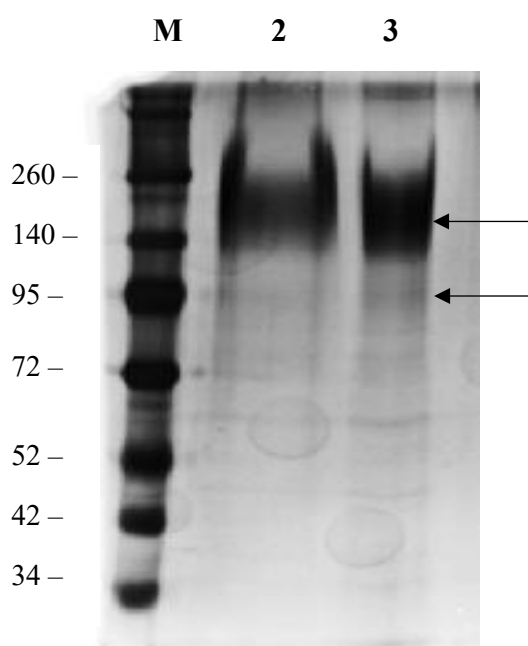


Fonte: (EBNER et al., 2021)

A possível dimerização da enzima Quit-ASOA foi investigada por meio de eletroforese SDS-PAGE sob condições redutoras (amostras tratadas com tampão Laemmli contendo  $\beta$ -mercaptoetanol) e não redutoras (sem  $\beta$ -mercaptoetanol). A preparação das amostras foi realizada com extratos purificados na ausência de Tween 20, com o objetivo de evitar a interferência

desse surfactante na análise eletroforética, e posteriormente concentradas por ultracentrifugação. Detergentes não iônicos como o Tween 20 podem comprometer a eficiência da ligação do SDS às proteínas, resultando em bandas com mobilidade anômala ou aparência difusa no gel (NORGEN BIOTEK, 2018). Em ambas as condições, observou-se uma banda predominante, porém difusa, com mobilidade entre 140 e 95 kDa (indicadas na Figura 4.6), além de uma banda secundária menos intensa próxima de 72 kDa, compatível com a massa molecular previamente estimada para o monômero da Quit-ASOA (~70 kDa). A banda de maior massa aparente é compatível com a forma dimérica da enzima. Notavelmente, essa banda apresentou-se mais definida na condição não redutora, o que sugere a presença de pontes dissulfeto estabilizando a estrutura dimérica da Quit-ASOA. Já sob condições redutoras, essa mesma banda apresentou aspecto mais difuso e mal resolvido, o que pode indicar redução parcial dos dímeros ou formação de agregados instáveis durante o preparo da amostra. A presença simultânea das bandas correspondentes ao dímero e ao monômero, mesmo na ausência de agente redutor, sugere que ambas as formas coexistem em solução. Esses dados indicam que a Quit-ASOA possui uma forma dimérica estável possivelmente mantida por ligação dissulfeto, mas também pode existir parcialmente como monômero, em equilíbrio dinâmico com a forma oligomérica.

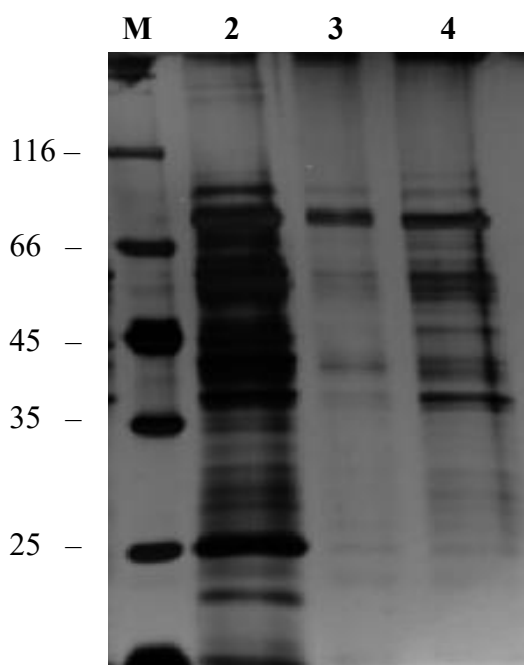
FIGURA 4.6 – Análise em SDS-PAGE 8% das amostras de Quit-ASOA na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, poços 2 e 3, respectivamente; M: marcador de peso molecular (kDa).



#### 4.4 - Purificação parcial da Quit-ASP

Para a obtenção de quitinase expressa em pupas (Quit-ASP) realizou-se também a extração a partir de pupas de *Atta sexdens*, utilizando a condição 6 da Tabela 3.1 (tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 contendo 0,1% (m/V) de Tween 20). No entanto, a etapa de purificação exigiu adaptações, uma vez que o extrato obtido das pupas apresentou comportamento distinto em relação ao da Quit-ASOAA tanto na precipitação com sulfato de amônio quanto nas interações com colunas cromatográficas. Diferentemente desta última, a saturação ideal de sulfato de amônio para a purificação preliminar da Quit-ASP foi de 60%, onde a fração solúvel (EE-ASP) apresentou a maior atividade quitinolítica. A análise por SDS-PAGE indicou que essa etapa foi eficiente na remoção ou redução de proteínas contaminantes (Figura 4.7).

FIGURA 4.7 – Análise em SDS-PAGE 12% das amostras de Quit-ASP. M: Marcador de peso molecular (kDa); Poço 2: Extrato bruto das pupas; Poço 3: EE-ASP e Poço 4: *pellet* obtido com a precipitação com sulfato de amônio



A segunda etapa de purificação da quitinase presente no EE-ASP foi realizada por cromatografia de exclusão molecular, utilizando a coluna HiLoad Superdex 200 acoplada a um sistema AKTA.

O perfil cromatográfico obtido é apresentado na Figura 4.8. A análise do cromatograma de exclusão molecular da Quit-ASP revelou três picos principais com intensidade superior a 3 mAU, denominados P1, P2 e P3. As frações correspondentes a cada pico foram agrupadas, concentradas, dialisadas e então submetidas à análise por SDS-PAGE (Figura 4.9), e posteriormente avaliadas quanto à atividade específica de quitinase. Dentre os picos, o P3 apresentou a maior atividade específica (Tabela 4.3), sugerindo que a quitinase de interesse estava presente majoritariamente nessa fração. No entanto, o perfil eletroforético do P3 revelou múltiplas bandas, o que indica a presença de outras proteínas contaminantes e impossibilitou a identificação precisa da massa molecular aparente da Quit-ASP. Além da coluna de exclusão molecular, também foram feitos testes em colunas de troca iônica e hidrofóbica, porém, nas condições testadas, a separação foi ineficiente. Esses resultados evidenciam que, embora a atividade esteja concentrada no P3, há necessidade de etapas adicionais de purificação para obtenção de uma fração mais homogênea.

FIGURA 4.8 – Cromatograma relativo à cromatografia de exclusão molecular do EE-ASP utilizando a coluna Superdex 200.

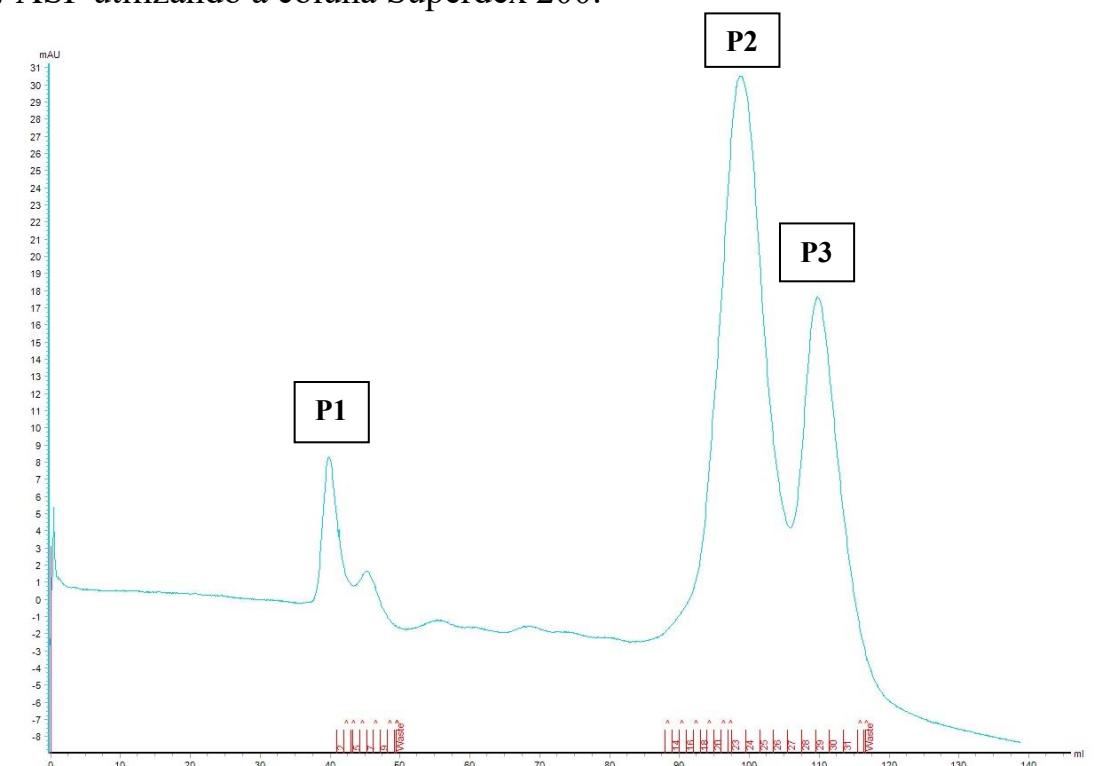


FIGURA 4.9 – Análise em SDS-PAGE 8% das amostras de Quit-ASP após o uso da Superdex 200. Poço 1: Frações correspondentes ao P1; Poço 2: Frações correspondentes ao P2; Poço 3: Frações correspondentes ao P3; M: Marcador de peso molecular (kDa).

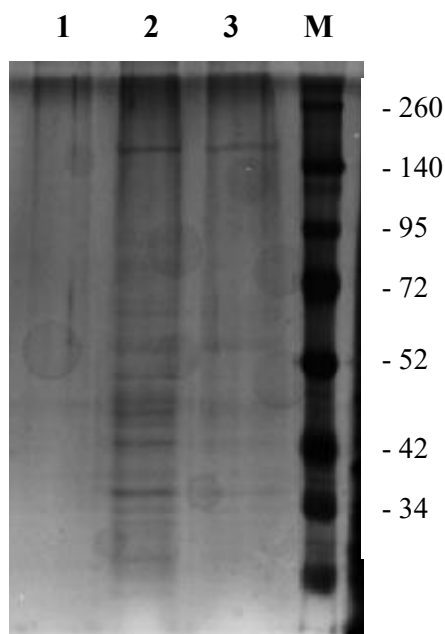


TABELA 4.3 – Atividade específica dos picos P1, P2 e P3 resultantes da purificação parcial da Quit-ASP

Amostra	[proteína] mg/ml	UA	UA/mg
<b>P1</b>	0,255	0,00813	0,319
<b>P2</b>	0,754	0,00886	0,117
<b>P3</b>	0,077	0,008077	1,048

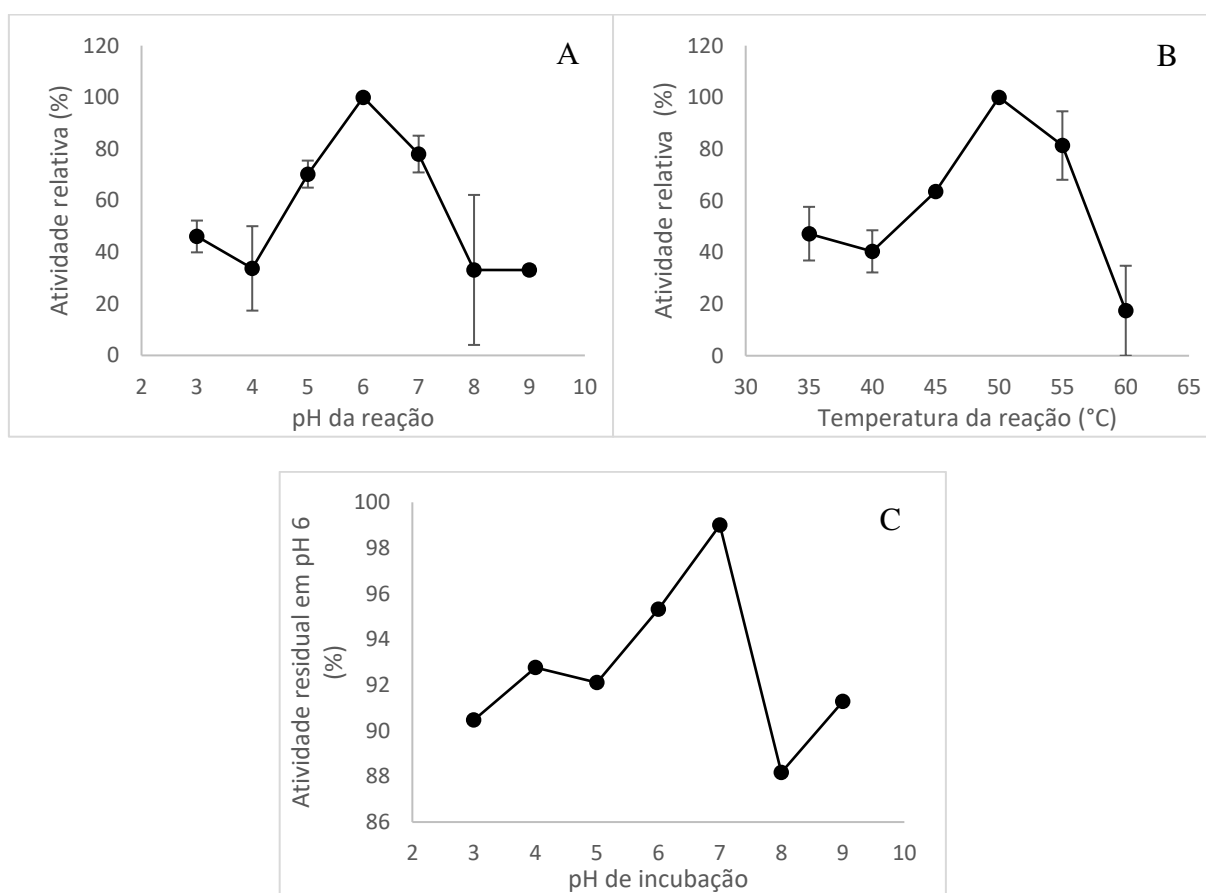
## 4.5 - Caracterização bioquímica das quitinases

### 4.5.1 - Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

A caracterização das quitinases extraídas de operárias e pupas de *Atta sexdens* revelou distintos perfis de pH ótimo e comportamento em diferentes valores de pH. A Quit-ASOA exibiu máxima atividade frente à quitina coloidal

em pH 6, mantendo em torno de 80% da atividade em pH 5 e 7. A atividade enzimática da Quit-ASOA também foi ótima em 50 e 55 °C (Figura 4.10, A e B). Além disso, a incubação em tampões com pH de 3 a 9 por 24 horas não inativou a enzima, que manteve até 88% de sua atividade em pH 8, e máxima atividade quando incubada em pH 7 (Figura 4.10, C).

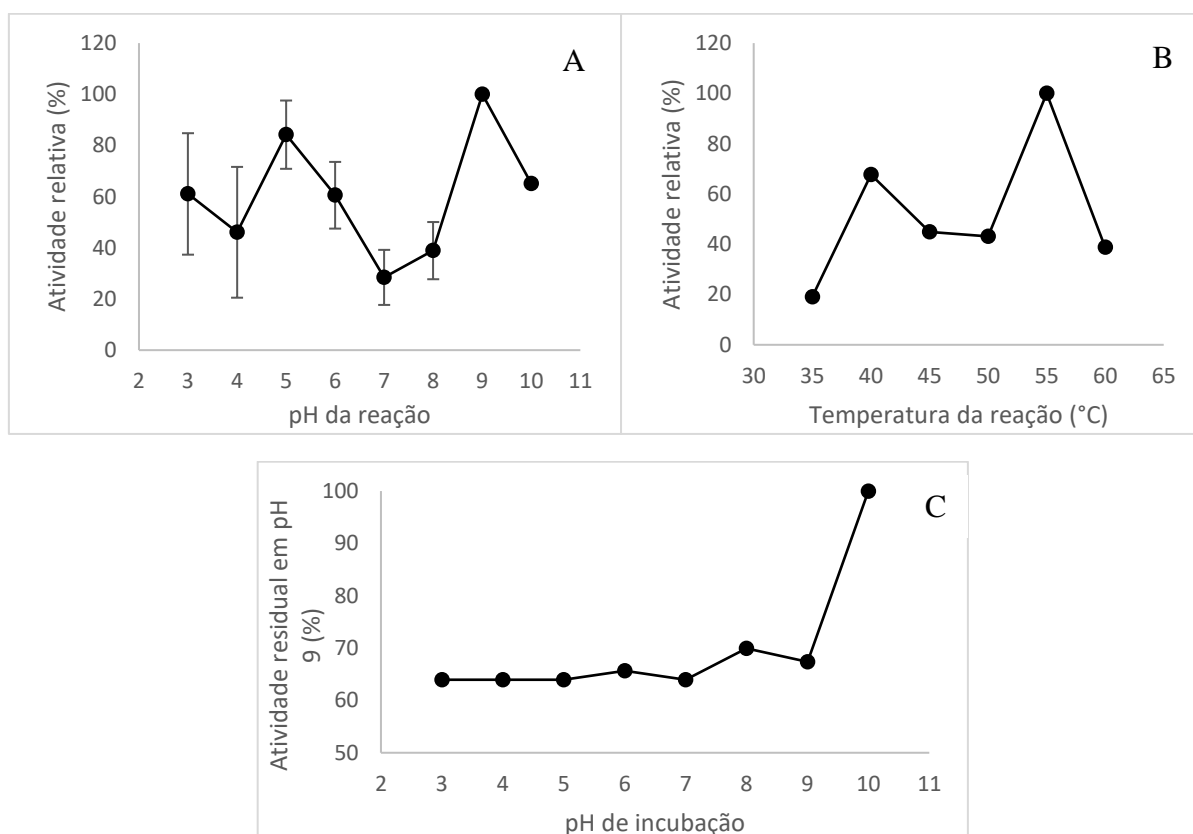
FIGURA 4.10 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da Quit-ASOA e estabilidade em diferentes pHs. (A) Efeito de diferentes valores de pH sobre a atividade enzimática, reação feita por 60 minutos a 40 °C; (B) Efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade enzimática, reação feita por 60 minutos em pH 6; (C) Estabilidade da Quit-ASOA quando incubada em diferentes pHs por 24 horas, onde a atividade residual foi medida por 30 minutos a 50 °C e pH 6 (condições ótimas). As barras de erro representam o desvio padrão.



A Quit-ASP exibiu máxima atividade frente à quitina coloidal em pH 9, mantendo mais de 80% da atividade em pH 5, e temperatura ótima em 55 °C (Figura 4.11, A e B). A existência de dois picos de pH e temperatura ótimos pode refletir a existência de mais de uma quitinase no extrato enzimático utilizado no

ensaio. A incubação em diferentes valores de pH (3 – 10), diferentemente da Quit-ASOA, mostrou que essa enzima se manteve muito mais estável quando incubada em pH 10, perdendo até 37% da atividade máxima em pHs menores (Figura 4.11, C).

FIGURA 4.11 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da Quit-ASP e estabilidade em diferentes pHs. (A) Efeito do pH sobre a atividade enzimática, reação feita por 60 minutos a 55 °C; (B) Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, reação feita por 30 minutos em pH 5; (C) Estabilidade da Quit-ASP quando incubada em diferentes pHs por 24 horas, onde a atividade residual foi medida em pH 9, por 30 minutos a 55 °C. As barras de erro representam o desvio padrão.



De acordo com os estudos de FEBVAY *et al.* (FEBVAY *et al.*, 1984), que demonstraram a presença de uma quitinase nas glândulas labiais de formigas operárias da espécie *Acromyrmex octospinosus* com pH ótimo de 7, e tal atividade quitinolítica estaria associada à digestão do fungo simbionte, e por isso as formigas produzem e secretam enzimas quitinolíticas (quitinases e chitobiosidades) nessas glândulas. Apesar da diferença no valor de pH ótimo em comparação com o da Quit-ASOA, para insetos, os resultados normalmente

variam entre 5,6 e 6,0 para quitinases do suco digestivo, como o de *P. americana* (WATERHOUSE et al., 1961), com pH ótimo de 6. Dessa maneira, a Quit-ASOA pode estar envolvida em processos de digestão de resíduos quitinosos no contato com o fungo simbiote ou na manutenção do exoesqueleto, atividades que ocorrem em microambientes com pH próximo ao neutro ou levemente ácido. Tal condição é compatível com o perfil de quitinases observadas em outros insetos durante a muda ou associados a secreções externas. Por exemplo, uma quitinase de *Ephestia kuehniella* associada à degradação da cutícula apresenta pH ótimo de 6 (MEHRANIAN et al., 2018).

Por outro lado, a atividade ótima e maior estabilidade da Quit-ASP em pH alcalino pode indicar a associação dessa quitinase ao ambiente intestinal da fase pupal. Embora não existam dados específicos sobre o pH do intestino médio de *Atta sexdens*, estudos com espécies próximas, como *Acromyrmex subterraneus*, indicam que o intestino médio posterior de larvas pode atingir valores de pH neutro a alcalino, enquanto a porção anterior se mantém ácida (ERTHAL et al., 2007). Nesse estudo, quitinases distintas foram identificadas nas glândulas labiais e no intestino médio, demonstrando que estas enzimas são específicas para cada microambiente. Além disso, o pH ótimo da Quit-ASP está de acordo com valores reportados na literatura, como o da quitinase de 75 kDa de *Bombyx mori*, que apresentou máxima atividade em pH 10 frente à glicol-quitina (KABIR et al., 2006). Outra hipótese sobre o papel da Quit-ASP nas pupas é o envolvimento desta com o remodelamento do exoesqueleto. O sinergismo entre a sintase de quitina e a quitinase nesse processo é estritamente regulado durante as fases pupais, sendo que a primeira é altamente expressa em larvas e pupas de *A. sexdens* (CHEN et al., 1982; MOREIRA et al., 2020). LEGER et al. (1998) demonstraram que a quitinase de inseto da espécie *Metarhizium anisopliae* foi expressa principalmente em pH ácido, próximo ao seu pH ótimo (5,0), mas também foi expressa em pH 8, o que está relacionado com o aumento do pH de extratos da cutícula do inseto devido à liberação de subprodutos amoniacais oriundos da degradação de proteínas da cutícula. Portanto, a presença de dois picos de pH ótimo podem representar uma adaptação das quitinases das pupas à variação de pH relacionada a esse processo.

A análise da temperatura ótima de atividade revelou que a Quit-ASOA apresenta máxima atividade enzimática a 50 °C, enquanto a Quit-ASP demonstrou desempenho superior a 55 °C. Esses valores se alinham à faixa de temperatura ideal descrita para quitinases de insetos, geralmente entre 40 e 60 °C, indicando que ambas as enzimas são termicamente estáveis e funcionalmente

adaptadas à fisiologia dos tecidos onde são expressas. Estudos anteriores também relatam valores similares para quitinases de outros insetos: uma quitinase recombinante de *Spodoptera litura*, por exemplo, apresentou temperatura ótima de 50 °C (SHINODA et al., 2001), enquanto quitinases de *Bombyx mori* e *Manduca sexta* demonstraram picos de atividade entre 40 e 60 °C (KOGA et al., 1997; ZHU et al., 2001). A temperatura ótima ligeiramente mais alta observada para a Quit-ASP pode refletir uma adaptação funcional ao contexto fisiológico da fase pupal, ou a diferenças estruturais intrínsecas da enzima, incluindo possíveis variações na glicosilação que conferem maior resistência térmica (SOLÁ; GRIEBENOW, 2009).

#### 4.5.2 - Influência de íons metálicos

O efeito de íons metálicos sobre a atividade da Quit-ASOA e da Quit-ASP foi avaliado em uma concentração de 5 mM (Figuras 4.12 e 4.13). A incubação das quitinases na presença desses íons durante 24 horas não acarretou na inibição da atividade em nenhum dos casos.

A Quit-ASOA teve sua atividade aumentada em 7% comparado com o controle pelos íons  $\text{Fe}^{3+}$ . De forma similar, uma quitinase de *Trichoderma asperellum* também apresentou aumento da atividade por parte desse íon (LOC et al., 2020). Em contrapartida, a Quit-ASOA foi ligeiramente afetada por íons  $\text{Ca}^{2+}$ , mantendo aproximadamente 85% da atividade nessa condição. Os outros íons tiveram efeitos insignificantes, mantendo de 92 a 99,8% da atividade.

Já a Quit-ASP apresentou maior sensibilidade ao efeito dos íons  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e, principalmente,  $\text{Cu}^{2+}$ , sendo responsáveis pelo aumento de 50%, 44% e 79% da atividade em relação ao controle, respectivamente. Resultados similares foram encontrados por MEHRANIAN *et al.* (MEHRANIAN et al., 2018), que reportaram a estimulação da quitinase de *Ephestia kuehniella* por esses mesmos íons, principalmente  $\text{Co}^{2+}$ . De acordo com os autores, o aumento da atividade está relacionado principalmente com a importância dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico nas quitinases, uma vez que esses grupos carboxílicos, identificados nos sítios ativos da enzima, são capazes de se ligar a certos cátions divalentes, o que pode favorecer a sua atividade catalítica.

FIGURA 4.12 – Efeito de íons metálicos sobre a atividade da Quit-ASOA, onde o controle (reação sem adição de metais) representa 100% de atividade. As barras de erro representam o desvio padrão.

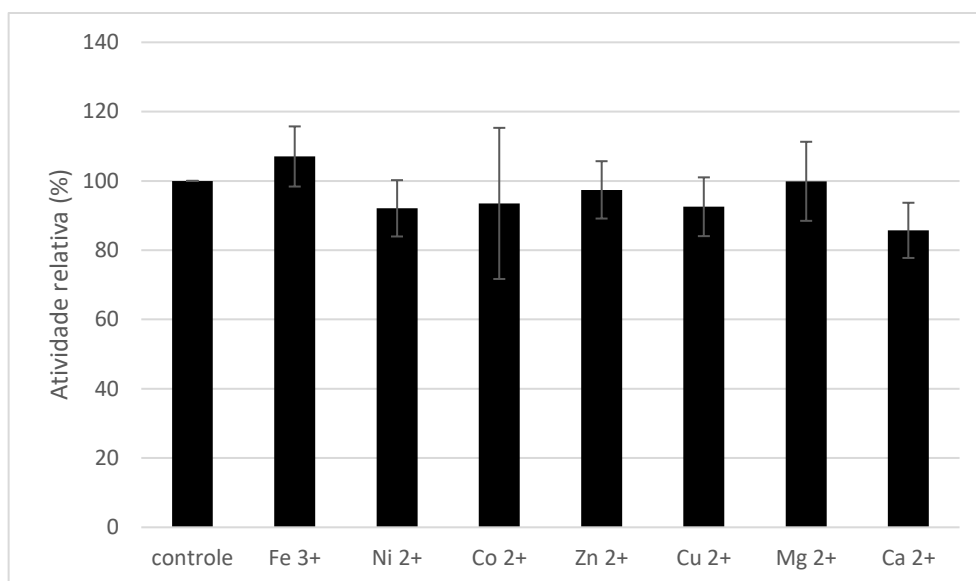
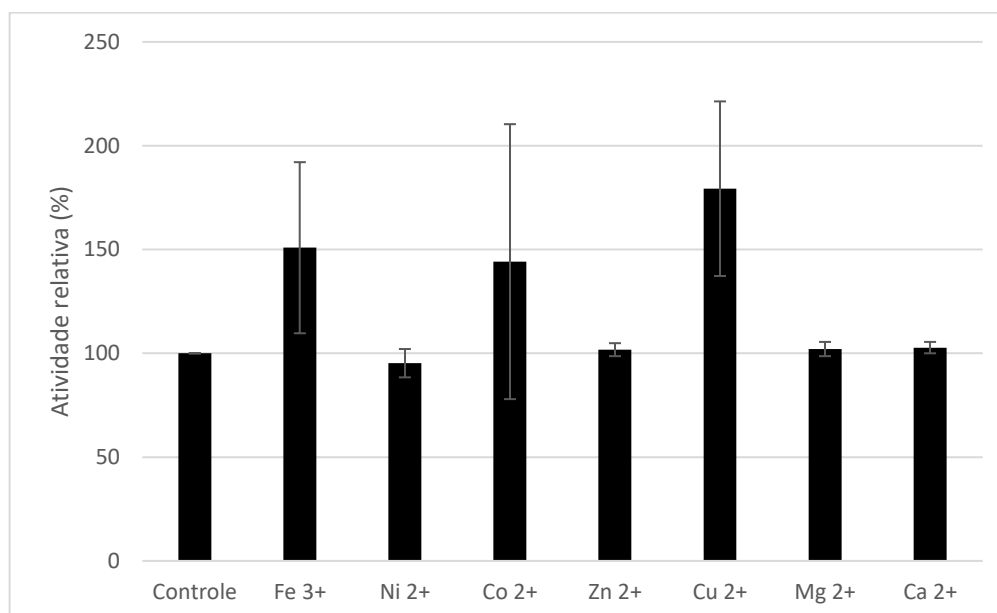


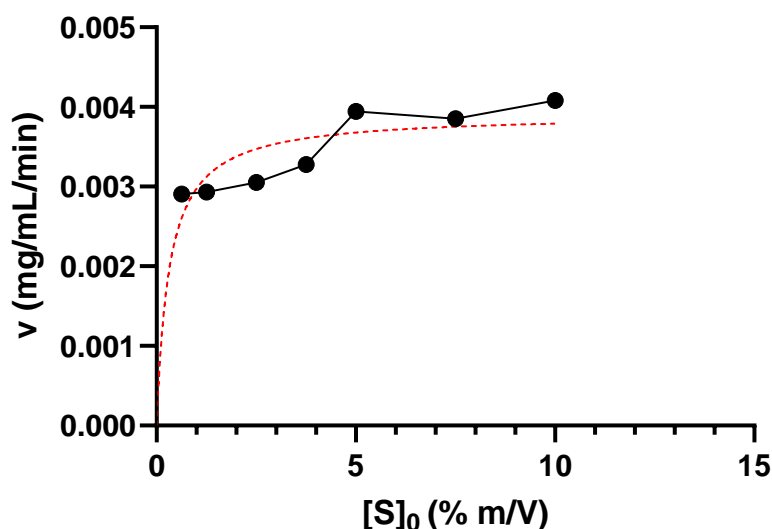
FIGURA 4.13 – Efeito de íons metálicos sobre a atividade da Quit-ASP, onde o controle (reação sem adição de metais) representa 100% de atividade. As barras de erro representam o desvio padrão.



### 4.5.3 - Análise cinética da Quit-ASOA

As constantes cinéticas da Quit-ASOA foram determinadas com quitina coloidal entre 0,625% a 10% m/V. Verificou-se que os dados obtidos apresentaram ajuste relativamente baixo com o modelo de Michaelis-Menten ( $R^2 = 0,6236$ , Figura 4.14). Também foi avaliado o modelo cinético de enzimas alostéricas, porém os dados não demonstraram boa correlação com o mesmo. Os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos com o ajuste de Michaelis-Menten foram de 0,3153% (m/V) (ou 3,1 mg/mL) e 0,0039 mg/mL/min, respectivamente, calculados por meio do Software GraphPad Prism 10 utilizando análises de regressão não-linear.

FIGURA 4.14 – Comportamento cinético da Quit-ASOA frente ao substrato quitina coloidal. A velocidade é dada em função da liberação de *N*-acetilglicosamina na reação (expressa em mg/mL/min). A linha pontilhada vermelha representa o ajuste ao modelo de Michaelis-Menten.



A análise gráfica indica que a faixa de concentração de quitina coloidal utilizada no ensaio foi inadequada para o alinhamento dos dados com o modelo cinético de Michaelis-Menten, sugerindo que o uso de concentrações mais baixas poderia ter representado a parte inicial da hipérbole, que não foi vista nas condições em que os dados foram adquiridos. Portanto, seria necessário adaptar o experimento para obter todas as fases da curva e, assim, parâmetros cinéticos mais precisos.

O valor de  $K_M$  encontrado para a Quit-ASOA foi próximo ao da quitinase de *E. kuehniella* ( $K_M = 3,98$  mg/mL) (MEHRANIAN et al., 2018) e de *S. marcescens* ( $K_M = 3,72$  mg/mL) (EMRUZIA et al., 2020), que também foram avaliados usando quitina coloidal como substrato, indicando que a Quit-ASOA possui afinidade um pouco maior por esse substrato. Entretanto, comparando os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , verificou-se que o da Quit-ASOA ( $\sim 83$ ) foi 11,7 vezes maior que o de *E. kuehniella* (7,11). Isso pode estar atrelado a diferenças de afinidade por substratos solúveis ou insolúveis, uma vez que os autores mostraram a quitinase de *E. kuehniella* exibiu maior afinidade pelo substrato solúvel (CM–Chitin–RBV) do que pela quitina coloidal, e explicaram que isso poderia estar relacionado com a estrutura de domínios da enzima. Estudos mostraram que domínios de ligação a quitina auxiliam na ancoragem da quitinase na superfície do substrato insolúvel, facilitando a hidrólise, mas isso não ocorre para substratos solúveis (MEHRANIAN et al., 2018). Portanto, o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  da Quit-ASOA pode estar associado a presença de CBD além de domínio catalítico.

#### 4.5.4 - Análise da estabilidade térmica da Quit-ASOA

A cinética de desativação térmica dependente do tempo da Quit-ASOA purificada foi estudada incubando a enzima em uma faixa de altas temperaturas (60 – 90 °C) para avaliar sua estabilidade nessas condições (Figura 4.15). Observou-se que a Quit-ASOA reteve mais de 78% de sua atividade nessa faixa de temperatura nos intervalos de tempo estudados. Além disso, essa quitinase foi ativada em 90 °C após 120 e 150 minutos de incubação, tendo sua atividade aumentada em relação ao controle.

O cálculo dos parâmetros termodinâmicos é essencial para prever o comportamento da enzima face à desnaturação térmica. Os parâmetros termodinâmicos da Quit-ASOA foram calculados através da obtenção das constantes de desnaturação  $k_d$  de primeira ordem, que é igual ao declive da curva %atividade relativa vs. tempo para cada temperatura estudada. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.3.

FIGURA 4.15 – Estabilidade térmica da Quit-ASOA em diferentes temperaturas (60, 70, 80 e 90 °C). A atividade da amostra controle (tempo 0) foi definida como 100% de atividade.

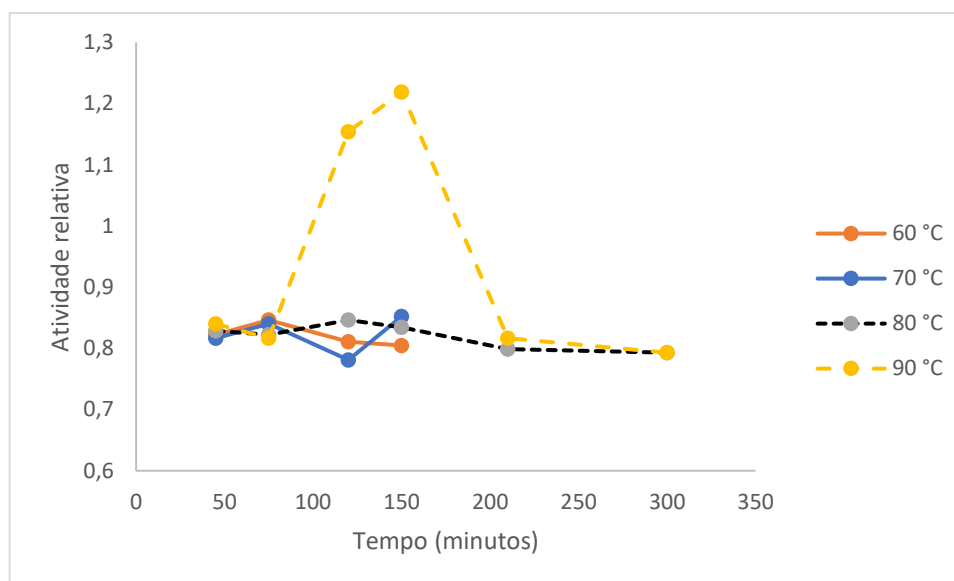


TABELA 4.4 – Parâmetros termodinâmicos para a desativação térmica da Quit-ASOA.

Temperatura (°C)	$\Delta H^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (J/mol·K)
<b>60</b>	77,7	122,8	-135,5
<b>70</b>	77,6	127,6	-143,6
<b>80</b>	77,5	131,9	-156,4
<b>90</b>	77,4	133,5	-159,6

Os parâmetros termodinâmicos determinados para a Quit-ASOA revelam comportamento compatível com enzimas termicamente estáveis, no entanto, verificou-se que com o aumento da temperatura (80 e 90 °C) o valor de  $k_d$  foi praticamente constante, já que mesmo após 5 horas de incubação a essas temperaturas a atividade enzimática ainda se manteve em 80% em relação ao controle. Observações na literatura mostram que a perda de atividade enzimática acima da temperatura ótima é reversível, à medida que a enzima recupera sua atividade ótima no processo de resfriamento (EISENTHAL et al., 2006). Além disso, as glândulas labiais de formigas cortadeiras secretam enzimas quitinolíticas

resistentes ao calor, outro fato que suporta o comportamento observado (MASIULIONIS; SAMUELS, 2025).

O valor da energia de ativação da desnaturação foi de 80,5 kJ/mol, valor compatível com a quitinase de *Trichoderma harzianum* (79 kJ/mol) (KAPAT; PANDA, 1997). Isso mostra que a Quit-ASOA é altamente tolerante a desnaturação e requer maior quantidade de energia até que o processo de desativação térmica inicie. O valor de  $\Delta H^\ddagger$  constante ( $\sim 77$  kJ/mol) também se assemelha aos valores encontrados para a quitinase de *T. harzianum* (70 a 76 kJ/mol em diferentes valores de pH) (KAPAT; PANDA, 1997) e o aumento gradual de  $\Delta G^\ddagger$  com a temperatura (de  $\sim 122$  a  $\sim 133$  kJ/mol) é semelhante ao observado ao de uma quitinase termicamente estável de *H. grisea* (EMRUZIA et al., 2020). Os valores positivos de  $\Delta G^\ddagger$  indicam que o processo de desativação térmica não foi termodinamicamente espontâneo, o que está de acordo com os resultados encontrados para as quitinases citadas anteriormente. O parâmetro  $\Delta H^\ddagger$  por sua vez está associado com o número de ligações não-covalentes que são rompidas durante o processo de desnaturação térmica, onde um maior valor de  $\Delta H^\ddagger$  representa maior estabilidade conformacional da enzima, pois mais energia é exigida para romper interações. Além disso, o valor de  $\Delta S^\ddagger$  representa a desordem estrutural da quitinase no estado de transição durante a desnaturação térmica. No presente estudo, os valores de  $\Delta S^\ddagger$  para a Quit-ASOA foram negativos, o que está de acordo com estudos anteriores. Isso é consistente com a agregação das enzimas desnaturadas, ou a compactação das enzimas reagentes, mas também pode estar atrelado à formação de partículas carregadas que são solvatadas pelas moléculas de solvente (EMRUZIA et al., 2020; KAPAT; PANDA, 1997).

#### 4.6 - Análise da sequência da Quit-ASOA

A análise por espectrometria de massas em modo MS/MS permitiu identificar e anotar um conjunto de peptídeos distribuídos ao longo de diferentes regiões estruturais da Quit-ASOA, os quais foram atribuídos a dezenas de sequências de quitinases de artrópodes baseado na porcentagem de cobertura e de espectros compartilhados. O conjunto de peptídeos identificados foram coerentes com o padrão de clivagem esperado para tripsina e quimotripsina, incluindo terminação preferencial em Lys/Arg (tripsina) e resíduos aromáticos (quimotripsina). Foram observados casos pontuais de *missed cleavage*,

particularmente em regiões estruturalmente compactas ou ricas em prolina, o que é consistente com a literatura (VAN DER LAARSE et al., 2020). Na análise, peptídeos quase idênticos com extensões de 1–2 aminoácidos nas extremidades foram agrupados, mantendo-se o peptídeo mais representativo.

A partir da classificação dos peptídeos, foi possível delimitar cinco regiões principais: (i) o domínio catalítico GH18, (ii) o domínio de ligação à quitina CBD, (iii) a região linker rica em serina (S), threonina (T) e prolina (P), (iv) regiões de baixa complexidade, e (v) um domínio acessório do tipo C1Q, como mostra a Tabela 4.5.

A presença simultânea dos domínios GH18 e CBD justifica e fortalece a identidade funcional da enzima como catalisadora da hidrólise da quitina insolúvel. Na região GH18, foram identificados diversos peptídeos contendo motivos altamente conservados, incluindo o motivo catalítico DXDXE, onde o glutamato é responsável pela coordenação e ativação da água nucleofílica na quebra da ligação  $\beta$ -1,4 entre resíduos de *N*-acetilglicosamina (SU et al., 2025). Entre os peptídeos detectados no domínio GH18, destacam-se: DPWADEEN, que apresenta a tríade catalítica D-D-E, e EAIAAGYDV, peptídeo localizado imediatamente adjacente ao resíduo catalítico. Na análise, este último foi atribuído a mais de 12 sequências de quitinases de diferentes isoformas.

Um ponto de particular relevância foi a identificação de peptídeos pertencentes a um domínio acessório do tipo C1q, que é caracterizado por apresentar estrutura globular na extremidade C-terminal. Em invertebrados, proteínas contendo o domínio C1q estão envolvidas no reconhecimento de patógenos e na resposta imune, além de exibir atividade de aglutinação seletiva, especialmente contra fungos, entre outras funções (GRINCHENKO et al., 2023). Em *Argopecten irradians*, por exemplo, uma proteína contendo o domínio C1q apresenta expressão induzida após exposição a bactérias e fungos, mas aglutina de forma eficaz apenas células de *P. pastoris*, indicando que a afinidade funcional pode ser específica para alvos fúngicos, e sua expressão ocorre predominantemente em glândulas digestivas e hemócitos, tecidos associados à interface digestiva e à imunidade inata (KONG et al., 2010).

TABELA 4.5 – Peptídeos identificados na estrutura primária da Quit-ASOA na análise por espectrometria de massas.

<b>GH18</b>	<b>CBD</b>	<b>LINKER</b>	<b>LOW COMPLEXITY</b>	<b>Domínio C1q</b>
AAAAYRKPPLTFSA	GSCDPGYK	DADIMSGGLTP	GKPSETPTTT	RTIISVGP GG
AMVFSIDM	GTIFHPVNLN	EKLPIPVL	GPKAPKIN	
DFYGSN	PGPAFECED	GQGKHPLMN	GPKRPLL	
DPWADEEN		ILATRANPLPAN	PGKPTSKP	
DQAYDIPAIKYLDIFIN		KAMKKEQGYK	PPKEITN	
EAIAGYDV		KNKTVSPNG	PPQTIPSTA	
EGHNYTGV		KPGKTVIKN	PPTTTSS	
EGSSGPGAPA		KPTKPSKPEPSK	PQGQRPHK	
FINSIVEFMN		KPTRPVTKPTN	PTKKPTATEKPP	
FSPMVADPA		LEKHRLNKN	PTKLSTRVP	
GDSGIKQN		LIDLHTTSSSVK	PTKPDHS	
GFAVLNSQ		LLVKEANAEAR	PTKPSKH	
GPKCAEN		NQIPAKKAQDR	PTKSSASS	
GPKGPGAPA		PGKARHS	PTKTTVRPA	
GPKVMLGLGG		PGKSHKN	QNTQSSSR	
GQSFQLENKSN		PLASDDRTS	QNVPIDVKKKN	
HLQPVVG		PPIETSRP	RSMVSSR	
IGKLLKANPN		PPTRAAVAW	SGVRPPPG	
KGPGRPTKLSH		PTINLQSST	SMAIPGGGI	
KPTKTLVIKNN		PTKKPNTQ	SSMTFSN	
KTGHLAPLYA		PTKLATPAAPI	SSRRRISSKIKQRTR	
LGGVTAWAV		PTKNRIKNN	SSRRRNKN	
LGHNRALMSR		PTKPNEI	TPAPPPTP	
LLKLTMDLKNKN		PTKPPGAWV	TPKPARPPTN	
LLSTVLPPFR		PTKPSKPE	TPKPKIPN	
LLTSAVAAGKST		PTTAASSSR	TPKPLTVTPSPVVHT	
MAVPASLE		QNFRLASKGG		
PGKAGALSH		QNQIAIQN		
PGKFSLE		QNSDRKGNALPVR		
PKMTRKQKN		QNVKIPTGG		
PTKALQHS		QQIQAAPLE		
SMGPYAY		SSMTFSN		
SSRKKFIESAI		TEAPLVSEEQ		
SSRKTISSTQK		TPKAESH		
TPKEKLVIGM		TPKISIGV		
TPKIVCY		TPKNSYR		
VAPLFYH		TPKQLEDFAT		
VMLLSAAVPVG		TPKTAVVSTEN		
WMKEGAP		VATVIALAVG		
YLVSLGAARSKLLVG		VNIRRSRPTTPT		

Na análise dos peptídeos da Quit-ASOA, o domínio C1q foi inicialmente reconhecido pela sobreposição com sequências homólogas de quitinases de espécies próximas, incluindo *Pseudoatta argentina* e *Acromyrmex charruanus*, nas quais esse mesmo domínio já havia sido anotado como parte da arquitetura estrutural. Esse achado é importante pois ressalta que o resultado não veio de erro de anotação, e demonstra que a presença desse domínio é observada em quitinases de formigas cortadeiras, indicando uma função adaptativa comum a certas espécies do grupo. Nessas espécies, a inclusão do domínio C1Q sugere um papel associado ao reconhecimento e ancoragem a superfícies fúngicas, favorecendo tanto a digestão quanto a distinção entre o fungo simbiote e potenciais patógenos oportunistas (GRINCHENKO et al., 2023). Diante disso, a interpretação funcional da Quit-ASOA é fortalecida pela caracterização bioquímica, que apontou atividade enzimática adaptada ao trato digestivo.

Considerando a organização modular GH18 + CBD + linker + C1Q, estima-se que a enzima possua ~600–780 aminoácidos, resultando em uma massa teórica de ~66–86 kDa para o monômero. Esse valor está de acordo com a massa experimental observada (~70 kDa).

A Figura 4.16 apresenta o alinhamento entre as sequências dos domínios CBD de quitinases de *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hermetia illucens* e *Orchesella cincta*, que apresentaram match com três dos peptídeos identificados na sequência da Quit-ASOA. A comparação entre os três domínios das sequências moldes revelou níveis baixos de identidade, variando entre 26% e 32,7%, e níveis moderadamente superiores de similaridade química, entre 42,9% e 50,9%, o que indica que a dobra tridimensional essencial permanece preservada mesmo diante da variabilidade primária. Esse padrão, caracterizado por identidade baixa a moderada, porém maior similaridade, é típico de proteínas homólogas que mantêm função semelhante, mas apresentam divergência primária acentuada (YANG; HONIG, 2000). A manutenção das características estruturais é reforçada pela conservação do padrão de cisteínas. Mesmo nos pares com menor identidade, o alinhamento revela que as cisteínas responsáveis pelas pontes dissulfeto aparecem posicionadas de modo compatível com o arranjo estrutural conhecido.

A Figura 4.17 mostra o alinhamento entre essas sequências molde e os peptídeos identificados para a Quit-ASOA, os quais apresentaram alta sobreposição em determinadas regiões. Observa-se que os peptídeos mapeados na Quit-ASOA contêm apenas dois resíduos de cisteína, enquanto os CBDs do tipo II, característicos de quitinases da Classe I e II, apresentam um conjunto conservado de seis resíduos de cisteína, essenciais para a formação da estrutura



## 5 - Conclusões

Neste trabalho, foram isoladas, purificadas e caracterizadas duas quitinases nativas da formiga cortadeira *Atta sexdens*, denominadas Quit-ASOA (extraída de operárias adultas) e Quit-ASP (extraída de pupas). A partir de estratégias de extração otimizadas, incluindo o uso de tampão acetato de sódio pH 5 e aditivos como Tween 20, foi possível obter extratos com maior atividade quitinolítica. A purificação das enzimas envolveu etapas de precipitação seletiva com sulfato de amônio, cromatografia por troca iônica (para a Quit-ASOA) e exclusão molecular, permitindo a separação de quitinases com diferentes perfis bioquímicos.

Através da caracterização bioquímica utilizando a quitina coloidal como substrato, verificou-se que a Quit-ASOA apresentou pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 50 °C, enquanto a Quit-ASP apresentou pH ótimo de 9,0 e temperatura ótima de 55 °C. A primeira foi estável em uma ampla gama de pH (3 – 9), enquanto a segunda demonstrou maior estabilidade em pH 10. Além disso, ambas tiveram sua atividade aumentada na presença de íons  $Fe^{3+}$ , sendo que a Quit-ASP demonstrou maior sensibilidade à ativação por íons metálicos, principalmente pelo  $Cu^{2+}$ , atingindo até 179% de atividade quitinolítica. Esses dados sugerem uma expressão diferencial dessas enzimas ao longo do ciclo de vida da formiga, refletindo adaptações fisiológicas às demandas específicas de cada fase.

As propriedades cinéticas da Quit-ASOA indicaram uma afinidade moderada pelo substrato quitina coloidal em comparação com dados da literatura, sugerindo a possível existência de domínio de ligação à quitina em sua estrutura, o qual é capaz de aumentar a afinidade por substratos insolúveis. As propriedades termodinâmicas dessa quitinase também foram determinadas utilizando altas temperaturas, indicando uma elevada estabilidade térmica.

Adicionalmente, análises por cromatografia e eletroforese indicaram a possível existência de formas diméricas da Quit-ASOA, potencialmente estabilizadas por pontes dissulfeto, fenômeno observado em quitinases de outros organismos. Através da espectrometria de massas da amostra purificada da Quit-ASOA, verificou-se a existência de múltiplos peptídeos associados a domínios catalíticos GH18, CBD, regiões de baixa complexidade e linker, além de um domínio acessório Clq. Esses achados confirmam que a enzima foi obtida em sua

forma ativa, e reforçam a hipótese funcional da Quit-ASOA no trato digestivo da formiga.

O presente trabalho contribui de forma inédita com a caracterização bioquímica e biofísica de uma quitinase nativa, e ajuda na compreensão da função e diferenciação dessa enzima ao longo das fases de vida da formiga cortadeira *Atta sexdens*.

## 6 - Referências bibliográficas

ADRANGI, Sina; FARAMARZI, Mohammad Ali. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1786–1795, dez. 2013.

ARAKANE, Yasuyuki; MUTHUKRISHNAN, Subbaratnam. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 2, p. 201–216, jan. 2010.

AUGUSTIN, J. O.; SANTOS, J. F. L.; ELLIOT, S. L. A behavioral repertoire of *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) queens during the claustral founding and ergonomic stages. **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 2, p. 197–206, maio 2011.

BARRERA, Corina A. *et al.* Phylogenomic reconstruction reveals new insights into the evolution and biogeography of *Atta* leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, v. 47, n. 1, p. 13–35, jan. 2022.

BOLOGNESI, Renata *et al.* Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 11, p. 1249–1259, nov. 2005.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

CABRAL, Aline Diniz *et al.* Dataset on recombinant expression of an ancient chitinase gene from different species of *Leishmania* parasites in bacteria and in *Spodoptera frugiperda* cells using baculovirus. **Data in Brief**, v. 32, p. 106259, out. 2020.

CHEN, Andrew C.; MAYER, Richard T.; DELOACH, John R. Purification and characterization of chitinase from the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 216, n. 1, p. 314–321, jun. 1982.

CORRÊA, Katia Celina Santos. **Obtenção E Aplicação Biológica De Quitinases Recombinantes Da Formiga *Atta Sexdens***. Tese de Doutorado—São Carlos: UFSCar, 2023.

DAHIYA, Neetu; TEWARI, Rupinder; HOONDAL, Gurinder Singh. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773–782, ago. 2006.

DUKARIYA, Garima; KUMAR, Anil. Distribution and Biotechnological Applications of Chitinase: A Review. **International Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 8, n. 2, p. 17–29, ago. 2020.

EBNER, Friederike *et al.* A Helminth-Derived Chitinase Structurally Similar to Mammalian Chitinase Displays Immunomodulatory Properties in Inflammatory Lung Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, p. 1–24, 25 nov. 2021.

EGUSA, Mayumi *et al.* Chitin Nanofiber Elucidates the Elicitor Activity of Polymeric Chitin in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 9 dez. 2015.

EISENTHAL, Robert *et al.* The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 289–292, jul. 2006.

EMRUZIA, Z. *et al.* Kinetic and Thermo-Inactivation Thermodynamic Parameters of a Novel Isolated *Serratia Marcescens* B4A Chitinase. p. 46–55, 2020.

ERTHAL, Milton; PERES SILVA, Carlos; IAN SAMUELS, Richard. Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1101–1111, nov. 2007.

FEBVAY, G.; DECHARME, M.; KERMARREC, A. Digestion of chitin by the labial glands of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Hymenoptera: Formicidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 2, p. 229–234, 1 fev. 1984.

FILHO, Tarcísio Marcos Macedo Mota. **Controle Da Formiga Cortadeira, Atta Sexdens (Hymenoptera: Formicidae), Utilizando Inseticidas: Estudo Sobre Os Mecanismos Comportamentais**. Dissertação de mestrado—Botucatu, SP: UNESP, 11 out. 2022.

FUKAMIZO, Fukamizo. Chitinolytic Enzymes: Catalysis, Substrate Binding, and their Application. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, n. 1, p. 105–124, 1 jul. 2000.

GALANTE, Rafaela Santos. **Estudos De Quitinases De Moniliophthora Perniciosa (Stahel) Aime & Phillips-Mora, Fungo Causador Da Vassoura-De-Bruxa No Cacaueiro: Purificação, Caracterização E Modelagem Comparativa**. Dissertação de mestrado—Feira de Santana: UEFS, 2008.

GAO, Cong *et al.* Characterization of extracellular chitinase from *Chitinibacter* sp. GC72 and its application in GlcNAc production from crayfish shell

enzymatic degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 59–64, maio 2015.

GRINCHENKO, Andrei; BURIK, Ivan; KUMEIKO, Vadim. Invertebrate C1q Domain-Containing Proteins: Molecular Structure, Functional Properties and Biomedical Potential. **Marine Drugs**, v. 21, n. 11, p. 570, 30 out. 2023.

HAMID, Rifat *et al.* Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 21, 2013.

HÖLLDOBLER, Bert; WILSON, Edward O. **The ants**. Cambridge, Mass: Belknap Press of Harvard University Press, 1990.

HORN, Svein J. *et al.* Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18089–18094, 28 nov. 2006.

HUANG, Qian-Sheng *et al.* The GH18 family of chitinases: Their domain architectures, functions and evolutions. **Glycobiology**, v. 22, n. 1, p. 23–34, jan. 2012.

INOKUMA, Kentaro; TAKANO, Maki; HOSHINO, Kazuhiro. Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 24–32, mar. 2013.

ISLAM, Roushan; DATTA, Bejoysekhar. Diversity of chitinases and their industrial potential. p. 55–60, 2015.

KABIR, Khondkar Ehteshamul *et al.* Purification and Characterization of a Novel Isozyme of Chitinase from *Bombyx mori*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 252–262, jan. 2006.

KABIR, Syed Rashel *et al.* Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 62–68, mar. 2016.

KAPAT, A.; PANDA, T. pH and thermal stability studies of chitinase from *Trichoderma harzianum*: A thermodynamic consideration. **Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 5, p. 269, 1997.

KHOUSHAB, Feisal; YAMABHAI, Montarop. Chitin Research Revisited. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 1988–2012, 28 jun. 2010.

KIM, Hee-Jung *et al.* ROSics: Chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 34, n. 2, p. 184–208, abr. 2015.

- KIM, Sung Kyum *et al.* Molecular Characterization of Four Alkaline Chitinases from Three Chitinolytic Bacteria Isolated from a Mudflat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12822, 26 nov. 2021.
- KOGA, Daizo *et al.* Purification and characterization of Bombyx mori chitinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 8–9, p. 757–767, ago. 1997.
- KONG, Pengfei *et al.* AiC1qDC-1, a novel gC1q-domain-containing protein from bay scallop *Argopecten irradians* with fungi agglutinating activity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 8, p. 837–846, ago. 2010.
- KRAMER, Karl J.; MUTHUKRISHNAN, Subbaratnam. Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 11, p. 887–900, nov. 1997.
- KUMARI, Rajni *et al.* Response surface optimization, purification, characterization and short-chain chitooligosaccharides production from an acidic, thermostable chitinase from *Thermomyces dupontii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 267, p. 131362, maio 2024.
- LACERDA, Fabrícia Gonçalves *et al.* Age Polyethism in *Atta sexdens* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 67, n. 4, p. 508–513, 28 dez. 2020.
- LIANG, Tzu-Wen *et al.* Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 8–14, fev. 2014.
- LIU, Tian *et al.* Structural and biochemical insights into an insect gut-specific chitinase with antifungal activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, p. 103326, abr. 2020.
- LOC, Nguyen Hoang *et al.* Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. **Mycology**, v. 11, n. 1, p. 38–48, 2 jan. 2020.
- MALERBA, Massimo; CERANA, Raffaella. Recent Applications of Chitin- and Chitosan-Based Polymers in Plants. **Polymers**, v. 11, n. 5, p. 839, 8 maio 2019.
- MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo, SP: [S.n.].
- MASIULIONIS, Virginia Elena; SAMUELS, Richard Ian. Investigating the Biology of Leaf-Cutting Ants to Support the Development of Alternative Methods for the Control and Management of These Agricultural Pests. **Agriculture**, v. 15, n. 6, p. 642, 18 mar. 2025.

MCILVAINE, T. C. A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183–186, nov. 1921.

MEHRANIAN, Mahmoud *et al.* Purification and characterization of chitinase from the integument of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and its antibacterial role. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 38, n. 02, p. 105–116, jun. 2018.

MENDONSA, E. S. *et al.* An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 4, p. 373–376, abr. 1996.

MICOCCI, Kelli C. *et al.* Identification, cloning, and characterization of a novel chitinase from leaf-cutting ant *Atta sexdens*: An enzyme with antifungal and insecticidal activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1867, n. 1, p. 130249, jan. 2023.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

MOREIRA, Ariele *et al.* Analysis of the Gene Expression and RNAi-Mediated Knockdown of Chitin Synthase from Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

MOREIRA, Ariele Cristina. **O futuro do controle das formigas-cortadeiras: metabolismo de lipídeos**. Rio Claro, SP: UNESP, 2023. . Acesso em: 28 jul. 2025.

NORGEN BIOTEK. **ProteoSpin Detergent Cleanup Micro Kit: Efficient removal of both free and tightly-bound SDS from protein samples.** [*S.l.*: *S.n.*]. Disponível em: <[https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/proteospin\\_detergent\\_cleanup\\_micro\\_kit\\_efficient\\_removal\\_of\\_both\\_free\\_and\\_tightlybound\\_sds\\_from\\_protein\\_application\\_notes\\_7.pdf](https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/proteospin_detergent_cleanup_micro_kit_efficient_removal_of_both_free_and_tightlybound_sds_from_protein_application_notes_7.pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2025.

OYELEYE, Ayokunmi; NORMI, Yahaya M. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 4, p. BSR2018032300, 31 ago. 2018.

PAZ, Luan Rios; SANTOS, Luis Alberto Loureiro dos. QUITINA E QUITOSANA: UMA REVISÃO SOBRE OS PROCESSOS DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES. 23 jan. 2024.

RABADIYA, Dhyeykumar; BEHR, Matthias. The biology of insect chitinases and their roles at chitinous cuticles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, p. 104071, fev. 2024.

RATHORE, Abhishek Singh; GUPTA, Rinkoo D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. **Enzyme Research**, v. 2015, p. 1–8, 19 nov. 2015.

ROBERTS, George A. F. **Chitin Chemistry**. London: Macmillan Education UK, 1992.

SHINODA, Tetsuro *et al.* Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant baculovirus lacking the virus-encoded chitinase gene. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 6–7, p. 521–532, abr. 2001.

SKUJINS, J. J.; POTGIETER, H. J.; ALEXANDER, M. Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and  $\beta$ -(1→3) glucanase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 111, n. 2, p. 358–364, ago. 1965.

SOLÁ, Ricardo J.; GRIEBENOW, Kai. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1223–1245, abr. 2009.

SOLIS, Daniel Russ *et al.* On the morphology of the worker immatures of the leafcutter ant *Atta sexdens* linnaeus (Hymenoptera: Formicidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 8, p. 1059–1065, ago. 2012.

SPANÒ, Delia *et al.* Chitinase III in *Euphorbia characias* latex: Purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 116, p. 152–158, dez. 2015.

ST. LEGER, Raymond J.; JOSHI, Lokesh; ROBERTS, Donald. Ambient pH Is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 709–713, fev. 1998.

STAUFENBERGER, Tim; IMHOFF, Johannes F.; LABES, Antje. First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*. **Microbiological Research**, v. 167, n. 5, p. 262–269, maio 2012.

SU, Haipeng *et al.* Biochemical Characterization of a Family GH18 Specific-Domain Chitinase: Chitin-Binding Domain Modulates the Reaction Specificity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 73, n. 17, p. 10389–10398, 30 abr. 2025.

THARANATHAN, Rudrapatnam N.; KITTUR, Farooqahmed S. Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61–87, jan. 2003.

THIMOTEO, Sarah Sacks. **Caracterização e Atividade Biológica de Quitinasas Provenientes de Uma Biblioteca Metagenômica**. Tese de Doutorado—Paraná: UFPr, 2015.

UDAYA PRAKASH, N. A. *et al.* Evolution, Homology Conservation, and Identification of Unique Sequence Signatures in GH19 Family Chitinases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 70, n. 5, p. 466–478, maio 2010.

VAN AALTEN, D. M. F. *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 8979–8984, 31 jul. 2001.

VAN DER LAARSE, Saar A. M. *et al.* Targeting proline in (phospho)proteomics. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 14, p. 2979–2997, jul. 2020.

VANNELLA, Kevin M. *et al.* Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes. **Nature Immunology**, v. 17, n. 5, p. 538–544, maio 2016.

WATANABE, T. *et al.* The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 15, p. 4465–4472, ago. 1994.

WATERHOUSE, D. F.; HACKMAN, R. H.; MCKELLAR, J. W. An investigation of chitinase activity in cockroach and termite extracts. **Journal of Insect Physiology**, v. 6, n. 2, p. 96–112, abr. 1961.

WEI, Anran; FU, Jimin; GUO, Fenglin. Mechanical properties of chitin polymorphs: A computational study. **Journal of Materials Science**, v. 56, n. 20, p. 12048–12058, jul. 2021.

WILSON, Edward O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta): I. The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, n. 2, p. 143–156, jul. 1980.

YANG, An-Suei; HONIG, Barry. An integrated approach to the analysis and modeling of protein sequences and structures. I. Protein structural alignment and a quantitative measure for protein structural distance. **Journal of Molecular Biology**, v. 301, n. 3, p. 665–678, ago. 2000.

ZAKARIASSEN, Henrik *et al.* Aromatic Residues in the Catalytic Center of Chitinase A from *Serratia marcescens* Affect Processivity, Enzyme Activity, and

Biomass Converting Efficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 16, p. 10610–10617, abr. 2009.

ZHU, Xiahui *et al.* Properties of *Manduca sexta* chitinase and its C-terminal deletions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 12, p. 1221–1230, nov. 2001.