

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA – DEQ
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

João Pedro Nardachione Teso

**Expressão heteróloga e análise *in silico* da nova enzima halogenase “LavH” de
Streptomyces lavendulae subsp. *lavendulae***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal de
São Carlos como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia
Orientador: Prof. Adilson José da Silva

São Carlos-SP
2026

RESUMO

Halogenases são enzimas capazes de adicionar um átomo de halogênio em uma molécula orgânica. Estão presentes em diversos gêneros de microrganismos e possuem grande variedade de substratos e mecanismos de ação como, por exemplo, as halogenases dependentes de flavina (FDH) capazes de halogenar L-triptofano utilizando FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo reduzido) como cofator. Há interesse industrial em prospectar novas halogenases, visto que os métodos de halogenação industrial dependem de substratos tóxicos, têm pouca especificidade estereoquímica e geram subprodutos poluentes e nocivos. Neste sentido, no presente estudo é reportada a expressão heteróloga e estudos *in silico* pela primeira vez da FDH de *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae*, aqui nomeada de LavH. Sua atividade como halogenase de L-triptofano com cloro e bromo foi constatada *in vivo* em células de *Escherichia coli* através de espectrometria de massas, e observou-se uma ótima solubilidade, diferentemente de outras halogenases, usualmente pouco solúveis. Ademais, para aumentar a sua viabilidade de uso em uma biofábrica, a enzima foi fusionada com a redutase de flavina Fre de *E. coli* resultando em uma enzima fusionada muito pouco solúvel, algo destoante da literatura. Visando realizar ensaios *in vitro*, a LavH e a Fre foram purificadas por cromatografia de afinidade em colunas Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético). No ensaio de atividade *in vitro* não houve formação de produto halogenado suficiente para a quantificação em HPLC e, desta forma, novos ensaios com tempos reacionais maiores são necessários. Nas análises *in silico*, foi realizado o alinhamento e construção de árvore filogenética com outras FDHs caracterizadas na literatura, observando proximidade evolutiva com as enzimas BorH e ThaL. Em seguida, a estrutura tridimensional da LavH foi modelada utilizando AlphaFold3 e estudos de *docking* molecular foram realizados visando elucidar a estrutura do sítio catalítico e a preferência de halogenação desta pelo substrato L-triptofano. Portanto, este estudo contribui para o entendimento da atividade desta nova halogenase, sua estrutura e parentesco evolutivo com outras enzimas, além do seu potencial como uma enzima industrial e os desafios relacionados a esta aplicação.

Palavras-chave: Halogenase. *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae*. *Escherichia coli*. LavH. Biofábrica. *Docking* molecular. Filogenia.

ABSTRACT

Halogenases are enzymes capable of adding a halogen atom to an organic molecule. They are present in diverse genera of microorganisms and exhibit a wide variety of substrates and mechanisms of action, such as flavin-dependent halogenases (FDHs), which are capable of halogenating L-tryptophan using FADH₂ (reduced flavin adenine dinucleotide) as a cofactor. There is industrial interest in prospecting for new halogenases, since industrial halogenation methods rely on toxic reagents, lack stereochemical specificity, and generate polluting and harmful byproducts. In this context, the present study reports, for the first time, the heterologous expression and *in silico* studies of the FDH from *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae*, herein named LavH. Its activity as an L-tryptophan halogenase with chlorine and bromine was confirmed *in vivo* in *Escherichia coli* cells through mass spectrometry, and excellent solubility was observed, unlike other halogenases, which are usually poorly soluble. Furthermore, to increase its viability for use in a biofactory, the enzyme was fused with the *E. coli* flavin reductase Fre, resulting in a highly insoluble fused enzyme, a finding that contrasts with existing literature. Thus, for *in vitro* assays, LavH and Fre were purified by affinity chromatography using Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) columns. However, insufficient halogenated product was formed through the *in vitro* assay for quantification via HPLC, indicating that further assays with longer reaction times are required. For the *in silico* analyses, sequence alignment and the construction of a phylogenetic tree with other characterized FDHs were performed, revealing an evolutionary proximity to the enzymes BorH and ThaL. Subsequently, the three-dimensional structure of LavH was modeled using AlphaFold3, and molecular docking studies were carried out to elucidate the catalytic site structure and its halogenation preference for the L-tryptophan substrate. Ultimately, this study contributes to the understanding of the activity of this novel halogenase, its structure, and its evolutionary relationship with other enzymes, as well as its potential as an industrial enzyme and the challenges associated with this application.

Keywords: Halogenase. *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae*. *Escherichia coli*. LavH. Biofactory. Molecular Docking. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fenazinas e seus respectivos MIC para <i>S. aureus</i> reportados no estudo.....	10
Figura 2 - Ciclo catalítico das haloperoxidases.....	12
Figura 3 - Carbonos alvo em L-triptofano.....	13
Figura 4 - Halogenação de L-triptofano em C5, C6 e C7.....	15
Figura 5 - Mecanismos catalíticos do sítio ativo das FDHs.....	16
Figura 6 - Esquema descritivo da fusão enzimática da SttH e Fre.....	17
Figura 7 - Imagem esquemática da reação da CPEC.....	25
Figura 8 - Alinhamento da sequência esperada do plasmídeo com o resultado do sequenciamento MinION visualizado no software SnapGene.....	34
Figura 9 - Variação da DO 600 nm ao longo do tempo em horas.....	35
Figura 10 - Cromatogramas EIC obtidos pelo sistema UHPLC-QTOF-MS/MS.....	36
Figura 11 - Extrato solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de <i>E. coli</i> QH4_PCA_S_LavH em seus respectivos tempos de indução.....	38
Figura 12 - Extrato proteico total, solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de <i>E. coli</i> BL21(DE3)_LavH em seus respectivos tempos de indução.....	38
Figura 13 - Extrato proteico total, solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de <i>E. coli</i> BL21(DE3)_Fre em seus respectivos tempos de indução.....	40
Figura 14 - Extrato proteico total, solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de <i>E. coli</i> BL21(DE3)_Fre_LavH em seus respectivos tempos de indução.....	41
Figura 15 - Frações de eluição da coluna cromatográfica visualizada em SDS-PAGE.....	42
Figura 16 - Frações de eluição da coluna cromatográfica para a purificação do estoque enzimático visualizada em SDS-PAGE.....	43
Figura 17 - Curva padrão da reação de Bradford.....	44
Figura 18 - Amostras enzimáticas concentradas em SDS-PAGE.....	45
Figura 19 - Curva padrão para a quantificação de L-triptofano.....	46
Figura 20 - Cromatograma da amostra de 300 μ M de L-triptofano.....	46
Figura 21 - Árvore filogenética para as halogenases de triptofano estudadas.....	49
Figura 22 - Estrutura tridimensional da LavH modelada com AlphaFold3.....	50

Figura 23 - Gráfico de ramachandran e tabela indicando o favorecimento da torção de resíduos.....	50
Figura 24 - Sobreposição da BorH com a LavH.....	52
Figura 25: Histograma de número de posições por cluster de energia.....	53
Figura 26 - Complexo receptor ligante para o docking rígido.....	53
Figura 27 - Mapa das forças de interação intermoleculares para o docking rígido.....	54
Figura 28 - Histograma de número de posições por cluster de energia.....	55
Figura 29 - Complexo receptor ligante para o docking com resíduo flexível.....	56
Figura 30 - Mapa das forças de interação intermoleculares para o docking com resíduo flexível.....	56
Figura 31 - Complexo entre ligante e receptor na estrutura cristalográfica da BorH.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPEC Circular polymerase extension reaction

DO Densidade óptica

ESI Eletrospray

FAD Flavina adenina dinucleotídeo

FADH₂ Flavina adenina dinucleotídeo reduzido

FDH Halogenase dependente de flavina Fre Redutase de flavina de E. coli

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

HOX Ácido hipohaloso

IPTG Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LB Luria-Bertani

MIC Minimum inhibitory concentration

NCBI Nacional Center For Biotechnology Information

Ni-NTA Níquel-ácido nitrilotriacético

PBS Phosphate-buffered saline

PCA Fenazina-1-ácido carboxílico

PCR Polymerase chain reaction

pLDDT Predicted local distance difference test

pTM Predicted template modeling PVC Policloreto de vinila

Q-TOF-MS/MS Quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry

RMN Ressonância Magnética Nuclear

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TB Terrific Broth

TSB Tryptic Soy Broth

UFSCar Universidade Federal de São Carlos

UHPLC Cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência

UNESP Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 HALOGENAÇÃO	9
1.2 HALOGENASES	11
1.2.1 Halogenases dependentes de flavina (FDHs)	12
1.2.1.1 Diversidade	12
1.2.1.2 Mecanismo de catálise	14
1.2.1.3 Aplicações e desafios	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MÉTODOS	19
3.1 PLASMÍDEOS E LINHAGENS	19
3.2 PRIMERS	20
3.3 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E ESTOQUE DOS GENES lavh E fre	21
3.4 TRANSFORMAÇÃO E CULTIVOS EM E. COLI QH4_PCA_S	22
3.4.1 Análise da solubilidade da LavH	23
3.4.2 Espectrometria de massas	24
3.5 FUSÃO DAS ENZIMAS FRE E LAVH	24
3.6 EXPRESSÃO E ANÁLISES EM E. COLI BL21(DE3)	26
3.6.1 Subclonagem e transformação	27
3.6.2 Análises de solubilidade	27
3.6.3 Purificação das enzimas por cromatografia de afinidade	28
3.6.4 Ensaios in vitro	29
3.6.5 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	31
3.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA	31
3.8 DOCKING MOLECULAR	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS	34
4.2 CULTIVOS DE E. COLI QH4_PCA_S_LAVH	35
4.2.1 Tolerância aos sais de halogênio	35
4.2.2 Expressão heteróloga e produção de compostos halogenados	36
4.3 EXPRESSÃO EM E. COLI BL21(DE3)	38
4.3.1 Solubilidade e expressão	38
4.3.2 Purificação das enzimas	42
4.3.3 Resultados da análise in vitro	46
4.4 ANÁLISES IN SILICO	48
4.4.1 Filogenia	48
4.4.2 Análises estruturais	50
4.4.2.1 Modelagem e validação	50
4.4.2.2 Docking molecular	52
5 CONCLUSÃO	58

6 REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS GÊNICAS E PLASMÍDEOS ENVOLVIDOS NAS CLONAGENS.....	67
APÊNDICE B - REAÇÕES DE PCR E GÉIS DE AGAROSE	81
APÊNDICE C - SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS UTILIZADAS EM ANÁLISES IN SILICO.....	91
APÊNDICE D - ANÁLISES NA FERRAMENTA INTERPROSCAN.....	95

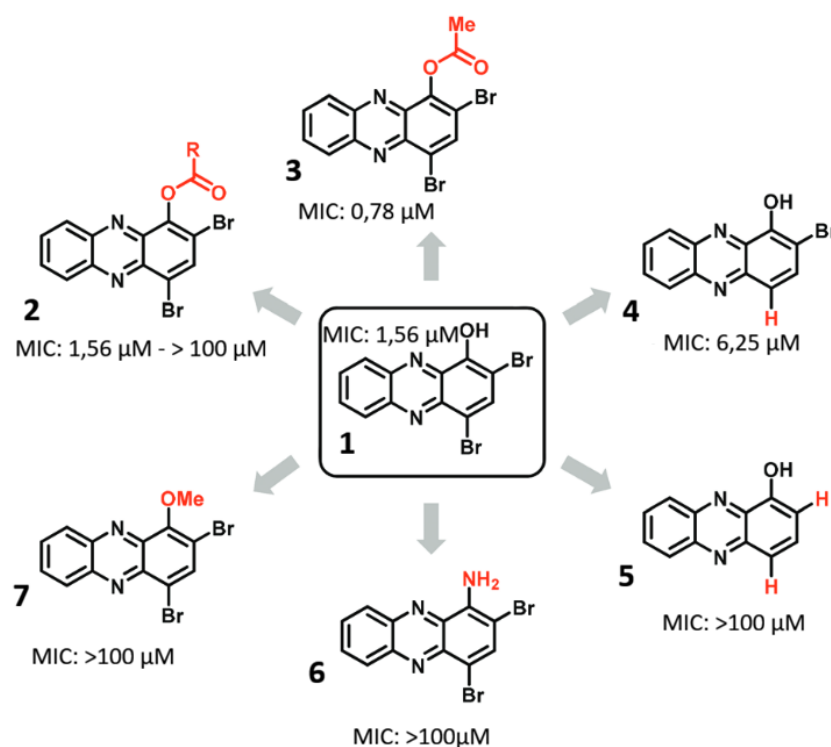
1 INTRODUÇÃO

1.1 HALOGENAÇÃO

A adição de halogênios (cloro, bromo, iodo e flúor) a moléculas é valorizada e utilizada extensivamente em diversos setores industriais como para a síntese de agroquímicos (Jeschke, 2025), drogas (Ali *et al.*, 2025), e materiais como, por exemplo, policloreto de vinila (PVC), poliestireno, tetrafluoretileno (Teflon) entre outros (Berger *et al.*, 2015). A dimensão desta utilização é tamanha que 47 dos 100 fármacos de pequenas moléculas mais vendidos nos Estados Unidos em 2024 contém pelo menos um átomo de halogênio (Leatherwood, 2025). Ainda, conforme reportado por Jeschke em 2017 e 2023, 96% dos agroquímicos introduzidos no mercado entre 2010 e 2016 e 77% dos introduzidos entre 2016 e 2022 contêm átomos de halogênios. Desta forma, é valiosa a expansão das ferramentas capazes de realizar a incorporação destes átomos em moléculas orgânicas.

Esta adoção generalizada destes átomos em moléculas industriais pode ser explicada em parte pela capacidade de alterar drasticamente a bioatividade de compostos através da adição de halogênios. Um exemplo é o estudo de fenazinas halogenadas com bromo, através de síntese química, realizada por Borrero e colaboradores em 2013, no qual foi estudada a MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) de diversas fenazinas halogenadas para o microrganismo *Staphylococcus aureus*, o qual é notório por sua capacidade de desenvolver resistência a diversos antibióticos (Figura 1). Por exemplo, com a diferença de um único halogênio entre a molécula 5 e 4, foi observado uma potencialização da capacidade inibitória com a MIC da molécula halogenada sendo 6,25 μM e da não halogenada sendo maior que 100 μM . Quando mais um bromo é adicionado à molécula, é observada subsequente potencialização para uma MIC de 1,56 μM , evidenciando o potencial de alterar a bioatividade que estes átomos possuem.

FIGURA 1 - Fenazinas e seus respectivos valores de MIC para *S. aureus* reportados no estudo de Borrero *et al.*, (2013).



Fonte: Editada de Borrero *et al.*, (2013).

A halogenação de moléculas através de síntese química é um processo bem compreendido, mas desafiador e pouco eficiente (Wang; Song; Jiao, 2024). Isto porque a síntese destes compostos frequentemente necessita de substratos tóxicos, condições extremas, solventes orgânicos altamente poluentes (Cantillo; Kappe, 2017 e Hegarty; Buchler; Buller, 2023), além de possuir baixa estereosseletividade e regioseletividade (Neumann; Fujimori; Walsh, 2008), o que encarece o processo de purificação, devido à necessidade de separação dos estereoisômeros produzidos. Neste sentido, métodos biológicos de produção de compostos halogenados podem, em teoria, superar todos estes desafios e proporcionar um método mais sustentável de produzir halogenados.

Na natureza, foram identificadas mais de 8400 moléculas orgânicas halogenadas atribuídas a diversos organismos eucariontes e procariontes (Gribble, 2024). Uma das classes de compostos de interesse é aquela que possui o L-triptofano halogenado como precursor, com as enzimas que realizam esta halogenação no L-triptofano livre sendo alvos frequentes de estudos. No caso, o L-triptofano halogenado

é um precursor essencial para moléculas como o corante púrpura tória (Lee *et al.*, 2021) e o fungicida Pirrolnitrina (Pawar *et al.*, 2019), além de ser explorado para a diversificação de moléculas bioativas como o pigmento violaceína (Lai *et al.*, 2021) e o peptídeo antibiótico Darobacitina A (Bohringer, 2023) buscando expandir a bioatividade e aplicações destas.

Assim, o interesse industrial na halogenação de compostos, seja para diversificar os produtos já conhecidos ou produzir as moléculas halogenadas já conhecidas de modo eficiente e sustentável, faz surgir a necessidade de explorar as ferramentas da natureza em busca de atingir estes objetivos. No caso, esta solução se apresenta na crescente prospecção, caracterização e engenharia de halogenases propícias a diversas aplicações (Wang, 2024).

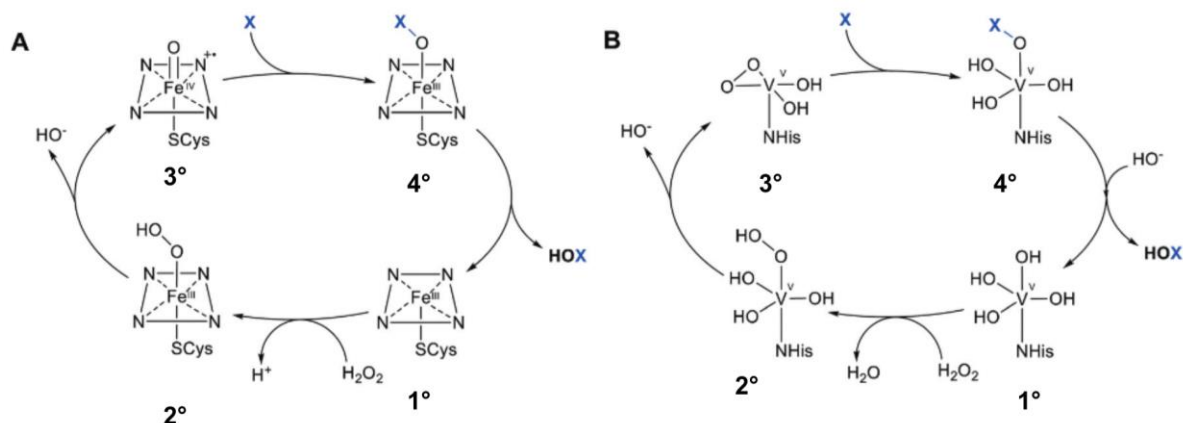
1.2 HALOGENASES

Halogenases são enzimas que realizam a adição de cloro, bromo, iodo ou flúor, a depender da enzima, em uma molécula. Estas enzimas podem ser classificadas mecanisticamente em eletrofílicas, radicais e nucleofílicas, a depender da espécie utilizada para transferir o halogênio para o substrato (Luo *et al.*, 2026). No caso das halogenases eletrofílicas, estas mediam a oxidação do halogênio para gerar uma espécie reativa eletrofílica, o ácido hipohaloso (HOX em que X é Cl, Br ou I). Esta classificação pode ser subdividida, ainda, em halogenases dependentes de flavinas (FDHs) ou haloperoxidases, a depender do modo de produção do HOX, com as primeiras utilizando flavina adenina dinucleotídeo reduzido (FADH₂) e a segunda peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Luo *et al.*, 2026. Crowe *et al.*, 2021).

Na área da halogenação eletrofílica, as FDHs possuem vantagens em sua aplicação em relação às haloperoxidases. Isto porque ambas as classes de haloperoxidases (*i.e* dependentes de vanádio e dependentes de grupo heme) necessitam de suprimento contínuo de H₂O₂ livre para a geração de HOX (Prakinee *et al.*, 2024) (Figura 2, A e B), algo industrialmente desafiador e perigoso, além de reduzir a estabilidade dos biocatalisadores (Yuan *et al.*, 2020). No caso de biofábricas, a aplicação das haloperoxidases é dificultada, novamente, pela necessidade de H₂O₂, o qual é altamente tóxico para células devido ao seu potencial de gerar radicais livres (*e.g* OH[•]) que destroem a célula (Mahaseth; Kuzminov, 2017). Por outro lado, FDHs

necessitam de substratos mais amenos e que podem ser produzidos em grande quantidade através do metabolismo das pelas próprias células e ser supridos no ambiente sem dano à enzima ou biofábrica.

FIGURA 2 - Ciclo catalítico das haloperoxidases. **A:** Haloperoxidases dependentes de heme. **B:** Haloperoxidases dependentes de vanádio. Em ambos os casos, H_2O_2 é incorporado ao grupo catalítico, radical livre ($\text{OH}\cdot$) é liberado e então o halogênio ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) é convertido à espécie reativa HOX .



Fonte: Crowe *et al.*, (2021).

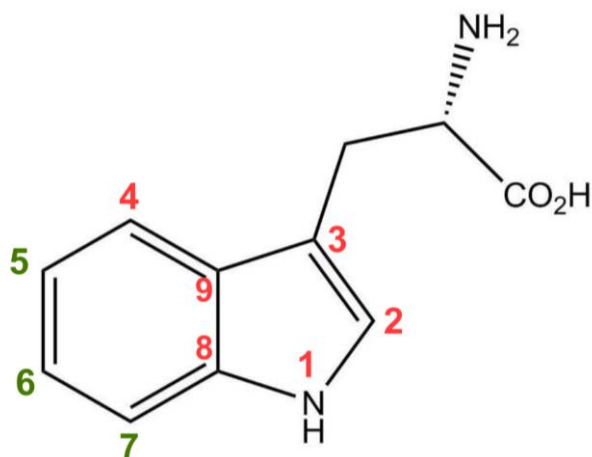
1.2.1 Halogenases dependentes de flavina (FDHs)

1.2.1.1 Diversidade

As FDHs podem ser classificadas como tipo A, na qual o substrato está livre, ou tipo B, na qual o substrato está ligado a proteínas carreadoras (Luo *et al*, 2025). As enzimas do tipo A possuem maior interesse biotecnológico e são mais estudadas, possivelmente devido a serem mais facilmente aplicáveis a substratos diversos, enquanto as do tipo B necessitam de proteínas carreadoras e substratos mais específicos.

No caso, para as enzimas do tipo A, um substrato comum é o aminoácido L-triptofano, porém outros substratos podem ser encontrados e, mesmo no L-triptofano, o local de halogenação varia de acordo com a enzima utilizada, podendo ser o carbono 5, 6 ou 7 do anel indólico (Figura 3). O Quadro 1 ilustra algumas FDHs já caracterizadas com destaque para o substrato destas, carbono alvo da halogenação, no caso do L-triptofano, e espécie de origem.

FIGURA 3 - Carbonos alvo em L-triptofano. Em verde, estão destacados o carbono 5, 6 e 7 do anel indólico, que são alvos conhecidos para as halogenases. Em vermelho, os átomos do anel indólico que não são alvos conhecidos das halogenases.



Fonte: Autoria própria.

QUADRO 1 – FDHs: Nomes, substratos, local de halogenação e espécies.

Enzima FDH	Substrato nativo	Carbono halogenado em L- triptofano	Espécie	Fonte
PrnA	L-triptofano	C7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hammer et al., 1997
RebH	L-triptofano	C7	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	Sánchez et al., 2002
KtzQ	6-Cloro- L-triptofano	C7	<i>Kutzneria</i> sp. 744	Fujimori et al., 2007
LooH	L-triptofano	C7	<i>Nocardiopsis flavescens</i>	Zhang et al., 2026
KtzR	L-triptofano	C6	<i>Kutzneria</i> sp. 744	Fujimori et al., 2007
BorH	L-triptofano	C6	Bactéria não cultivada AB1650	Lingkon;Bell lizzi, 2020

Thal	L-triptofano	C6	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	Seibold et al., 2006
SttH	L-triptofano	C6	<i>Streptomyces toxytricini</i> NRRL 15443	Zeng; Zhan, 2011
Th-Hal	L-triptofano	C6	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	Menon et al., 2016
AbeH	L-triptofano	C5	Bactéria não cultivada AB1650	Ashaduzzaman et al., 2025
SnFDHal	L-triptofano	C5	<i>Streptomyces noursei</i>	Sher et al., 2026
PyrH	L-triptofano	C5	<i>Streptomyces rugosporus</i>	Zehner et al., 2005
PltA	Pirrol	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC BAA-477	Nowak et al., 1999
Bmp2	Pirrol	-	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	Agarwal, 2014
Rdc2	Macrolactonas aromáticas	-	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i>	Zeng; Zhan, 2010

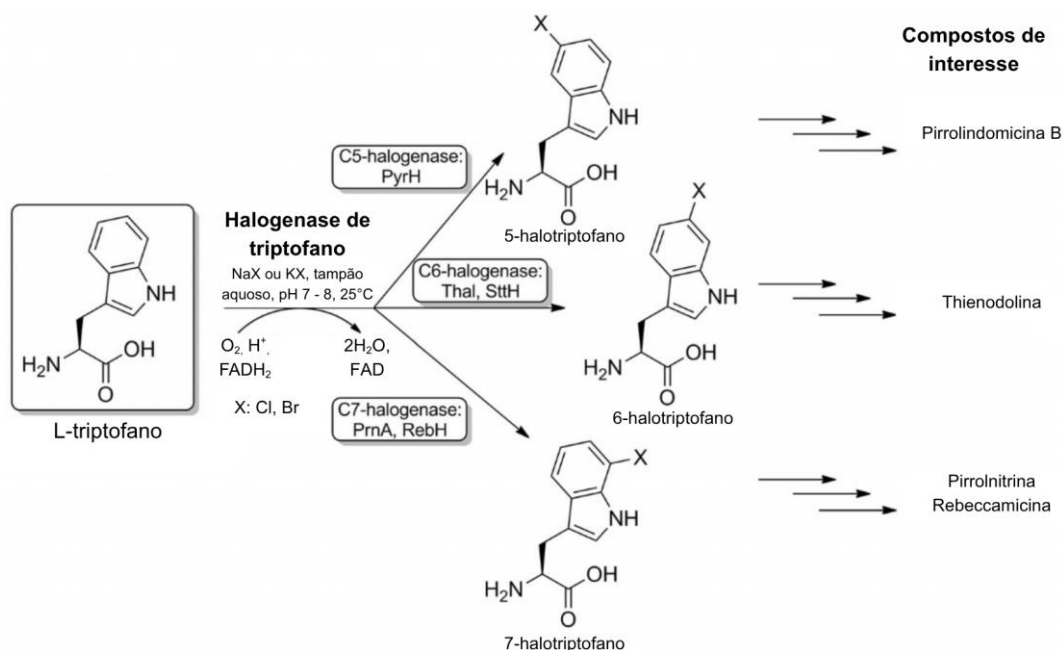
Fonte: Autoria própria.

1.2.1.2 Mecanismo de catálise

FDHs catalisam a halogenação regioseletiva de um substrato rico em elétrons, frequentemente anel aromático, utilizando oxigênio molecular, íons de halogênios e FADH₂ em condições amenas de temperatura (entre 25 e 30°C) (Luo et al., 2025) (Figura 4). No caso, FADH₂ liga-se em um motivo GxGxxG conservado e reage com O₂ e o íon halogênio para gerar HOX, o qual é direcionado através de um túnel conservado de aproximadamente 10 ângstroms, que separa o sítio de formação

do HOX do sítio de catálise, para halogenar seletivamente o substrato ligado à enzima (Prakinee *et al.*, 2022).

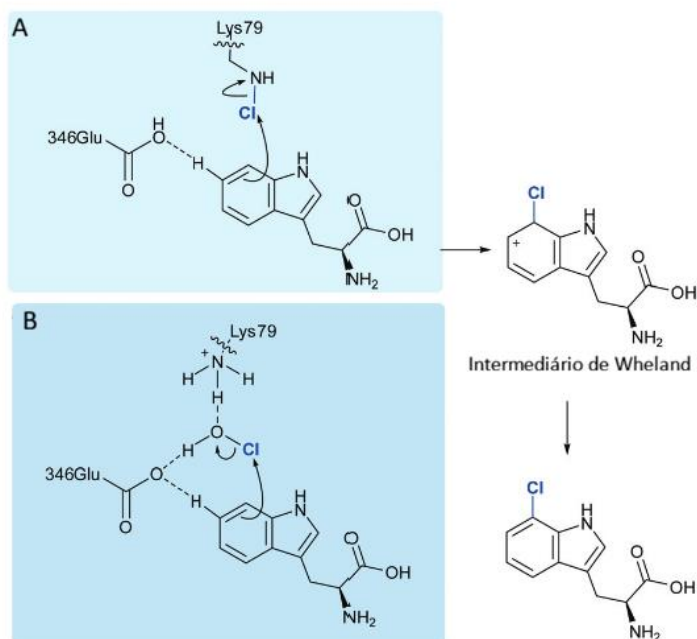
FIGURA 4 - Halogenação de L-triptofano em C5, C6 e C7. As FDHs catalisam a halogenação em condições amenas em locais que variam de enzima para enzima. Posteriormente, o L-triptofano halogenado pode ser convertido em produtos naturais bioativos.



Fonte: Adaptado de Schnepel; Sewald, (2017).

Existem dois modelos propostos mais aceitos para explicar a catálise das FDHs, ambos envolvendo interações entre HOX e uma lisina ou ácido glutâmico no sítio ativo da enzima (onde o HOX se encontra após percorrer o túnel de 10 angstroms). No modelo proposto por YeH *et al* em 2007, conhecido como modelo de Walsh, uma lisina conservada reage com o HOX formando uma haloamina intermediária que guia a posição de halogenação da molécula (Figura 5 A). Já no modelo proposto por Flecks *et al* em 2008, conhecido como modelo de van Pée, a lisina e um resíduo de ácido glutâmico próximo são responsáveis por estabilizar e ativar o HOX, direcionando a halogenação (Figura 5 B). Em ambos os casos, portanto, há a atribuição de um resíduo de lisina, frequentemente de posição 79 (K79), que é fundamental para a halogenação, algo comprovado por estudos de mutagênese deste resíduo (Andorfer; Jared, 2018).

FIGURA 5 - Mecanismos catalíticos do sítio ativo das FDHs. **A:** Modelo de Walsh. **B:** Modelo de Van Pée.



Fonte: Adaptada de Crowe *et al.*, (2021).

1.2.1.3 Aplicações e desafios

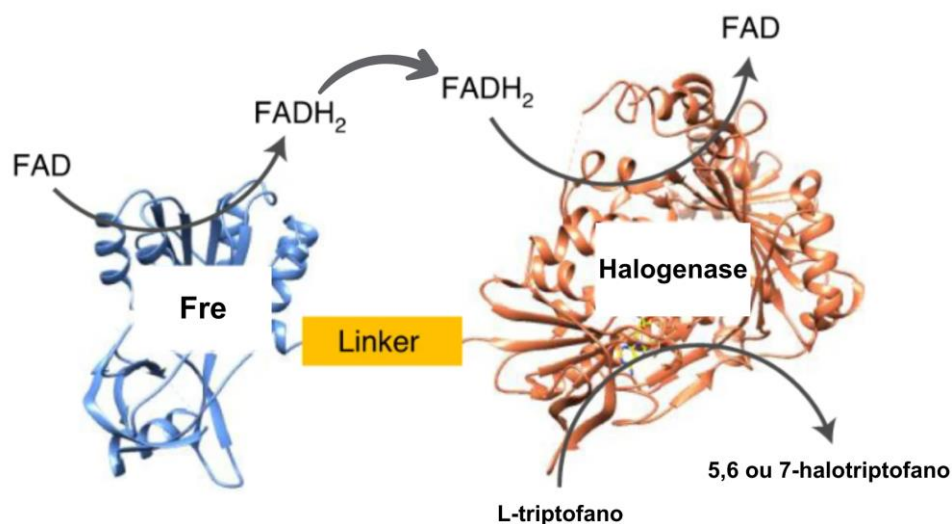
Halogenases têm sido utilizadas em substratos não nativos com sucesso para produzir moléculas de interesse em biofábricas em grandes quantidades e, também, para a produção de novas moléculas não existentes na natureza. Um exemplo é o estudo realizado por Wang *et al.*, (2015), no qual, através da inserção da enzima Rdc2 (Quadro 1) em uma rota biossintética heteróloga do resveratrol em *E. coli* BL21(DE3) foi gerado um novo derivado do resveratrol não encontrado na natureza, o 2-cloro-resveratrol, demonstrando a versatilidade das halogenases na síntese de novos compostos bioativos.

Ainda, outro exemplo notável de halogenases sendo utilizadas em biofábricas para a síntese de moléculas é o de Lee *et al.*, (2020), no qual foi demonstrada a biossíntese do corante púrpura tília através de uma rota sintética utilizando a halogenase SttH (Quadro 1), a enzima triptofanase de *E. coli* (TnaA) e uma monooxigenase de *Methylophaga aminisulfidivorans*. No caso, a SttH catalisa a síntese do 7-bromo-triptofano, o qual é convertido no corante pela ação das outras enzimas. Neste estudo, foi produzido até $315 \frac{mg}{L}$ do corante após superar os desafios

de solubilidade da enzima e fornecimento de FADH_2 através da fusão da SttH com a redutase de flavina de *E. coli* (Fre), aumentando significativamente sua solubilidade e atividade na biofábrica.

Esta estratégia de fusão enzimática das halogenases com a Fre é bem estudada e demonstrou ser eficiente em aumentar a solubilidade e o rendimento de halogenases (Andorfer *et al.*, 2018), as quais são, tipicamente, pouco solúveis em *E. coli*, característica que prejudica drasticamente seu potencial catalítico (Pulschen *et al.*, 2026). Ainda, realizar a fusão da enzima com a Fre, além de aumentar a solubilidade das halogenases, confere a vantagem de regenerar o cofator das FDHs e criar uma alta concentração dele nas proximidades da enzima, impedindo que a reação seja limitada pelo cofator, já que esta Fre realiza a redução de FAD em FADH_2 utilizando NADH (Fontecave *et al.*, 1987) (Figura 6). Desta forma, além de mutações e evolução dirigida (Pulschen *et al.*, 2026), esta é uma estratégia bastante empregada e simples de executar (Liu Hanyu *et al.*, 2026) para remediar a baixa solubilidade e a abundância de cofatores das halogenases.

FIGURA 6 - Esquema descritivo da fusão enzimática Fre + Halogenase. O FADH_2 gerado pela Fre concentra-se estericamente próximo à halogenase e, assim,



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

Outro desafio na aplicação das halogenases é sua baixa capacidade catalítica por demonstrar, em sua maioria, um k_{cat} baixo em torno de 0,5 a 5 min^{-1} (Phintha *et al.*, 2020). Este baixo *turnover* pode ser devido, pelo menos em parte, ao HOX “vazar”

para o meio ao invés de reagir com o substrato, um fenômeno conhecido das halogenases (Phintha *et al.*, 2020). Para remediar isto e aumentar a capacidade catalítica das halogenases, estratégias de engenharia racional de enzimas (Minges *et al.*, 2020; Prakinee *et al.*, 2022) e evolução dirigida (Poor *et al.*, 2014. Pulschen *et al.*, 2026) foram empregadas.

No caso, evolução dirigida de enzimas consiste em criar uma biblioteca de variantes de uma enzima de modo não direcionado, seja por mutagênese ou recombinação, expressar estas variantes e selecioná-las para um propósito específico através de ensaios (Johannes; Zhao, 2006). Apesar de eficiente para halogenases (Pulschen *et al.*, 2026), a evolução dirigida possui uma triagem dispendiosa de cada variante. Por outro lado, a engenharia racional de enzimas utiliza dados sobre sua estrutura e interação com o ligante para escolher quais aminoácidos devem ser modificados para atingir o objetivo desejado. Desta forma, é de grande interesse biotecnológico a elucidação do relacionamento entre sequência, estrutura e mecanismo das diferentes halogenases para, assim, possibilitar a engenharia destas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi expressar de maneira heteróloga a halogenase de *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae* e sua versão fusionada com a redutase de flavina Fre de *E. coli* para estudos sobre sua atividade e viabilidade como biocatalisador em biofábrica de *E. coli*, além de purificá-la para ensaios *in vitro*. Ademais, compará-la a outras halogenases da literatura a partir de estudos *in silico* como construção de árvore filogenética e estudos estruturais com *docking* molecular para caracterizá-la.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar a halogenase LavH de forma heteróloga em *E. coli* para estudos sobre sua atividade e solubilidade;
- Analisar o efeito da fusão de Fre com a LavH, visando observar o efeito desta fusão em uma enzima já altamente solúvel em *E. coli*;

- Purificar a LavH e Fre através de cromatografia de afinidade em coluna Ni-NTA (Níquel-ácido nitrilotriacético) e realizar estudos *in vitro*;
- Realizar análise filogenética da LavH com outras halogenases caracterizadas na literatura;
- Realizar análise estrutural da LavH a partir de modelo construído com AlphaFold3 e *Docking* molecular;

3 MÉTODOS

3.1 PLASMÍDEOS E LINHAGENS

QUADRO 2 – Plasmídeos e linhagens utilizadas neste trabalho

Plasmídeos	Descrição	Fonte
pRSM4	Derivado do pRSM3 contendo promotor lacUV5, ori RSF; Kan+	Xu <i>et al.</i> , (2015); Silva <i>et al.</i> , (2021)
pRSM4_LavH	pRSM4 contendo gene <i>lavH</i> de <i>S. lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i>	Este trabalho
pRSM4_Fre	pRSM4 contendo o gene <i>fre</i> de <i>E. coli</i> K-12 MG1655	Este trabalho
pRSM4_Fre_no_stop	pRSM4_Fre com o gene <i>fre</i> sem o stop códon	Este trabalho
pRSM4_Fre_LavH	pRSM4 contendo o gene <i>fre</i> fusionado, com o <i>linker</i> , ao gene <i>lavH</i>	Este trabalho
pET28a(+)	Promotor T7, ori colE1, ori f1, Kan+	Rosenberg <i>et al.</i> , 1987
pET28a(+)_LavH	pET28a(+) contendo gene <i>lavH</i> de <i>S. lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i>	Este trabalho
pET28a(+)_Fre	pET28a(+) contendo o gene <i>fre</i> de <i>E. coli</i> K-12 MG1655	Este trabalho
pET28a(+)_Fre_LavH	pET28a(+) contendo o gene <i>fre</i> fusionado, com o <i>linker</i> , ao gene <i>lavH</i>	Este trabalho
pETM7_phzABGFCDE	Plasmídeo pETM7 contendo os genes <i>phzABGFCDE</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 para produção de fenazina-1-ácido carboxílico (PCA). Promotor lacUV5; ori ColE1; Amp+	Silva <i>et al.</i> , 2021
pACM5_phzS	Plasmídeo pACM5 contendo o gene <i>phzS</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 para produção da 1-hidroxifenazina a partir da PCA. Promotor lacUV5, ori p15A, Cm+	Silva <i>et al.</i> , 2021
Linhagens		
<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i>	Utilizada para amplificação do gene <i>lavH</i> a partir do genoma	CCT 2402. Banco de culturas da Fundação André Tosello (Campinas, SP)
<i>E. coli</i> DH5 α	Utilizada para propagação e estoque de todos os plasmídeos	Estoque laboratorial.

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Utilizada para a expressão heteróloga da LavH	Estoque laboratorial.
<i>E. coli</i> BL21_Fre	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada com pET28a(+)_Fre	Este trabalho
<i>E. coli</i> BL21_LavH	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada com pET28a(+)_LavH	Este trabalho
<i>E. coli</i> BL21_Fre_LavH	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada com pET28a(+)_Fre_LavH	Este trabalho
<i>E. coli</i> QH4_PCA_S	<i>E. coli</i> QH4 transformada com o plasmídeo pETM7_phzABGFCDE e pACM5_phzS para produção de 1-hidroxifenazina	Este trabalho
<i>E. coli</i> QH4_PCA_S_LavH	<i>E. coli</i> QH4_PCA_S transformada com pRSM4_LavH	Este trabalho

Fonte: Autoria própria.

3.2 PRIMERS

QUADRO 3 – Primers utilizados neste trabalho.

Primers	Sequência (5' □ 3')
PBRrevBam e Primer R Kan	Primer forward: GGTGATGTCGGCGATATAGG Primer reverse: GAGCCATATTCAACGGGAAACGTC
LavH_F e LavH_R	Primer forward: CTTTAAGAAGGAGATATAC <u>CATATG</u> ACCGGCACCGACAACCG (Sítio de reconhecimento NdeI sublinhado) Primer reverse: GTTTCTTTACCAGACTCGAGTCAGGAGGCGCCGTGCAGCT (Sítio de reconhecimento XhoI sublinhado)
frag_Fre_For e frag_Fre_Rev	Primer forward: ATCACAGCAGCGGCCTGGTG <u>CATATG</u> ACAACCTTAAGCTGTAA (Sítio de reconhecimento NdeI sublinhado) Primer reverse: CAGCTTCCTTTGCGGCTTTG <u>CTCGAGT</u> CAGATAAATGCAAACGCAT (Sítio de reconhecimento XhoI sublinhado)
P.Del.Stop.Fre.For e P.Del.Stop.Fre.Rev	Primer forward: CTCGAGTCTGGTAAAGAAAC Primer reverse: GATAAATGCAAACGCATCGC
P.No.Stop.Fre e rrnB T1 term_R	Primer forward: GCGTTTGCATTTATCCTCGA Primer reverse: GAGAGCGTTCACCGACAAAC
Vector.CPEC.For e Vector.CPEC.Rev	Primer forward: AGCACATGGACTCGTCTACTAGTCGCAG Primer reverse: GCCGCTGCTTCTTTGGCCGCTGCTTCGGCGATAAATGCAAACGCATCGC CAAACAGGC
Frag.CPEC.Rev e LavH.CPEC.For	Primer forward: CAGCGGCCAAAGAAGCAGCGGCCAAAGCGATGACCGGCACCGACAAC CG

	Primer reverse: GCTGCGACTAGTAGACGAGTCCATGTGC
--	--

Fonte: Autoria própria.

3.3 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E ESTOQUE DOS GENES *LAVH* E *FRE*

O cultivo de *S. lavendulae* subsp. *lavedulae* foi realizado em frasco erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio TSB (triptona $17 \frac{g}{L}$, peptona $3 \frac{g}{L}$, glicose $2,5 \frac{g}{L}$, NaCl $5 \frac{g}{L}$, K_2HPO_4 $2,5 \frac{g}{L}$) a 28°C, 200 rpm por 72 h. Este cultivo foi iniciado pela raspagem de esporos/micélio a partir de uma cultura em meio sólido TSB. O DNA genômico foi extraído conforme as orientações do kit Genomic DNA Prep Kit (Cellco) e sua concentração e qualidade aferida em nanodrop (Thermo-Fisher).

A partir do genoma de *S. lavendulae* subsp. *lavedulae*, foi realizada amplificação da sequência codificadora do gene *lavH* (Apêndice A.1) através de PCR (Apêndice B.1) com “DNA polimerase Platinum SuperFi II master mix” (Thermo-Fisher) e o mix de primer LavH_F com LavH_R. Já com o genoma de *E. coli* K-12 (já disponível no laboratório previamente), a sequência codificadora do gene *fre* (Apêndice A.2) foi amplificada (Apêndice B.2) utilizando “Phusion High-Fidelity master mix” (Thermo-Fisher) e o mix de primers frag_Fre_For e frag_Fre_Rev. Ambos produtos amplificados foram purificados a partir de gel de agarose utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (PROMEGA) e quantificados em nanodrop.

Para a obtenção do plasmídeo pRSM4 (Apêndice A), foi feita miniprep em linhagem estoque de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo com o kit “Wizard® Plus SV Minipreps” (PROMEGA) crescida overnight a 37°C, 225 rpm em 5 mL de meio LB (NaCl $10 \frac{g}{L}$, triptona $10 \frac{g}{L}$, extrato de levedura $5 \frac{g}{L}$) suplementado com os antibióticos apropriados (canamicina 50 μ M) e quantificado em nanodrop.

A clonagem das sequências codificantes em pRSM4 para estoque foi realizada pela clivagem do plasmídeo e das sequências codificantes com as enzimas NdeI e XhoI de modo a gerar extremidades coesivas em ambos e, então, submetê-los à reação da ligase para a junção das extremidades compatíveis (*i.e* técnica conhecida como clonagem por restrição e ligação). Então, foi feita a transformação do plasmídeo

clonado para células competentes preparadas previamente com base no método de cloreto de cálcio e cloreto de rubídio utilizando a técnica de transformação por choque térmico, na qual as células com o DNA a ser inserido são incubadas em gelo, submetidas por 45 segundos a 42°C, acrescidas de meio de cultura gelado e incubadas sob agitação a 37°C por 1 hora para a recuperação das células. Então, a cultura é plaqueada em meio sólido e as colônias são selecionadas e confirmadas.

No caso, as transformações foram confirmadas com PCR de colônia com o mix de primers LavH_F, LavH_R e PBRrevBam, Primer R Kan, além de digestão enzimática, com a enzima Sall para a LavH e NdeI+XhoI para a *fre*, após miniprep, seguido de análise em gel de agarose (Apêndice B.3 e 4) e, também, por sequenciamento MinION para o *fre* (Apêndice A). Todos os sequenciamentos MinION reportados foram realizados no Laboratório de Engenharia Genética e Enzimática (LEGE) da professora Danielle Pedrolli na UNESP de Araraquara.

3.4 TRANSFORMAÇÃO E CULTIVOS EM *E. COLI* QH4_PCA_S

Visando teste de atividade em fenazinas e, também, em substratos naturalmente presentes em biofábrica de *E. coli*, como o L-triptofano, o plasmídeo pRSM4_LavH foi transformado na biofábrica *E. coli* QH4_PCA_S produtora de 1-hidroxifenazina (Figura 1, molécula 5) através de choque térmico, após torná-la competente com o método de cloreto de cálcio.

Inicialmente, foi realizado um cultivo para testar se a concentração planejada de sais de halogênio a ser utilizada nos cultivos de produção (100 mM de KCl ou KBr) era prejudicial à célula. Este cultivo foi realizado com *E. coli* QH4_PCA_S_LavH em duplicata a partir de um pré-inóculo em LB overnight a 37°C e 225 rpm suplementado com os antibióticos apropriados (*i.e* ampicilina 80 µM, canamicina 50 µM e cloranfenicol 25 µM), o qual foi utilizado para inocular 1 mL em 4 mL de LB suplementado com antibióticos e o respectivo sal ou, no caso do controle, sem a adição de sais de halogênio a 37°C e 225 rpm. O crescimento celular foi acompanhado durante 24 horas.

Então, o cultivo de produção foi realizado da seguinte maneira: Pré-inóculo em 5 mL de LB overnight a 37°C, 225 rpm suplementado com os antibióticos apropriados; Inoculação de 1 mL em 50 mL de meio TB 2% glicerol suplementado

(extrato de levedura 24 $\frac{g}{L}$, triptona 20 $\frac{g}{L}$, glicerol 20 $\frac{g}{L}$, 0,017 M KH_2PO_4 , 0,072 M K_2HPO_4 e 100 mM de KCl ou KBr) em frasco aletado com os antibióticos apropriados; Crescimento até DO 0,8 - 1 nas mesmas condições; Indução com 1 mM de IPTG e diminuição da temperatura para 30 °C. Para a análise dos produtos halogenados, foram coletados pontos de 2 mL pré-indução e 6, 24 e 48 horas após indução. O cultivo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante filtrado com membrana de 22 μ m para ser submetido à espectrometria de massas.

3.4.1 Análise da solubilidade da LavH

Para avaliar a solubilidade da enzima, o pellet celular foi ressuspensionado em PBS (8 $\frac{g}{L}$ NaCl, 0,2 $\frac{g}{L}$ KCl, 1,44 $\frac{g}{L}$ Na_2HPO_4 , 0,24 $\frac{g}{L}$ KH_2PO_4 em pH 7,08) suficiente para uma concentração celular equivalente a uma DO 600 nm de 4. Então, este foi submetido à sonicação (50% de amplitude, 30 segundos *ON* e 30 segundos *OFF* por 2 minutos). As amostras foram centrifugadas a 7000 g por 10 minutos, coletou-se 100 μ L do sobrenadante, e o pellet, que poderia conter proteínas insolúveis, foi ressuspensionado em um tampão de ressuspensão (8 M de ureia e 1% Triton X), utilizando o mesmo volume que foi utilizado para o PBS anteriormente.

As amostras produzidas foram preparadas para a corrida em SDS-PAGE 12% adicionando-se 25 μ L de tampão de ruptura ("2x Laemmli sample buffer" contendo 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris-HCl e pH 6,8) a 25 μ L de cada amostra. Então, as amostras foram mantidas a 95°C por 15 minutos e aplicadas no volume de 10 μ L no gel. Após a corrida, realizada em voltagem constante de 150V, o gel foi corado em solução corante (1 $\frac{g}{L}$ de azul de comassie, 10% ácido acético glacial e 50% metanol) e descorado com solução descorante (9,09% ácido acético glacial e 28,4% etanol) sob leve agitação até que as bandas fossem visíveis.

3.4.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada pelo Dr. Luis Guillermo Cuadrado Durango do Grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) Agilent 1290

Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) acoplado a um sistema Agilent 6545 Q-TOF-MS/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

A separação pelo UHPLC ocorreu em coluna Phenyl-Hexyl (100 mm x 2,1 mm d.i., 1,8 μm , Zorbax Eclipse Plus, Agilent, USA). A fase móvel foi composta de água (solvente A) e Acetonitrila (solvente B) com ácido fórmico 0,1%. Foi realizado o gradiente: 0-7 min, 5% a 80% de B; 7-8 min, 80% de B; 8-9 min, 80 a 5% de B; e de 9-12 min, 5% de B. O fluxo foi de 0,25 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$, e volume de injeção de 1,0 μL . A temperatura do forno da coluna e auto-amostrador foi de 25°C.

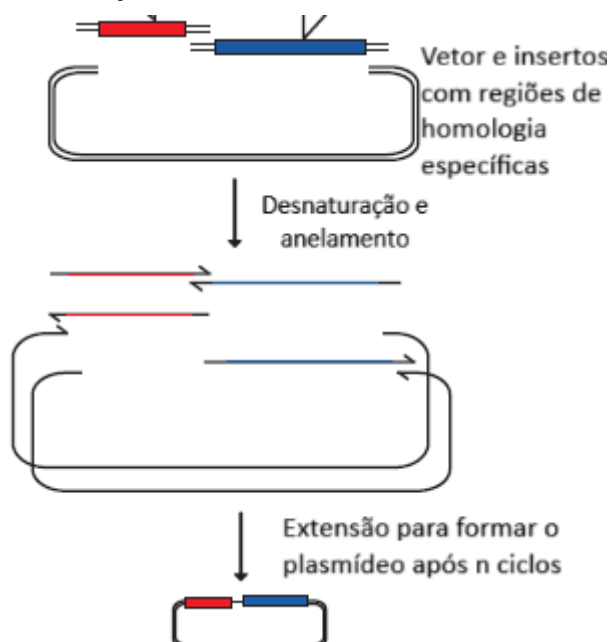
No caso do espectrômetro de massa, foi utilizado eletrospray (ESI) de Jet no modo de íon positivo com uma voltagem do capilar (VCap) de 1,8 kV. Desta forma, foi aplicado fluxo de gás de 12 $\frac{\text{L}}{\text{min}}$, temperatura do gás de 350°C, nebulizador de 35 psig, tensão noze de 115 V, *fragmentor* de 60 V, skimmer de 30 V, enquanto as energias de colisão foram avaliadas na faixa de 2~10 V. Os dados em uma faixa de 50 a 1000 Da, com taxa de varredura 3.0 espectro.s⁻¹ foram processados pelo software MassHunter Workstation Software Version B.08.00.

3.5 FUSÃO DAS ENZIMAS FRE E LAVH

Para a fusão das enzimas, foi utilizada a técnica da CPEC (*Circular Polymerase Extension Cloning*) (Quan; Tian, 2011), um método de clonagem que permite a junção de vários fragmentos através de uma “reação de PCR” final sem primers, já que a hibridização dos fragmentos a serem unidos ocorre através de sequências homólogas específicas presentes nos fragmentos e no vetor (Figura 7) e não ocorre aumento exponencial da quantidade de DNA, somente a amplificação dos fragmentos para formar o produto final. No caso, a região de homologia inserida foi planejada para atuar como um *linker* peptídico de mesma sequência que o *linker* 3 no estudo de Lee *et al.*, (2020) (AEAAAKEAAKA), o qual demonstrou ser o mais eficiente para a fusão da SttH e Fre, para unir as enzimas Fre e LavH enquanto permite seu dobramento adequado.

FIGURA 7 - Imagem esquemática da reação da CPEC. Insertos e vetor previamente amplificados para conter regiões de homologia são submetidos a esta “PCR sem primers” para que suas próprias

extremidades 3'OH atuem como ponto de ancoragem para a polimerase e, assim, seja construído o plasmídeo, linear, final através desta reação.



Fonte : Adaptado de Quan; Tian, (2011).

Antes, foi necessário remover o stop códon da Fre para possibilitar a tradução de uma única sequência peptídica. Para isto, a técnica *round the horn* PCR (Floor, 2018) foi empregada com o mix de primers P.Del.Stop.Fre.For e P.Del.Stop.Fre.Rev e a “Phusion High-Fidelity master mix” (Thermo-Fisher). Esta técnica consiste no uso de primers que flanqueiam a sequência a ser deletada apontando para direções opostas entre si (diferentemente da PCR tradicional, na qual os primers apontam para si) obtendo-se, assim, uma sequência linear do plasmídeo sem a sequência entre os primers. A amplificação foi tratada com DpnI, fosforilada com Anza™ T4 PNK e circularizada com T4 DNA ligase (Apêndice B.5). O plasmídeo resultante foi transformado como descrito anteriormente e a deleção do *stop* códon foi confirmada através de PCR de colônia com o par de primers P.No.Stop.Fre e rrnB T1 term_R, no qual o primeiro somente anela sua extremidade 3' na sequência quando o *stop* códon está ausente (Apêndice B.6).

Então, os produtos de PCR preparativos da CPEC foram realizados utilizando “GoTaq® G2 Green master mix” (PROMEGA) e o par de primers Frag.CPEC.Rev e LavH.CPEC.For para o fragmento e par de primers Vector.CPEC.For e Vector.CPEC.Rev para o plasmídeo contendo o gene *fre* sem stop códon. As

amplificações foram recortadas de gel de agarose (Apêndice B.7) e purificadas. Então, o fragmento e o vetor foram submetidos à reação de CPEC em uma proporção molar 2:1 (calculado com NEBcalculator) com 200 ng de vetor. Foram utilizados 20 ciclos e uma rampa de temperatura de 0,5 °C/s entre a fase de anelamento e de extensão, conforme sugerido no protocolo de Quan e Tian, (2011). A reação foi transformada diretamente com choque térmico em *E. coli* DH5 α , a qual é responsável por circularizar o plasmídeo utilizando sua maquinaria celular para fechar os *nicks* do esqueleto fosfato. Além disso, parte da reação foi separada e corrida em gel de agarose a fim de visualizar o produto linear formado (Apêndice B.8)

A clonagem foi confirmada através de PCR de colônia com o par de primers PBRrevBam e Primer R Kan além de miniprep seguido de digestão com as enzimas NdeI e XhoI (Apêndice B.9) e sequenciamento por MinION (Apêndice A).

3.6 EXPRESSÃO E ANÁLISES EM *E. COLI* BL21(DE3)

Visando análise de solubilidade e purificação, tanto da LavH nativa quanto da fusionada, optou-se por expressar as enzimas com o promotor T7 presente no pET28a(+) em *E. coli* BL21(DE3), um sistema de expressão heterólogo que proporciona uma grande quantidade de enzima em pouco tempo de expressão, o que desafia a maquinaria celular de dobramento proteico da *E. coli*, sendo propício para os testes e obtenção de grandes quantidades de enzima. Além disso, o plasmídeo possui uma cauda de histidina 6x *in frame* com a sequência da proteína permitindo, assim, sua purificação por cromatografia de afinidade Ni-NTA.

3.6.1 Subclonagem e transformação

Inicialmente foi realizada miniprep de linhagem estoque de *E. coli* DH5 α para a obtenção do pET28a(+) como descrito anteriormente. Então, realizou-se a subclonagem de *lavH*, *fre* e *fre_lavH* dos plasmídeos pRSM4_LavH, pRSM4_Fre e pRSM4_fre_LavH para o pET28a(+) utilizando restrição e ligação (XhoI e NdeI). Então, o plasmídeo resultante foi transformado em *E. coli* DH5 α , como descrito anteriormente, e a transformação foi confirmada através de PCR de colônia com os primers PBRrevBam e Primer R Kan (sendo possível, através do tamanho no gel, diferenciar claramente uma sequência codificadora presente em pRSM4 de uma

presente em pET28a devido ao tamanho diferente destes) além de miniprep e digestão enzimática (XhoI e NdeI) (Apêndice B.10). Então, as linhagens transformantes com os plasmídeos pET28a(+) foram utilizadas para miniprep e o plasmídeo transformado em *E. coli* BL21(DE3), do mesmo modo que descrito para *E. coli* QH4_PCA_S.

3.6.2 Análises de solubilidade

Para comparar a solubilidade da LavH, Fre e Fre_LavH no sistema de expressão pET28a(+) *E. coli* BL21(DE3), e otimizar as condições de expressão para a purificação, foram testadas as temperaturas de 18°C e 25°C com indução de 0,5 mM de IPTG a 225 rpm em meio LB nos pontos 0, 4, 16 e 24 horas após indução. Para isso, um pré-inóculo *overnight* foi realizado como descrito anteriormente e adicionado a um meio LB fresco suplementado com o antibiótico apropriado (canamicina 50 µM) de modo que a DO 600 nm calculada para o volume final de 50 mL de cultivo fosse 0,1. Então, os cultivos foram crescidos a 37°C, 225 rpm e induzidos em 0,6 a 0,8 de DO 600 nm, com a temperatura sendo reduzida para 25°C ou 18°C (em incubadora refrigerada). Os pontos foram aferidos na DO 600 nm e coletados nos tempos informados para serem centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. Coletou-se os pellets e estes foram ressuspensos em tampão fosfato (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, pH 7,5) de modo que a concentração celular fosse equivalente a uma DO 600 nm de 6.

Em seguida, os pellets ressuspensos foram lisados por sonicação (10 s *ON*, 10 s *OFF* a 50% amplitude por 5 min), a amostra pré-indução foi armazenada (proteína total) e o restante foi centrifugado a 7000 g por 10 minutos a 4 °C, com a coleta da fase solúvel. Então, a fase insolúvel foi ressuspensa em tampão de ressuspensão (8 M de ureia e 1% Triton X), utilizando o mesmo volume que foi utilizado de tampão fosfato anteriormente. A preparação de amostras e o SDS-PAGE foi feito como já descrito, mas, desta vez, a corrida foi realizada a voltagem de 80 W por 25 minutos e 130 W por 55 minutos.

3.6.3 Purificação das enzimas por cromatografia de afinidade

O lisado celular foi obtido a partir de cultivos a 25 °C em meio LB, conforme descrito anteriormente para os ensaios de solubilidade. A coleta do caldo foi realizada

4 horas após a indução para *E. coli*_BL21_Fre e 16 horas após a indução para a *E. coli*_BL21_LavH. No momento da coleta, a DO a 600 nm foi aferida e registrada. O caldo dos cultivos foi centrifugado a 7.000 g por 10 minutos, e o precipitado celular foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise (tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,8). As células foram lisadas por sonicação durante 40 minutos (10 s *ON* e 10 s *OFF*, a 50% de amplitude). O lisado foi então centrifugado a 4.500 g por 20 minutos a 4 °C, e a fração solúvel (sobrenadante) foi filtrada em membrana com porosidade de 0,22 µm, sendo armazenada a 4 °C até o momento do uso.

Para a etapa de purificação, utilizou-se uma coluna cromatográfica Ni-NTA de 1 mL acoplada a uma bomba peristáltica (EP-1 Econo *Pump*, Bio-Rad®), para o controle da vazão, e a um espectrofotômetro (EM-1 Econo UV *Monitor*, Bio-Rad®), permitindo o monitoramento da absorbância das frações eluídas a 280 nm. O lisado solúvel foi aplicado na coluna previamente equilibrada com tampão de lise, sob uma vazão de $0,16 \frac{mL}{min}$ (10 volumes de coluna por hora). A coluna foi lavada com tampão de lavagem (tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 6,0) a uma vazão de $0,6 \frac{mL}{min}$ (36 volumes de coluna por hora) até que a absorbância a 280 nm retornasse à linha de base. As eluições foram realizadas aplicando-se 7 volumes de coluna de tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 50, 100, 150, 250 e 500 mM em tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM). Após o processo, a coluna foi lavada com 5 volumes de água ultrapura e 5 volumes de etanol 20% na mesma vazão das lavagens, sendo armazenada a 4 °C nesta solução. As frações coletadas foram conservadas a 4 °C e analisadas por SDS-PAGE, conforme descrito anteriormente.

Entre as purificações de enzimas distintas, a coluna foi submetida a *stripping* com 10 volumes de EDTA 100 mM para a remoção completa das proteínas, seguido de sua recarga com 10 volumes de NiSO₄ 100 mM. As frações contendo a proteína de interesse foram concentradas por ultrafiltração utilizando concentradores Vivaspin (10 kDa de *cut-off*). Nesta etapa, também foi realizada a troca de tampão para remover o cloreto proveniente do NaCl, uma vez que a presença de íons de halogênio não controlados inviabilizaria reações com controle de quais halogênios encontravam-se presentes. Realizaram-se três ciclos de ultrafiltração utilizando tampão fosfato 30 mM

(pH 7,5). Em seguida, foi adicionado glicerol estéril ($50\% \frac{Volume}{Volume}$) até atingir uma concentração final de $10\% \left(\frac{Volume}{Volume}\right)$ nas amostras. Por fim, as enzimas foram quantificadas pelo método de Bradford (*Quick Start™ Bradford Protein Assay*, Bio-Rad®), adicionando 20 µL de amostra a 1 mL do reagente e incubando 5 minutos em temperatura ambiente, para, então, realizar a leitura a 595 nm contra uma curva de calibração de soroalbumina bovina (BSA), fornecida pelo kit de reagente Bradford, para quantificação. A enzima Fre teve sua atividade enzimática mensurada e todas as enzimas foram vitrificadas em alíquotas de 100 µL em nitrogênio líquido, conforme o protocolo de Deng *et al.* (2004), sendo armazenadas a -20 °C até a utilização.

3.6.4 Ensaios *in vitro*

O ensaio enzimático *in vitro* foi realizado como tentativa de medir a velocidade inicial da enzima LavH. Essa fase corresponde à condição em que menos de 10% do substrato inicial foi convertido em produto, refletindo a velocidade mais próxima da máxima para aquela concentração enzimática e de substrato. Para isso, conduziram-se ensaios com tempos de reação de 1, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos em triplicata, avaliando-se cloro e bromo como halogênios. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços com volume final de 100 µL por poço, totalizando 36 reações experimentais. Além disso, controles negativos (brancos) foram realizados em duplicata: um sem a adição de nenhuma enzima e outro contendo apenas a redutase de flavina (Fre).

A reação foi composta por: Tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,5), 10 mM de sal halógeno (KCl ou KBr), 1 mM de L-triptofano, 3 mM de NADH, 100 µM de FAD, $2 \frac{U}{mL}$ de Fre e 5 µM de LavH. As reações foram incubadas a 25 °C sob agitação de 150 rpm. Para pré equilibrar o sistema e gerar FADH₂ suficiente para o início da reação de halogenação, as reações foram incubadas por 5 minutos com a Fre antes da adição da halogenase (LavH), a qual iniciou o tempo de reação de fato. A interrupção da reação foi feita através da adição de 100 µL de metanol. As amostras foram então centrifugadas a 20000 g e 100 µL do sobrenadante foram coletados, adicionando-se a estes, em seguida, 150 µL de tampão fosfato 30 mM, para obter volume suficiente para a análise no HPLC sem risco da amostra não ser injetada pelo equipamento por possuir baixo volume. Esta mistura final, que consiste na reação enzimática diluída

em um fator de 5 vezes (com um total máximo de 200 μM de L-triptofano devido à diluição) foi filtrada em membrana de porosidade 0,22 μm e submetida à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em fase reversa para observação do tempo de retenção do produto e substrato, além da quantificação do consumo do substrato, como será descrito na seção 3.6.5. Os protocolos reacionais foram baseados nos trabalhos de Ismail *et al.* (2019) e Sher *et al.* (2026).

Para mensurar a atividade da redutase de flavina, foi seguido o protocolo de Ismail *et al.* (2019). Para isso, foram realizadas reações monitorando a oxidação do NADH em NAD, utilizada pela enzima para promover a redução de FAD para FADH_2 , através de aferimento da diminuição da DO a 340 nm, visto que o NADH absorve neste comprimento de onda, diferentemente do NAD. As reações foram feitas em triplicata em volume de 1,020 mL de reação a 25°C por 20s, contados após adição da enzima. A composição da reação consiste em: 1 mL Tampão fosfato 30 mM (pH 7,5); 50 μM FAD; 160 μM NADH; 20 μL da amostra da Fre. Então, a atividade específica da enzima (expressa em $\frac{U}{\text{mg de enzima}}$) foi calculada a partir dos dados de absorbância por meio da lei de Beer-Lambert adotando-se o coeficiente de extinção molar do NADH de $\epsilon_{340\text{nm}} = 6.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e considerando que uma unidade de atividade (1 U) equivale a 1 μmol de NADH consumido por minuto.

3.6.5 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a análise de HPLC, utilizou-se um sistema Shimadzu, bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996, utilizando coluna C18 (Sunfire Waters, Milford, EUA) a 25 °C conectada ao detector UV/VIS 280 nm, visando a detecção de L-triptofano e halotriptofanos. A solução A foi água contendo 0,1% ($\frac{V}{V}$) de ácido trifluoroacético, e a solução B foi acetonitrila contendo 0,1% ($\frac{V}{V}$) de ácido trifluoroacético, ambas com vazão de 0,6 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$. O gradiente empregado foi: 0-2 min, 2%-15% B; 2-14 min, 15%-83% B; 14-16 min, 83%-2% B; 16-20 min, 12% B.

Inicialmente, uma curva padrão de L-triptofano foi estabelecida através da solubilização de concentrações crescentes de L-triptofano (1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 μM) em solução solvente que mimetiza as condições da amostra reacional que seria injetada (20% metanol, 20% tampão fosfato 100 mM, 60% água ultrapura).

Então, a curva padrão foi corrida no equipamento conforme descrito e a área de absorbância a 280 nm do pico do triptofano foi correlacionada com as concentrações injetadas, estabelecendo a curva padrão. Para os cálculos da velocidade de reação, seria utilizada a subtração da média da concentração de L-triptofano presente nas reações sem enzimas, representando o início da reação, pela média de concentração de triptofano presente após certo tempo de reação decorrido (1, 2, 5, 10, 15 ou 30 minutos). Assim, a velocidade de consumo do substrato seria encontrada através de regressão linear. No entanto, como será abordado nos resultados, isto não foi possível devido ao triptofano não ter sido consumido suficientemente para este cálculo durante o tempo reacional proposto.

3.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a seleção das enzimas a serem alinhadas e submetidas à análise filogenética, foi feita a seleção de FDHs que possuem L-triptofano como substrato que já foram previamente caracterizadas, ao menos parcialmente (expressas heterologamente e submetidas a análises de atividade ou análise estrutural). Inicialmente, realizou-se alinhamento local de aminoácidos utilizando a ferramenta blastp (NCBI - *Nacional Center For Biotechnology Information*) da sequência enzimática da halogenase de *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* (Uniprot ID: A0A2K8PCX4) contra o banco de dados “UniprotKB/Swiss-Prot(swissprot)”. Além disso, outras enzimas foram selecionadas com base em análise da literatura. Assim, foram selecionadas 12 enzimas de maior identidade com a LavH: ThaL; RebH; PrnA; PyrH; AbeH; BorH; KtzQ; SttH; Th-Hal; SnFDHal; LooH e KtzR (Quadro 1)(Apêndice C). No caso, todas as enzimas analisadas pertenciam à família das halogenases de triptofano dependentes de flavina, classificação comprovada com a ferramenta InterProScan (Blum et al., 2025) (Paysan et al., 2025) (Apêndice D). A identidade (*identity%*) das enzimas selecionadas foi anotada após alinhamento local com blastp.

O alinhamento MUSCLE (Edgar, 2004) e a construção da árvore filogenética foi feita no software MEGA12 (Kumar et al., 2024). De início, as sequências foram alinhadas com MUSCLE, curadas através da remoção de sequências hipervariáveis e, então, submetidas à ferramenta de “seleção de melhor modelo” para a escolha do modelo a ser utilizado na construção da árvore, a qual retornou o modelo Le-Gascuel

(Le; Gascuel, 2008) com distribuição gamma e sítios invariantes como a melhor opção. Então, a árvore filogenética foi estabelecida por máxima verossimilhança (Felsenstein, 1981), considerando deleção parcial e as configurações recomendadas, aplicando-se teste bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

3.8 DOCKING MOLECULAR

Para a modelagem estrutural da LavH, devido à ausência de estrutura cristalográfica, foi utilizado o servidor do AlphaFold3 (Abramson *et al.*, 2024). Então, o modelo de pTM (*predicted template modeling*) igual a 0,97 foi selecionado para ser refinado através do Galaxy Refine (Heo *et al.*, 2013) no servidor GalaxyWeb, o qual retornou 5 modelos refinados. Os modelos foram, então, submetidos à análise Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) no servidor SAVES v6.1 da “doe-mbi.ucla” (*Institute for Genomics and Proteomics, University of California Los Angeles*) com o modelo de maior quantidade de resíduos em posições mais favorecidas, correspondente a 96,1% dos resíduos, no gráfico de ramachandran (Ramachandran; Sasisekharan, 1968) sendo selecionado. Somente o resíduo K345 encontrava-se em uma posição não permitida.

O melhor modelo foi, então, sobreposto à estrutura cristalográfica da BorH (PDB ID: 6UL2, Quadro 1) devido à semelhança filogenética observada entre a LavH e BorH, visando identificar o sítio catalítico. Para isto, o software UCSF Chimera 1.19 (Pettersen *et al.*, 2004) foi empregado e observou-se que o resíduo K345 não estava localizado no sítio catalítico e, desta forma, prosseguiu-se com este modelo. Durante a sobreposição, o ligante da BorH (L-triptofano) foi selecionado e o comando “*measure center sel*” foi utilizado para retornar as coordenadas do centro da molécula, as quais foram -29.80, 130.37 e 124.29 (coordenadas X, Y e Z, respectivamente). Estas coordenadas foram utilizadas para estabelecer a *Grid Box* posteriormente no sítio catalítico da LavH, visto que ela foi sobreposta à BorH e encontrava-se nas mesmas coordenadas no arquivo.

Então, o ligante L-triptofano foi desenhado no PubChem Sketcher 2,4 e convertido para .pbd com o Chimera. O ligante e o modelo enzimático da LavH (receptor) foram preparados para *docking* (adição de cargas e hidrogênio) no software

Autodock Tools 1.5.7 (Morris *et al.*, 2009) e convertidos para .PDBQT. Inicialmente foi realizado um *docking* assumindo a estrutura do receptor como totalmente rígida.

Para isto, o grid foi calculado com as coordenadas coletadas e um tamanho de 40,40,40 (x,y,z) utilizando o AutoGrid do Autodock Tools. Então, com o grid mapeado, utilizou-se o Autodock 4 para realizar 100 simulações de *docking* com um modelo lamarckiano disponível no software. As conformações presentes no cluster de energia mais abundante foram analisadas e comparadas com a literatura utilizando o software Discovery Studio (Biovia; Dassault Systèmes, 2025), identificando resíduos catalíticos e levantando a suspeita de que uma fenilalanina F115 era responsável por direcionar o triptofano para o sítio catalítico. Assim, foi realizado um *docking* com este resíduo simulado como flexível.

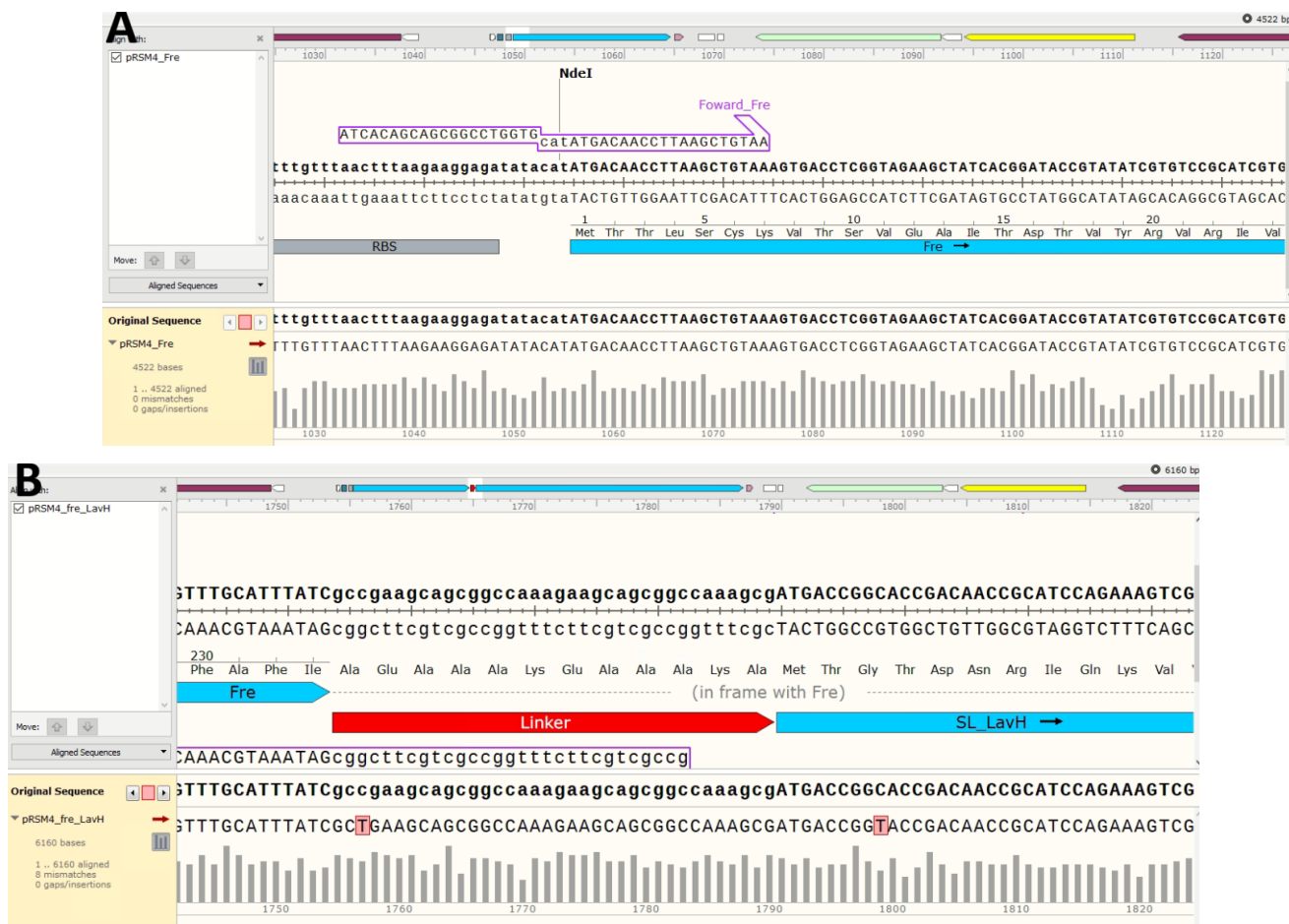
Neste sentido, no chimera o resíduo F115 foi salvo separadamente do receptor sem este aminoácido. Então, o autogrid foi realizado conforme descrito, porém com o grid de tamanho 40,40,50 (x,y,z), visto que isso permitia uma maior cobertura dos resíduos catalíticos. O Autodock 4 foi executado com o resíduo F115 atribuído como flexível e o restante do receptor como rígido. Os resultados foram analisados como descrito anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS

Foi possível confirmar a clonagem bem-sucedida do gene *fre*, a fusão das enzimas Fre e LavH e, portanto, a sequência da LavH (Figura 8). As mutações pontuais encontradas nos genes presentes no plasmídeo pRSM4_Fre_LavH são todas silenciosas, com exceção de uma localizada no aminoácido 326, onde se esperava encontrar um códon que codifica asparagina, mas o sequenciamento retornou um códon de serina, ambos aminoácidos polares e sem carga sendo, assim, uma mutação conservativa. Este resíduo encontra-se distante do sítio ativo da enzima. Estas mutações podem ser devido à polimerase utilizada para a CPEC (GoTaq® G2 da PROMEGA) não ser considerada de “alta fidelidade” como a Phusion ou Platinum SuperFi II utilizada nas outras amplificações.

FIGURA 8 - Alinhamento da sequência esperada do plasmídeo com o resultado do sequenciamento MinION visualizado no software SnapGene. **A:** Alinhamento do pRSM4_Fre. **B:** Alinhamento do pRSM4_Fre_LavH, com dois mismatches silenciosos destacados em vermelho.



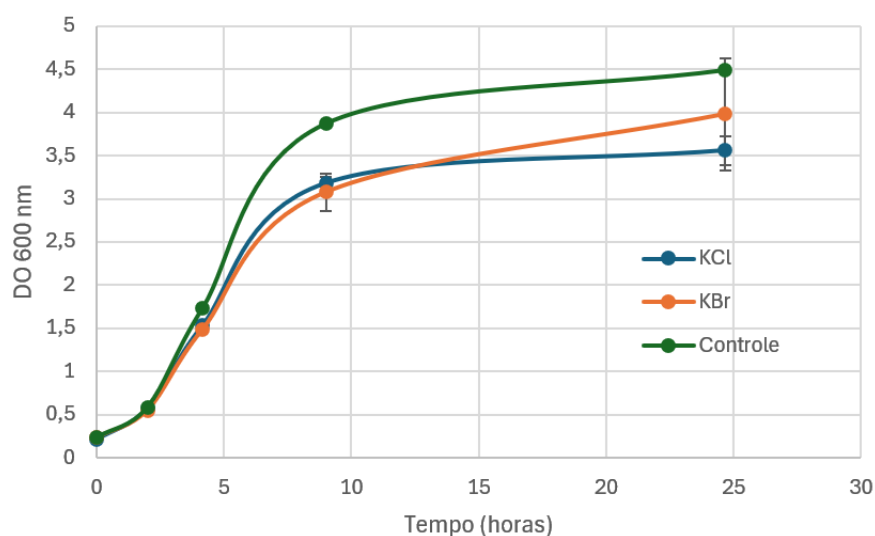
Fonte: Autoria própria.

4.2 CULTIVOS DE *E. COLI*/QH4_PCA_S_LAVH

4.2.1 Tolerância aos sais de halogênio

De acordo com as medições de DO 600 nm realizadas (Figura 9), é possível observar uma inibição de crescimento em todos os meios contendo sais de halogênio em relação ao grupo controle em magnitude semelhante para todos os sais. Ainda assim, houve crescimento suficiente para atingir uma concentração celular adequada e, desta forma, prosseguiu-se com 100 mM de sais de halogênio (KCl ou KBr), visando garantir o excesso desses átomos no meio.

Figura 9 - Variação da DO 600 nm ao longo do tempo em horas.

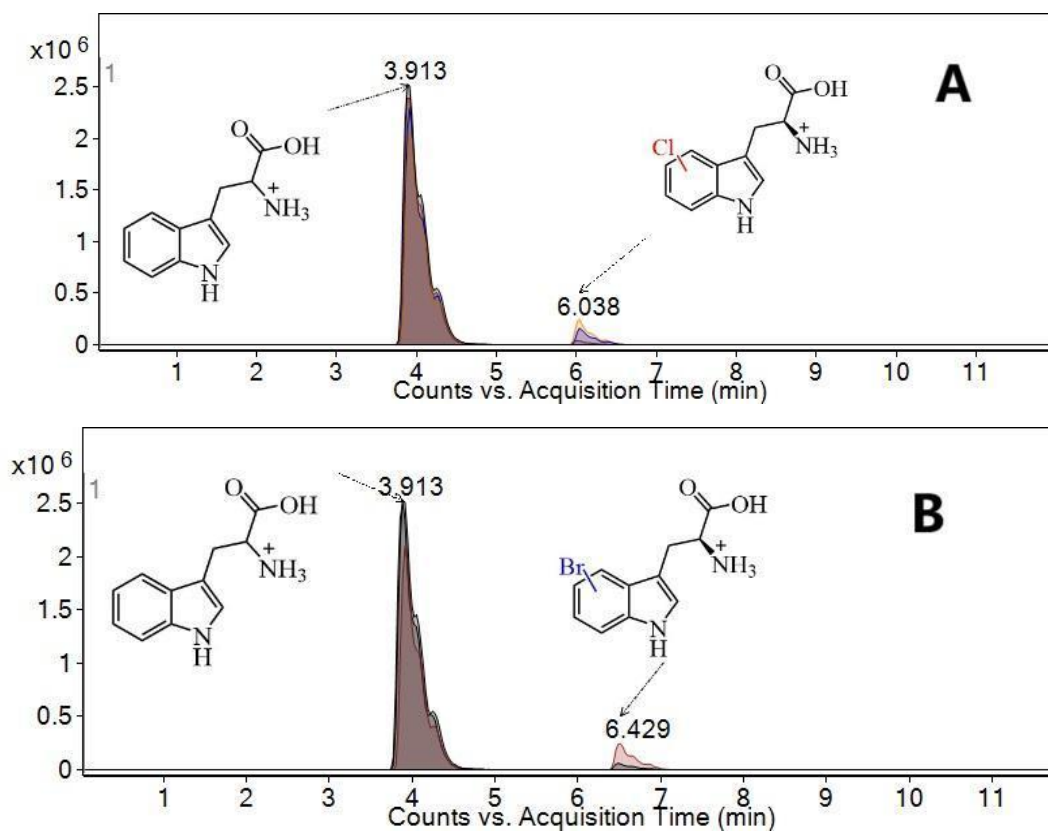


Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Expressão heteróloga e produção de compostos halogenados

Nos cultivos da linhagem de *E. coli* QH4_PCA_S_LavH em meio com sais de halogênio, após o processamento dos dados, foi possível observar a presença de triptofano halogenado com bromo e cloro, de acordo com a condição do meio. Isto é, foi observada halogenação seletiva com cloro em meio suplementado com sal de cloro e com bromo em meio suplementado com sal de bromo (Figura 10). Não foram identificadas fenazinas halogenadas.

FIGURA 10 - Cromatogramas EIC obtidos pelo sistema UHPLC-QTOF-MS/MS. Sobreposição dos cromatogramas dos tempos de 6, 24 e 48 h do cultivo da linhagem *E. coli* QH4_PCA_S_LavH em KCl (A) e em KBr (B).



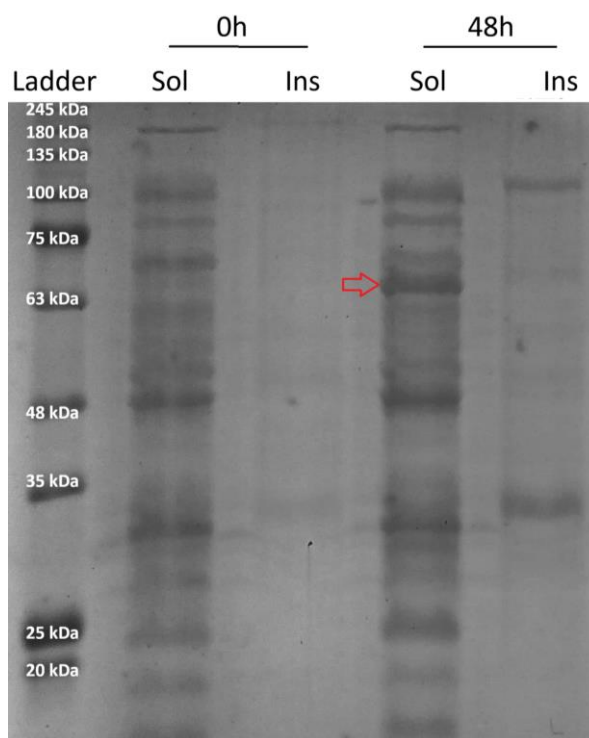
Fonte: Relatório das análises de espectrometria de massas elaborado pelo Dr. Luis Guillermo Cuadrado Durango, (2024).

Estes resultados comprovam a atividade de halogenase prevista da enzima e sua capacidade de halogenar o L-triptofano com cloro e com bromo. Para testes com iodo, o qual pode ser utilizado por algumas halogenases (e.g. PezW, descoberta por Chen Zhenshan *et al.*, (2025)), é necessário algum método para inibir a produção de peróxido de hidrogênio no experimento pela decomposição espontânea de FADH₂, visto que a presença deste composto com íons de iodo é reportada como sendo responsável por falsas atribuições de atividade de algumas halogenases, como reportado para a enzima Virx1 (Gkotsi *et al.*, 2019) por Zhang Y. *et al.*, (2021).

Ainda, a análise de SDS-PAGE realizada das fases solúvel e insolúvel (Figura 11) revelou uma ótima solubilidade para a LavH, com massa molecular prevista de 62,07 kDa, estando, mesmo após 48 horas de cultivo a 30 °C, presente em grande quantidade em sua forma solúvel. Isto combinado à atividade comprovada em biofábrica, indica um potencial catalítico industrial desta enzima, o qual motivou as análises posteriores de sua solubilidade e purificação (para ensaios *in vitro* de

caracterização) a partir de um sistema de expressão utilizado frequentemente para produção em larga escala de enzimas.

FIGURA 11 - Extrato solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de *E. coli* QH4_PCA_S_LavH em seus respectivos tempos de coleta. A seta vermelha indica a banda de peso molecular previsto para LavH (62,07 kDa).



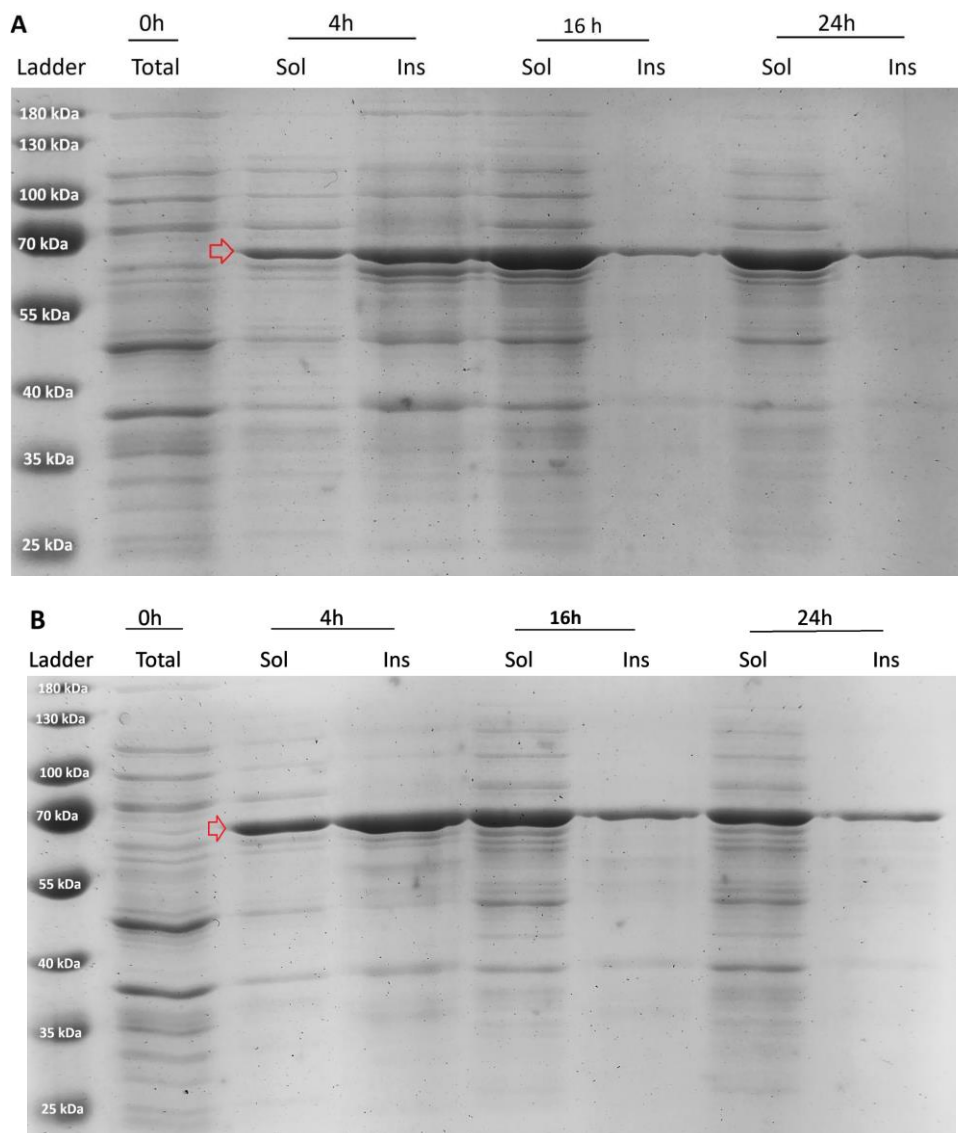
Fonte: Autoria própria.

4.3 EXPRESSÃO EM *E. COLI* BL21(DE3)

4.3.1 Solubilidade e expressão

Para a LavH (Figura 12), foi observada boa solubilidade ao longo de 24 horas tanto em um cultivo a 18°C (Figura 12 A) quanto a 25°C (Figura 12 B). Isto é uma característica destoante das demais halogenases, conhecidas por serem pouco solúveis necessitando, muitas vezes, de coexpressão de chaperonas (Payne *et al*, 2013), ou fusão com outras enzimas (Andorfer *et al*, 2017) para viabilizar sua expressão eficiente.

FIGURA 12 - Extrato proteico total, solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de *E. coli* BL21(DE3)_LavH em seus respectivos tempos de indução. **A:** Cultivo a 18°C. **B:** Cultivo a 25°C.

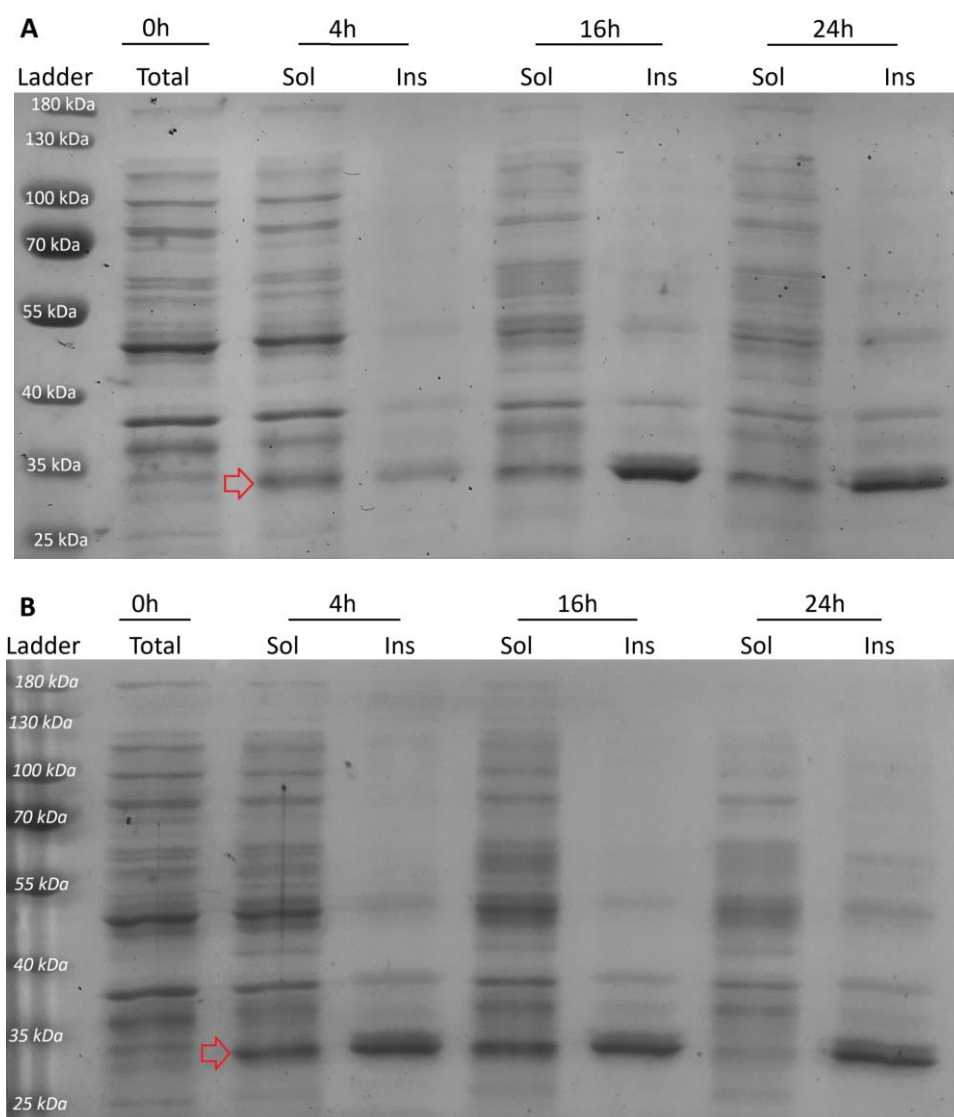


Fonte: Autoria própria.

Já nos testes com a Fre (Figura 13), a qual é uma enzima nativa de *E. coli* com massa molecular prevista de 28,41 kDa, foi observado uma solubilidade inferior, comparativamente. Entretanto, ainda foi possível observar solubilidade aceitável em 4 horas e 16 horas a 25 e 18 °C respectivamente. É possível que esta solubilidade abaixo do esperado para uma proteína nativa possa ser devido à expressão acelerada desta enzima resultar em um consumo de NADH, e produção de FADH₂, ocasionando um desbalanço redox que causa o fenômeno de “*metabolic burden*”, fator que prejudica o dobramento proteico (Bhatwa *et al.*, 2021). Uma maneira de confirmar esta hipótese poderia ser a mutação de um resíduo essencial para a catálise da Fre por um análogo, seguida da análise da solubilidade desta enzima mutante (inativa) para,

assim, estabelecer se sua atividade catalítica prejudica a sua própria solubilidade dentro da *E. coli*.

FIGURA 13 - Extrato proteico total, solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de *E. coli* BL21(DE3)_Fre em seus respectivos tempos de indução. **A:** Cultivo a 18°C. **B:** Cultivo a 25°C.

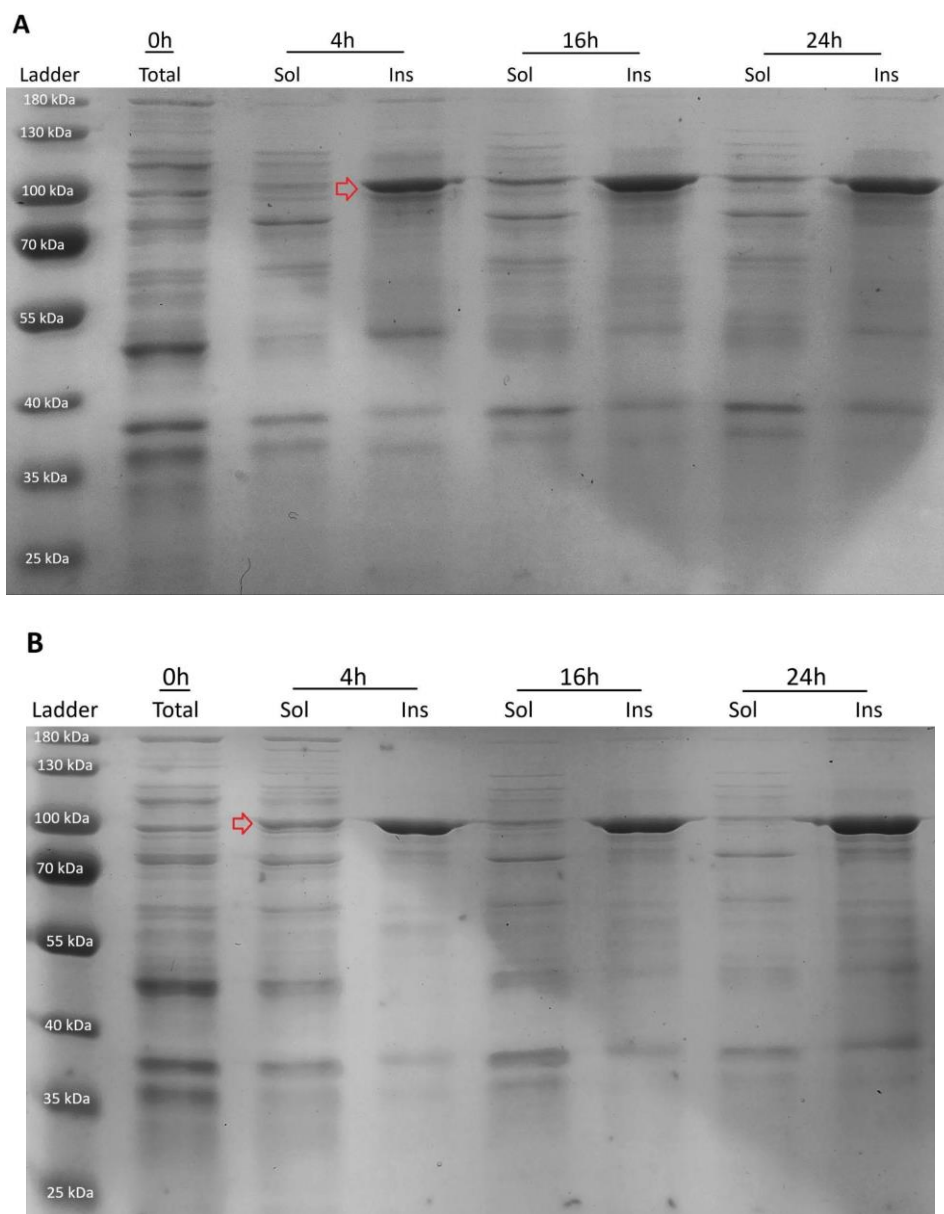


Fonte: Autoria própria.

Nos testes com a enzima fusionada Fre_LavH (Figura 14), com massa molecular prevista de 90,01 kDa, foi observada uma queda drástica na solubilidade quando comparado à LavH selvagem, com grande parte de sua fração sendo insolúvel em todos os pontos de coleta. Isto é destoante com outros artigos que realizaram este método (Andorfer *et al*, 2017. Kong *et al*, 2020. Lee *et al*, 2020) e sugere que a fusão

com a Fre pode prejudicar a solubilidade de FDHs que já são muito solúveis, dificultando a aplicação desta estratégia em uma biofábrica. Porém, isto pode ter ocorrido, também, por conta da sequência de *linker* utilizada, visto que o mesmo *linker* pode ter efeitos positivos ou negativos na solubilidade e atividade em diferentes enzimas (Wang Jiawei *et al*, 2025). Isto é um fenômeno bem conhecido e que adiciona complexidade à estratégia de fusão enzimática, sendo necessário, muitas vezes, o teste de mais de um *linker* peptídico para alcançar um efeito positivo com as mesmas enzimas, como feito por Lee *et al.*, (2020) ao testar 3 *linkers* diferentes para a fusão da Stth e Fre.

FIGURA 14 - Extrato proteico total, solúvel (sol) e insolúvel (Ins) de *E. coli* BL21(DE3)_Fre_LavH em seus respectivos tempos de indução. **A:** Cultivo a 18°C. **B:** Cultivo a 25°C.



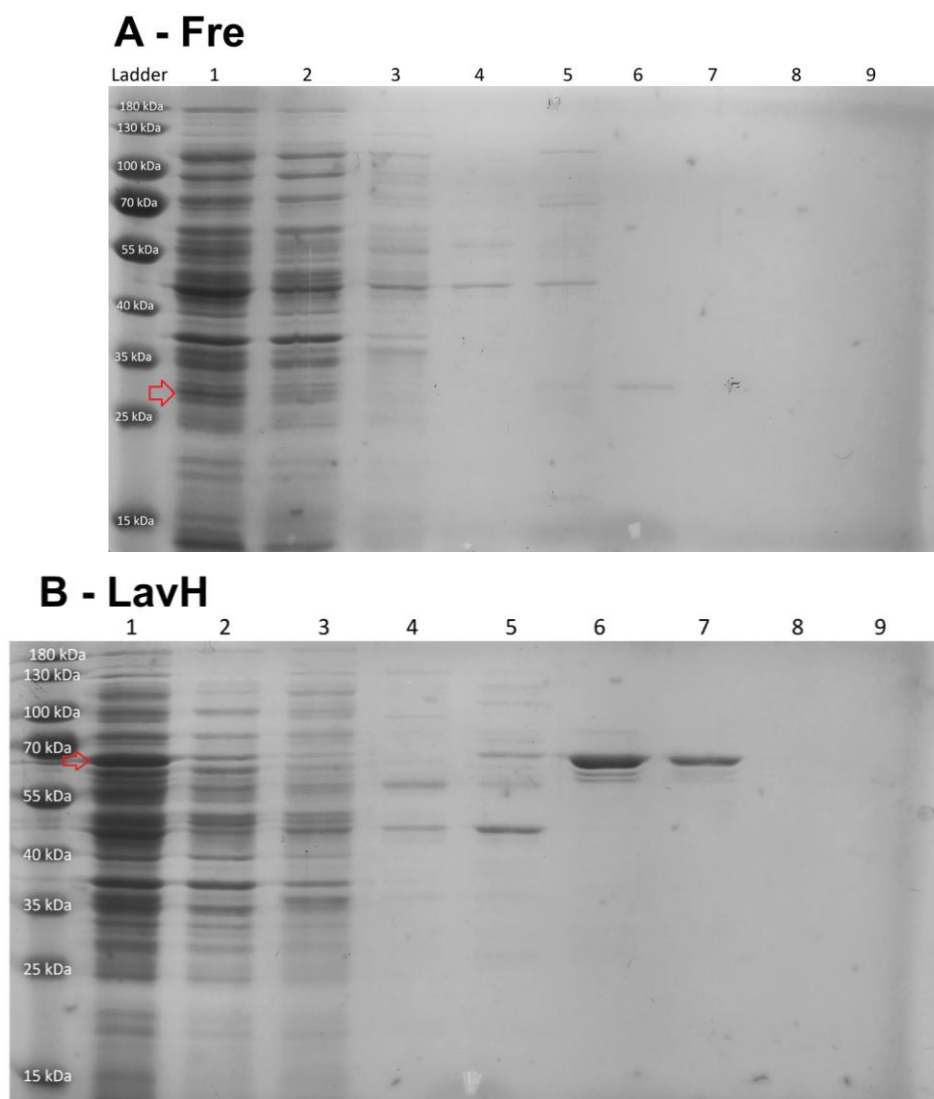
Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Purificação das enzimas

Para as escalas experimentais da purificação (*i.e* purificações teste para identificar o momento de eluição das enzimas, não visando sua concentração e estoque), foram utilizados 25 mL de cultivo. Tanto para a Fre quanto para a LavH, a melhor concentração de imidazol para garantir sua eluição e pureza foi 100 mM (Figura 15).

FIGURA 15 - Frações de eluição da coluna cromatográfica visualizada em SDS-PAGE. **A:** 1 - Lisado solúvel *E. coli*_BL21_Fre; 2 - Eluato; 3 - Lavagem pH 6; 4 - Lavagem imidazol 10 mM; 5 - Lavagem imidazol 50 mM; 6 - Eluição imidazol 100 mM; 7 - Lavagem imidazol 150 mM; 8 - Lavagem imidazol

250 mM; 9 - Eluição imidazol 500 mM. **B:** 1 - Lisado solúvel *E. coli*_BL21_LavH; 2 - Eluato; 3 - Lavagem pH 6; 4 - Lavagem imidazol 10 mM; 5 - Lavagem imidazol 50 mM; 6 - Eluição imidazol 100 mM; 7 - Lavagem imidazol 150 mM; 8 - Lavagem imidazol 250 mM; 9 - Eluição imidazol 500 mM. Tamanhos previstos: Fre 28,41 kDa ; LavH 62,07 kDa.

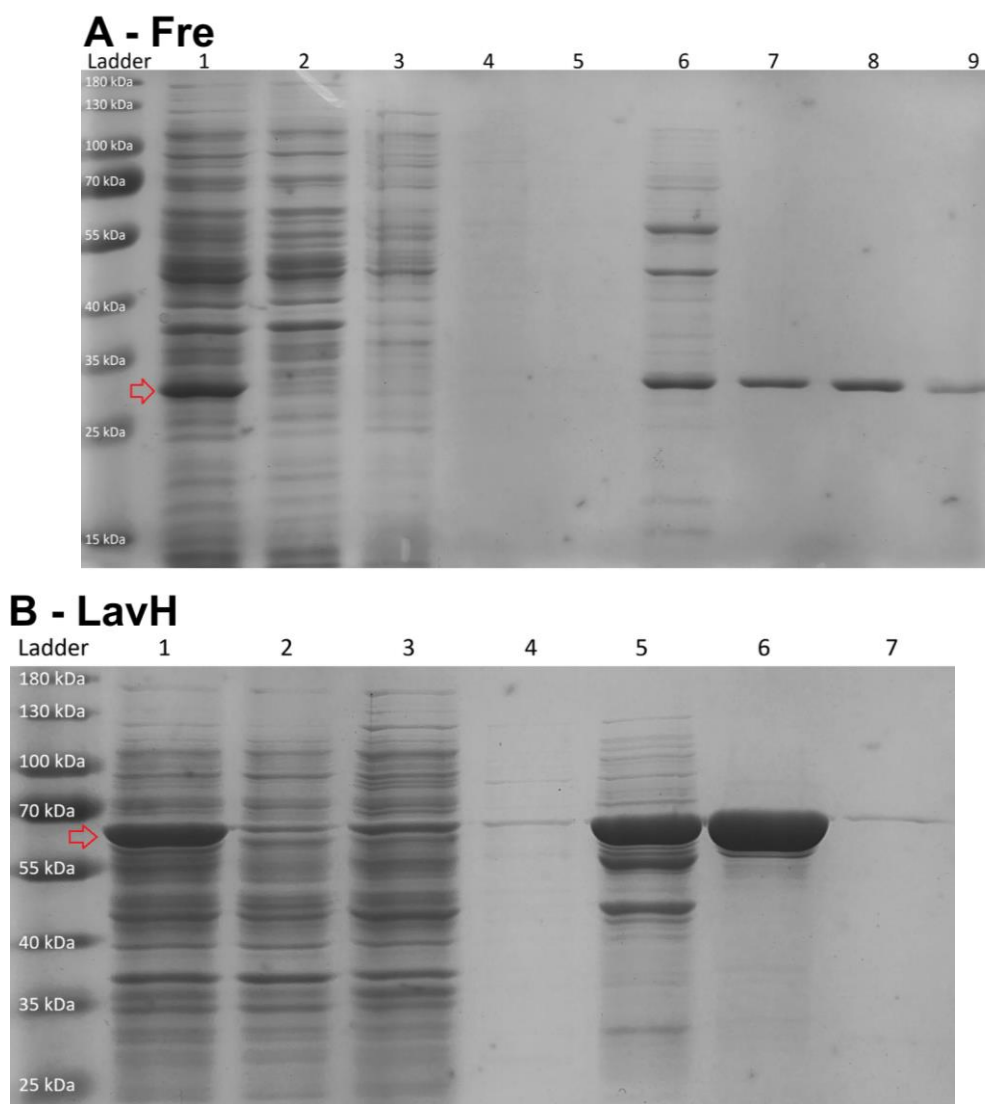


Fonte: Autoria própria.

Então, foram feitas as purificações utilizando 130 mL de cultivo (Figura 16), visando obter grandes quantidades de enzima, além da concentração e quantificação das enzimas puras através de reação de Bradford (Figura 17). Foi necessário passar volumes maiores pela coluna devido à maior quantidade de proteínas presentes.

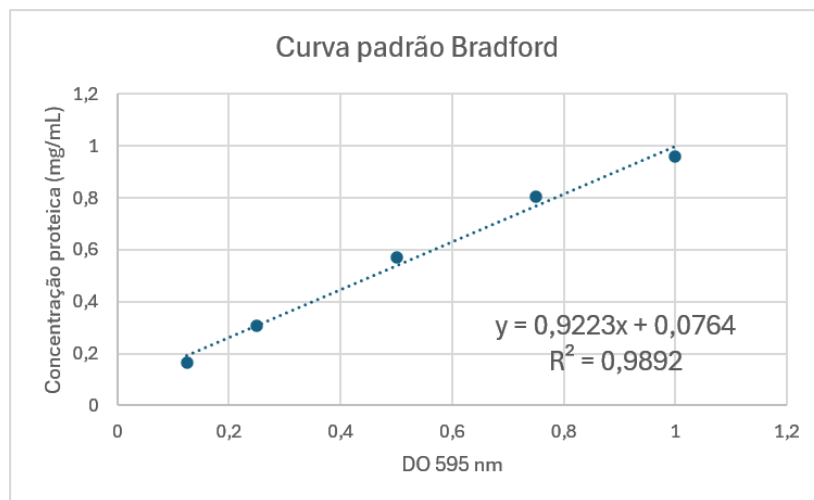
FIGURA 16 - Frações de eluição da coluna cromatográfica para a purificação do estoque enzimático visualizada em SDS-PAGE. **A:** 1 - Lisado solúvel *E. coli*_BL21_Fre diluído 5x; 2 - Eluato diluído 5x; 3 - Lavagem pH 6 (14 mL); 4 - Lavagem pH 6 (14 mL); 5 - Lavagem pH 6 (14 mL); 6 - Lavagem imidazol 50 mM (14 mL); 7 - Lavagem imidazol 50 mM (14 mL); 8 - Eluição imidazol 100 mM (11 mL); 9 -

Limpeza imidazol 500 mM (10 mL). **B:** 1 - Lisado solúvel *E. coli*_BL21_LavH; 2 - Eluato; 3 - Lavagem pH 6 (14 mL); 4 - Lavagem pH 6 (14 mL); 5 - Lavagem imidazol 50 mM (10 mL); 6 - Eluição imidazol 100 mM (10 mL); 7 - Lavagem imidazol 500 mM (10mL). Tamanhos previstos: Fre 28,41 kDa ; LavH 62,07 kDa. Concentraram-se as frações 7,8 e 9 da Fre e 6 da LavH para a amostra final.



Fonte: Autoria própria.

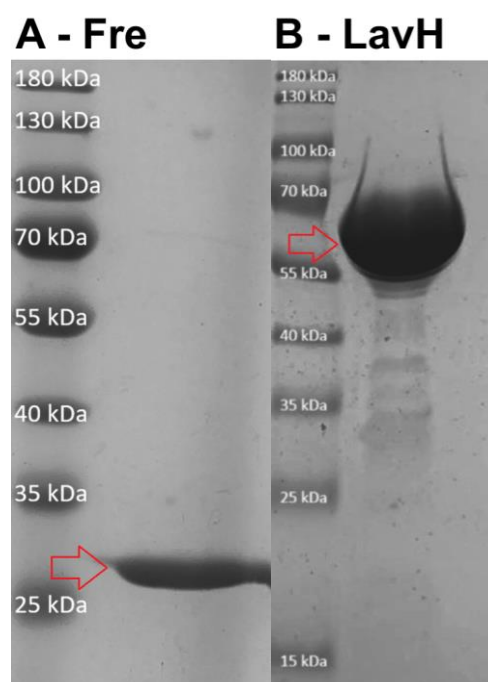
FIGURA 17 - Curva padrão da reação de Bradford.



Fonte: Autoria própria.

Após a concentração final para um total aproximado de 4 mL para cada enzima, a amostra final de Fre estava visivelmente pura ao ser observada em SDS-PAGE (Figura 18 A) e possuía uma concentração de $1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. A amostra da LavH encontrava-se, também, visivelmente pura (Figura 18 B) e com uma concentração de $3,89 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. Portanto, foi possível purificar aproximadamente $119 \frac{\text{mg}}{\text{L de cultivo}}$ desta halogenase através do protocolo descrito, enquanto que $30,8 \frac{\text{mg}}{\text{L de cultivo}}$ da redutase de flavina nativa de *E. coli* foi obtida. Entretanto, é visível que houve perdas significativas durante a lavagem com 50 mM de imidazol na purificação (Figura 16 B, poço 5). Portanto, é provável que o rendimento da purificação desta enzima possa ser otimizado e encontra-se sub expresso aqui. De qualquer modo, a quantidade de enzima obtida foi suficiente para prosseguir com diversas reações *in vitro*.

FIGURA 18 - Amostras enzimáticas concentradas em SDS-PAGE. **A:** Fre; **B:** LavH. Tamanhos previstos: Fre 28,41 kDa ; LavH 62,07 kDa

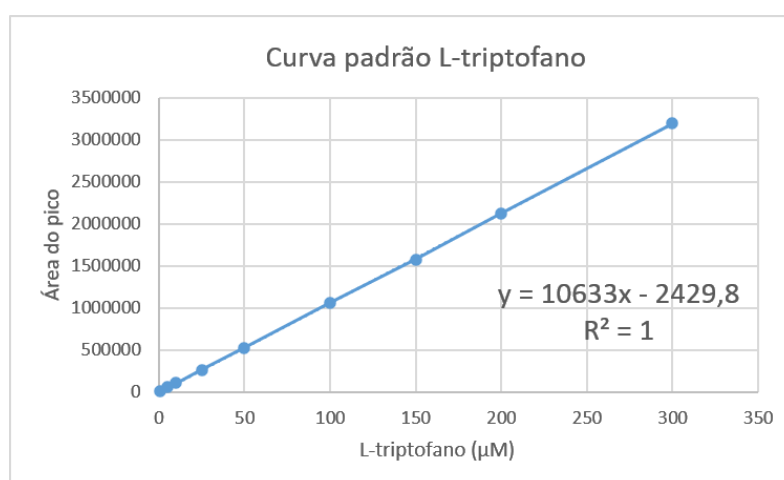


Fonte: Autoria própria.

4.3.3 Resultados da análise *in vitro*

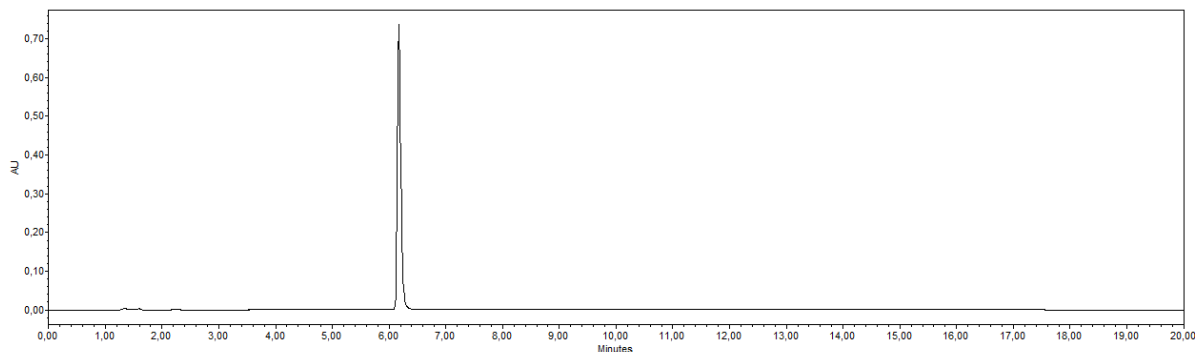
A curva padrão construída para o L-triptofano (Figura 19) indicou boa confiabilidade para quantificações. Além disso, o cromatograma (Figura 20) demonstrou que o método empregado para as análises é apropriado, devido à alta resolução do pico.

FIGURA 19 - Curva padrão para a quantificação do L-triptofano.



Fonte: Autoria própria.

FIGURA 20 - Cromatograma da amostra de 300 µM de L-triptofano. Monitorada a 280 nm indicando a eluição do L-triptofano em 6,17 minutos de corrida.



Fonte: Autoria própria.

Entretanto, mesmo nas reações incubadas por 30 minutos com cloro ou bromo, nenhum pico eluído após o L-triptofano foi identificado com segurança, onde encontrariam-se os picos de L-triptofano halogenado (Sher *et al.*, 2026). Isto porque os picos eram pequenos demais para serem diferenciados de ruído e, também, estavam presentes nas amostras das reações em que não foi adicionada enzima (branco). Logo, é possível que o tempo de reação tenha sido demasiado curto, já que para outras enzimas, como a KtzQ utilizada na concentração de 20 μM , ainda há grandes quantidades de L-triptofano (concentração inicial de 0,5 mM) mesmo após 16 horas (Heemstra; Walsh, 2008), algo que não é inesperado para enzimas com K_{cat} baixo ($K_{\text{cat}} = 0,19 \text{ min}^{-1}$). Por outro lado, há enzimas com K_{cat} mais elevado como a SnFDHal ($K_{\text{cat}} = 243,09 \text{ min}^{-1}$) que, com 5 μM de enzima, convertem 95% de uma concentração inicial de 1 mM de L-triptofano em sua versão halogenada em 60 minutos nas suas condições ótimas (Sher *et al.*, 2026).

É possível, também, que a enzima tenha sido purificada em sua forma inativa mesmo que esteja aparentemente solúvel, algo documentado para certas enzimas mas menos comum (Sabate; De Groot; Ventura, 2010). Porém, isto não é documentado para as halogenases em nenhum artigo encontrado durante a revisão literária deste trabalho. Ainda, o fato da redutase de flavina ter mantido sua atividade após ser armazenada (*i.e* já que demonstrou atividade de $22,032 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ de enzima no momento em que foi purificada e $18,5 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ quando foi utilizada na reação de halogenação), afasta a possibilidade de um armazenamento inadequado.

É importante ressaltar, também, que as condições reacionais adotadas são genéricas (pH 7,5, temperatura ambiente de 25°C e agitação de 150 rpm) não

representando, necessariamente, a maior capacidade catalítica da enzima. Portanto, é preciso testar novas condições como temperaturas mais altas ou valores de pH levemente ácidos ou básicos (e.g 30°C pH 6,8) mas, principalmente, repetir as reações *in vitro* com um maior tempo reacional (e.g 16 horas de reação) para qualitativamente identificar o tempo de eluição do produto halogenado e, assim, prosseguir com uma curva de tempo apropriada.

4.4 ANÁLISES *IN SILICO*

4.4.1 Filogenia

O alinhamento blastp das sequências peptídicas das enzimas selecionadas informou a identidade de todas as sequências em relação à sequência da halogenase LavH de *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* (Quadro 4). Além disso, o alinhamento revela que a sequência codificante da LavH, anotada no banco de dados secundário Uniprot (A0A2K8PCX4) com o mesmo nome da outra enzima halogenase “RebH” da espécie *Lechevalieria aerocolonigenes* (Sánchez *et al.*, 2002) possui, na verdade, apenas 67% de identidade com a RebH sendo, portanto, uma enzima diferente não descrita previamente na literatura. Desta forma, o nome LavH foi adotado para referir-se à halogenase de *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* neste trabalho, visto que esta é a única halogenase prevista no genoma da espécie.

QUADRO 4 – FDHs utilizadas na construção da árvore filogenética: Nomes, identidade (%) com a LavH, espécie de origem.

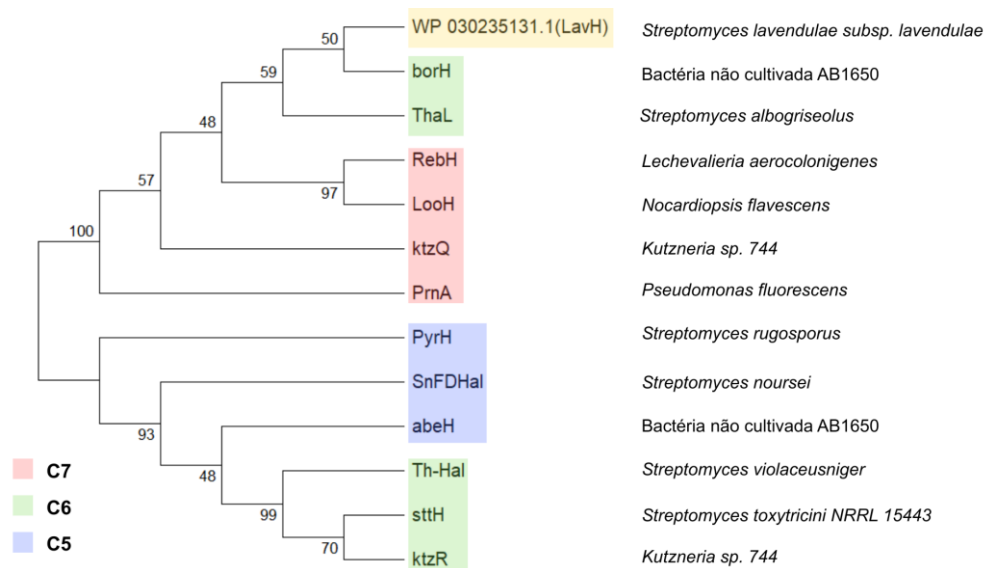
Enzima FDH	Identidade (%)	Espécie	Fonte
LavH	100	<i>Streptomyces lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i>	Este trabalho
ThaL	74	<i>Streptomyces</i> <i>albogriseolus</i>	Seibold <i>et al.</i> , 2006
BorH	72	Bactéria não cultivada AB1650	Lingkon;Bellizzi, 2020
RebH	67	<i>Lechevalieria</i> <i>aerocolonigenes</i>	Sánchez <i>et al.</i> , 2002
LooH	64	<i>Nocardiosis flavescens</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2026
KtzQ	60	<i>Kutzneria</i> sp. 744	Fujimori <i>et al.</i> , 2007
PrnA	58	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hammer <i>et al.</i> , 1997

SnFDHal	40	<i>Streptomyces noursei</i>	Sher <i>et al.</i> , 2026
Th-Hal	40	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	Menon <i>et al.</i> , 2016
PyrH	39	<i>Streptomyces rugosporus</i>	Zehner <i>et al.</i> , 2005
SttH	39	<i>Streptomyces toxytricini</i> NRRL 15443	Zeng; Zhan, 2011
KtzR	39	<i>Kutzneria</i> sp. 744	Fujimori <i>et al.</i> , 2007
AbeH	40	Bactéria não cultivada AB1650	Ashaduzzaman <i>et al.</i> , 2025

Fonte: Autoria própria.

Na árvore filogenética por máxima verossimilhança construída (Figura 21), observou-se maior proximidade da LavH com a BorH e a ThaL, as quais possuem o carbono 6 do L-triptofano como alvo. Porém, a relação entre a posição do carbono halogenado e a proximidade evolutiva não é unânime entre todas as enzimas, como denotado pela distância filogenética entre o clado contendo Th-Hal, SttH e KtzR e o clado contendo BorH e ThaL, mesmo que todas tenham como alvo o carbono 6. Entretanto, por mais que essa relação proposta não seja unânime, enzimas que possuem o mesmo carbono como alvo se agruparam com frequência nos mesmos clados, como é o caso do agrupamento já citado (Th-Hal, SttH e KtzR). Desta forma, é necessário análise estrutural e, como prova definitiva, experimental através de análise por ressonância magnética nuclear no produto formado pela enzima para afirmar qual o carbono alvo da LavH.

FIGURA 21 - Árvore filogenética para as halogenases de triptofano estudadas. O termo “WP_030235131.1” se refere à sequência de referência no NCBI.



Fonte: Autoria própria.

4.4.2 Análises estruturais

4.4.2.1 Modelagem e validação

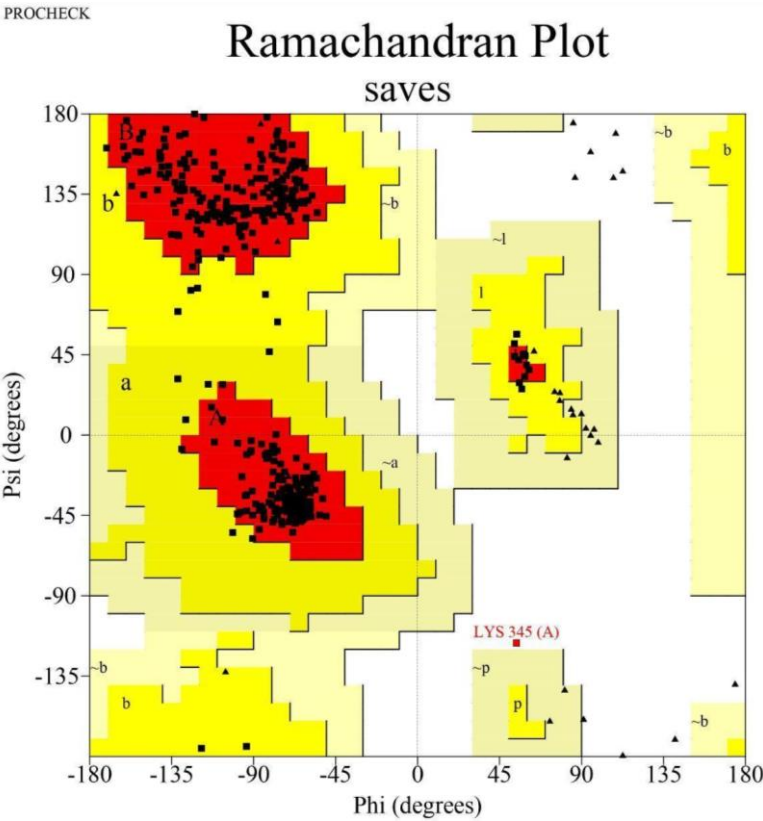
A modelagem feita em AlphaFold3 (Figura 22) demonstrou que a maioria dos resíduos modelados possui alta pontuação no “*predicted local distance difference test* (pLDDT)”. Ainda, após o refino, o melhor modelo apresentou 96,1% dos resíduos localizados em posições mais favorecidas com somente uma lisina (K345) localizada em uma torção desfavorável (Figura 23).

FIGURA 22 - Estrutura tridimensional da LavH modelada com AlphaFold3. Áreas em azul indicam alto pLDDT e, em vermelho ou branco, baixo ou medíocre pLDDT.



Fonte: Autoria própria.

FIGURA 23 - Gráfico de ramachandran e tabela indicando o favorecimento da torção de resíduos.



Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	446	96.1%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	17	3.7%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	1	0.2%

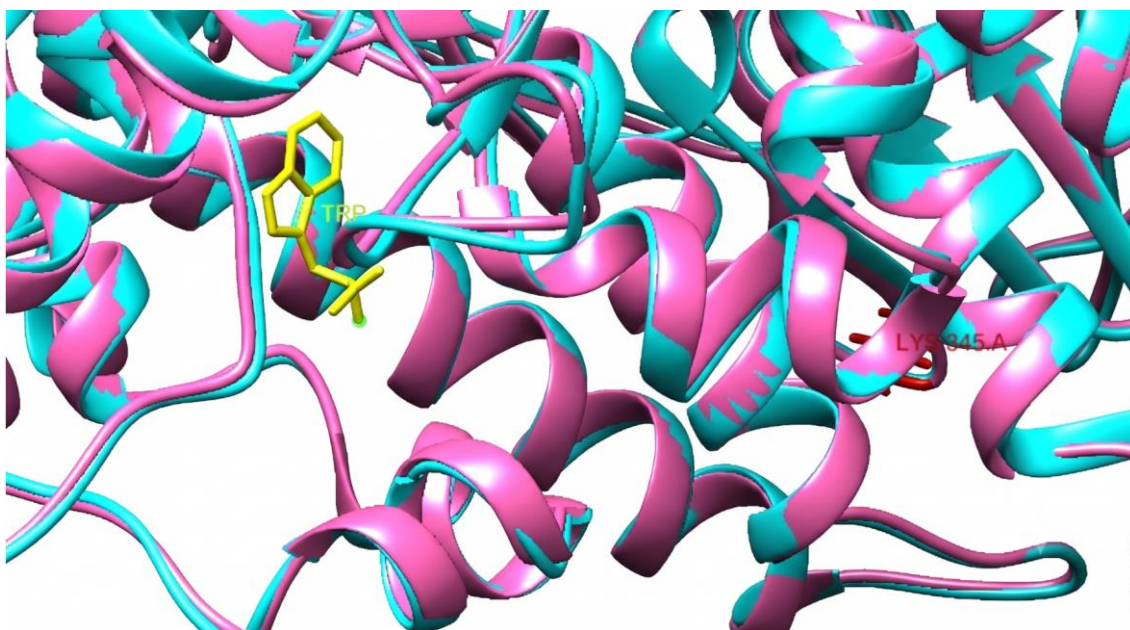
Number of non-glycine and non-proline residues	464	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	39	
Number of proline residues	29	

Total number of residues	534	

Fonte: Autoria própria.

Durante a sobreposição da estrutura cristalográfica da BorH com a estrutura modelada, foi possível observar que o resíduo K345 estava localizado distante do sítio ativo (Figura 24). Assim, foi validada a estrutura modelada como adequada para estudos de *docking* molecular.

FIGURA 24 - Sobreposição da BorH com a LavH. BorH, em rosa, com a LavH modelada, em azul, e o ligante L-triptofano em amarelo. Resíduo K345 reportado em região desfavorável destacado em vermelho.



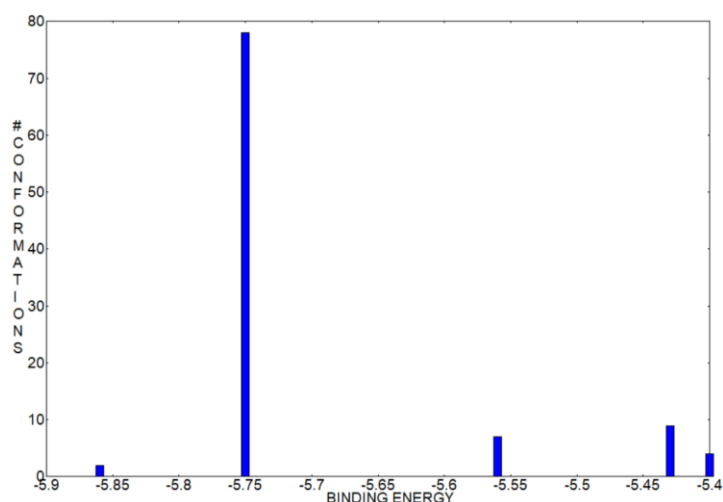
Fonte: Autoria própria.

4.4.2.2 Docking molecular

Para o *docking* rígido inicial, foi retornado o histograma da energia das posições (Figura 25), nas quais as posições de ligante com receptor de energia similares são agrupadas no mesmo cluster, indicando que a maioria das posições

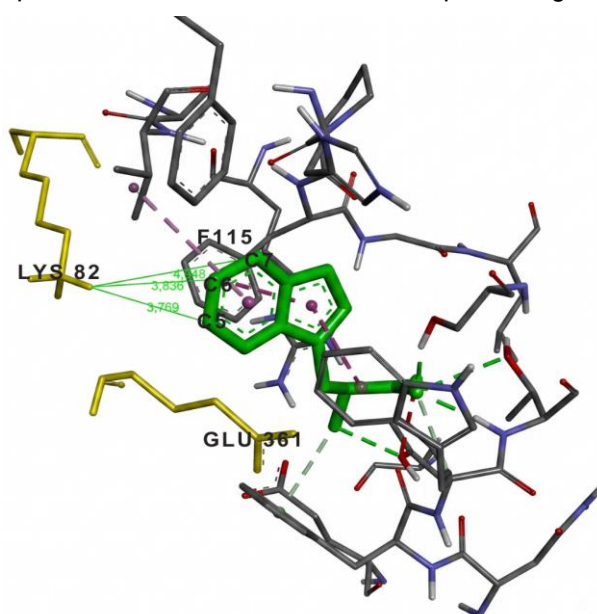
simuladas possuía energia livre em torno de $-5,75 \frac{kcal}{mol}$. Assim, deste cluster foi selecionada a posição de menor energia livre que localiza os possíveis carbonos alvos (C5, C6 e C7) do L-triptofano próximo aos resíduos catalíticos que, neste caso, são os resíduos da lisina K82, e do ácido glutâmico E361 (Figura 26).

Figura 25: Histograma de número de posições por cluster de energia.



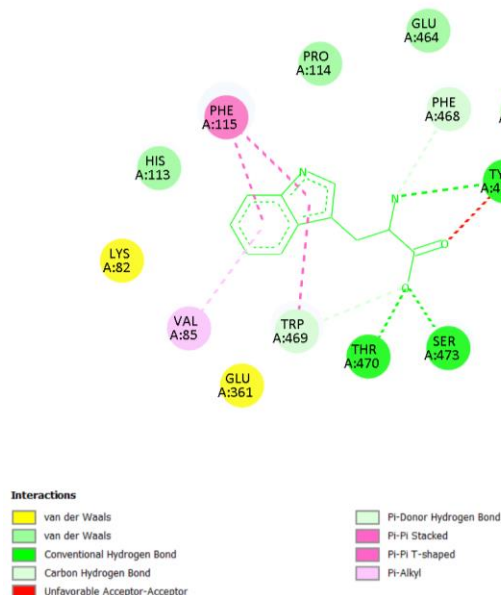
Fonte: Autoria própria.

FIGURA 26 - Complexo receptor ligante para o *docking* rígido. Em números verdes, distância entre os carbonos C5, C6 e C7 do resíduo K82 destacada (3,769; 3,836 e 4,948 angstroms, respectivamente). Os resíduos K82 e E361 são representados com cor amarela e o triptofano ligante com cor verde.



Fonte: Autoria própria.

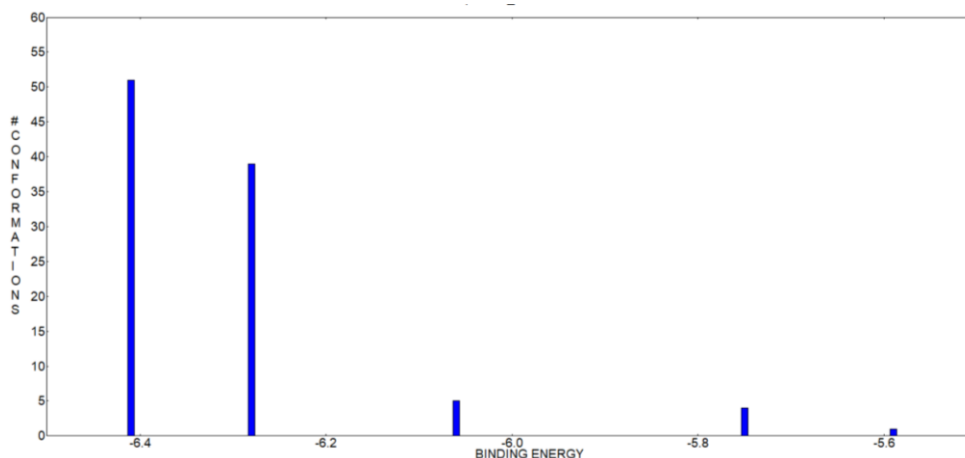
FIGURA 27 - Mapa das forças de interação intermoleculares para o *docking* rígido. Elaborado com Discovery Studio.



Fonte: Autoria própria.

No entanto, no mapa das forças de interação intermoleculares (Figura 27) é visível uma interação desfavorável, em vermelho, indicando que esta pode não ser a posição mais realista. Desta forma, após simulação flexível do resíduo de fenilalanina na posição 115, assim como realizado por Sher *et al.*, (2026), foram retornadas as posições com, desta vez, dois cluster abundantes com energias livres ainda menores do que o observado no *docking* anterior (Figura 28), indicando que as posições desta simulação são mais favorecidas energeticamente. Ou seja, a flexibilidade da cadeia lateral permitiu uma otimização das forças intermoleculares de modo que a simulação se tornou mais realista, minimizando a energia livre do sistema.

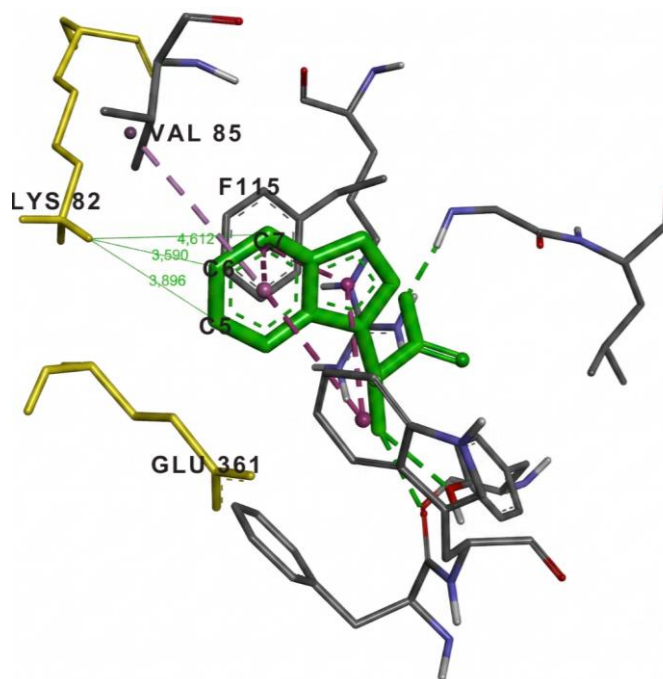
Figura 28 - Histograma de número de posições por cluster de energia.



Fonte: Autoria própria.

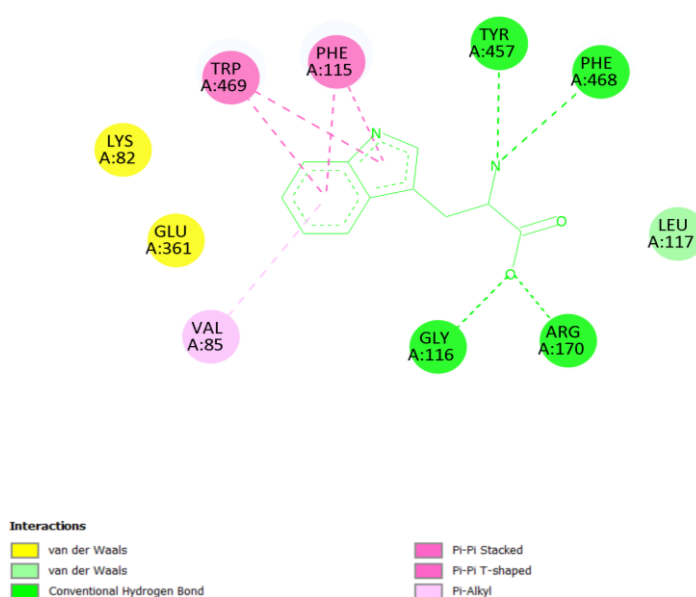
Então, a análise do melhor complexo (Figura 29), o qual possui energia livre de $-6,22 \frac{kcal}{mol}$, e do mapa de energia (Figura 30) revelou que a distância entre os resíduos catalíticos diminuiu, com exceção do C5 que aparentou estar mais distante e que, agora, não há interações intermoleculares desfavoráveis entre os resíduos. Estas distâncias reportadas para o C5 e C6 são compatíveis com a catálise das halogenases (Sher *et al.*, 2026) e sugerem que a LavH tem preferência por halogenar o carbono 6 do L-triptofano devido à menor distância observada ser entre o carbono 6 e o resíduo K82 o que indica, como observado na literatura (Lingkon; Bellizzi, 2020. Sher *et al.*, 2026) preferência por este carbono. Esta observação de preferência está alinhada com a análise filogenética. Esta hipótese poderá ser validada experimentalmente utilizando ressonância magnética nuclear para elucidar o produto formado pela enzima após, por exemplo, reação *in vitro*.

FIGURA 29 - Complexo receptor ligante para o *docking* com resíduo flexível. Em números verdes, distância dos carbonos C5, C6 e C7 do resíduo K82 destacado (3,896; 3,590 e 4,612 angstroms, respectivamente). Os resíduos K82 e E361 são representados com cor amarela e o triptofano ligante de cor verde.



Fonte: Autoria própria.

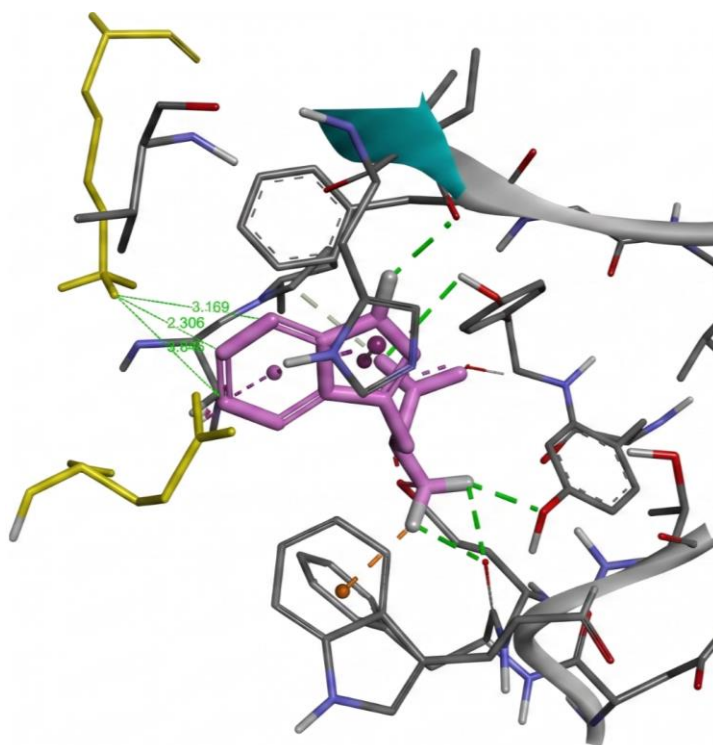
FIGURA 30 - Mapa das forças de interação intermoleculares para o *docking* com resíduo flexível. Elaborado no Discovery Studio.



Fonte: Autoria própria.

Ao comparar a posição do ligante com a posição do triptofano no modelo tridimensional cristalográfico da BorH (Figura 31), é possível observar que existem diferenças nas interações intermoleculares. Especificamente, enquanto o resíduo W469 (junto do F115 e do V85) aparenta direcionar e guiar o anel indólico do ligante na LavH para posicioná-lo em relação aos resíduos catalíticos, na BorH o resíduo de triptofano correspondente está localizado muito mais distante do ligante. É possível que isso ocorra por uma característica inerente do sítio catalítico da LavH, mas também é possível que seja devido à limitação da simulação de *docking* ocasionada pela maioria dos resíduos do sítio catalítico terem sido simulados como rígidos.

FIGURA 31 - Complexo entre ligante e receptor na estrutura cristalográfica da BorH.



Fonte: Autoria própria.

Além disso, este mapeamento do sítio catalítico contribui para futuros esforços de engenharia enzimática. O resíduo V85 da LavH, por exemplo, está na mesma posição do resíduo V82 da ThaL. No caso, este resíduo da ThaL foi substituído por Prakinee *et al.*, (2022) por uma isoleucina ocasionando um aumento da

termotolerância e do k_{cat} (de 2,7 a 25°C na selvagem para 7,6 a 45°C para a engenheirada). Assim, o conhecimento estrutural da enzima contribui para futuros esforços de engenharia da LavH ou outras halogenases similares.

5 CONCLUSÃO

A sequência codificante da enzima aqui denominada LavH foi clonada e expressa com êxito em *E. coli*. Foi demonstrada sua capacidade de halogenação de L-triptofano com cloro e bromo em uma biofábrica através de análise via UHPLC-QTOF-MS/MS. Além disso, a enzima demonstrou solubilidade notável não necessitando de chaperonas para ser expressa em altas quantidades de forma solúvel, algo incomum nas halogenases, as quais são, em sua maioria, pouco expressas e altamente insolúveis. Porém, sua solubilidade foi altamente prejudicada quando foi feita a fusão com a redutase de flavina Fre, algo destoante com a literatura, já que a Fre é uma enzima nativa de *E. coli* reconhecidamente benéfica para a atividade e solubilidade das halogenases. Este prejuízo dificulta a utilização desta fusão em biofábricas sendo necessário, para colher os benefícios desta técnica, a realização de mais testes com diferentes *linkers* entre as duas enzimas para, assim, encontrar o melhor *linker* possível que favoreça a atividade e solubilidade da enzima.

Ao ser purificada através de cromatografia de afinidade, a LavH apresentou alto rendimento e pureza. No entanto, o ensaio *in vitro* realizado falhou em demonstrar a capacidade de halogenação da enzima, provavelmente por conta do baixo tempo reacional. A ausência de um padrão do produto desta enzima exige que sejam feitos novos ensaios com mais tempo reacional para identificar a formação de um produto com confiança no HPLC. Além disso, novas condições de temperatura e pH podem ser testadas visando aumentar a atividade desta enzima nestes ensaios.

Sobre as análises *in silico* desta enzima, através de alinhamento e filogenia foi possível inferir parentesco evolutivo mais próximo com as enzimas BorH e ThaL, ambas com seletividade pelo carbono 6 do L-triptofano. Além disso, foi realizada modelagem através de AlphaFold, validação do modelo, localização do sítio catalítico e *docking* molecular da enzima com L-triptofano a fim de caracterizá-la estruturalmente. Assim, os achados reportados contribuem para um maior

entendimento desta enzima e expandem o número de halogenases estudadas na literatura.

Tanto os estudos estruturais quanto filogenéticos são indicativos de que a preferência da LavH é pelo carbono 6 do L-triptofano, porém são necessários estudos experimentais para comprovação. Neste sentido, perspectivas e próximos passos para o estudo desta enzima incluem: Ensaio de halogenação *in vitro* com maior tempo reacional; Caracterização das condições ótimas desta halogenase; Ensaio de halogenação para produção suficiente do produto halogenado para a análise em RMN; Testes *in vitro* em diferentes substratos; Utilização de diferentes *linkers* para viabilizar sua aplicação em biofábricas de *E. coli*; e aprimoramento da catálise da enzima através de engenharia racional.

6 REFERÊNCIAS

ABRAMSON, Josh et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature**, v. 630, n. 8016, p. 493–500, 2024.

AGARWAL, Vinayak et al. Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 8, p. 640–647, 2014.

ALI, Saghir et al. Highlights on U.S. FDA-approved halogen-containing drugs in 2024. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 287, n. 117380, p. 117380, 2025.

ANDORFER, Mary C. et al. Aromatic halogenation by using bifunctional flavin reductase-halogenase fusion enzymes. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 18, n. 21, p. 2099–2103, 2017.

ANDORFER, Mary C.; LEWIS, Jared C. Understanding and improving the activity of flavin-dependent halogenases via random and targeted Mutagenesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 159–185, 2018.

ASHADUZZAMAN, Md et al. Crystallographic and thermodynamic evidence of negative coupling in the flavin-dependent tryptophan halogenases AbeH and BorH. **ACS Omega**, v. 10, n. 6, p. 5849–5865, 2025.

BERGER, Gilles; SOUBHYE, Jalal; MEYER, Franck. Halogen bonding in polymer science: from crystal engineering to functional supramolecular polymers and materials. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 19, p. 3559–3580, 2015.

BHATWA, Arshpreet et al. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 630551, 2021.

BIOVIA; DASSAULT SYSTÈMES. Discovery Studio Visualizer. Versão 20.1.0.19295. San Diego: Dassault Systèmes, 2025. Disponível em: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>. Acesso em: 21 jun. 2026.

BLUM, Matthias et al. InterPro: the protein sequence classification resource in 2025. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D444–D456, 2025.

BÖHRINGER, Nils et al. Genome- and metabolome-guided discovery of marine BamA inhibitors revealed a dedicated darobactin halogenase. **Cell Chemical Biology**, v. 30, n. 8, p. 943–952.e7, 2023.

BORRERO, Nicholas V. et al. Phenazine antibiotic inspired discovery of potent bromophenazine antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 881–886, 2014.

CANTILLO, David; KAPPE, C. Oliver. Halogenation of organic compounds using continuous flow and microreactor technology. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 1, p. 7–19, 2017.

CHEN, Zhenshan et al. Discovery and characterization of a single-component halogenase for phenazine halogenation. **Organic Letters**, v. 27, n. 37, p. 10553–10558, 2025.

CROWE, Charlotte et al. Halogenases: a palette of emerging opportunities for synthetic biology-synthetic chemistry and C-H functionalisation. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 17, p. 9443–9481, 2021.

DA SILVA, Adilson José et al. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production. **Metabolic Engineering**, v. 64, p. 15–25, 2021.

DENG, Junpeng *et al.* An improved protocol for rapid freezing of protein samples for long-term storage. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. 1, p. 203–204, 1 jan. 2004.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–376, 1981.

FELSENSTEIN, Joseph. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*; **International Journal of Organic Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

FLECKS, Silvana et al. New insights into the mechanism of enzymatic chlorination of tryptophan. **Angewandte Chemie**, v. 47, n. 49, p. 9533–9536, 2008.

FLOOR, Stephen. Around-the-horn PCR and cloning v1. protocols.io ZappyLab, Inc. 3 Julho, 2018.

FONTECAVE, M.; ELIASSON, R.; REICHARD, P. NAD(P)H:flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 25, p. 12325–12331, 1987.

FUJIMORI, Danica Galonic et al. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 42, p. 16498–16503, 2007.

GKOTSI, Danai S. et al. A marine viral halogenase that iodinates diverse substrates. **Nature Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 1091–1097, 2019.

GRIBBLE, Gordon W. A survey of recently discovered naturally occurring organohalogen compounds. **Journal of Natural Products**, v. 87, n. 4, p. 1285–1305, 2024.

HAMMER, P. E. et al. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2147–2154, 1997.

HEEMSTRA, John R. Jr.; WALSH, Christopher T. Tandem Action of the O₂- and FADH₂-Dependent Halogenases KtzQ and KtzR Produce 6,7-Dichlorotryptophan for Kutzneride Assembly. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 43, p. 14024–14025, 29 out. 2008.

HEGARTY, Eimear; BÜCHLER, Johannes; BULLER, Rebecca M. Halogenases for the synthesis of small molecules. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 41, n. 100784, p. 100784, 2023.

HEO, Lim; PARK, Hahnbeom; SEOK, Chaok. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W384-8, 2013.

ISMAIL, Mohamed *et al.* Flavin-Dependent Halogenases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 Prefer Bromination over Chlorination. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 361, n. 11, p. 2475–2486, 2019.

JESCHKE, Peter. Latest generation of halogen-containing pesticides: Latest halogen-containing pesticides. **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1053–1066, 2017.

JESCHKE, Peter. New active ingredients for sustainable modern chemical crop protection in agriculture. **ChemSusChem**, v. 18, n. 2, p. e202401042, 2025.

JESCHKE, Peter. Recent developments in fluorine-containing pesticides. **Pest Management Science**, v. 80, n. 7, p. 3065–3087, 2024.

JOHANNES, Tyler W.; ZHAO, Huimin. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 261–267, 2006.

KONG, Lingxin et al. Flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase XanH and engineering of multifunctional fusion halogenases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 18, p. e01225-20, 2020.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA12: Molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. **Molecular Biology and Evolution**, v. 41, n. 12, p. msae263, 2024.

LAI, Hung-En et al. GenoChemetic strategy for derivatization of the violacein natural product scaffold. **ACS Chemical Biology**, v. 16, n. 11, p. 2116–2123, 2021.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LE, Si Quang; GASCUEL, Olivier. An improved general amino acid replacement matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 2008.

LEATHERWOOD, M. H. Njardarson Laboratory: Top 200 Posters. [S. l.], 2025. Disponível em: <https://sites.arizona.edu/njardarson-lab/top200-posters/>. Acesso em: 7 jun. 2026.

LEE, Jeongchan et al. Production of Tyrian purple indigoid dye from tryptophan in *Escherichia coli*. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 1, p. 104–112, 2021.

LINGKON, Kazi; BELLIZZI, John J., 3rd. Structure and activity of the thermophilic tryptophan-6 halogenase BorH. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 21, n. 8, p. 1121–1128, 2020.

LIU, Hanyu et al. Research progress on the regeneration of the coenzyme of flavin-dependent halogenases. **ACS Synthetic Biology**, v. 15, n. 3, p. 971–984, 2026.

LUO, Jing et al. Halogenases and dehalogenases: mechanisms, engineering, and applications. **Natural Product Reports**, v. 43, n. 3, p. 427–461, 2026.

MAHASETH, Tulip; KUZMINOV, Andrei. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. Mutation Research. **Reviews in Mutation Research**, v. 773, p. 274–281, 2017.

MENON, Binuraj R. K. et al. Structure and biocatalytic scope of thermophilic flavin-dependent halogenase and flavin reductase enzymes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 39, p. 9354–9361, 2016.

MINGES, Hannah et al. Targeted enzyme engineering unveiled unexpected patterns of halogenase stabilization. **ChemCatChem**, v. 12, n. 3, p. 818–831, 2020.

MORRIS, Garrett M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

NEUBAUER, Pia R. et al. A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. **PloS One**, v. 13, n. 5, p. e0196797, 2018.

NEUMANN, Christopher S.; FUJIMORI, Danica Galonić; WALSH, Christopher T. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2008.

NOWAK-THOMPSON, B. et al. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 7, p. 2166–2174, 1999.

PAWAR, Shraddha et al. Microbial pyrrolnitrin: Natural metabolite with immense practical utility. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. E443, 2019.

PAYNE, James T.; ANDORFER, Mary C.; LEWIS, Jared C. Regioselective arene halogenation using the FAD-dependent halogenase RebH. **Angewandte Chemie**, v. 52, n. 20, p. 5271–5274, 2013.

PAYSAN-LAFOSSE, Typhaine et al. The Pfam protein families database: embracing AI/ML. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D523–D534, 2025.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PHINTHA, Aisaraphon et al. Dissecting the low catalytic capability of flavin-dependent halogenases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 296, n. 100068, p. 100068, 2020.

POOR, Catherine B.; ANDORFER, Mary C.; LEWIS, Jared C. Improving the stability and catalyst lifetime of the halogenase RebH by directed evolution. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 15, n. 9, p. 1286–1289, 2014.

PRAKINEE, Kridsakorn et al. Mechanism-guided tunnel engineering to increase the efficiency of a flavin-dependent halogenase. **Nature Catalysis**, v. 5, n. 6, p. 534–544, 2022.

PRAKINEE, Kridsakorn et al. On the mechanisms of hypohalous acid formation and electrophilic halogenation by non-native halogenases. **Angewandte Chemie**, v. 63, n. 24, p. e202403858, 2024.

PULSCHEN, Andre Arashiro et al. Continuous evolution of a halogenase enzyme with improved solubility and activity for sustainable bioproduction. **Nature Communications**, v. 17, n. 1, 2026.

QUAN, Jiayuan; TIAN, Jingdong. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, v. 6, n. 2, p. 242–251, 2011.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283–438, 1968.

ROSENBERG, A. H. et al. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. **Gene**, v. 56, n. 1, p. 125–135, 1987.

SÁNCHEZ, César et al. The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. **Chemistry & Biology**, v. 9, n. 4, p. 519–531, 2002.

SCHNEPEL, Christian; SEWALD, Norbert. Enzymatic halogenation: A timely strategy for regioselective C-H activation. **Chemistry—A European Journal**, v. 23, n. 50, p. 12064–12086, 2017.

SEIBOLD, Corina et al. A flavin-dependent tryptophan 6-halogenase and its use in modification of pyrrolnitrin biosynthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 6, p. 401–408, 2006.

SHER, Hassan et al. Discovery and functional characterization of SnFDHal, an efficient tryptophan 5-halogenase from *Streptomyces noursei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 198, n. 1, p. 400–414, 2026.

WANG, Huibin; ABE, Ikuro. Recent trends in the identification and engineering of halogenases. **Tetrahedron Chem**, v. 12, n. 100112, p. 100112, 2024.

WANG, Jiawei et al. Rational multienzyme architecture design with iMARS. **Cell**, v. 188, n. 5, p. 1349–1362.e17, 2025.

WANG, Siyuan et al. Metabolic engineering of Escherichia coli for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives. **Metabolic Engineering**, v. 29, p. 153–159, 2015.

WANG, Weijin; SONG, Song; JIAO, Ning. Late-stage halogenation of complex substrates with readily available halogenating reagents. **Accounts of Chemical Research**, v. 57, n. 21, p. 3161–3181, 2024.

XU, Peng et al. ePathBrick: a synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in E. coli. **ACS synthetic biology**, v. 1, n. 7, p. 256–266, 2012.

YEH, Ellen et al. Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. **Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1284–1292, 2007.

YUAN, Bo et al. Water-soluble anthraquinone photocatalysts enable methanol-driven enzymatic halogenation and hydroxylation reactions. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 15, p. 8277–8284, 2020.

ZEHNER, Susanne et al. A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in Streptomyces rugosporus LL-42D005. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 4, p. 445–452, 2005.

ZENG, Jia; ZHAN, Jixun. A novel fungal flavin-dependent halogenase for natural product biosynthesis. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 11, n. 15, p. 2119–2123, 2010.

ZENG, Jia; ZHAN, Jixun. Characterization of a tryptophan 6-halogenase from Streptomyces toxytricini. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1607–1613, 2011.

ZHANG, F. et al. Crystal structure of LooH: 9Lmg. Worldwide Protein Data BankWorldwide **Protein Data Bank**, , 21 Jan. 2026.

ZHANG, Yuyang et al. Aryl C-H iodination: are there actual flavin-dependent iodinases in nature? **Science China. Chemistry**, v. 64, n. 10, p. 1730–1735, 2021.

APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS GÊNICAS E PLASMÍDEOS ENVOLVIDOS NAS CLONAGENS

>WP_030235131.1(LavH) tryptophan halogenase family protein [Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae]

ATGACCGGCACCGACAACCGCATCCAGAAAGTCGTCATCCTCGGTGGAGGCAC
GGCAGGCTGGATGACGGCCGCTACCTCGGCAAGGCACTGCAGAACACCGTG
GAGATCACGGTTCTGGAGGCGCCGACCATCCCCGCATCGGCGTGGGCGAGG
CAACCGTACCCAATCTCCAGCGCGTGCTTTTCGACTACCTCGGGATCAACGAGG
ACGAGTGGATGCGCGAATGCAACGCCAGCTTCAAGATGGCGGTCCGCTTCGTC
AACTGGCGCACCGGGCGGCCAGGGCGAGGCCGAGGCCCGTGAGCTGGAGGAG
GGCGGCCCCGGACCACTTCTACCACCCGTTCCGGCCTGCTCCCCGACTACGACCA
GACGCCGCTCTCCCACTACTGGTACAAGCGCAAGTTCGAGGGGCGAGACGAACG
AGCCGTTGCACTACGCCTGCTTCCGCGAACCCCCGGTCATGGACGCCAAGCTG
GCCCCGCGCTGGATGGACGGCCGCCCGCCACCCGCTACGCCTGGCACTTCG
ACGCCGCGCTCGTCGCCAAGTTCCTGCGCAGATTGCCACCGAGAAGCAGGG
CGTCCTGCACGTCGAGGACGAGATGACGCGCGTGAGAGCAGGACGAGCGCGGC
TTCGTCACCGCCCTGCACACCAAGTCCGGCCGGGTCTCGACGCCGACCTGTT
CATCGACTGCTCCGGTTTCCGCGGCCTGCTGATCAACGAGGCCATGGCGGAGC
CCTTCATCGACATGAGCGACCACCTGCTGTGCGACTCGGCCGTCGCCACGGCG
GTGCCGCACGACGACGAGGCCAACGGCGTCGAGCCGTACACCTCCGCCATCG
CGATGTCTCTCCGGCTGGGCCTGGAAGATCCCCATGCTGGGCCGCTTCGGCAG
CGGTTACGTGTACTCCAGCAAGTTCGCCTCCCAGGACGAGGCCACCAAGGAGT
TCAGCGAGCTCTGGGGCCTGGACCAGGAGAACACGAAGTTCAACCACATCCGC
TTCCGGGTCGGCCGCAACCGCCGCGCCTGGGTCAAGAACGTGGTCAGCATCG
GCCTGTCTCTCTGCTTCCTGGAGCCGCTGGAGTCGACCGGCATCTACTTCATCA
CCGCGGCCATCTACCAGCTCGCGAAGCACTTCCCGAACAAAGGACTTCAACGAG
TCGCTCATCGGCGCGTTCAACAACGAGATCGAGCTGATGTTTCGATGACACGCG
CGACTTCATCCAGGCACACTTCTACTACGCGCCGCGCAACGACACGCCGTTCT
GGCGCGCCAACAAGGAGCTGACGCTCCCCGACAACATCCAGAAGAAGATCGCC
GCCTACCGCGCCGGTCTGCCGATCAACTCGCCGGTGACCGACGAGTCCACGTA
CTACGGCAACTTCGAGGCCGAGTTCCGCAACTTCTGGACCAACGGCAGCTACT
ACTGCATCTTCGCCGGCCTCGGCCTGGTCCCGGACGAGCCGCTGCCCGCGCT
CGCCTACAAGCCGGAGTCCGTCGCCGGGGGCCAGCCGCTCTTCCAGACGGTC
AAGCGCCAGCAGCAGGACCTGCTCGACACCCTGCCAGCACCTACGACTACCT
GCGCCAGCTGCACGGCGCCTCCTGA

>Fre [Escherichia coli K-12 MG1655]

ATGACAACCTTAAGCTGTAAAGTGACCTCGGTAGAAGCTATCACGGATACCGTA
TATCGTGTCCGCATCGTGCCAGACGCGGCCTTTTCTTTTCGTGCTGGTCAGTAT
TTGATGGTAGTGATGGATGAGCGCGACAAACGTCCGTTCTCAATGGCTTCGACG

CCGGATGAAAAAGGGTTTATCGAGCTGCATATTGGCGCTTCTGAAATCAACCTT
TACGCGAAAGCAGTCATGGACCGCATCCTCAAAGATCATCAAATCGTGGTCGAC
ATTCCCACGGAGAAGCGTGGCTGCGCGATGATGAAGAGCGTCCGATGATTTT
GATTGCGGGCGGCACCGGGTTCTCTTATGCCCGCTCGATTTTGTCTGACAGCGT
TGGCGCGTAACCCAAACCGTGATATCACCATTTACTGGGGCGGGCGTGAAGAG
CAGCATCTGTATGATCTCTGCGAGCTTGAGGCGCTTTCGTTGAAGCATCCTGGT
CTGCAAGTGGTGCCGGTGGTTGAACAACCGGAAGCGGGCTGGCGTGGGCGTA
CTGGCACCGTGTTAACGGCGGTATTGCAGGATCACGGTACGCTGGCAGAGCAT
GATATCTATATTGCCGGACGTTTTGAGATGGCGAAAATTGCCCGCGATCTGTTTT
GCAGTGAGCGTAATGCGCGGGAAGATCGCCTGTTTGGCGATGCGTTTGCATTT
ATCTGA

>Fre_LavH

ATGACAACCTTAAGCTGTAAAGTGACCTCGGTAGAAGCTATCACGGATACCGTA
TATCGTGTCCGCATCGTGCCAGACGCGGCCTTTTCTTTTCGTGCTGGTCAGTAT
TTGATGGTAGTGATGGATGAGCGCGACAAACGTCCGTTCTCAATGGCTTCGACG
CCGGATGAAAAAGGGTTTATCGAGCTGCATATTGGCGCTTCTGAAATCAACCTT
TACGCGAAAGCAGTCATGGACCGCATCCTCAAAGATCATCAAATCGTGGTCGAC
ATTCCCACGGAGAAGCGTGGCTGCGCGATGATGAAGAGCGTCCGATGATTTT
GATTGCGGGCGGCACCGGGTTCTCTTATGCCCGCTCGATTTTGTCTGACAGCGT
TGGCGCGTAACCCAAACCGTGATATCACCATTTACTGGGGCGGGCGTGAAGAG
CAGCATCTGTATGATCTCTGCGAGCTTGAGGCGCTTTCGTTGAAGCATCCTGGT
CTGCAAGTGGTGCCGGTGGTTGAACAACCGGAAGCGGGCTGGCGTGGGCGTA
CTGGCACCGTGTTAACGGCGGTATTGCAGGATCACGGTACGCTGGCAGAGCAT
GATATCTATATTGCCGGACGTTTTGAGATGGCGAAAATTGCCCGCGATCTGTTTT
GCAGTGAGCGTAATGCGCGGGAAGATCGCCTGTTTGGCGATGCGTTTGCATTT
ATCgcccgaagcagcgggccaaagaagcagcgggccaaagcgATGACCGGCACCGACAACCGCAT
CCAGAAAGTCGTCATCCTCGGTGGAGGCACGGCAGGCTGGATGACGGCCGCC
TACCTCGGCAAGGCACTGCAGAACACCGTGGAGATCACGGTTCTGGAGGCGCC
GACCATCCCCCGCATCGGCGTGGGCGAGGCAACCGTACCCAATCTCCAGCGC
GTGCTTTTCTGACTACCTCGGGATCAACGAGGACGAGTGGATGCGCGAATGCAA
CGCCAGCTTCAAGATGGCGGTCCGCTTCGTCAACTGGCGCACCGGCGGGCCAG
GGCGAGGCCGAGGCCCGTGAGCTGGAGGAGGGCGGGCCCGGACCACTTCTACC
ACCCGTTTCGGCCTGCTCCCCGACTACGACCAGACGCCGCTCTCCCACTACTGG
TACAAGCGCAAGTTCGAGGGCGAGACGAACGAGCCGTTCTGACTACGCCTGCTT
CCGCGAACCCCCGGTCATGGACGCCAAGCTGGCCCCGCGCTGGATGGACGGC
CGCCCCGCCACCCGCTACGCCTGGCACTTCGACGCCGCGCTCGTCGCCAAGTT
CCTGCGCAGATTGCCACCGAGAAGCAGGGCGTCTGCACGTGAGGACGAG
ATGACGCGCGTGAGCAGGACGAGCGCGGCTTCGTCACCGCCCTGCACACCA
AGTCCGGCCGGGTCTCTGACGCCGACCTGTTTCATCGACTGCTCCGGTTTCCGC
GGCCTGCTGATCAACGAGGCCATGGCGGAGCCCTTCATCGACATGAGCGACCA

CCTGCTGTGCGACTCGGCCGTCGCCACGGCGGTGCCGCACGACGACGAGGCC
 AACGGCGTCGAGCCGTACACCTCCGCCATCGCGATGTCCTCCGGCTGGGCCTG
 GAAGATCCCCATGCTGGGCCGCTTCGGCAGCGGTTACGTGTACTCCAGCAAGT
 TCGCCTCCCAGGACGAGGCCACCAAGGAGTTCAGCGAGCTCTGGGGCCTGGA
 CCAGGAGAACACGAAGTTCAACCACATCCGCTTCCGGGTCCGGCCGCAACCGCC
 GCGCCTGGGTCAAGAACGTGGTCAGCATCGGCCTGTCCTCCTGCTTCCTGGAG
 CCGCTGGAGTCGACCGGCATCTACTTCATCACCGCGGCCATCTACCAGCTCGC
 GAAGCACTTCCCGAACAAGGACTTCAACGAGTCGCTCATCGGCGCGTTCAACAA
 CGAGATCGAGCTGATGTTTCGATGACACGCGCGACTTCATCCAGGCACACTTCTA
 CTACGCGCCGCGCAACGACACGCCGTTCTGGCGCGCCAACAAGGAGCTGACG
 CTCCCCGACAACATCCAGAAGAAGATCGCCGCCTACCGCGCCGGTCTGCCGAT
 CAACTCGCCGGTGACCGACGAGTCCACGTACTACGGCAACTTCGAGGCCGAGT
 TCCGCAACTTCTGGACCAACGGCAGCTACTACTGCATCTTCGCCGGCCTCGGC
 CTGGTCCCGGACGAGCCGCTGCCCGCGCTCGCCTACAAGCCGGAGTCCGTGCG
 CCGGGGCCCAGCCGCTCTTCCAGACGGTCAAGCGCCAGCAGCAGGACCTGCT
 CGACACCCTGCCCAGCACCTACGACTACCTGCGCCAGCTGCACGGCGCCTCCT
 GA

>pRSM4

CGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCCA
 GTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAG
 AGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGG
 CATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGA
 GAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCG
 ACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACA
 ATTTGCGACGGCGCGTGTCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCA
 ACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCT
 CCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCT
 GGTTCAACACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACA
 TCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGC
 GCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTGTCCGGGATCT
 CGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTG
 AGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGC
 CCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCACGCCGAAACAAGC
 GTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGA
 TATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCG
 TCCGGCGTAGCCTAGGATCAAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTTTACACTTT
 ATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCT
 AGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAGATCTCAATTG
 GATATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCCTCGAGTCTGGTAAAG
 AAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGTCGCA

GCTTAATTAACCTAAACTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACCAGGCATCAAATAAA
ACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGT
GAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGT
TTATAGCTAGCGAAAGGAGGAGTCGACAAGCTGACGACCGGGTCTCCGCAAGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATAC
ATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAA
ATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCC
GTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGAT
CCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTT
CCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGA
ATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGC
CAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTC
GTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGGTGCGCTGTTAAAAGGACAATTAC
AAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATA
TTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGA
TCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGG
TCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAA
CATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGG
GCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCAGACATTATCGCGAG
CCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGA
GCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAA
GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
AAATAAACAAATAGGCATGCAGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCT
ACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGTGTCAGCTCACTCAAAGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAAGCCGGAAAGAACATGTGAGCAAAAA
GCAAAGCACCGGAAGAAGCCAACGCCGCAGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC
CCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGCCAGAGGTGGCGAAACCCGA
CAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTC
CTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAA
GCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTTGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCG
TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGC
GCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG
CCACTGGCAGCAGCCATTGGTAACCTGATTTAGAGGACTTTGTCTTGAAGTTATG
CACCTGTTAAGGCTAAACTGAAAGAACAGATTTTGGTGAGTGCGGTCTCTCAAC
CCACTTACCTTGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGCGAACCTTGAGAAAACCAAC
GTTGGTAGCGGTGGTTTTTTCTTTATTTATGAGATGATGAATCAATCGGTCTATCA
AGTCAACGAACAGCTATTCCGTTACTCTAGATTTAGTGCAATTTATCTCTTCAA
TGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTCATGTTAGTCA
TGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCAT
CGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCG
CTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT

CGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC GTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTT
TCTTTTCACCA GTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTG
AGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCAGCAGGCGAAAATCCT
GTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGT
ATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAAATGGCG
CGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAAC
GATGCCCTCATT CAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCA
GTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATG
CCAGCCAGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCC

>pET28a(+)

ATCCGGATATAGTTCCTCCTTT CAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGG
CCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGCTT
CCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCG
AGTGCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGAATTCGGATCCGCGACCCATTT
GCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCCGCTG
CTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTA
AACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGA
GTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCATCGT
GGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGAC
ATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTT
CGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATC
TCCTTG CATGCACCATTCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTA
CTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCCGG
ACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAA
GAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCA
GAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAG
CCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGA
ATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACA ACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGA
TTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCG
GCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGT
AGAACGAAGCGGCGTCAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGC
AACGCGTCAGTGGGCTGATCATTA ACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTG
CTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACC
AGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCG
TGGAGCATCTGGTTCGCAATTGGGT CACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCA
TTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACT
CGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTC
CGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGAT
GCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGT
CCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAA

GACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTG
CTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGT
GAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACTG
CGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAG
CTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA
ATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGAG
CCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGGCATGACTATCGTCGCC
GCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCG
CTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGG
CCTGTGCTTGCGGTATTCGGAATCTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCAC
TGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGG
CGGCCCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTGCTTGAGGACCCGGCTAGG
CTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAA
CGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATG
GTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGC
ACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACA
CCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGT
CCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGG
CATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTAT
CATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAAACA
GGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCT
TCTGGAGAAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAAT
CGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGT
GATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTG
TCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGT
GTTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAG
TGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCA
TATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGG
CGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTTCGGCTGCG
GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG
GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC
CGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA
GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT
AAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA
CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG
CTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCC
AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATC
CGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGC
AGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTA
TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT

CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGA
 TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC
 TGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAA
 AACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACG
 GGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATAT
 GGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGA
 TTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGC
 GTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTT
 ATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTAC
 TCACCACTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTG
 ATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCCTGCGCCGGTTGCATT
 CGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGTCTCGCTCA
 GCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGA
 GCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCC
 ATTCTCACCGGATTTCAGTCGTCCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTT
 TTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAG
 ACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTT
 CATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAA
 TTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGAATTAATTCATGAGCGGAT
 ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
 CCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAATTCGCGTTA
 AATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCC
 TTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAC
 AAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTC
 TATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGG
 TCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAG
 AGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCG
 AAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAA
 CCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCA

>Resultado_MinION_pRSM4_Fre:

CCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCC
 AGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCA
 GAGACATCAAGAAATAACGCCGAACATTAGTGACGGCAGCTTCCACAGCAATG
 GCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGC
 GAGAAGATTGTGACCCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCAT
 CGACACCACACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGA
 CAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAG
 CAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAG
 CTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGC
 CTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGA

CATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTACACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGAT
CTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGT
TGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGC
GCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAA
GCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCCGGC
GATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATG
CGTCCGGCGTAGCCTAGGATCAAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTTTACACT
TTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTC
TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACAACCTTAAGCT
GTAAAGTGACCTCGGTAGAAGCTATCACGGATACCGTATATCGTGTCCGCATCG
TGCCAGACGCGGCCTTTTCTTTTCGTGCTGGTCAGTATTTGATGGTAGTGATGG
ATGAGCGCGACAAACGTCCGTTCTCAATGGCTTCGACGCCGGATGAAAAAGGG
TTTATCGAGCTGCATATTGGCGCTTCTGAAATCAACCTTTACGCGAAAGCAGTCA
TGGACCGCATCCTCAAAGATCATCAAATCGTGGTCGACATTCCCCACGGAGAAG
CGTGGCTGCGCGATGATGAAGAGCGTCCGATGATTTTGATTGCGGGCGGCACC
GGGTTCTCTTATGCCCCGCTCGATTTTGCTGACAGCGTTGGCGCGTAACCCAAAC
CGTGATATCACCATTACTGGGGCGGGCGTGAAGAGCAGCATCTGTATGATCTC
TGCGAGCTTGAGGCGCTTTCGTTGAAGCATCCTGGTCTGCAAGTGGTGCCGGT
GGTTGAACAACCGGAAGCGGGCTGGCGTGGGCGTACTGGCACCGTGTTAACG
GCGGTATTGCAGGATCACGGTACGCTGGCAGAGCATGATATCTATATTGCCGGA
CGTTTTGAGATGGCGAAAATTGCCCGCGATCTGTTTTGCAGTGAGCGTAATGCG
CGGGAAGATCGCCTGTTTGGCGATGCGTTTGCATTTATCTGACTCGAGTCTGGT
AAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGT
CGCAGCTTAATTAACCTAACTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACCAGGCATCAA
ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGT
CGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCT
GCGTTTATAGCTAGCGAAAGGAGGAGTCGACAAGCTGACGACCGGGTCTCCGC
AAGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAA
ATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCA
TCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTTGA
AGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCA
AGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTA
ATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGAC
TGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACA
GGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTC
ATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGGTGCTGTAAAAGGACAA
TTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAAC
AATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCG
GGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTG
ATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCT

GTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCAT
 CGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGC
 GAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCT
 AGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATT
 GAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA
 GAAAAATAAACAAATAGGCATGCAGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTC
 GCTACGCTCGGTCTGTTGACTGCGGCGAGCGGTGTCAGCTCACTCAAAAGCGG
 TAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAAGCCGGAAAGAACATGTGAGCAA
 AAAGCAAAGCACCGGAAGAAGCCAACGCCGAGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
 CCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGCCAGAGGTGGCGAAACC
 CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
 TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCG
 GGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTTGGTATCTCAGTTCGGTGTAG
 GTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTGAGCCCGACCG
 CTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT
 ATCGCCACTGGCAGCAGCCATTGGTAACCTGATTTAGAGGACTTTGTCTTGAAGT
 TATGCACCTGTAAAGGCTAAACTGAAAGAACAGATTTTGGTGAGTGCGGTCTC
 CAACCCACTTACCTTGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGCGAACCTTGAGAAAAC
 CACCGTTGGTAGCGGTGGTTTTCTTTATTTATGAGATGATGAATCAATCGGTCT
 ATCAAGTCAACGAACAGCTATTCCGTTACTCTAGATTTGAGTGCAATTTATCTCTT
 CAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTTCTCATGTTA
 GTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGG
 GCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGT
 TGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAAT
 GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGG
 TTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCGCCTGGC
 CCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAA
 TCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCG
 TCGTATCCCCTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAAAT
 GGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGG
 GAACGATGCCCTCATTGAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCAC
 TCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATT
 TATGCCAGCCAGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGC

>Resultado_MinION_pRSM4_Fre_LavH:

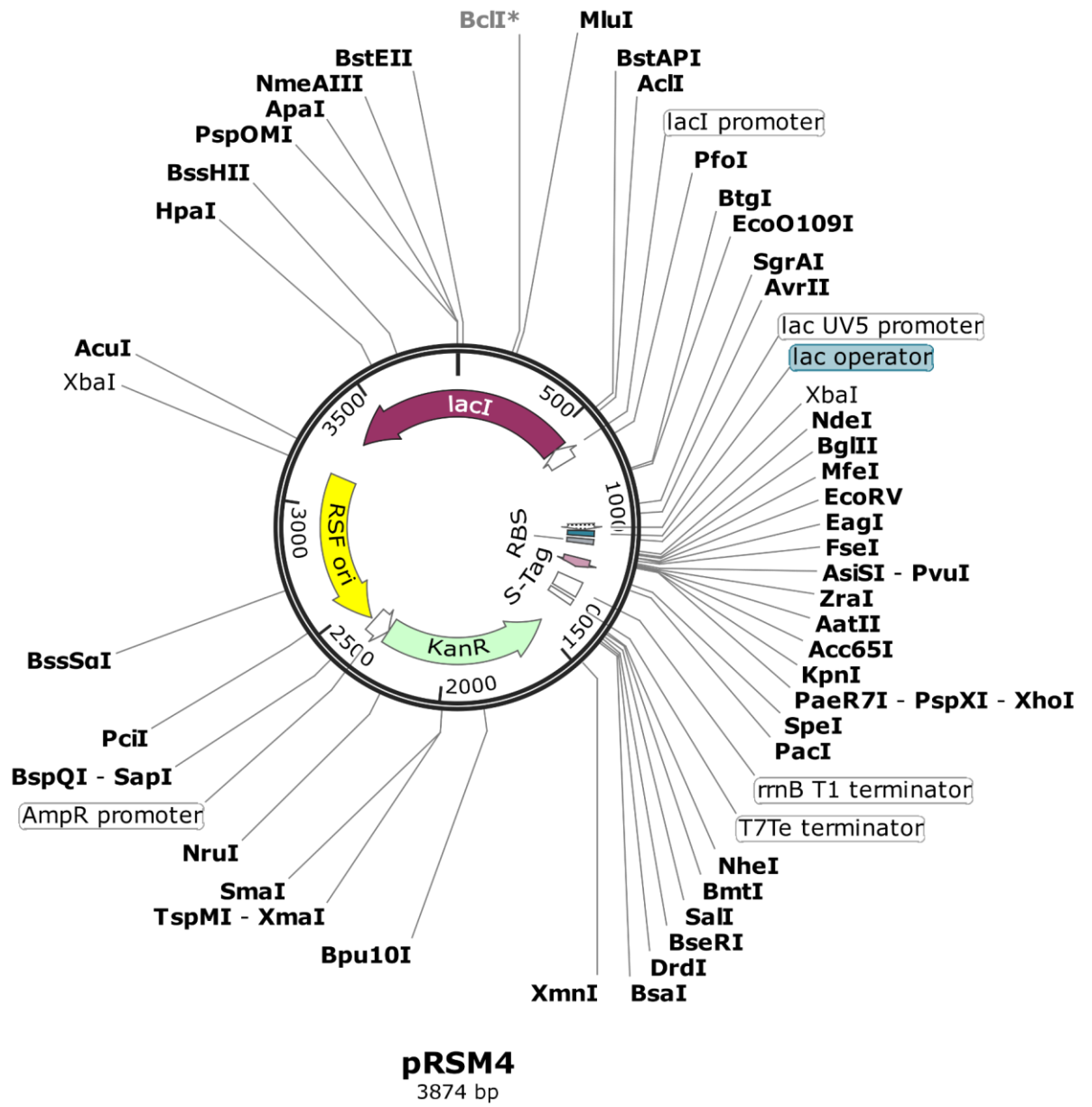
CCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCC
 AGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCA
 GAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGACAGGCAGCTTCCACAGCAATG
 GCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGC
 GAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCAT
 CGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGA

CAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAG
CAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAG
CTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGC
CTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGA
CATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGAT
CTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGT
TGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGC
GCCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCACGCCGAAACAA
GCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCCGGC
GATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCTGTGATGCCGGCCACGATGC
GTCCGGCGTAGCCTAGGATCAAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTTTACACTT
TATGCTTCCGGCTCGTATGATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAACCTCCCCTC
TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACAACCTTAAGCT
GTAAAGTGACCTCGGTAGAAGCTATCACGGATACCGTATATCGTGTCCGCATCG
TACCAGACGCGGCCTTTTCTTTTCGTGCTGGTCAGTATTTGATGGTAGTGATGG
ATGAGCGCGACAAACGTCCGTTCTCAATGGCTTCGACGCCGGATGAAAAAGGG
TTTATCGAGCTGCATATTGGCGCTTCTGAAATCAACCTTTACGCGAAAGCAGTCA
TGGACCGCATCCTCAAAGATCATCAAATCGTGGTCGACATTCCCCACGGAGAAG
CGTGGCTGCGCGATGATGAAGAGCGTCCGATGATTTTGATTGCGGGCGGCACC
GGGTTCTCTTATGCCCGCTCGATTTTGCTGACAGCGTTGGCGCGTAACCCAAAC
CGTGATATCACCATTTACTGGGGCGGGCGTGAAGAGCAGCATCTGTATGATCTC
TGCGAGCTTGAGGCGCTTTCGTTGAAGCATCCTGGTCTGCAAGTGGTGCCGGT
GGTTGAACAACCGGAAGCGGGCTGGCGTGGGCGTACTGGCACCGTGTTAACG
GCGGTATTGCAGGATCACGGTACGCTGGCAGAGCATGATATCTATATTGCCGGA
CGTTTTGAGATGGCGAAAATTGCCCGCGATCTGTTTTGCAGTGAGCGTAATGCG
CGGGAAGATCGCCTGTTTGGCGATGCGTTTGCATTTATCGCTGAAGCAGCGGC
CAAAGAAGCAGCGGCCAAAGCGATGACCGGTACCGACAACCGCATCCAGAAAG
TCGTCATCCTCGGTGGAGGCACGGCAGGCTGGATGACGGCCGCCTACCTCGG
CAAGGCACTGCAGAACACCGTGGAGATCACGGTTCTGGAGGCGCCGACCATCC
CCCGCATCGGCGTGGGCGAGGCAACCGTACCCAATCTCCAGCGCGTGCTTTTC
GACTACCTCGGGATCAACGAGGACGAGTGGATGCGCGAATGCAACGCCAGCTT
CAAGATGGCGGTCCGCTTCGTCAACTGGCGCACCGGCGGGCCAGGGCGAGGCC
GAGGCCCCGTGAGCTGGAGGAGGGCGGCCCGGACCACTTCTACCACCCGTTTCG
GCCTGCTCCCCGACTACGACCAGACGCCGCTCTCCCACTACTGGTACAAGCGC
AAGTTCGAGGGCGAGACGAACGAGCCGTTGCACTACGCCTGCTTCCGCGAACC
CCCGGTCATGGACGCCAAGCTGGCCCCGCGCTGGATGGACGGCCGCCCCGCC
ACCCGCTACGCCTGGCACTTCGACGCCGCGCTCGTCGCCAAGTTCCTGCGCAG
ATTCGCCACCGAGAAGCAGGGCGTCCTGCACGTCGAGGACGAGATGACGCGC
GTGGAGCAGGACGAGCGCGGCTTCGTACCGCCCTGCACACCAAGTCCGGCC
GGGTCCTCGACGCCGACCTGTTTCATCGACTGCTCCGGTTTCCGCGGCCTGCTG

ATCAACGAGGCCATGGCGGAGCCCTTCATCGACATGAGCGACCACCTGCTGTG
CGACTCGGCCGTCGCCACGGCGGTGCCGCACGACGACGAGGCCAACGGCGTC
GAGCCGTACACCTCCGCCATCGCGATGTCCTCCGGCTGGGCCTGGAAGATCCC
CATGCTGGGCCGCTTCGGCAGCGGTTACGTGTACTCCAGCAAGTTCGCCTCCC
AGGACGAGGCCACCAAGGAGTTCAGCGAGCTCTGGGGCCTGGACCAGGAGAG
CACGAAGTTCAACCACATCCGCTTCGGGGTCGGCCGCAACCGCCGCGCCTGG
GTCAAGAACGTGGTCAGCATCGGCCTGTCCTCCTGCTTCCTGGAGCCGCTGGA
GTCGACCGGCATCTACTTCATCACCGCGGCCATCTACCAGCTCGCGAAGCACTT
CCCGAACAAGGACTTCAACGAGTCGCTCATCGGCGCGTTCAACAACGAGATCG
AGCTGATGTTTCGATGACACGCGCGACTTCATCCAGGCACACTTCTACTACGCGC
CGCGCAACGACACGCCGTTCTGGCGCGCCAACAAGGAGCTGACGCTCCCCGA
CAACATCCAGAAGAAGATCGCCGCCTACCGCGCCGGTCTGCCGATCAACTCGC
CGGTGACCGACGAGTCCACGTACTACGGCAACTTCGAGGCCGAGTTCGCGAAC
TTCTGGACCAACGGCAGCTACTACTGCATCTTCGCCGGCCTCGGCCTGGTCCC
GGACGAGCCGCTGCCCCGCGCTCGCCTACAAGCCGGAGTCCGTCGCCGGGGCC
CAGCCGCTCTTCCAGACGGTCAAGCGCCAGCAGCAGGACCTGCTCGACACCCT
GCCCAGCACCTACGACTACCTGCGCCAGCTGCACGGCGCCTCCTGACTCGAGT
CTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTA
CTAGTCGCAGCTTAATTAACCTAACTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACCAGGC
ATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTG
TTTGTCCGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCC
TTTCTGCGTTTATAGCTAGCGAAAGGAGGAGTCGACAAGCTGACGACCGGGTCT
CCGCAAGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTT
TCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATC
GAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTT
GAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGA
TGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAAC
CTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGT
GACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGT
TCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCG
TTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGGTGCTGTTAAAA
GGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGC
ATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTT
TCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAT
GCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCT
CATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGG
CGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATT
ATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGC
GGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCCTTTTTTCAAT
ATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGCATGCAGCGCTCTTCGGCTTCCTCGCTCACTG

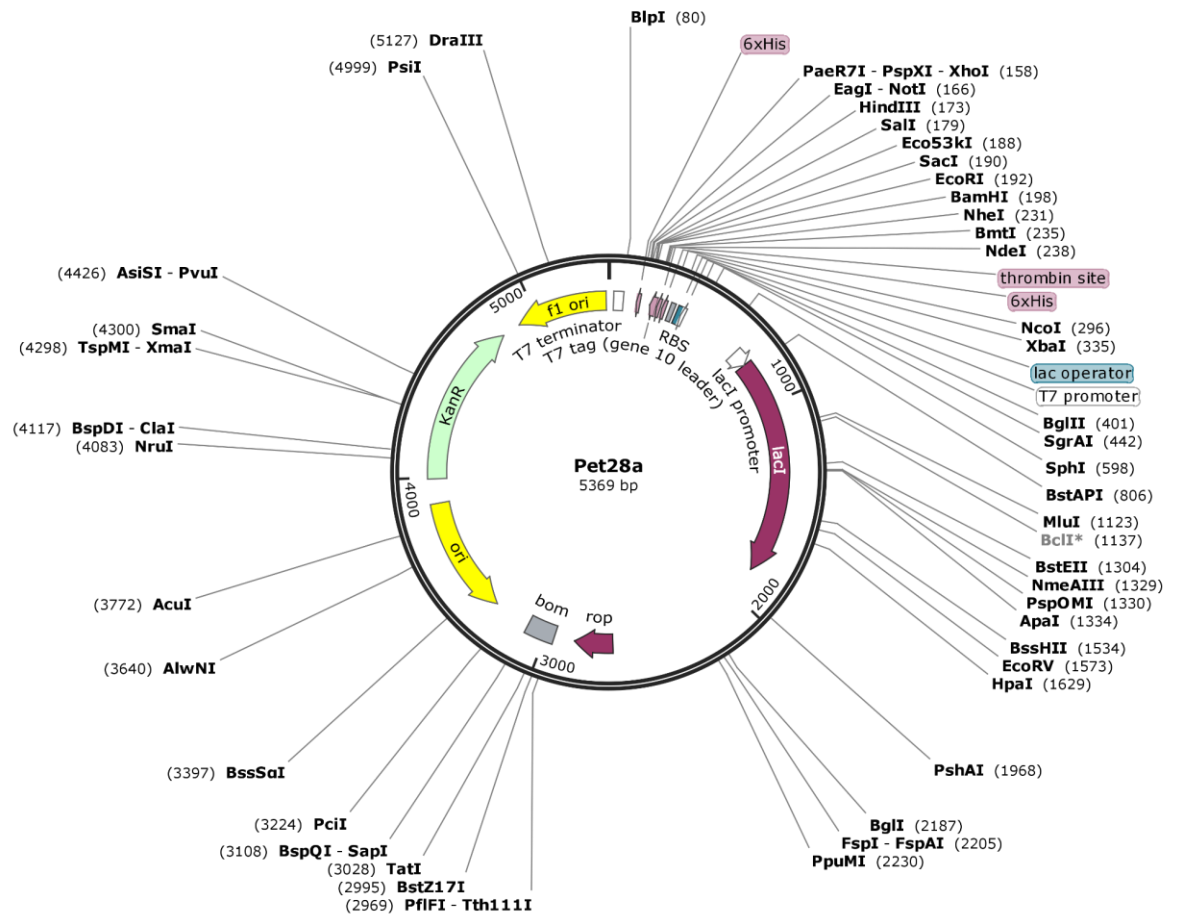
ACTCGCTACGCTCGGTTCGACTGCGGCGAGCGGTGTCAGCTCACTCAAAA
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAAGCCGGAAAGAACATGTGA
GCAAAAAGCAGAGCACCGGAAGAAGCCAACGCCGCAGGCGTTTTTCCATAGGC
TCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGCCAGAGGTGGCGA
AACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTG
CGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTTGGTATCTCAGTTCCGGTG
TAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCGA
CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCATTGGTAACTGATTTAGAGGACTTTGTCTTGA
AGTTATGCACCTGTAAAGGCTAAACTGAAAGAACAGATTTTGGTGAGTGCGGTC
CTCCAACCCACTTACCTTGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGCGAACCTTGAGAA
AACCACCGTTGGTAGCGGTGGTTTTTCTTTATTTATGAGATGATGAATCAATCGG
TCTATCAAGTCAACGAACAGCTATTCCGTTACTCTAGATTTTCAAGTGAATTTATCT
CTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTCATG
TTAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAAGGCTCTCAA
GGGCATCGGTTCGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGC
GTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA
ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGT
GGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTG
GCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAA
AATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTAT
CGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTA
ATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGT
GGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGC
ACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATA
TTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGC

FIGURA 1 Apêndice A - Mapa do plasmídeo pRSM4. Elaborado com Snap Gene.



Fonte: Autoria própria.

FIGURA 2 Apêndice A - Mapa do plasmídeo pET28a(+). Elaborado com Snap Gene.



Fonte: Autoria própria.

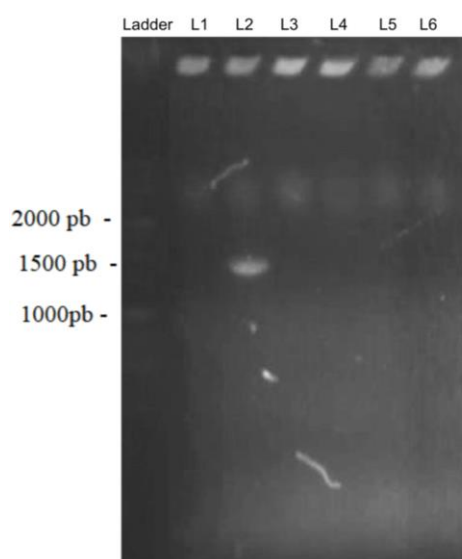
APÊNDICE B - REAÇÕES DE PCR E GÉIS DE AGAROSE

1 - Amplificação *lavH*: Condições da PCR: 98°C - 30 segundos; (98°C - 30 segundos; 60°C - 30 segundos; 72°C - 1 minuto) x 30 ; 72°C - 5 minutos.

2 - Amplificação *fre*: Condições da PCR: 98°C - 30 segundos; (98°C - 10 segundos; 49°C - 30 segundos; 72°C - 20 segundos) x 30 ; 72°C - 5 minutos.

3 - Pcr de colônia *lavH*: Condições da PCR: 98°C - 30 segundos; (98°C - 10 segundos; 49°C - 30 segundos; 72°C - 1 minuto) x 30 ; 72°C - 5 minutos.

FIGURA 1 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de colônia da LavH. Resultado positivo: 1551 pb. 6 colônias foram testadas (L1 - L6) com a L2 sendo selecionada para prosseguir



Fonte: Autoria própria.

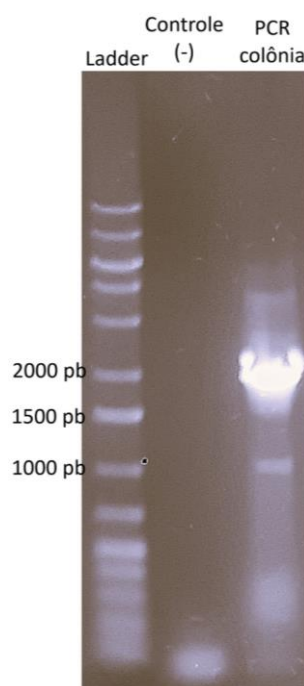
FIGURA 2 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão enzimática (Sall) de pRSM4_*LavH*. Resultado positivo: 4648 pb + 777 pb.



Fonte: Autoria própria.

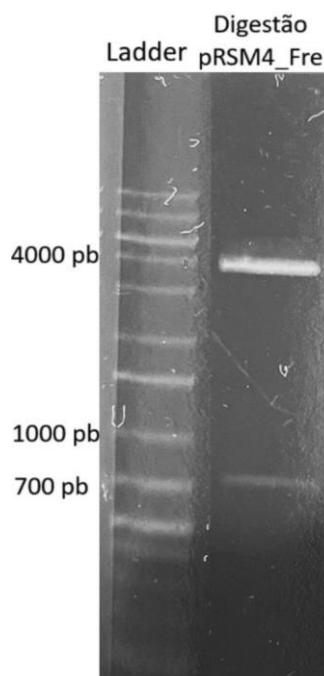
4 - Pcr de colônia *fre*: 95°C - 5 minutos; (95°C - 30 segundos; 54°C - 30 segundos; 72°C - 2:30 minutos) x 30 ; 72°C - 5 minutos

FIGURA 3 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de colônia da *fre*. Resultado positivo: 2101 pb.



Fonte: Autoria própria.

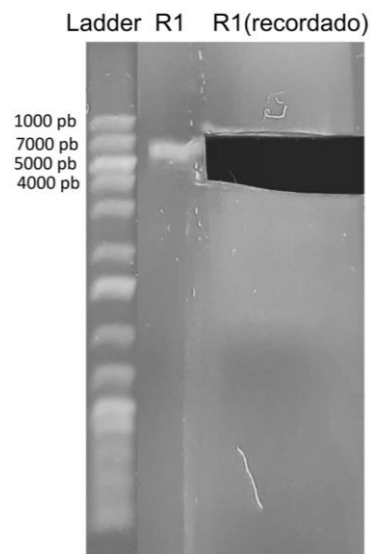
FIGURA 4 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão enzimática (NdeI +XhoI) de pRSM4_Fre. Positivo: 3818 pb + 704 pb.



Fonte: Autoria própria.

5 - Pcr *round the horn fre*: 98°C - 30 minutos; (98°C - 10 segundos; 58,6°C - 30 segundos; 72°C - 1:20 minutos) x 35 ; 72°C - 5 minutos. Reação de fosforilação: 75 ng do DNA foi incubado a 20°C por 20 minutos na reação de 20 µL da PNK, conforme descrito no protocolo da Anza™ T4 PNK).

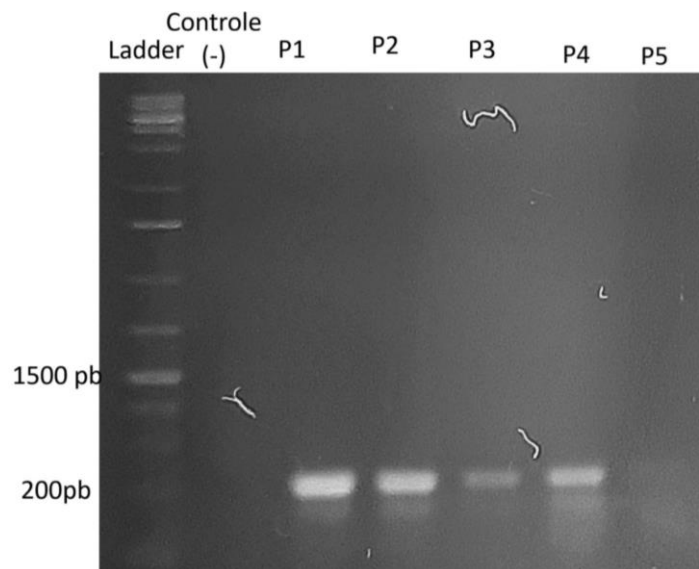
FIGURA 5 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% do PCR *Round the horn*. Banda esperada: 4519 pb.



Fonte: Autoria própria.

6 - PCR de confirmação da deleção do stop códon: 95°C - 5 minutos; (95°C - 30 segundos; 53°C - 30 segundos; 72°C - 20 segundos) x 30 ; 72°C - 5 minutos.

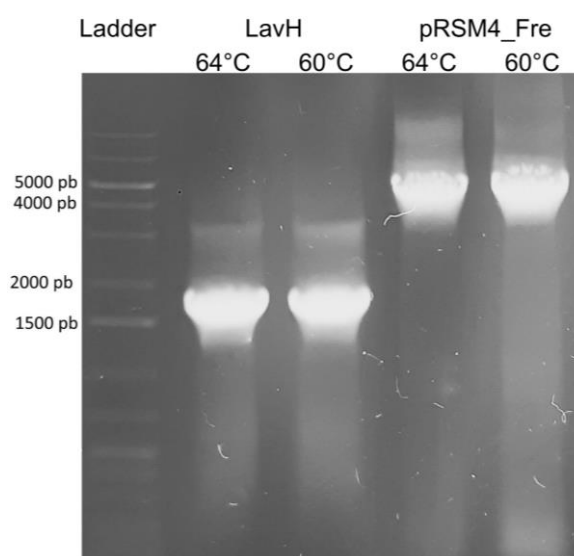
FIGURA 6 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 2% do PCR de colônia que confirma a deleção do stop códon. Testou-se 5 colônias (P1-P5) e a P2 foi escolhida para dar prosseguimento. Positivo: 200 pb.



Fonte: Autoria própria.

7 - PCRs preparativos para a CPEC: 95°C - 2 minutos; (95°C - 30 segundos; 60 ou 64°C - 45 segundos; 72°C - 4:50 minutos para pRSM4_Fre e 2 minutos para pRSM4_LavH) x 35 ; 72°C - 6 minutos

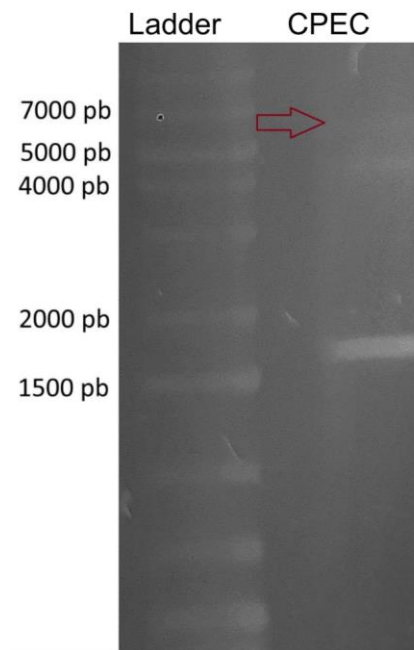
FIGURA 7 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% das PCRs preparativas. Foram estabelecidas duas temperaturas de anelamento ótimas após testes, de 60 e 64°C. Positivo LavH: 1706 pb. Positivo pRSM4_Fre: 4505 pb.



Fonte: Autoria própria.

8 - Reação da CPEC: 95°C - 2 minutos; (95°C- 30 segundos; 70°C - 2 segundos; rampa de temperatura 0,5°C/s para 55°C - 30 segundos; 72°C - 4:50 minutos) x 20; 72°C - 5 minutos

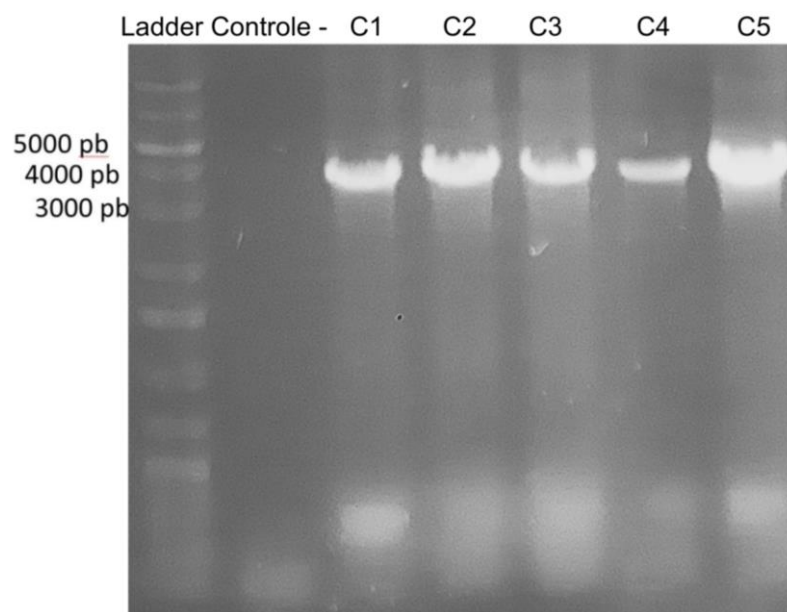
FIGURA 8 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% das reações CPEC. É possível observar fracas bandas do produto esperado da CPEC, em torno de 6200 pb, indicadas pelas setas vermelhas. As bandas abaixo desta são, de cima para baixo, do vetor e do inserto.



Fonte: Autoria própria.

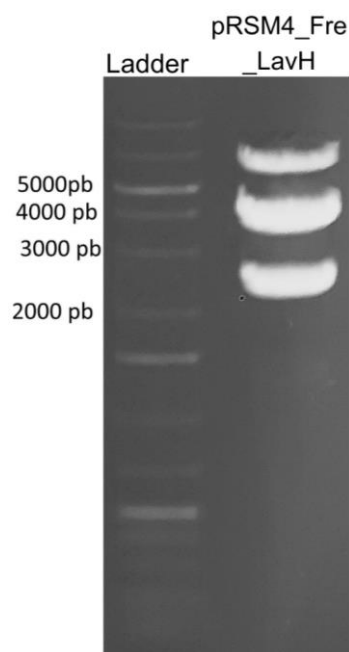
9 - PCR de colônia (Fre_LavH fusionada): 95°C - 5 minutos; (95°C - 30 segundos; 54°C - 30 segundos; 72°C - 4 minutos) x 30 ; 72°C - 5 minutos.

FIGURA 9 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% das PCRs de colônia. Positivo: 3740 pb.



Fonte: Autoria própria.

FIGURA 10 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão enzimática (NdeI+XhoI) do pRSM4_Fre_LavH. Positivo: 3818 e 2342 pb. Acima das bandas positivas, é visível uma banda adicional correspondente a uma digestão parcial (somente um corte no plasmídeo).



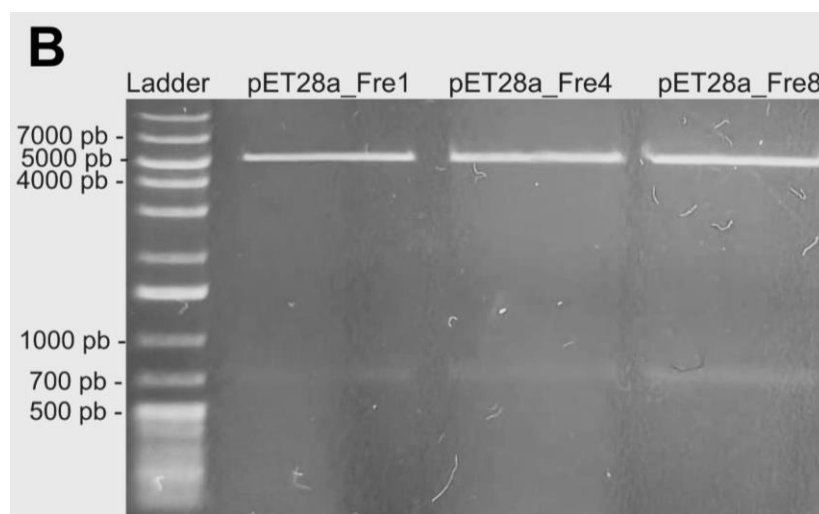
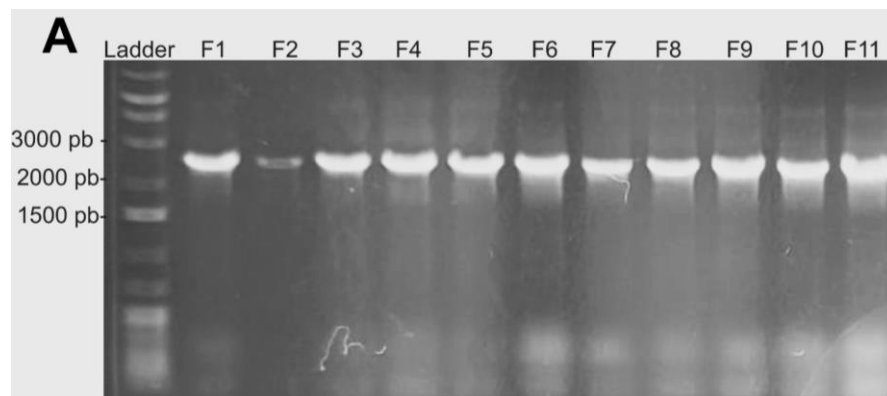
Fonte: Autoria própria.

10 - PCR de colônia para pET28_Fre: 95°C - 5 minutos; (95°C - 30 segundos; 56°C - 45 segundos; 72°C - 3 minutos) x 30 ; 72°C - 5 minutos

PCR de colônia para pET28_LavH: 95°C - 5 minutos; (95°C - 30 segundos; 56°C - 45 segundos; 72°C - 4 minutos) x 30 ; 72°C - 5 minutos

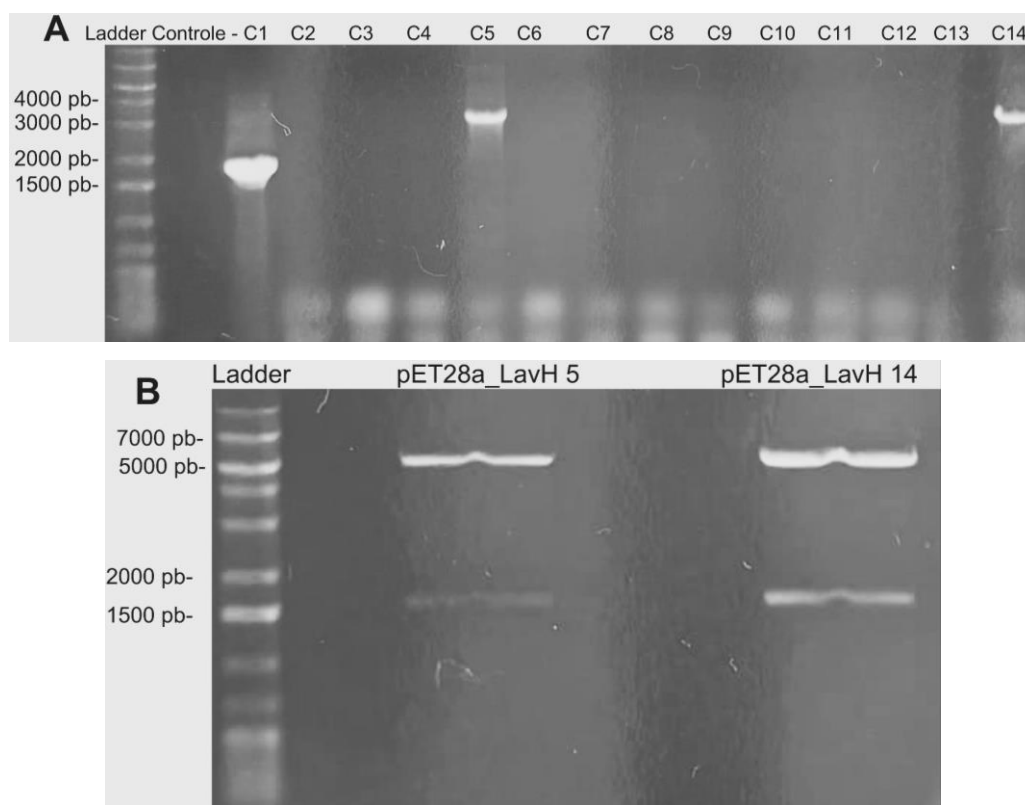
PCR de colônia para pET28_Fre_LavH: 95°C - 5 minutos; (95°C - 30 segundos; 56°C - 45 segundos; 72°C - 4:50 minutos) x 25 ; 72°C - 5 minutos

FIGURA 11 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar o pET28a_Fre **A**: PCR de colônia para Fre (positivo de 2485 pb) **B**: Digestão enzimática (NdeI+XhoI, positivo de 5289 pb e 706 pb)



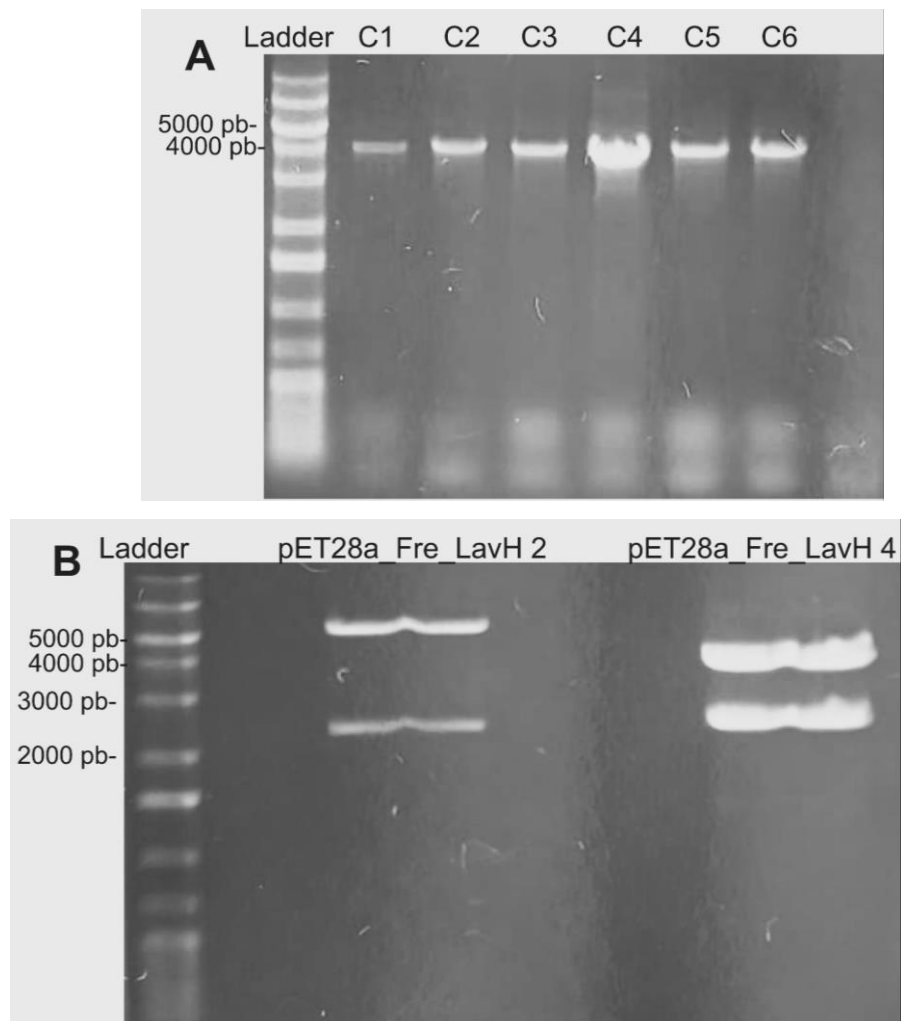
Fonte: Autoria própria.

FIGURA 12 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar o pET28a_LavH **A:** PCR de colônia para LavH (positivo de 3400 pb) **B:** Digestão enzimática (NdeI+XhoI, positivo de 5289 pb e 1609 pb)



Fonte: Autoria própria.

FIGURA 13 Apêndice B - Eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar o pET28a_Fre_LavH **A:** PCR de colônia para Fre_LavH (positivo de 4126 pb) **B:** Digestão enzimática (NdeI+XhoI, positivo de 5289 pb e 2384 pb, somente presente no poço pET28a_Fre_LavH 2). //



Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE C - SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS UTILIZADAS EM ANÁLISES *IN SILICO*

>WP_030235131.1(LavH) tryptophan halogenase family protein [Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae]

MTGTDNRIQKVILGGGTAGWMTAAYLGKALQNTVEITVLEAPTIPRIGVGEATVPNL
QRVLFDYLGINEDEWMRECNASFKMAVRVFNWRTGGQGAEARELEEGGPDHFIY
HPFGLLPDYDQTPLSHYWKRFEGETNEPFDYACFREPPVMDAKLAPRWMDGR
PATRYAWHFDAAALVAKFLRRFATEKQGVLVHVEDEMTRVEQDERGFVTALHTKSGR
VLDADLFIDCSGFRGLLINEAMAEPFIDMSDHLLCDSAVATAVPHDDEANGVEPYTS
AIAMSSGWAWKIPMLGRFGSGYVYSSKFASQDEATKEFSELWGLDQENTKFNHIRF
RVGRNRRRAWVKNVVSIGLSSCFLEPLESTGIYFITAAYQLAKHFPNKDFNESLIGAF
NNEIELMFDDTRDFIQAHFYAPRNDTPFWRANKELTPDNIQKKIAAYRAGLPINSP
VTDESTYYGNFEAEFRNFWTNGSYCYCIFAGLGLVPDEPLPALAYKPESVAGAQLF
QTVKRQQQDLLDTLPSTYDYLRQLHGAS

>ThaL

MDNRIKTVVILGGGTAGWMTAAYLGKALQNTVKIVVLEAPTIPRIGVGEATVPNLQR
AFFDYLGIPEEEWMRECNASYKMAVKFINWRTPGEGSPDPRTLDDGHTDTFHHPF
GLLPSADQIPLSHYWAAKRLQGETDENFDEACFADTAIMNAKKAPRFLDMRRATNY
AWHFDASKVAAFLRNFAVTKQAVEHVEDEMTEVLTDERGFITALRTKSGRILQGDLF
VDCSGFRGLLINKAMEEPFIDMSDHLLCNSAVATAVPHDDEKNGVEPYTSSIAMEA
GWTWKIPMLGRFGSGHVYSDHFATQDEATLAFSKLWGLDPDNTEFNHVRFRVGR
NRRRAWVRNCVSVGLASCFVEPLESSGIYFIYAAIHMLAKHFPDKTFDKVLVDRFNRE
IEEMFDDTRDFLQAHYYFSPRVDTPFWRANKELKLADSIKDKVETYRAGLPVNLPT
DEGTYYGNFEEAEFRNFWTNGSYCYCIFAGLGLMPRNPLPALAYKPQSIAEAELLFADV
KRKGDTLVESLPSTYDLLRQLHGAS

>RebH

MSGKIDKILVGGGTAGWMAASYLGKALQGTADITLLQAPDIPTLGVGEATIPNLQTA
FFDFLGIPEDWWMRECNASYKVAIKFINWRTAGEGTSEARELDGGPDHFIYHSFGLL
KYHEQIPLSHYWFDRSYRGKTVEPFDYACYKEPVILDANRSPRRLDGSKVTNYAWH
FDAHLVADFLRRFATEKLGVVRHVEDRVEHVQRDANGNIESVRTATGRVFDADLFVD
CSGFRGLLINKAMEEPFLDMSDHLLNDSAVATQVPHDDDANGVEPFTSAIAMKSGW
TWKIPMLGRFGTGYVYSSRFATEDEAVREFCEMWHLPETQPLNRIRFRVGRNRR
AWVGNCVSIQTSSCFVEPLESTGIYFVYAALYQLVKHFPDKSLNPVLTARFNREIET
MFDDTRDFIQAHFYFSPRTDTPFWRANKELRLADGMQEKIDMYRAGMAINAPASDD
AQLYYGNFEEFRNFWNNSNYCVLAGLGLVPDAPSPRLAHMPQATESVDEVFGA
VKDRQRNLLLETLP SLHEFLRQQHGR

>PrnA

MNKPIKNIVIVGGGTAGWMAASYLVRALQQQANITLIESAAIPRIGVGEATIPSLQKVF
FDFLGIPEREWMPQVNGAFKAAIKFVNWRKSPDPSRDDHFYHLFGNVPNCDGVPL
THYWLKREQGFGQPMMEYACYPQPGALDGKLAPCLSDGTRQMASHAWHFD AHLVA
DFLKRWAVERGVNRVVDEVVDVRLNNRGYISNLLTKEGRTLEADLFIDCSGMRGLLI
NQALKEPFIDMSDYLLCDSAVASAVPNDDARDGVEPYTSSIAMNSGWTWKIPMLGR
FGSGYVFSSHFTSRDQATADFLKLWGLSDNQPLNQIKFRVGRNKRAWVNNCVSIG
LSSCFLEPLESTGIYFIYAALYQLVKHFDPDTSFDPRLSDFNAEIVHMFDDCRDFVQA
HYFTTSRDDTPFWLANRHDLRLSDAIKEKVQRYKAGLPLTTTSFDDSTYYETFDYEF
KNFWLNGNYCYCIFAGLGMLPDRSLPLLQHRPESIEKAEAMFASIRREAERLRTSLPT
NYDYLRSLRDGDAGLSRGQRGPKLAAQESL

>PyrH

MIRSVVIVGGGTAGWMTASYLKAAFDDRIDVTLVESGNVRRIGVGEATFSTVRHFFD
YLGLDEREWLPRCAGGYKLGIRFENWSEPGEYFYHPFERLRVVDGFNMAEWWLA
VGDRRTSFSEACYLTHRLCEAKRAPRMLDGSLFASQVDESLGRSTLAEQRAQFPY
AYHFDADADEVARYLSEYAIARGVRHVDDVQHVGGQDERGWISGVHTKQHGEISGDL
FVDCTGFRGLLINQTLGGRFQSFSDVLPNNRAVALRVPRENDEDMRPYTTATAMSA
GMMWTIPLFKRDGNGYVYSDEFISPEEAERELRSTVAPGRDDLEANHIQMRIGRNE
RTWINNCVAVGLSAAFVEPLESTGIFFIQHAIEQLVKHFPGERWDPVLISAYNERMA
HMVDGVKEFLVLHYKGAQREDTPYWKAATRAMPDGLARKLELSASHLLDEQTIYP
YYHGFETYSWITMNLGLGIVPERPRPALLHMDPAPALAEFERLRREGDELIAALPSC
YEYLASIQ

>abeH

MLKNVVVGGGTAGWMTASYLTAAFGDRIGVTLVESKRVGSIGVGEATFSTVRHFF
EYLGLEEKWMPACNATYKLAIRFENWREPGHHFYHPFERQRVVDGFPLTDWWL
REPRSDRFDKDCFLVGTLCDLKSQRQLNGELFEGGLGGRSAYRTTLAEQTTQFP
YAYHFDATLVANYLRDYAVARGVKHVLDDVQDVALDDRGWISHVVTGESGNLTGD
LFIDCTGFRSLLL GKALAEFQSYQDSL PND SAVALRV PQDMENRGLRPCTTATAQ
EAGWIWTIPLFDRIGTGYVYAGDYISPEEAERTLRAFVGPAAEHADANHIKMRIGRS
NRHVVNNCVAVGLSSGFVEPLESTGIFFIQHAIEQLVKHFPPDERWDDGLRTAYNKL
VNNVMDGVREFLVVHYAAKRQDNQYWKDAKTRPLPDGLAERLERWQTRLPDNE
SVFPHYHGFESYSYVCMLLGLGGLDLKSSPALGLMDAAPARHEFKLVGEQAAELAR
TLPTQYEFYFAQLHRAR

>borH

MDNRINRIVILGGGTAGWMTASYLAKALGDTVTTITLEAPAIGRIGVGEATVPNLQRV
FFDFLGLREEEWMPECNAAFKTAVKFINWRTPGPGGEAKARTIDGRPDHFYHPFGLL
PEHGQVPLSHYWAYNRAAGTTDEPFDYACFAETAAMD A VRAPKWLDGRPATRYA

WHFDAHLVAEFLRRHATERLNVEHVQGEMQQVLRDERGFITALRTVEGRDLEGDL
 FIDCSGFRGLLINKAMEEPFIDMNDQLLCNRAVATAIKHDDDAHGVEPYTSAIAMRS
 GWSWKIPMLGRFGTGYVYSSRFAEKDEATLDFCRMWGLDPENTPLNQVAFRVGR
 NRRRAWVKNCVSIGLASCFLEPLESTGIYFITAAYQLTQHFPDRTFALALSDAFNHEIE
 AMFDDTRDFIQAHFYVSPRTDTPFWKANKDLHLPEQMREKIAMYKAGLPINAPVTD
 ESTYYGRFEAEFRNFWTNGSYCYCIFAGLGLRPDNPLPMLRHRPEQVREAQALFAG
 VKDKQRELVETLPSNLEFLRSLHGK

>ktzQ

MDDNRIRSILVLGGGTAGWMSACYLSKALGPGVEVTVLEAPSSIRRVGEATIPNLH
 KVFFDFLGIAEDEWMRECNASYKAAVRFVNWRTPGDGQATPRRRPDGRPDHFDH
 LFGQLPEHENLPLSQYWAHRRNLGLTDEPFDRSCYVQPELLDRKLSPRLMDGTCLA
 SYAWHFDADLVADFLCRFAVQKLVTHVQDVFTHADLDQRGHITAVNTESGRTLAA
 DLFIDCSGFRSVLMGKVMQEPFLDMSKHLLNDRAVALMLPHDDEKVGIEPYTSSLA
 MRSGWSWKIPLLGRFGSGYVYSSQFTSQDEAAEELCRMWDVDPAEQTFNNVRFR
 VGRSRRAWVRNCVAIGVSAMFVEPLESTGLYFSYASLYQLVKHFPDKRFRPILADR
 FNREVATMYDDTRDFLQAHFSLSPRDDSEFWRACKELPFADGFAEKVEMYRAGLP
 VELPVTIDDGHYYGNFEAEFRNFWTNSNYCYCIFAGLGLPEHPLPVLEFRPEAVDRA
 EPVFAAVRRRTEELVATAPTMQAYLRRLHQGT

>sttH

MNTRNPDKVIVGGGTAGWMTASYLKKAFGERSVTLVESGTIGTVGVGEATFSDI
 RHFFFEFLDLREEEWMPACNATYKLAVRFQDWQRPGHHFYHPFEQMRSVDGFPLT
 DWWLQNGPTDRFDRDCFVMASLCDAGRSPRYLNGSLLQQEFDERAEPAAGLTMS
 EHQQKTQFPYAYHFEEAALLAEFLSGYSKDRGVKHVVDEVLEVKLDDRGWISHVVTK
 EHGDIGGDLFVDCTGFRGVLLNQALGVFPVSYQDTLPNDSAVALQVPLDMEARGIP
 PYTRATAKEAGWIWTIPLIGRIGTGYVYAKDYCSPEEAERTLREFVGPEAADVEANHI
 RMRIGRSEQSWKNNCVAIGLSSGFVEPLESTGIFFIHHAIEQLVKHFPAGDWHQPQLR
 AGYNSAVANVMDGVREFLVHLHYLGAARNTRYWKDTKTRAVPDALAERIERWKVQ
 LPDSENVFPYYHGLPPYSYMAILLGTGAIGLRPSALALADPAAAEKEFTAIRDRAF
 LVDTLPSQYEFYAAMGQRV

>Th-Hal

LNNVVIVGGGTAGWMTASYLKAAFGRIDITLVESGHIGAVGVGEATFSDIRHFFEFL
 GLKEKDWMACNATYKLAVRFENWREKGYHYFYHPFEQMRSVNGFPLTDWWLKQ
 GPTDRFDKDCFVMASVIDAGLSPRHQDGTLIDQPFDGADQMGLTMSEHQQKTQ
 FPYAYQFEAALLAKYLTYSVERGVKHIVDDVREVSLDDRGWITGVRTGEHGDLTG
 DLFIDCTGFRGLLLNQALEEPFISYQDTLPNDSAVALQVPMDMERRGILPCTTATAQ
 DAGWIWTIPLTGRVGTGYVYAKDYLSPEEAERTLREFVGPAAADVEANHIRMRIGR
 SRNSWVKNCVAIGLSSGFVEPLESTGIFFIHHAIEQLVKNFPAADWNSMHRDLYNVA
 VSHVMDGVREFLVHLHYVAAKRNDTQYWRDTKTRKIPDSLAERIEKWKVQLPDSETV

YPYYHGLPPYSYMCILLGMGGIELKPSPALALADGGAAQREFEQIRNKTQRLTEVLP
KAYDYFTQ

>SnFDHal

MLSSVVIVGGGTSGWMTAAYLRAALGTSVNVTVIESKRIKTIGVGEATFSTVRHFFD
YLGLSENDWMPKCNATYKLGIRFENWRAKGHYFYHPFERLRVVDGFPLTEWWLNK
KPSDRFDQDVFLMSEICDTMRSPRYLDGTLFEQDFVEHGGSMDBERSTLSEQATQ
FPYAYQFDASLLADFLTEYATTRGARHIEDDVVEVVRDERGWISHLKTREHGELAG
DLFVDCTGFAGLLLNLKTLGEPFVSQNTLPNDSAVALRVPHDAERTRLRPCTTATA
QEAGWIWTIPLFERIGTGYVYASDYTTPEEAERTLREFVGPQAADVEANHIRMGRIGR
SRHSWVNNCVAIGLSSGFVEPLESTGIFFIQGGIEELVKHFPAADWNPCLRDSYNRV
VANTMDGVREFLVLYHRTAARNNDNAYWRDAKTRELPGLAARLEAWQSKLPTEET
VFPHYHGFEPYSYHAMLGLGLGGLDVKPAPVLAHMDDSRAAQEIQLKDQARDIAKR
LPSQYEYLAQMH

>LooH

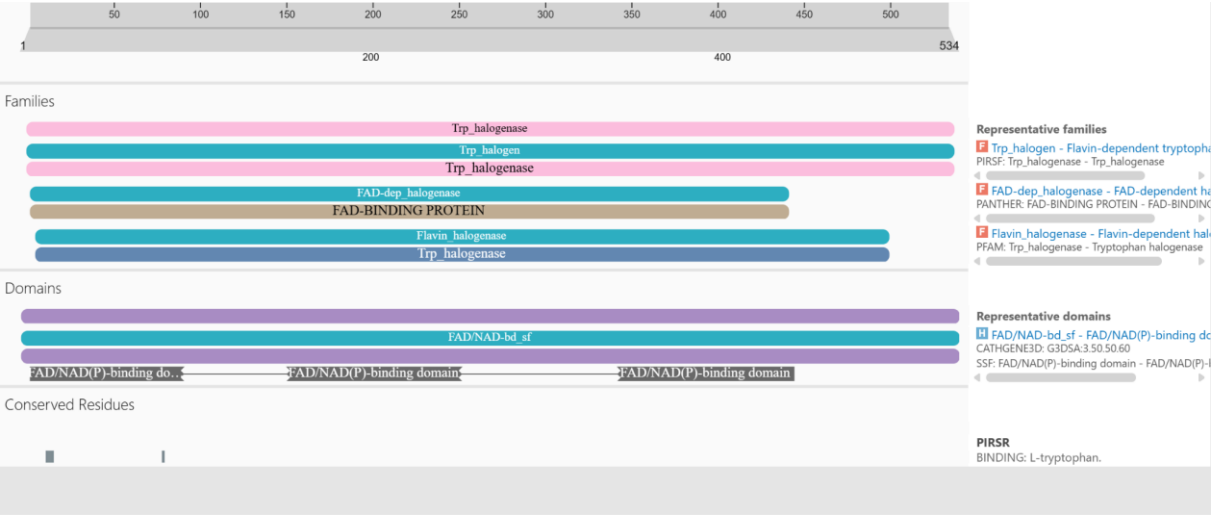
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSDAIEEIVVLGGGTAGWMSACYLAKATNGTARVT
VLEAPQIPTLGVEATIPNLQTAFFDFVGIDEDDWMRECNASYKTAIRFINWRTGGA
GQAEPRDLGPGIDHFYHSFGLPHHEGIPLSHYWARSLRGETKEAFDYACYKEPA
LMDAKKSPRFMDGTRATNYAWHFD AHLVARYLTRVATEELGVHHVQGRMVRAEQ
NTDGFIALITEEGERIPGDLFIDCSGFRGLLINKTLEEFIDMGDHLCDLSAVATQVP
HDDDAEGVEPYTSAIAMKSGWTWKIPMLGRFGTGYVYSSRFCSQDEAIDFCSLW
RLDPQEAELNKIRFRVGRNRRRAWVKNCVSIGAASCFVEPLESTGIYFAYAALHQLVK
FFPDKRFNGSLIDSFNREIETMFDDTRDFIAHYFSPREDTPFWRANKELNLSETIQ
RKVAMYSAGLAINQPPNDDAGIYYGNFEEEFNFWNNSNYFCVLAGLGKIPDAMP
RLSHLPQALESVGSVYNRVQRQEERRLLDSLPTLHEFLKQQHGV

>ktzR

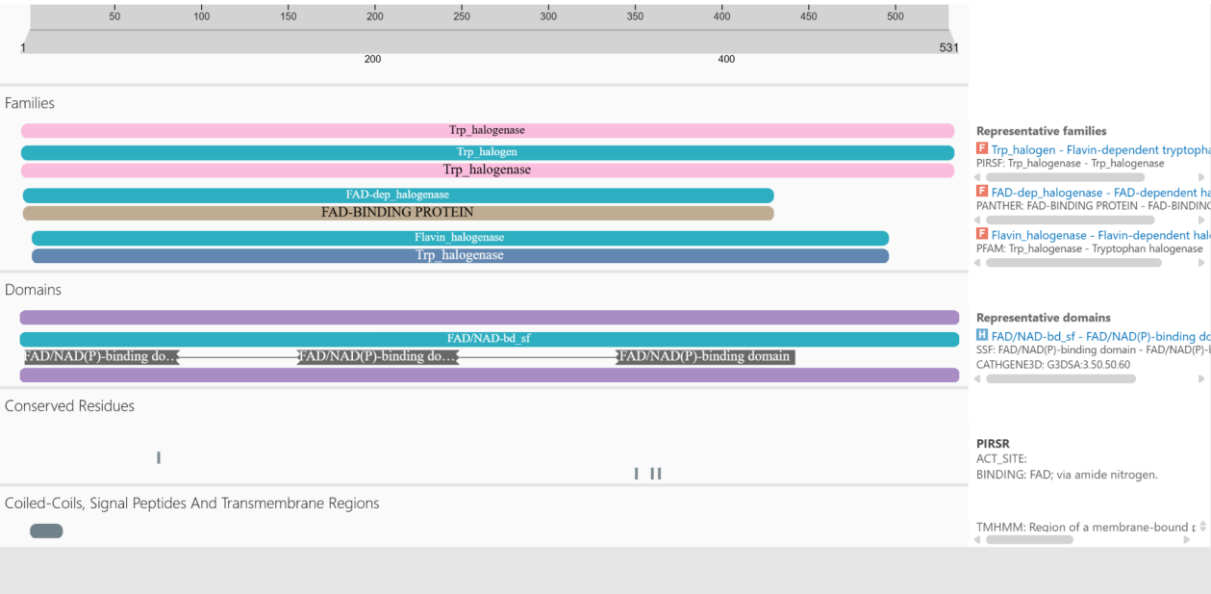
MVIVGGGTAGWMTAAYLKTAFGDRLSITVVESSRIGTIGVGEATFSDIQHFFQFLNLR
EQDWMPACNATYKLGIRFENWRHVGHGFYQPFQIRPVYGFPLTDWWLHDAPTD
RFDTD CFVMPNLCEAGRSRHL DGT LADEDFVEEGDELANRTMSEHQGKSQFPYA
YHFEAALLAKFLTGYAVDRGVEHVVDVLDVRLDQRGWIEHVVTAEHGEIHGDLFV
DCTGFRGLLLNLKALGVFVSQDTLPNDSAVALQVPLDMQRRGIVPNTTATAREAG
WIWTIPLFGRVGTGYVYAKDYLSPEEAERTLREFVGPAAADVEANHIRMGRIGRSQES
WRNNCVAIGLSSGFVEPLESTGIFFIHHAIEQLVKHFPAADWNPCLRDSYNRV
MDGIREFLVIHYRGAARADNQYWRDTKTRPLPDGLAERIECWQTQLPDTEIYPY
HGLPPYSYMCILMGGGAIRTPASAALALTDQGAAQKEFAAVRDRAAQLRDTLPSHY
EYLARMRGLDV

APÊNDICE D - ANÁLISES NA FERRAMENTA INTERPROSCAN

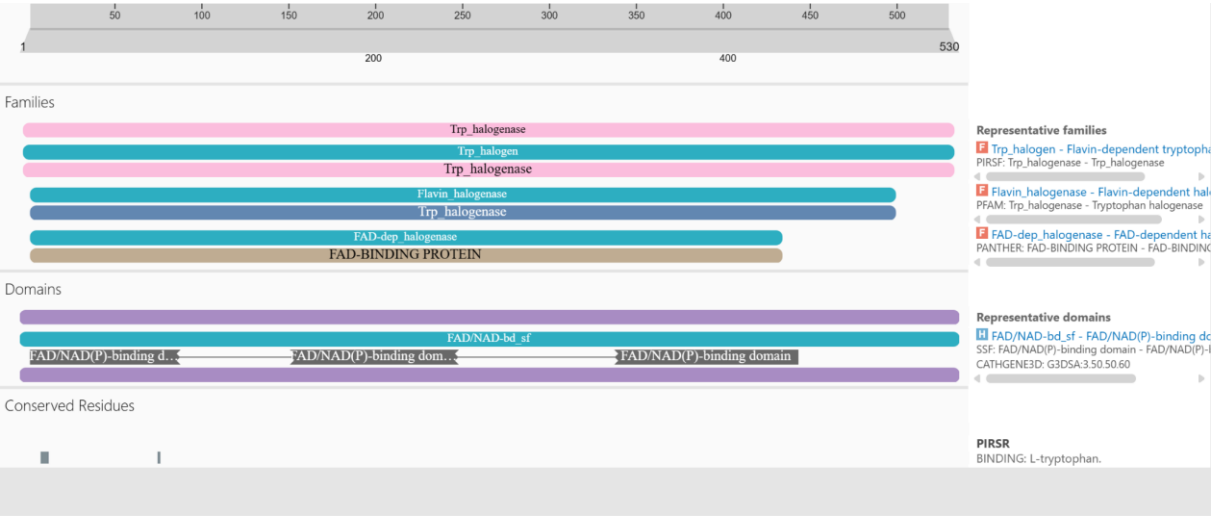
LavH:



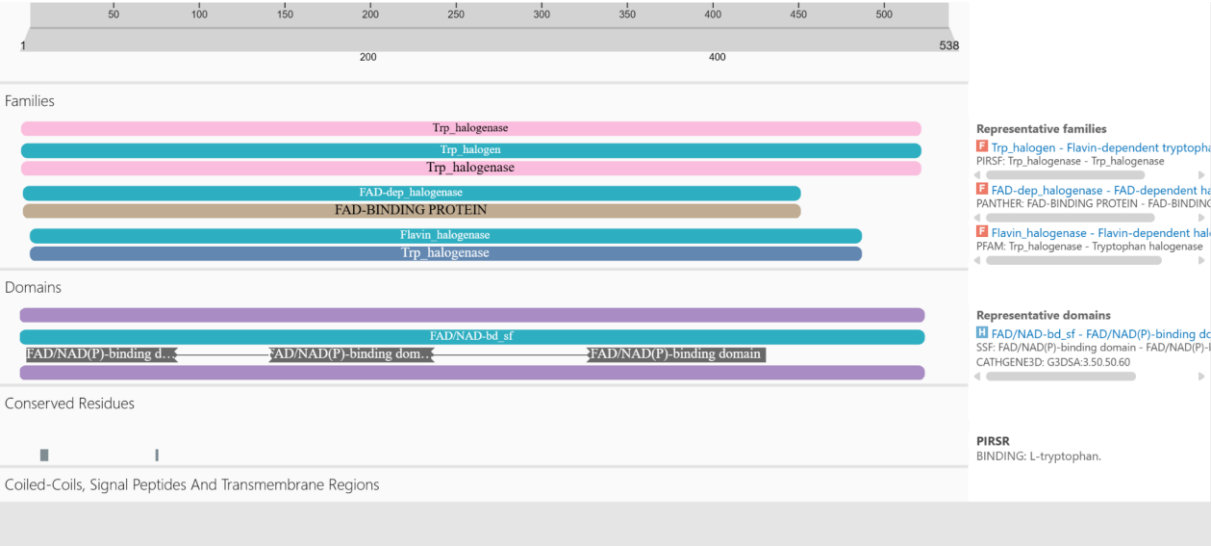
ThaL:



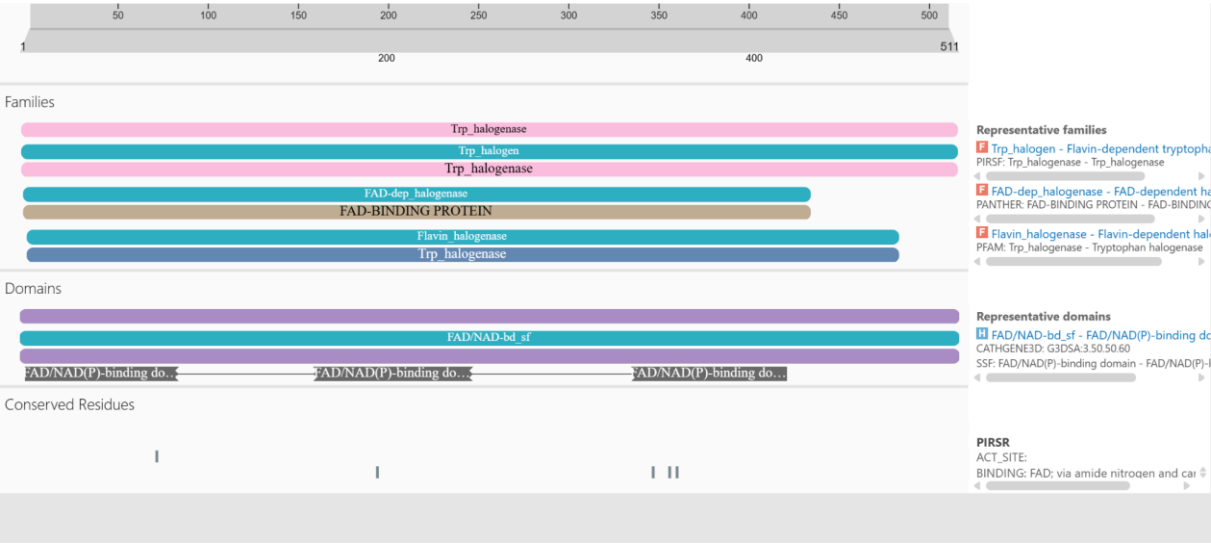
RebH:



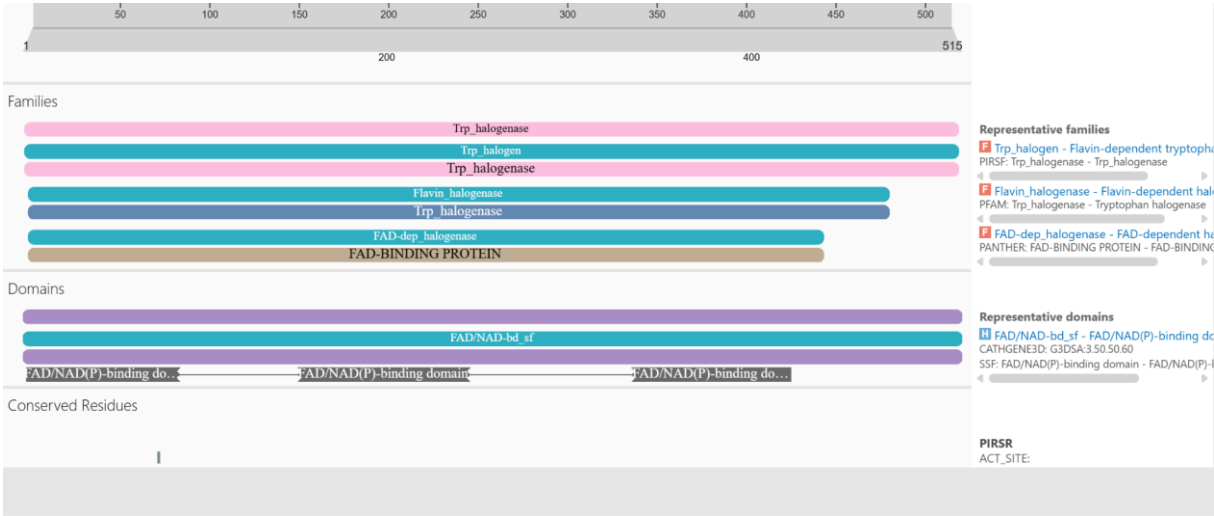
PrnA:



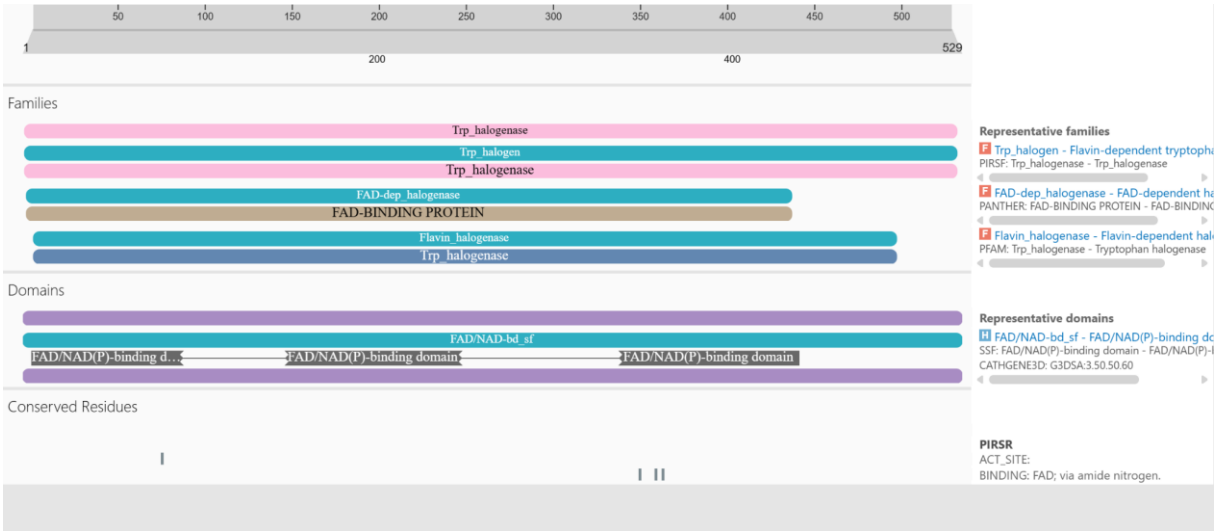
PyrH:



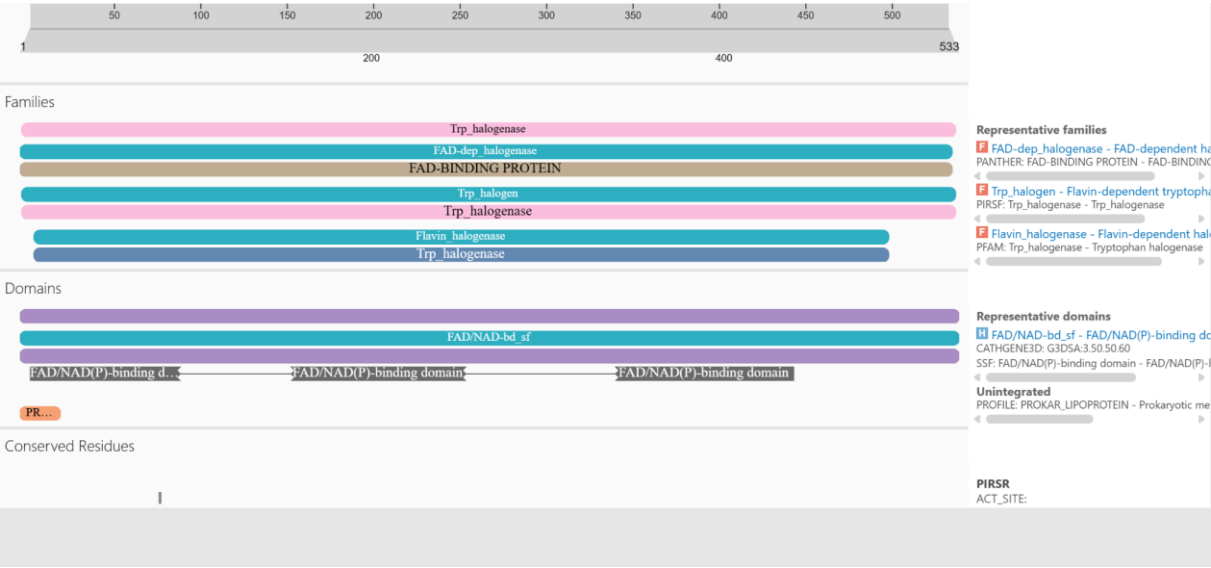
AbeH:



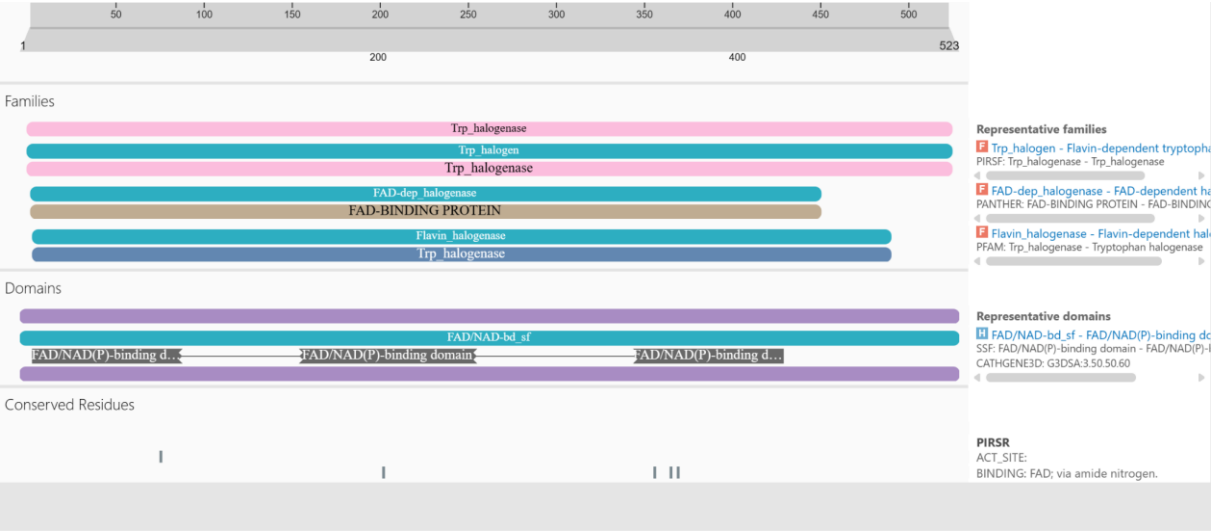
BorH:



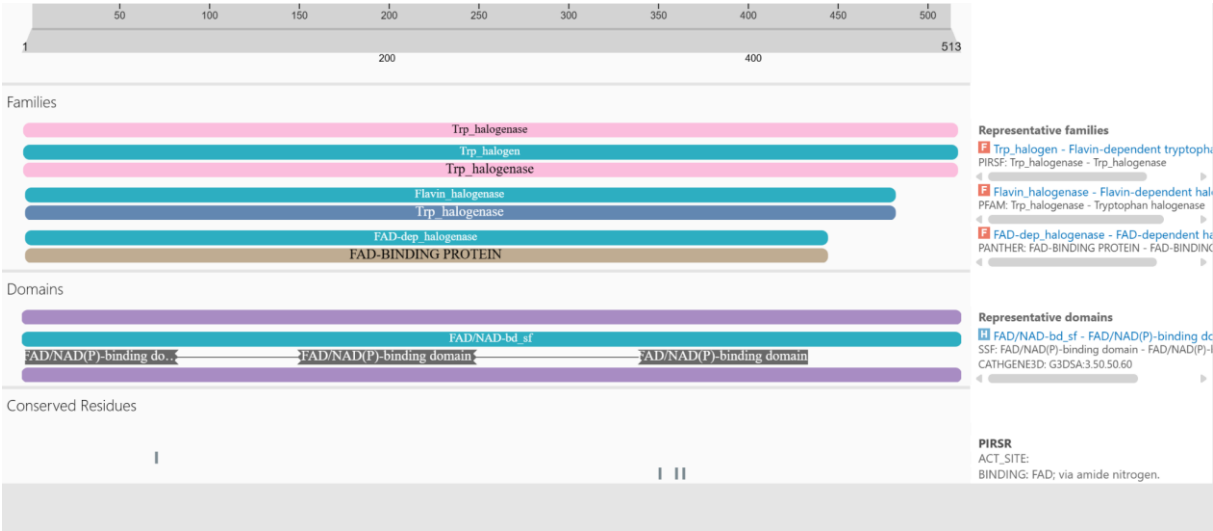
KtzQ:



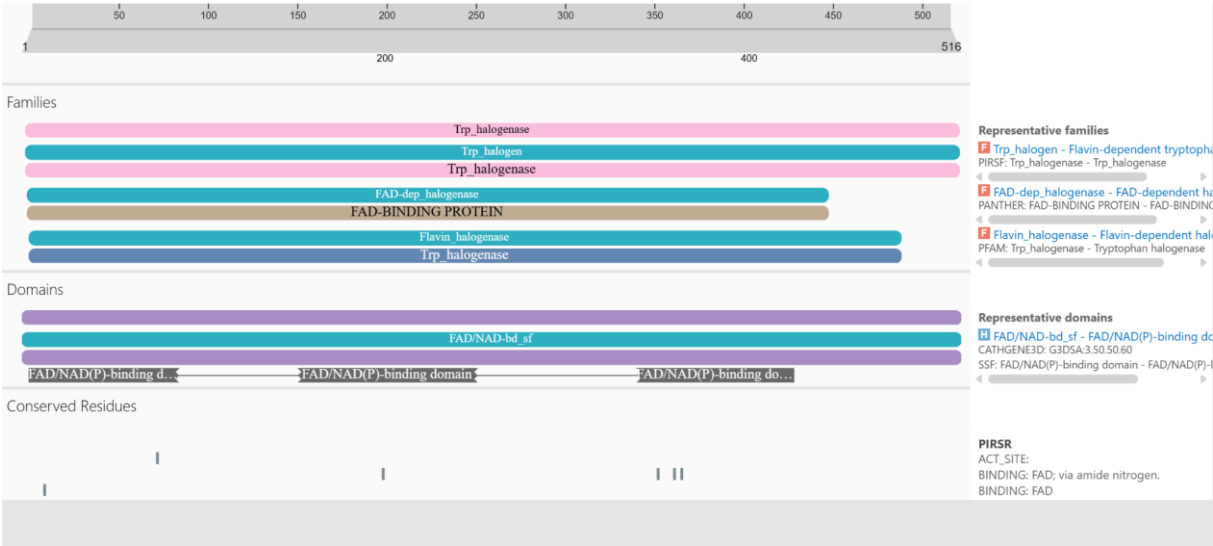
SttH:



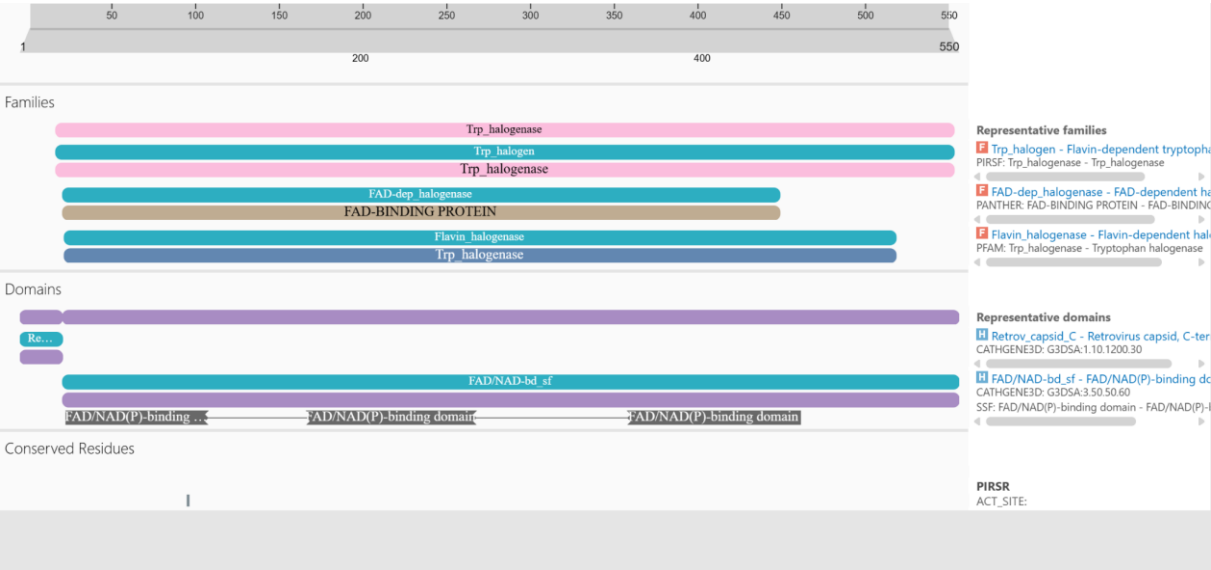
Th-Hal:



SnFDHal:



LooH:



KtzR:

