



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

DENISE ROCHA NEPOMUCENO

**EXPRESSÃO EM *ESCHERICHIA COLI* E *PICHLIA PASTORIS* DE UMA QUITINASE
ANTIFÚNGICA DA FAMÍLIA 19 DAS GLICOSÍDEO HIDROLASES DE
*CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM***

**FORTALEZA
2012**

DENISE ROCHA NEPOMUCENO

**EXPRESSÃO EM *ESCHERICHIA COLI* E *PICHA PASTORIS* DE UMA QUITINASE
ANTIFÚNGICA DA FAMÍLIA 19 DAS GLICOSÍDEO HIDROLASES DE
*CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM***

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

**FORTALEZA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- N362e Nepomuceno, Denise Rocha.
Expressão em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* de uma quitinase antifúngica da família 19 das glicosídeo hidrolases de *Chromobacterium violaceum* / Denise Rocha Nepomuceno – 2012.
171 f. : il., colr., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. Expressão heteróloga. 2. Proteína recombinante. 3. Potencial antifúngico. I. Título.

CDD 574-192

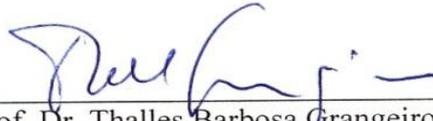
DENISE ROCHA NEPOMUCENO

**EXPRESSÃO EM *ESCHERICHIA COLI* E *PICHIA PASTORIS* DE UMA QUITINASE
ANTIFÚNGICA DA FAMÍLIA 19 DAS GLICOSÍDEO HIDROLASES DE
*CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM***

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 14 / 12 / 2012 .

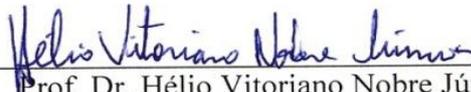
BANCA EXAMINADORA



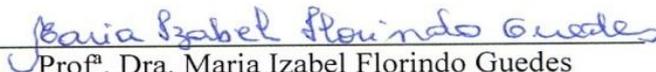
Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará - UFC
(Orientador)



Prof.^a. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof.^a. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Thalles Barbosa Grangeiro*, pela orientação, dedicação, disposição e oportunidade que me deu ao me receber no Laboratório de Genética Molecular.

À Profa. Dra. *Cristina Paiva da Silveira Carvalho*, pela ajuda, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. *Hélio Vitoriano Nobre Júnior*, pelo auxílio nos ensaios de atividade antifúngica contra leveduras e pela participação em minha banca. Por ter estado sempre disponível quando precisei.

Aos professores doutores *Maria Izabel Florindo Guedes* e *Rodrigo Maranguape Silva da Cunha*, pela disponibilidade em avaliar o trabalho e compor a banca examinadora.

À Profa. Dra. *Ilka Maria Vasconcelos* e sua orientanda *Helen*, pela realização do sequenciamento N-terminal da proteína em estudo e pela ajuda nos ensaios de atividade antifúngica contra fungos filamentosos.

À Profa. *Leila Beltramini* e demais integrantes do laboratório de Biofísica Sérgio Mascarenhas, do Instituto de Física de São Carlos, por ter disponibilizado os equipamentos necessários para realização dos experimentos de dicroísmo circular e fluorescência.

À Profa. *Ana Cristina Moreira* e Dr. *Frederico Moreno*, pela realização dos experimentos de espectrometria de massa. Pela colaboração e disponibilidade.

Aos orientandos do prof. Dr. *Hélio Vitoriano*, *João* e *Cecília*, pela indispensável ajuda nos ensaios de atividade antifúngica contra leveduras.

Ao colega *Cícero*, pela ajuda na realização dos experimentos de dicroísmo circular e fluorescência.

Às amigas *Marina*, *Patrícia* e *Suelen*, pela ajuda e colaboração na realização deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Genética Molecular, Profa. Ms. *Maria Aparecida Alves*, *Antônio*, *Beatriz*, *Bruno*, *Edvar*, *Juliana*, *Laisa*, *Lucas*, *Raquel*, *Paloma* e *Thaís*, pela colaboração quando foi necessária.

À querida *Priscila Araújo*, pela ajuda ao longo do desenvolvimento dessa tese.

Aos meus queridos pais *Luís* e *Helena*, pela forma especial que me educaram e me incentivaram.

Aos meus irmãos *Eduardo e Liliane*, meus cunhados *Mirele e Washington* e minha sobrinha *Lara*, por toda a alegria e amor.

Ao meu amado *Hélcio*, por toda paciência, incentivo e companheirismo. Agradeço pela presença e amor nos momentos difíceis.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho.

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:

Universidade Federal do Ceará (UFC).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Ceará (FUNCAP).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.

“Amarás o Senhor, teu Deus, de todo o teu coração, de toda a tua alma e de todo o teu entendimento... Amarás o teu próximo como a ti mesmo.”

Jesus Cristo

(Mt 22: 37-39)

RESUMO

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa, saprófita, não patogênica e de vida livre. A anotação do genoma dessa espécie revelou muitos genes codificando produtos com potenciais aplicações em diversas áreas. Dentre esses produtos estão várias quitinases, enzimas capazes de degradar quitina, um polissacarídeo de *N*-acetil- β -D-glucosamina presente na parede celular de muitos fungos e no exoesqueleto de insetos e crustáceos. As quitinases são de grande interesse biotecnológico, podendo ser utilizadas para converter quitina em derivados úteis, e também para o controle de fungos e insetos que causam danos em culturas agrícolas. O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização bioquímica, estrutural e biológica de uma quitinase recombinante (CV1897), da família 19 das glicosil hidrolases, de *C. violaceum* ATCC 12472. A sequência completa da ORF CV1897 (codificando CV1897_{PS+}, com o peptídeo sinal nativo) foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonada nos vetores pET302/NT-His e pPICZ α A para expressão em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente. A sequência parcial da ORF (rCV1897_{PS-}, sem o peptídeo sinal nativo) foi expressa apenas em *P. pastoris*. Em *E. coli*, a rCV1897_{PS+} foi produzida principalmente em corpos de inclusão, de forma insolúvel e inativa. Em *P. pastoris*, as proteínas (rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-}) foram secretadas para o meio de cultura de forma solúvel e funcional. As enzimas foram purificadas por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, com rendimentos de 1,8 mg/L (rCV1897_{PS+}) e 2,1 mg/L (rCV1897_{PS-}), sendo detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) como duas isoformas com massas moleculares diferentes (43,2 kDa e 51,4 kDa; 44 e 50 kDa, respectivamente). A quitinase recombinante (CV1897_{PS+}) mostrou atividade ótima em Ph 5,0 e foi ativa quando tratada a temperaturas de até 40 °C por 30 min. A Rcv1897 apresentou atividade quitinásica frente a quitina coloidal e glicol-quitina (em gel SDS-PAGE). Os espectros de dicroísmo circular revelaram que a estrutura da proteína possui predominantemente estrutura secundária do tipo α -hélice (37%), com 26% de fitas- β e 38% de estrutura desordenada. Os espectros de fluorescência revelaram que a proteína foi produzida na sua conformação enovelada. A rCV1897_{PS+} inibiu a germinação de conídios e o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Penicillium herquei* e *Colletotrichum lindemuthianum*. As quitinases rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-} em associação com o fluconazol atuaram de forma sinérgica contra diferentes cepas da levedura patogênica *Candida tropicalis*. Os estudos bioquímicos, estruturais e biológicos da rCV1897 poderão ser úteis para aplicação biotecnológica dessa enzima.

ABSTRACT

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative, saprophytic, non-pathogenic and free living bacterium. The annotation of the genome of this species revealed many genes encoding products with potential applications in many areas. Among these products are several chitinases, which are enzymes capable of degrading chitin, a polysaccharide of *N*-acetyl- β -D-glucosamine. Chitin is found in the cell wall of many fungi and in the exoskeleton of insects and crustaceans. Chitinases are of great biotechnological interest because these enzymes can be used to produce useful derivatives from chitin, and also to be exploited for the control of fungi and insects that cause damages in crops. This study aimed to carry out the biochemical, biological and structural characterization of a recombinant chitinase (CV1897) belonging to family GH19 from *C. violaceum* ATCC 12472. The complete sequence of the ORF CV1897 (encoding CV1897_{SP+}, with the native signal peptide) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the vectors pET302/NT-His and pPICZ α A, for expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, respectively. The partial sequence of the ORF CV1897 (encoding CV1897_{SP-}, without the native signal peptide) was expressed only in *P. pastoris*. In *E. coli* the rCV1897_{SP+} was mainly produced as insoluble inclusion bodies. In *P. pastoris*, the two versions of the protein (rCV1897_{PS+} and rCV1897_{PS-}) were secreted into the culture medium, in their soluble and functional form. The enzymes were purified by affinity chromatography on immobilized nickel ions, with yields of 1.8 mg/L (rCV1897_{PS+}) and 2.1 mg/L (rCV1897_{PS-}), being detected by electrophoresis as two isoforms with different molecular weights. The recombinant chitinase (rCV1897_{PS+}) showed optimal hydrolytic activity at pH 5.0 and was active after treatment at temperatures up to 40 °C for 30 min. The rCV1897 showed chitinolytic activity against colloidal chitin and glycol-chitin on SDS-PAGE. Circular dichroism spectra showed that the protein has predominantly α -helical arrangements (37%), also having 26% of β -strands and 38% disordered structure. The fluorescence spectra revealed that the protein was produced in their folded conformation. The rCV1897_{PS+} inhibited the conidial germination and mycelial growth of the phytopathogenic fungi *Penicillium herquei* and *Colletotrichum lindemuthianum*. Both rCV1897_{PS+} and rCV1897_{PS-} in combination with fluconazole acted synergistically against different strains of the human pathogenic yeast *Candida tropicalis*. The biochemical, structural and biological studies of rCV1897 may be useful for biotechnological application of this enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da violaceína.	22
Figura 2	Mecanismo de ação das quitinases.	26
Figura 3	Sequência de aminoácidos codificada pela ORF CV1897 de <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472.	65
Figura 4	Predição de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF CV1897 de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472.	66
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR.	66
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com <i>AvrII</i> e <i>XhoI</i> .	68
Figura 7	Indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>E. coli</i> evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE).	68
Figura 8	Indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>E. coli</i> evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE).	70
Figura 9	Indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>E. coli</i> evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE).	70
Figura 10	Atividade quitinásica específica (U/mg) na fração intracelular solúvel de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada com pET::CV1897 _{PS+} .	71
Figura 11	Atividade quitinásica específica (U/mg) do meio livre de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas com pET::CV1897 _{PS+} .	71
Figura 12	Indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>E. coli</i> evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE).	72
Figura 13	Indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>E. coli</i> evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE).	72
Figura 14	Atividade quitinásica específica (U/mg) na fração intracelular solúvel de <i>E. coli ArcticExpress</i> (DE3) transformada com pET::CV1897 _{PS+} .	74
Figura 15	Atividade quitinásica específica (U/mg) do meio livre de células de <i>E. coli ArcticExpress</i> (DE3) transformada com pET::CV1897 _{PS+} .	74

Figura 16	Purificação de rCV1897 _{PS+} por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.	75
Figura 17	SDS-PAGE de rCV1897 _{PS+} purificada.	75
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos amplificados por PCR.	77
Figura 19	Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> .	79
Figura 20	Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos amplificados por PCR.	79
Figura 21	Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos amplificados por PCR.	80
Figura 22	Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> .	82
Figura 23	Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos amplificados por PCR.	82
Figura 24	Atividade quitinásica total do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>Pichia pastoris</i> GS115.	83
Figura 25	Atividade quitinásica total do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>Pichia pastoris</i> KM71H.	83
Figura 26	Atividade quitinásica específica do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>Pichia pastoris</i> GS115.	85
Figura 27	Atividade quitinásica específica do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>Pichia pastoris</i> KM71H.	85
Figura 28	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE).	87
Figura 29	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE).	88
Figura 30	Atividade quitinásica total do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897 _{PS-} em <i>Pichia pastoris</i> KM71H.	89
Figura 31	Atividade quitinásica específica do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897 _{PS-} em <i>Pichia pastoris</i> KM71H.	89
Figura 32	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE).	91
Figura 33	Purificação de rCV1897 _{PS+} por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.	93

Figura 34	SDS-PAGE de rCV1897 _{PS+} purificada.	93
Figura 35	SDS-PAGE de rCV1897 _{PS+} purificada.	94
Figura 36	Purificação de rCV1897 _{PS-} por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.	96
Figura 37	SDS-PAGE de rCV1897 _{PS-} purificada.	96
Figura 38	Imunodeteccção das quitinases (rCV1897 _{PS+} e rCV1897 _{PS-}) produzidas em <i>P. pastoris</i> .	97
Figura 39	Atividade quitinásica em gel da quitinases (rCV1897 _{PS+} e rCV1897 _{PS-}) produzidas em <i>P. pastoris</i> .	99
Figura 40	Sequência N-terminal de rCV1897 _{PS+} obtida por degradação de Edman.	101
Figura 41	Sequência N-terminal de rCV1897 _{PS-} obtida por degradação de Edman.	102
Figura 42	Resultado da análise da sequência de aminoácidos de CV1897 pelo software <i>NetNGlyc</i> .	103
Figura 43	Resultado da análise da sequência de aminoácidos de CV1897 pelo software <i>NetOGlyc</i> .	103
Figura 44	Resíduos identificados por espectrometria de massa das amostras de rCV1897 _{PS+} e rCV1897 _{PS-} produzidas em <i>P. pastoris</i> e digeridas com tripsina.	105
Figura 45	Atividade relativa da quitinase rCV1897 _{PS+} produzida em <i>P. pastoris</i> , após incubação em diferentes temperaturas (30 a 100 °C) durante 30 min.	106
Figura 46	Efeito do pH na atividade enzimática relativa da quitinase rCV1897 _{PS+} produzida em <i>P. pastoris</i> .	106
Figura 47	Efeito da temperatura na estrutura secundária de rCV1897 _{PS+} medido por dicroísmo circular.	108
Figura 48	Espectro de dicroísmo circular da rCV1897 _{PS+} em função da temperatura.	109
Figura 49	Efeito da temperatura na estrutura secundária da rCV1897 _{PS+} medido por dicroísmo circular.	110
Figura 50	Espectros de fluorescência da rCV1897 _{PS+} .	112
Figura 51	Efeito da rCV1897 _{PS+} sobre o crescimento fúngico.	113

Figura 52	Efeito da rCV1897 _{PS+} sobre a germinação de conídios dos fungos.	114
Figura 53	Efeito de diferentes concentrações da rCV1897 _{PS+} sobre a germinação de conídios do fungo <i>Penicillium herquei</i> .	115
Figura 54	Ensaio de permeabilidade de membrana dos conídios de <i>Penicillium herquei</i> .	117
Figura 55	Análise por citometria de fluxo para avaliação das alterações morfológicas e danos na membrana após exposição de fluconazol e quitinases (CV1897 _{PS+} ; CV1897 _{PS-}) (64µg/mL) em cepas de <i>C.tropicalis</i> FLC-sensível e FLC-resistente.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Purificação de CV1897 _{PS+} produzida em <i>P. pastoris</i> por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.	94
Tabela 2 -	Purificação de CV1897 _{PS-} produzida em <i>P. pastoris</i> por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.	97
Tabela 3 -	Especificidade da quitinase rCV1897 _{PS+} por substratos.	99
Tabela 4 -	Avaliação da atividade antifúngica de CV1897 _{PS+} contra cepas de <i>Candida tropicalis</i> resistentes ao fluconazol, isoladas no Ceará.	118
Tabela 5 -	Avaliação da atividade antifúngica de CV1897 _{PS-} contra cepas de <i>Candida tropicalis</i> resistentes ao fluconazol, isoladas no Ceará.	119

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Dicroísmo circular
DMAB	para-dimetilbenzaldeído
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
DO₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EtBr	Brometo de Etídio
IPTG	Isopropiltiogalactopiranosídeo
kDA	Quilodalton
N- terminal	Amino-terminal
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pET302	Vetor para expressão em <i>Escherichia coli</i>
pPICZαA	Vetor para expressão em <i>Pichia pastoris</i>
pET-CV1897	Vetor recombinante pET302/NT-His com a região codificadora da CV1897
pPIC-CV1897	Vetor recombinante pPICZ α A com a região codificadora da CV1897
rCV1897	CV1897 recombinante
rCV1897_{PS+}	Sequência completa de CV1897
rCV1897_{PS-}	Sequência parcial de CV2897
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletenodiamina

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	21
1.2 Quitina.....	24
1.3 Quitinases: estrutura, funções e aplicações.....	24
1.3.1 <i>Quitinases bacterianas</i>	28
1.3.2 <i>Atividade antifúngica das quitinases bacterianas</i>	29
1.4 Expressão Heteróloga.....	30
1.4.1 <i>Escherichia coli</i>	31
1.4.2 <i>Pichia pastoris</i>	32
1.5 Expressão de quitinases em sistemas heterólogos.....	33
2. HIPÓTESES	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. MATERIAIS	40
4.1 Fungos filamentosos.....	40
4.2 Leveduras.....	40
4.3 Células para clonagem e expressão.....	40
4.4 Plasmídeos.....	40
4.5 Enzimas.....	40
4.6 Reagentes e outros materiais.....	41
5. MÉTODOS	42
5.1 Análises <i>in silico</i> da sequência de aminoácidos da proteína CV1897.....	42
5.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	42
5.3 Amplificação dos fragmentos de DNA CV1897 _{PS+} e CV1897 _{PS-}	43
5.4 Expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>Escherichia coli</i>	44
5.4.1 <i>Obtenção do vetor recombinante (pET302::CV1897_{PS+}) e transformação genética de E. coli</i>	44
5.4.2 <i>Transformação genética de E. coli</i> estirpes BL21(DE3) e ArcticExpress (DE3) com o vetor recombinante pET302::CV1897 _{PS+}	45
5.4.3 <i>Indução da expressão de rCV1897_{PS+} a partir de E. coli</i> BL21(DE3) e	45

<i>ArcticExpress</i> (DE3).....	46
5.4.4 Lise celular.....	46
5.5 Expressão de rCV1897 _{PS+} e rCV1897 _{PS-} em <i>Pichia pastoris</i>	47
5.5.1 Obtenção dos vetores recombinantes pPICZαA::CV1897 _{PS+} e pPICZαA::CV1897 _{PS-}	47
5.5.2 Linearização dos plasmídeos recombinantes pPICZαA::CV1897 _{PS+} e pPICZαA::CV1897 _{PS-}	47
5.5.3 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> GS115 e KM71H com os vetores recombinantes pPICZαA::CV1897 _{PS+} e pPICZαA::CV1897 _{PS-}	48
5.5.4 Indução da expressão de rCV1897 _{PS+} e rCV1897 _{PS-} em <i>Pichia pastoris</i> GS115 e KM71H.....	49
5.6 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes.....	49
5.7 Dosagem de proteínas solúveis.....	50
5.8 Imunodeteção da proteína recombinante imobilizada em membrana (<i>Western blotting</i>).....	50
5.9 Ensaio de atividade quitinolítica.....	51
5.10 Purificação das quitinases recombinantes (rCV1897 _{PS+} e rCV1897 _{PS-}).....	52
5.10.1 Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.....	52
5.10.2 Cromatografia de afinidade em matriz de quitina.....	53
5.10.3 Cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Phenyl Sepharose CL-4B.....	53
5.11 Caracterização bioquímica e estrutural das quitinases recombinantes.....	54
5.11.1 Ensaio de atividade quitinásica em gel.....	54
5.11.2 Ensaio enzimático com substratos sintéticos.....	54
5.11.3 Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal.....	55
5.11.4 Revelação de glicoproteínas pelo método de Schiff.....	56
5.11.5 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da quitinase recombinante.....	56
5.11.6 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da quitinase recombinante.....	56
5.11.7 Espectro de Dicroísmo Circular (CD).....	56
5.11.8 Espectro de Fluorescência.....	57
5.11.9 Espectrometria de massa.....	57
5.12 Atividade antifúngica contra fungos filamentosos.....	59
5.12.1 Cultivo dos fungos.....	59
5.12.2 Obtenção da suspensão de conídios.....	59
5.12.3 Efeito da rCV1897 _{PS+} sobre o crescimento fúngico em meio líquido.....	59
5.12.4 Efeito da rCV1897 _{PS+} sobre a germinação dos conídios.....	60
5.12.5 Ensaio de permeabilidade de membrana de conídios utilizando iodeto de propídeo.....	60

5.13 Atividade antifúngica contra <i>Candida tropicalis</i>	61
5.13.1 Efeito sobre o crescimento e determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	61
5.13.2 Efeito da quitinase recombinante combinada com FLC sobre a integridade da membrana plasmática e a viabilidade celular	62
5.13.2.1 Preparação da suspensão de leveduras.....	62
5.13.2.2 Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular.....	63
6. RESULTADOS	64
6.1 Análise <i>in silico</i> da sequência da proteína CV1897.....	64
6.2 Expressão em <i>Escherichia coli</i>	64
6.2.1 Obtenção do vetor recombinante pET302::CV1897 _{PS+} e transformação de <i>E. coli</i> BL21(DE3) e ArcticExpress (DE3)	64
6.2.2 Indução da expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e ArcticExpress (DE3)	67
6.2.3 Purificação de rCV1897 _{PS+} produzida em <i>E. coli</i>	73
6.3 Expressão em <i>Pichia pastoris</i>	76
6.3.1 Obtenção do vetor recombinante pPICZαA::CV1897 _{PS+} e transformação de <i>P. pastoris</i> GS115 e KM71H.....	76
6.3.2 Obtenção do vetor recombinante pPICZαA::CV1897 _{PS-} e transformação de <i>P. pastoris</i> KM71H.....	78
6.3.3 Expressão de rCV1897 _{PS+} em <i>P. pastoris</i> GS115 e KM71H	81
6.3.4 Expressão de rCV1897 _{PS-} em <i>P. pastoris</i> KM71H	86
6.3.5 Purificação de rCV1897 _{PS+} produzida em <i>P. pastoris</i>	90
6.3.6 Purificação de rCV1897 _{PS-} produzida em <i>P. pastoris</i>	95
6.4 Imunodeteção das quitinases recombinantes (rCV1897 _{PS+} e rCV1897 _{PS-}).....	95
6.5 Caracterização bioquímica e estrutural da quitinase recombinante produzidas em <i>Pichia pastoris</i>	98
6.5.1 Ensaio de atividade quitinásica em gel	98
6.5.2 Ensaio enzimático na presença e ausência de β-glucuronidase.....	98
6.5.3 Ensaio enzimático com substratos sintéticos.....	98
6.5.4 Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal.....	100
6.5.5 Verificação de N-glicosilação na quitinase recombinante.....	100
6.5.6 Verificação de O-glicosilação na quitinase recombinante.....	100
6.5.7 Espectrometria de massa.....	104
6.5.8 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da rCV1897.....	104

6.5.9 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV1897.....	104
6.5.10 Espectro de Dicroísmo Circular (CD).....	107
6.5.11 Espectro de Fluorescência.....	111
6.6 Atividade biológica.....	111
6.6.1 Atividade antifúngica sobre fungos filamentosos.....	111
6.6.2 Atividade antifúngica sobre <i>Candida tropicalis</i>	116
6.7 Avaliação das alterações morfológicas e danos na membrana celular.....	120
7. DISCUSSÃO	122
8. CONCLUSÃO	140
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
10. ANEXOS	157

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é uma β -proteobactéria Gram-negativa de vida livre, saprófita, não patogênica e aeróbica facultativa, da família Neisseriaceae. Essa bactéria é encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes, como por exemplo, na água e nas bordas do Rio Negro, na Amazônia (DURÁN *et al.*, 2001).

Ocasionalmente, *C. violaceum* pode atuar como patógeno oportunista, causando septicemia a partir de lesões na pele expostas a solo ou água contaminada, produzindo abscessos no fígado, pâncreas e pulmão (DURÁN *et al.*, 2001). O primeiro registro de *C. violaceum* como patógeno foi feito por Woolley (1905), em búfalos nas ilhas Filipinas. Em humanos, o primeiro caso de infecção por *C. violaceum* foi documentado na Malásia, em 1927 (SNEATH, 1953). Desde então, pouco mais de 100 casos de infecções em seres humanos foram relatados em todo o mundo, com uma taxa de mortalidade de 53% (YANG; LI, 2011). No Brasil, um caso fatal de infecção por *C. violaceum* foi documentado em 2000, em um agricultor de 30 anos do interior do Estado de São Paulo (MARTINEZ *et al.*, 2000). Em maio de 2004, três irmãos foram infectados por *C. violaceum* após exposição às águas de uma lagoa no município de Ilhéus, Estado da Bahia, dois deles vindo a óbito em virtude de septicemia (SIQUEIRA *et al.*, 2005).

Os primeiros relatos de atividade biológica da *C. violaceum* foram publicados no final da década de 40, quando os cientistas Kidder e Stuart (1939) e Burbank (1942) reportaram suas observações sobre protozoários ciliados que foram rapidamente mortos quando expostos a culturas de *C. violaceum*. Um pigmento púrpura foi considerado o responsável pela ação letal sobre os protozoários (DURÁN *et al.*, 2001).

Muitas estirpes de *C. violaceum* produzem um pigmento púrpura, 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (Figura 1), conhecido como violaceína, isolado pela primeira vez em 1944 (STRONG, 1944). A violaceína é um derivado do indol e é sintetizada a partir de L-triptofano em uma via composta por cinco enzimas (VioA, VioB, VioC, VioD e VioE) (HOSHINO, 2011). Esse composto confere às colônias de *C. violaceum* uma cor violeta característica e também é produzido por outras bactérias, tais como *Janthionobacterium lividum*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Alteromonas luteoviolacea*, dentre outras (DURÁN *et al.*, 2012).

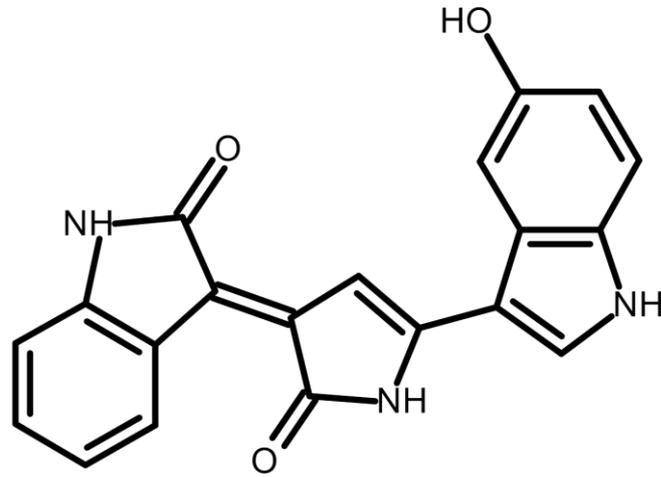


Figura 1 – Estrutura da violaceína. A violaceína {3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona}, é um pigmento púrpura produzido pela *Chromobacterium violaceum*. A estrutura foi desenhada com o programa Accelrys Draw versão 4.0 (disponível no endereço eletrônico www.accelrys.com).

A violaceína exibe diferentes atividades biológicas: atividade bactericida contra *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Pseudomonas aeruginosa* (DURÁN *et al.*, 1983; DURÁN; MENCK, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2003); atividade contra protozoários tais como *Trypanosoma cruzi* (DURÁN *et al.*, 1994), *Leishmania* sp. (LEON *et al.*, 2001) e *Plasmodium* sp. (LOPES *et al.*, 2009); e atividade antiviral (DURÁN & MENCK, 2001) e antiulcerogênica (DURÁN *et al.*, 2003). A violaceína também apresenta efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais, efeito apoptótico em células leucêmicas HL60 (FERREIRA *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2003); inibição da transdução de sinais em células cancerosas do cólon humano (KODACH *et al.*, 2006; DE CARVALHO *et al.*, 2006) e inibição do crescimento do tumor Ehrlich ascites (BROMBERG *et al.*, 2010). Essas atividades podem oferecer possíveis aplicações clínicas da violaceína na terapia contra o câncer. Recentemente, os efeitos imunomodulatórios, analgésicos e antipiréticos foram relatados (DURÁN *et al.*, 2012).

Outros aspectos de interesse biotecnológico dessa bactéria incluem: a capacidade de hidrolisar filmes plásticos (GOURSON *et al.*, 1999); a solubilização de ouro por um processo livre de mercúrio (SMITH; HUNT, 1985) e a síntese de polihidroxicanoatos de cadeia curta, que podem representar uma alternativa aos plásticos derivados de petroquímicos (FORSYTH *et al.*, 1958; STEINBUCHER *et al.*, 1993).

Para uma melhor exploração do potencial biotecnológico desse micorganismo, bem como contribuir para a elucidação dos mecanismos e estratégias relacionadas à sua adaptabilidade a diferentes ambientes, o genoma da estirpe ATCC 12472 de *C. violaceum* foi completamente sequenciado por um consórcio de laboratórios, integrantes do Projeto Genoma Brasileiro (VASCONCELOS *et al.*, 2003). A análise genômica de *C. violaceum* revelou caminhos alternativos para a geração de energia, um número significativo de proteínas relacionadas ao transporte, mobilidade celular e secreção, proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro, proteínas osmoticamente induzidas, e proteínas relacionadas à tolerância a variações de temperatura, acidez e estresse a luz UV, bem como proteínas envolvidas na utilização de *quorum sensing* para o controle de sistemas induzidos. Esse perfil metabólico e fisiológico sustenta, portanto, a versatilidade, competitividade e tolerância de *C. violaceum* às variadas condições de estresse que enfrenta nos seus habitats (VASCONCELOS *et al.*, 2003; GRANGEIRO *et al.*, 2004; HUNGRIA *et al.*, 2004 ; BARRETO *et al.*, 2008). Genes codificando quitinases também foram anotados, e a relevância desse achado está relacionada ao fato dessas proteínas serem potenciais agentes no biocontrole de insetos, fungos e nematóides. Do ponto de vista fisiológico, as quitinases provavelmente são

responsáveis pela capacidade de *C. violaceum* de usar quitina como única fonte de carbono e nitrogênio (STREICHSBIER, 1983).

1.2 Quitina

A quitina é um homopolissacarídeo linear não ramificado de resíduos de *N*-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) unidos por ligações *O*-glicosídicas do tipo β -(1,4). Esse polissacarídeo é o principal constituinte estrutural da parede celular de muitos fungos e do exoesqueleto de invertebrados, como insetos e crustáceos (LEE *et al.*, 2010). Depois da celulose, a quitina é o polissacarídeo mais abundante na natureza (LEE *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2008).

Na quitina, as longas cadeias de poli-GlcNAc se empacotam lado a lado formando folhas, e nessas folhas a interação entre cadeias adjacentes se dá por meio de pontes de hidrogênio entre os grupamentos amina de uma cadeia e os grupos carbonila da cadeia adjacente. A quitina forma arranjos microfibrilares nos organismos vivos e pode ser classificada em três diferentes formas cristalinas: α , β e γ . Elas diferem principalmente quanto ao grau de hidratação, tamanho da unidade celular e número de cadeias de quitina por unidade celular. Na forma α , as microfibrilas estão dispostas em orientação antiparalela ($\uparrow\downarrow$), enquanto que na forma β , as microfibrilas são orientadas em paralelo ($\uparrow\uparrow$). Já a forma γ possui uma formação mista de microfibrilas em orientações antiparalelas e paralelas ($\uparrow\uparrow\downarrow$) (SIKORSKI *et al.*, 2009; NISHIYAMA *et al.*, 2011).

Diversos organismos produzem uma variedade de enzimas quitinolíticas, como as quitinases, por exemplo, que estão envolvidas na degradação da quitina. Essas enzimas possuem especificidades e propriedades catalíticas diferentes, e suas funções fisiológicas incluem nutrição, parasitismo, reciclagem de quitina, morfogênese e defesa (HOWARD *et al.*, 2003).

1.3. Quitinases: estrutura, funções e aplicações

Quitinases (EC 3.2.1.14) são glicosil hidrolases (GHs) que clivam as ligações covalentes β -1,4 entre os resíduos de GlcNAc das cadeias que formam a quitina. Tomando como base as similaridades nas suas sequências de aminoácidos, as quitinases são classificadas como pertencentes às famílias 18 e 19 das GHs (HENRISSAT, 1991;

HENRISSAT; BAIROCH, 1993). Os membros dessas duas famílias diferem quanto à sequência de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos moleculares das reações catalíticas, possuindo, portanto, diferentes origens evolutivas (MIZUNO *et al.*, 2008a).

As quitinases da família GH18 são encontradas em arqueias, bactérias, fungos, vírus, animais e plantas (classes III e V). O domínio catalítico das quitinases da família GH18 possui uma estrutura tridimensional caracterizada por um barril $(\beta/\alpha)_8$, ou barril TIM (triose fosfato isomerase), com oito hélices α e oito fitas β (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007). O mecanismo de hidrólise apresentado pelos membros desta família é a catálise assistida pelo substrato (Figura 2A), que retém a configuração (β) do carbono anomérico do resíduo de GlcNAc que ocupa o subsítio -1 do sítio de ligação ao substrato da enzima (ISELI *et al.*, 1996).

Quitinases da família GH19 são encontradas em plantas (classes I, II e IV), nematódeos, vírus e bactérias, como por exemplo *Streptomyces griseus* (UBHAYASEKERA, 2011). A ocorrência de quitinases da família GH19 em espécies de *Streptomyces* e outros gêneros da classe Actinobacteria é um aspecto bem estabelecido (WATANABE *et al.*, 1999; KAWASE *et al.*, 2006). Além de Actinobacteria, as bactérias verdes não sulfurosas (filo Chloroflexi) e as bactérias púrpuras (filo Proteobacteria) são os únicos grupos de Bacteria que possuem quitinases GH19 (UDAYA PRAKASH *et al.*, 2010), o que revela uma distribuição mais restrita dessas quitinases em relação àquelas da família GH18. O domínio catalítico das quitinases da família GH19 têm um elevado conteúdo de α -hélices e uma estrutura tridimensional semelhante àquelas encontradas em quitosanases (EC 3.2.1.132) e lisozimas (EC 3.2.1.17) (CHUANG *et al.*, 2008). Os membros desta família hidrolisam o substrato por um mecanismo de catálise ácida (Figura 2B), no qual ocorre a inversão da configuração do carbono anomérico (de β para α) do resíduo de GlcNAc que ocupa o subsítio -1 do sítio de ligação ao substrato (ISELI *et al.*, 1996). A estrutura tridimensional das quitinases dessa família foi inicialmente relatada para uma quitinase de classe II de cevada (HART *et al.*, 1995).

Dependendo do padrão de clivagem, as quitinases podem ser divididas em duas categorias: endo- e exoquitinases (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998). As endoquitinases clivam aleatoriamente a quitina em sítios no interior da cadeia, produzindo uma mistura de oligômeros de GlcNAc de baixo peso molecular, como quitotriose $[(\text{GlcNAc})_3]$, quitotetraose $[(\text{GlcNAc})_4]$ e diacetilquitobiose $[(\text{GlcNAc})_2]$. Já as exoquitinases (ou quitobiosidases) clivam a quitina de forma regular em sítios no interior da cadeia, catalisando a liberação progressiva de um único produto, diacetilquitobiose, a partir da extremidade não-redutora do

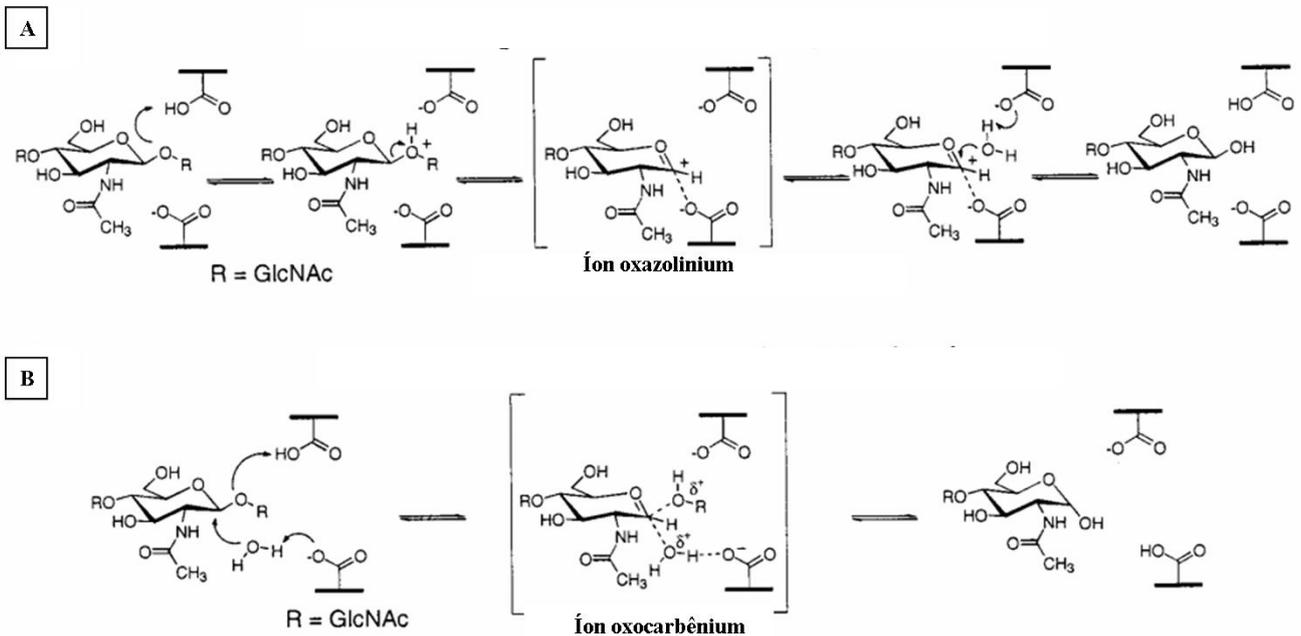


Figura 2 – Mecanismo de ação das quitinases. (A) Mecanismo de hidrólise por duplo-deslocamento proposto para quitinases da família GH18. A protonação de um resíduo de GlcNAc leva à formação de um intermediário, que pode ser hidrolisado para formar um produto com a retenção da configuração anomérica. (B) Mecanismo de hidrólise por deslocamento único, proposto para as quitinases da família GH19. Dois resíduos de aminoácidos são requeridos no sítio ativo e o produto da hidrólise tem a inversão da configuração anomérica. Fonte: BRAMELD; GODDARD, 1998, com algumas modificações.

polissacarídeo (LI, 2006; SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008). Ambos os tipos (endo- e exoquitinases) ocorrem tanto nas quitinases GH18 como naquelas da família GH19.

Estas proteínas possuem diferentes papéis fisiológicos e ecológicos para cada organismo. Nos fungos, as quitinases são utilizadas nos processos de desenvolvimento e estão envolvidas com a nutrição e morfogênese (SAHAI; MANOCHA, 1993; ADAMS, 2004). Nos artrópodes, são importantes no desenvolvimento pós-embriônico, particularmente na degradação das cutículas e da matriz peritrófica durante o processo de muda (MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003). Nos vírus, estão envolvidas com a patogênese (GOODAY, 1995). As quitinases produzidas pelas plantas fazem parte do mecanismo de defesa contra organismos que possuem quitina em sua estrutura (GRAHAM; STICKLEN, 1994). Nas bactérias, estas enzimas têm um importante papel na degradação da quitina para utilização como fonte de carbono, nitrogênio e energia, e dessa forma, possibilitam a reciclagem de quitina na natureza (HOLLAK *et al.*, 1994; BOOT *et al.*, 2001). O papel das quitinases nos humanos ainda não foi esclarecido, contudo, podem estar envolvidas na defesa contra patógenos quitinosos e no metabolismo de carboidratos (SOUZA *et al.*, 2011).

Dois diferentes quitinases de humanos encontradas possuem atividade quitinolítica, a quitotriosidade (CHIT-1) e a quitinase ácida de mamíferos (AMCase). O nível destas enzimas pode variar em resposta a infecções fúngicas, o que sugere a possibilidade de utilizar essa resposta como diagnóstico. CHIT-1 é altamente expressa por macrófagos ativado e é usada como marcador para a estimulação de macrófagos, sugerindo um possível papel na imunidade inata. Esta proteína foi primeiramente descoberta no plasma de pacientes com a doença de Gaucher, que está relacionada com o metabolismo de lipídeos. Diferentes ensaios mostraram que o nível de CHIT-1 no plasma aumenta cerca de 100 vezes em pacientes com esta doença. Dessa forma, esta enzima vem sendo utilizada como um biomarcador para o diagnóstico da doença de Gaucher. Já a quitinase AMCase vem sendo estudada como biomarcador para asma (VEGA; KALKUM, 2012).

Além das diferentes funções que as quitinases desempenham nos organismos onde são encontradas, essas proteínas tem atraído grande interesse do ponto de vista biotecnológico, em virtude das diversas aplicações potenciais que as mesmas podem ter. Assim, quitinases podem ser utilizadas para converter biomassa contendo quitina em derivados úteis, serem exploradas para o controle de fungos patogênicos e insetos-praga que atacam culturas agrícolas (CEASAR; IGNACIMUTHU, 2012; FANG; AZIMZADEH; ST LEGER, 2012), além de poder ser empregadas em cuidados com a saúde humana, como por exemplo, no uso de preparações oftálmicas, juntamente com outros microbicidas (PATIL *et*

al., 2000). Alguns produtos oriundos da bioconversão da quitina pela ação hidrolítica, como os quitto-oligosacarídeos, possuem importância médica, uma vez que apresentam ação antitumoral, anti-inflamatória e antifúngica (AAM *et al.*, 2010). Além disso, monômeros de GlcNAc podem ser usados como adoçantes e suplementos nutricionais (HUANG *et al.*, 2012).

1.3.1 Quitinases bacterianas

A reciclagem da quitina no ecossistema marinho é atribuída principalmente a bactérias quitinolíticas (SOUZA *et al.*, 2011). A quitina é um elemento constituinte do exoesqueleto de zooplâncton, de larvas de invertebrados, da parede celular de algumas clorofíceas e do material extracelular de algumas diatomáceas (COTTRELL *et al.*, 1999). Somente na biosfera aquática, estima-se que mais de 10^{11} toneladas de quitina são produzidas por ano pelo zooplâncton, em processos de muda e senescência. Na perspectiva ecológica, a degradação da quitina é importante para a reciclagem de nutrientes, liberando carbono e nitrogênio para o ecossistema marinho (KEYHANI; ROSEMAN, 1999).

A capacidade de degradar quitina tem sido descrita em muitas bactérias que vivem no ambiente marinho, incluindo *Alteromonas* sp., *Microbulbifer degradans*, *Moritella marina*, *Salinivibrio costicola*, *Streptomyces* sp., *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio furnissi* e *Vibrio proteolyticus* (SOUZA *et al.*, 2011).

Diferentes genes que codificam quitinases têm sido identificados de fontes bacterianas, como por exemplo, em *Bacillus circulans*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces thermoviolaceus* e *Streptomyces coelicolor*. (NAZARI *et al.*, 2011).

As bactérias produzem vários tipos de quitinases, provavelmente para hidrolisar a grande variedade de quitina encontrada na natureza. *Vibrio harveyi*, por exemplo, secreta cerca de dez diferentes quitinases quando cultivado em meio de cultura contendo quitina. A produção dessas quitinases varia em resposta a estrutura da quitina encontrada no meio, provando que a bactéria pode distinguir entre os diferentes tipos de arranjos de quitina. *V. harveyi* apresentou uma maior taxa de crescimento e mais alta atividade quitinásica quando cultivado na presença de β -quitina do que em α -quitina. Svitil e colaboradores (1997) sugerem que o arranjo paralelo das microfibrilas em β -quitina permite um acesso mais fácil para as enzimas bacterianas.

A maioria das quitinases de bactérias identificadas pertence à família GH18

(KEYHANI; ROSEMAN, 1999). Quitinases bacterianas da família GH19 se restringem as actinobactérias, bactérias verdes não sulfurosas e ao grupo de bactérias púrpuras (PRAKASH *et al.*, 2010). A quitinase C (Chic) de *Streptomyces griseus* HUT6037 foi a primeira quitinase da família GH19 encontrada em bactéria. Esta quitinase possui um domínio catalítico homólogo ao de quitinases vegetais das classes I, II e IV, e um domínio de ligação a quitina que possui similaridade com domínios de ligação a quitina de algumas quitinases bacterianas da família GH18, incluindo quitinases A1 e D1 de *Bacillus circulans* WL-12 (WATANABE *et al.*, 1999). Devido à similaridade entre sequências de quitinases de bactérias e de plantas e a presença de resíduos altamente conservados entre as estruturas tridimensionais de uma quitinase de mamão (*Carica papaya*) e a uma quitinase bacteriana de *S. griseus*, hipotetizou-se que ambas teriam a mesma origem evolutiva. Acredita-se que, para o gene da quitinase de *Streptomyces* sp., este tenha sido adquirido através de processos de transferência horizontal entre bactérias do solo e vegetais superiores (PRAKASH *et al.*, 2010).

As quitinases bacterianas são separadas em três grandes subfamílias: A, B e C, com base na sequência de aminoácidos de cada um dos domínios catalíticos (WATANABE *et al.*, 1993). Nas quitinases da subfamília A, existe um domínio de inserção entre a fita $\beta 7$ e a hélice $\alpha 7$ da estrutura do barril $(\beta/\alpha)_8$, estando este domínio ausente nas subfamílias B e C. A estrutura tridimensional (3D) de algumas quitinases bacterianas já foram determinadas, como da quitinase A (Chia) e B (ChiB) de *Serratia marcescens* QMB1466 e da quitinase A1 (ChiA1) de *Bacillus circulans* WL-12, ambas pertencentes à família GH18 e subfamília A. Já a quitinase C (Chic) de *S. griseus* HUT6037 foi a primeira quitinase bacteriana da família GH19 cuja estrutura 3D foi determinada (CHUANG *et al.*, 2008).

1.3.2. Atividade antifúngica das quitinases bacterianas

A parede celular dos fungos protege o organismo contra um ambiente hostil e transmite sinais para a invasão e infecção de hospedeiros como plantas, animais e humanos. Esta parede é uma estrutura complexa formada por quitina, vários glucanos, lipídeos e peptídeos incorporados em uma matriz proteica (SELITRENNIKOFF *et al.*, 2001). A quitina constitui de 22 a 44% da parede celular dos fungos (SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008).

Várias classes de proteínas antifúngicas estão envolvidas na inibição da síntese da parede celular dos fungos ou na ruptura da estrutura desta parede, e outras agem na estrutura da membrana, resultando na lise celular (SELITRENNIKOFF *et al.*, 2001).

O grande interesse no estudo das quitinases é principalmente devido as suas propriedades antifúngicas (MATROUDI *et al.*, 2008). A atividade inibitória das quitinases está relacionada com a proporção de quitina presente na parede celular de cada fungo. Aqueles fungos cuja proporção de quitina na parede celular for menor, serão menos susceptíveis às quitinases, visto que este é o único substrato presente na parede sobre o qual a enzima pode atuar. Além disso, a microestrutura desta parede deve ser levada em conta, uma vez que há variações da exposição das ligações β -1,4-glicosídicas da quitina nas diferentes paredes celulares. Em teoria, a quitinase pode interagir facilmente com a quitina, presente na parede celular do fungo, quando o arranjo dos componentes da parede se dá de forma a expor, na superfície, as ligações glicosídicas das fibras de quitina. Se, no arranjo da parede, tais ligações estiverem menos expostas, menor será a ação imediata da quitinase. Quanto mais facilmente a quitinase interagir com seu substrato na parede celular do fungo, maior será a velocidade da hidrólise da quitina e, conseqüentemente, maior será a inibição sobre o fungo (YAN *et al.*, 2008).

As bactérias produzem quitinases com a função principal de degradar quitina e usar esse polissacarídeo abundante na natureza como fonte de carbono. Entretanto, algumas quitinases de bactéria também possuem elevada atividade antifúngica, como as isoladas de *Serratia plymuthica* (FRANKOWSKI *et al.*, 2001), *Alcaligenes xylosoxydans* (VAIDYA *et al.*, 2003), *Enterobacter* sp. NRG4 (DAHIYA *et al.*, 2005b), *Bacillus thuringiensis* (*Bt.*) (DRISS *et al.*, 2005) e *Bacillus cereus* (HUANG *et al.*, 2005). Assim, os genes que codificam essas quitinases são potenciais alternativas para a proteção de plantas.

Segundo Vaidya e colaboradores (2003), a quitinase produzida por *Alcaligenes xylosoxydans* inibiu o crescimento de *Fusarium udum* e *Rhizoctonia bataticola*. Já a quitinase produzida por *Enterobacter* sp. NRG4 foi ativa contra *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxi* e *Rhizopus nigricans* (DAHIYA *et al.*, 2005b). *Bacillus cereus* produz uma quitinase (ChiCW) que se mostrou efetiva contra o patógeno fúngico *Botrytis elliptica* (HUANG *et al.*, 2005). A quitinase purificada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* apresentou atividade lítica contra a parede celular de seis fungos fitopatogênicos e inibiu o crescimento micelial de *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfii* (DE LA VEGA, *et al.*, 2006).

1.4. Expressão heteróloga

A produção de proteínas recombinantes envolve a clonagem de um determinado gene em um vetor de expressão sob o controle de um promotor. Os fatores que influenciam o

nível de expressão incluem a estabilidade e a eficiência do mRNA, o correto enovelamento da proteína, a degradação por proteases e a toxicidade da proteína (SCHUMANN *et al.*, 2004). Os sistemas heterólogos produzem proteínas com uma sequência de aminoácidos definida e permitem que a relação entre sequência e função da proteína possa ser explorada (LUO *et al.*, 2005).

Proteínas podem ser expressas em culturas de células de bactérias, leveduras, mamíferos e insetos, ou por meio de animais e plantas transgênicas (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Para a escolha do sistema de expressão ideal, devem ser levados em conta a produtividade, a bioatividade, o propósito e as características físico-químicas da proteína de interesse, além do custo, conveniência e segurança do próprio sistema (YIN *et al.*, 2007).

O crescimento da demanda mundial por proteínas recombinantes ajudou no progresso da engenharia de bioprocessos em relação ao desenvolvimento de sistemas de produção economicamente viáveis. Em 2004, o mercado global de proteínas terapêuticas recombinantes foi no valor de 44 bilhões de dólares e em 2010, o esperado foi de 70 bilhões de dólares (POTVIN *et al.*, 2012). Entre as proteínas farmacêuticas recombinantes já produzidas, podemos citar a insulina humana, a albumina, o fator VIII de coagulação e o hormônio de crescimento humano. Proteínas não glicosiladas são usualmente produzidas em *Escherichia coli* ou leveduras, e as mesmas representam cerca de 40% do mercado de proteínas terapêuticas. (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

1.4.1. *Escherichia coli*

A bactéria Gram-negativa *E. coli* é um dos hospedeiros mais utilizados na produção de proteínas heterólogas. A escolha por esse sistema resulta do fato de ser um organismo bem caracterizado em relação aos aspectos bioquímico e genético. Esse sistema de expressão também apresenta uma rápida taxa de multiplicação e expressão, fácil cultivo, baixo custo e alto rendimento do produto (HUANG; LIN; YANG, 2012). Aproximadamente 80% das proteínas usadas para resolver estruturas tridimensionais do PDB (Protein Data Bank), até 2003, foram obtidas de forma recombinante em *E. coli* (SORENSEN; MORTENSEN, 2005).

Escherichia coli pode acumular proteínas recombinantes em até 80% do seu peso seco e sobreviver em uma variedade de condições ambientais (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Entretanto, existem algumas limitações na produção de proteínas em *E. coli*, como a incapacidade de realizar algumas modificações pós-traducionais e formação de pontes

dissulfeto (HUANG; LIN; YANG, 2012). Por ser o processamento pós-traducional de uma pré-pro-teína um evento fundamental para a produção da proteína biologicamente ativa, os mecanismos de processamento pós-traducional das proteínas devem ser compreendidos em detalhes. A criação de sistemas heterólogos para a produção de proteínas recombinantes tem contribuído de forma efetiva com o esclarecimento da biossíntese e processamento das mesmas (STREICHER; SHARON, 2003).

As proteínas podem ser expressas em *E. coli* de diferentes maneiras: secretadas para o meio extracelular ou espaço periplasmático, e intracelular, de forma solúvel ou formando os corpos de inclusão, que resultam de uma falha do sistema de reparo ou remoção de proteínas desenoveladas ou enoveladas incorretamente (HUANG; LIN; YANG, 2012). Para a obtenção de proteínas solúveis, faz-se necessária a aplicação de métodos apropriados de solubilização e renaturação das proteínas recombinantes (MIDDELBERG, 2002). Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para evitar a formação desses agregados insolúveis, como: vetor com baixo número de cópias, promotor fraco, indução em baixas temperaturas, co-expressão de chaperonas moleculares. Proteínas recombinantes também podem ser produzidas na sua forma solúvel e ativa, quando seus genes são fundidos com o gene que codifica a tiorredoxina, uma pequena proteína solúvel (~11 KDa) de *E. coli* (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A recuperação de proteínas biologicamente ativas de corpos de inclusão também tem algumas vantagens. Os corpos de inclusão podem ser acumulados no citoplasma em níveis muito mais elevados que as proteínas solúveis. Os mesmos são resistentes à proteólise por proteases de *E. coli*, permitindo um alto rendimento da proteína recombinante. Esses agregados não têm atividade biológica, facilitando a produção de proteínas que normalmente seriam tóxicas em *E. coli* (CHOI *et al.*, 2006; HUANG; LIN; YANG, 2012).

1.4.2 Pichia pastoris

As leveduras são frequentemente utilizadas para produzir proteínas recombinantes cuja expressão não foi bem sucedida em *E. coli* devido à problemas como enovelamento e glicosilação. As estirpes de leveduras são bem caracterizadas e conhecidas por realizar modificações pós-traducionais, como processamento proteolítico, dobramento, formação de pontes dissulfeto, glicosilação, metilação, acilação e endereçamento da proteína para compartimentos subcelulares. As mais utilizadas são: *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (LI *et al.*, 2007; DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Pichia pastoris é um dos sistemas de expressão heteróloga mais eficazes e versáteis. Esse sistema é de grande interesse industrial devido ao forte promotor derivado do gene da álcool oxidase I (*AOX1*), a capacidade para a secreção de proteínas recombinantes, a habilidade em realizar modificações pós-traducionais e a forte preferência pelo crescimento em condições aeróbicas, uma característica fisiológica chave que facilita muito o seu cultivo em altas densidades celulares em relação a leveduras fermentadoras (POTVIN *et al.*, 2012). O sistema *P. pastoris* também é considerado como sendo mais rápido, mais fácil e mais barato do que sistemas de expressão derivados de eucariontes superiores, tais como células de insetos e de mamíferos e, normalmente, resulta em níveis mais altos de expressão (CREGG *et al.*, 2000).

A levedura metilotrófica *P. pastoris* é capaz de metabolizar o metanol como única fonte de carbono. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a sua oxidação a formaldeído, usando oxigênio molecular pela enzima álcool oxidase. Esta reação gera também peróxido de hidrogênio. Para evitar a toxicidade, este produto é sequestrado em peroxissomos. A enzima álcool oxidase possui pouca afinidade pelo oxigênio molecular, fato compensado pela grande produção desta enzima na levedura. O promotor que regula a produção da álcool oxidase em *P. pastoris* é o mesmo que tem sido usado em muitos vetores para dirigir a expressão da proteína recombinante. Existem dois genes (*AOX1* e *AOX2*) que codificam a enzima álcool oxidase, sendo que a maior parte da atividade no metabolismo do metanol se deve ao produto do gene *AOX1* (CREGG *et al.*, 2000; CEREGHINO *et al.*, 2002).

A expressão de um gene exógeno em *P. pastoris* envolve três etapas básicas: (1) clonagem do gene em um vetor de expressão; (2) integração do vetor de expressão no genoma de *P. pastoris*; e (3) seleção das estirpes de expressão para o gene escolhido (LI *et al.*, 2007). A expressão pode ser intracelular ou secretada. A secreção requer a presença de uma sequência sinal na proteína expressa para o devido endereçamento na via secretória. O sinal de secreção (fator α) de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido usado com sucesso (CREGG *et al.*, 1993). Uma grande vantagem de obter a proteína secretada é que *P. pastoris* secreta um nível muito baixo de proteínas, fazendo com que a proteína recombinante compreenda a maioria do total de proteínas secretadas no meio (BARR *et al.*, 1992).

1.5. Expressão de quitinases em sistemas heterólogos

Quitinases de diversos organismos já foram produzidas em sistemas heterólogos. Essas enzimas podem conferir uma maior resistência contra patógenos que contém quitina, ou

até mesmo ajudar na reciclagem de quitina em ambientes ricos em quitina. Entre as quitinases bacterianas expressas em *E. coli*, estão as de *Pseudomonas* sp. (JANG *et al.*, 2005), *Aeromonas hydrophila* (LAN *et al.*, 2006), *Sanguibacter* sp. (YONG *et al.*, 2006), *Streptomyces coelicolor* (KAWASE *et al.*, 2006), *Vibrio parahaemolyticus* (KADOKURA, *et al.*, 2007), *Chromobacterium* sp. (PARK, *et al.*, 2007), *Bacillus subtilis* (YANG, *et al.*, 2008), *Serratia proteamaculans* (MEHMOOD *et al.*, 2009) e *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* (LIU *et al.*, 2010).

A quitinase recombinante de *Sanguibacter* sp. expressa em *E. coli* foi detectada tanto na fração insolúvel como no meio de cultura, com massa molecular aparente menor, sugerindo que o peptídeo sinal foi reconhecido e clivado pela célula hospedeira e a proteína recombinante foi secretada para o meio extracelular. Este resultado também foi confirmado pela detecção de atividade quitinásica no meio de cultura (YONG *et al.*, 2006).

A bactéria *S. coelicolor* A3(2) produz 11 quitinases da família GH18 e duas da GH19. Para comparar as propriedades enzimáticas das quitinases das famílias 18 e 19 produzidas por essa mesma bactéria, quatro quitinases (Chi18bA, Chi18aC, Chi18aD, e Chi19F), cujos genes são expressos em níveis elevados em presença de quitina, foram produzidas em *E. coli* e purificadas. Observou-se que o efeito do pH na atividade hidrolítica foi muito diferente, não só entre as quatro quitinases, mas também entre os substratos. A atividade hidrolítica da Chi19F, quitinase da família 19, contra substratos solúveis foi extremamente alta, em comparação com as três da família 18 quitinases, mas foi a menor contra substratos cristalinos entre as quatro quitinases. Pelo contrário, Chi18aC, uma quitinase da família 18, sub-família A, mostrou maior atividade contra substratos cristalinos. Apenas Chi19F exibiu atividade antifúngica significativa (KAWASE *et al.*, 2006).

Segundo Yang e colaboradores (2008), a quitinase de *B. subtilis* expressa em *E. coli* exibiu elevada e estável atividade quitinásica em quitina coloidal e inibiu o crescimento do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

A quitinase de *S. proteamaculans* 18A1 foi expressa em *Escherichia coli* por Mehmood e colaboradores (2009) e a enzima recombinante purificada foi ativa em uma ampla faixa de pH (pH 4.5 a 9) e temperatura (4 a 70 °C), com um pico de atividade em pH 5,5 e temperatura de 55 °C, e além disso, mostrou atividade inibitória na germinação dos esporos e crescimento das hifas dos fungos patogênicos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*.

Lobo (2009) relatou a expressão da quitinase CV2935 de *C. violaceum* em *E. coli*. Nesse trabalho, a proteína recombinante teve seu peptídeo sinal intrínseco reconhecido e clivado pela célula hospedeira, sendo secretada para o meio extracelular após 24 horas de

cultivo a 37 °C, com massa molecular aparente de 43 kDa, de acordo com o esperado para a rCV2935 madura. A quitinase recombinante foi purificada por meio de cromatografia de afinidade em matriz de quitina e apresentou elevada atividade quitinásica, demonstrando que foi produzida de maneira funcional.

Liu e colaboradores (2010) produziram a quitinase A de *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* (ChiA) no meio de cultura de *E. coli*. A enzima recombinante se mostrou ativa nas temperaturas de 20 a 60 °C e em pH variando de 4.0 a 8.0. O pico de atividade foi em 50 °C e pH 5.0 e a mesma foi inibida por Ag⁺ e Zn²⁺. ChiA inibiu a germinação de esporos dos fungos *R. solani*, *Physalospora piricola*, *Penicillium chrysogenum* e *Botrytis cinerea*.

Muitas quitinases vegetais também já foram expressas em *E. coli*, como as de classe I de feijão-de-corda (CORREIA, 2007), de banana (FAN *et al.*, 2007), de cevada (KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007) e de arroz (MIZUNO *et al.*, 2008).

Correia (2007) relatou a clonagem da sequência codificadora de uma quitinase de classe I de feijão-de-corda em *E. coli*. A proteína recombinante foi obtida em corpos de inclusão. Após a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de *Sepharose* com níquel imobilizado, a quitinase recombinante não apresentou atividade quitinásica. A quitinase de classe I de banana foi expressa em *E. coli* na sua forma solúvel e ativa. A enzima recombinante apresentou efeito inibitório no crescimento do fungo *Gloeosporium musarum* (FAN *et al.*, 2007). Kirubakaran e Sakthivel (2007) clonaram e expressaram a sequência codificadora de uma quitinase de classe I de cevada em *E. coli*. Porém, estes autores obtiveram uma quitinase expressa na forma insolúvel. Após “refolding”, seguido de purificação, a proteína foi utilizada em ensaios antifúngicos contra importantes fungos fitopatogênicos, mostrando-se ativa nas doses de 100 e 300 µg.

A atividade antifúngica de algumas quitinases é comparável a fungicidas químicos e seu efeito é expresso em uma ampla gama de patógenos. Além disso, as mesmas exibem um efeito sinérgico significativo quando usado em combinação com proteínas relacionadas à patogênese (PR), fungicidas comerciais ou estirpes bacterianas empregadas no controle biológico (PIETRO *et al.*, 1993; LORITO, *et al.*, 1996 apud SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008). Plantas transgênicas expressando diferentes quitinases apresentaram um aumento na resistência às doenças causadas por fungos (CEASAR; IGNACIMUTHU, 2012).

Diferentes quitinases bacterianas têm sido expressas em plantas, como as de *Serratia marcescens* (JACH *et al.*, 1992), *S. plymuthica* (SHAKHBAZAU, 2005), *Streptomyces griseus* (RAHAM *et al.*, 2008), *S. olivaceoviridis* (HASSAN *et al.*, 2009) e *Bacillus pumilus* (DEHESTANI *et al.*, 2010).

Jach e colaboradores (1992) expressaram a quitinase de *S. marcescens* em *Nicotiana tabacum*. As plantas transformadas tiveram um aumento na resistência ao fungo *R. solani* e a mortalidade das plantas transgênicas crescidas em solo infectado foi 60% menor que os genótipos controle. A endoquitinase de *S. plymuthica* expressa em *N. tabacum* apresentou a capacidade de reduzir o crescimento de fungo patogênico *F. oxysporum* em até 60% em relação ao controle, bem como diminuir o nível de germinação dos esporos de *B. cinerea* (SHAKHBAZAU, 2005).

Hassan e colaboradores (2009) expressaram a quitinase de *S. olivaceoviridis* em *Pisum sativum* e os resultados mostraram que as plantas transgênicas inibiram ou retardaram a extensão das hifas de *Trichoderma harzianum*.

Segundo Dehestani e colaboradores (2010), a quitinase de *B. pumilus* foi expressa em *Arabidopsis thaliana* e apresentou um alto efeito inibitório na germinação dos esporos e no crescimento radial das hifas de *Alternaria brassicicola*, *Fusarium graminearum* e *B. cinerea*.

A expressão de quitinases de bactérias, fungos, insetos, plantas e até de humanos em *P. pastoris* também tem sido relatada. A endoquitinase do fungo *Chaetomium globosum* (CHI46) foi produzida de forma ativa em *P. pastoris*. O pico de atividade foi em 45 °C e pH 5,0 e a mesma foi eficaz na degradação da parede celular dos fungos fitopatogênicos *R. solani*, *F. oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Valsa sordida*, *Septoria tritici* e *Phytophthora sojae* (LIU *et al.*, 2008). Wang e Yang (2009) expressaram uma quitinase da família GH18 do fungo *Chaetomium cupreum* (CHI58) em *P. pastoris*. A enzima possui massa molecular aparente de 58 kDa e também apresentou um pico de atividade em 45 °C e pH 5,0, quando a quitina coloidal foi usada como substrato.

Segundo Fitches e colaboradores (2004), a quitinase do inseto *Lacanobia oleracea* foi produzida de forma funcional em *P. pastoris*. A proteína recombinante mostrou-se altamente tóxica para larvas de *L. oleraceae*, causando 100% de mortalidade em baixas concentrações (2,5 µg/g de inseto).

Park e colaboradores (2002) clonaram e expressaram duas quitinases de classe III (OsChib1a e OsChib1b) de arroz (*Oryza sativa* L.) em *P. pastoris*. As quitinases recombinantes degradaram ativamente a glicol-quitina em pH 4,3 e 8,3, respectivamente. Somente a OsChib1b mostrou forte atividade lítica e atividade antifúngica significativa.

A quitinase de classe III de bambu (*Bambusa oldhami*) foi expressa em *P. pastoris*. Duas quitinases recombinantes com massa moleculares de aproximadamente 28,3 e 35,7 kDa foram purificadas, sendo a última uma isoforma glicosilada. Ambas apresentaram-se

enzimaticamente ativas contra glicol-quitina e apresentaram atividade antifúngica contra *Scolecobasidium longiphorum*, além de apresentarem estabilidade térmica acima de 70 °C (KUO *et al.*, 2008)

Liu e colaboradores (2010) produziram a endoquitinase de *Limonium bicolor* (Lbchi31) de forma ativa em *P. pastoris*. O pico de atividade foi em 40 °C e pH 5,0 e a mesma foi efetiva na degradação da parede celular dos fungos fitopatogênicos *R. solani*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *V. sordida*, *S. tritici* e *P. sojae*.

Goodrick e colaboradores (2001) conseguiram produzir uma quitinase humana (rh-chitinase) com rendimento de 200 a 400 mg/L da proteína recombinante.

Algumas quitinases bacterianas também já foram produzidas na levedura *P. pastoris*. Lee e colaboradores (2010) produziram a endoquitinase de *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 (rChi21702) usando a otimização de códons. O pico de atividade foi em 37 °C e pH 7,6 e o rendimento da proteína recombinante foi de 1 mg/L de cultura.

As quitinases de *C. violaceum* codificadas pelas ORFs CV3316, CV2736 e CV2935 também foram produzidas por essa levedura (TEIXEIRA, 2011; LOBO, 2012; MEDEIROS, 2012). Teixeira (2011) relatou a expressão da quitinase CV3316, pertencente à família GH18, de forma solúvel e ativa contra quitina coloidal e substratos sintéticos. Entretanto, a CV3316 não se mostrou efetiva contra os fungos fitopatogênicos analisados. A quitinase CV2736 da família GH18 foi produzida em *P. pastoris* com sucesso, sendo secretada para o meio de cultura de forma solúvel e com atividade hidrolítica contra quitina coloidal e substratos sintéticos. Uma fração enriquecida com essa proteína exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MEDEIROS, 2012).

Lobo (2012) expressou a endoquitinase CV2935, pertencente à família GH18, de maneira funcional em *P. pastoris*. A enzima mostrou-se ativa contra substratos solúveis e insolúveis, em ampla faixa de pH e temperatura, além de retardar o desenvolvimento do fungo fitopatogênico *R. solani*. A enzima teve sua estrutura cristalográfica resolvida a uma resolução de 2.1Å e seu domínio catalítico apresentou um dobramento do tipo barril (β/α)₈ (barril TIM) e resíduos essenciais para catálise conservados, características essas, comuns às proteínas da mesma família.

A produção heteróloga de uma quitinase pertencente à família GH19 de *C. violaceum*, e posterior caracterização estrutural e bioquímica, contribuirá para o entendimento da função biológica e poderá confirmar o potencial da mesma no controle biotecnológico de doenças causadas por fungos patogênicos.

2. HIPÓTESES

Tendo em vista que as quitinases são expressas em bactérias em pequenas quantidades e o processo de purificação das mesmas pode se tornar bastante complexo, a expressão heteróloga é uma alternativa viável para a produção dessas proteínas de uma forma rápida e com maior rendimento, sendo, portanto, útil para a caracterização da quitinase CV1897 de *C. violaceum*. Desta forma, essa Tese foi desenvolvida com o propósito de testar as seguintes hipóteses:

- 1 - A quitinase CV1897 de *C. violaceum* ATCC 12472 pode ser produzida de forma solúvel e ativa em dois sistemas heterólogos: *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*;
- 2 - A quitinase recombinante pode ser purificada, o que permitirá sua caracterização bioquímica e estrutural;
- 3 - A rCV1897 é ativa contra leveduras de importância médica e fungos fitopatogênicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produção da quitinase codificada pela ORF CV1897 de *C. violaceum* ATCC 12472, assim como, avaliar o seu potencial biotecnológico como uma ferramenta no controle de leveduras de importância médica e fungos fitopatogênicos.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar a sequência codificadora da quitinase CV1897 de *C. violaceum* em vetores adequados para expressão em dois sistemas heterólogos: *E. coli* e *P. pastoris*;
- Expressar a proteína recombinante nas estirpes de *E. coli* BL21(DE3) e ArticExpress (DE3) e nas estirpes de *P. pastoris* GS115 e KM71H;
- Purificar a quitinase rCV1897;
- Realizar a caracterização bioquímica e estrutural da proteína recombinante;
- Avaliar os efeitos da proteína recombinante sobre estirpes de *Candida tropicalis* e fungos fitopatogênicos.

4. MATERIAIS

4.1 Fungos filamentosos

Os fungos *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. musae*, *C. gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* e *Penicillium herquei* foram obtidos da micoteca mantida pelo Laboratório de Proteínas Vegetais e pelo Laboratório de Defesa e Toxinas Vegetais, ambos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da UFC.

4.2 Leveduras

As estirpes de *Candida tropicalis* usadas fazem parte da Coleção de Leveduras do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação de Leveduras da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC.

4.3 Células para clonagem e expressão

A estirpe de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) foi utilizada nos experimentos de clonagem, enquanto que as estirpes BL21(DE3) e ArticExpress (DE3) (Stratagene, Texas, USA) foram utilizadas como hospedeiro de expressão. Células de *P. pastoris* estirpes GS115 e KM71H (Invitrogen Life Technologies) foram usadas como hospedeiro de expressão.

4.4. Plasmídeos

Os vetores de expressão utilizados foram o plasmídeo pET302/NT-His (Anexo A) para expressão em *E. coli*, e pPICZαA (Anexo B) para expressão em *P. pastoris*. Ambos os plasmídeos foram adquiridos da Invitrogen.

4.5 Enzimas

As enzimas de restrição *ArvII* (10 U/μL), *EcoRI* (10 U/μL), *SacI* (10 U/μL), *XhoI* (10 U/μL) e *XbaI* (10 U/μL) foram obtidas da Fermentas (Burlington, Ontario, Canadá). T₄

DNA ligase (3 U/ μ L) foi adquirida da Promega (Madison, WI, USA). A DNA Polimerase *Phusion Hot Start*, de alta fidelidade, juntamente com seus tampões, foi adquirida da Finzymes (Vantaa, Finlândia).

A enzima β -glucuronidase de *Helix pomatia* tipo HP-2, utilizada nos ensaios de atividade quitinásica, foi adquirida da Sigma-Aldrich (USA).

4.6 Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores, apropriados para reações de PCR, foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, San Diego, CA, USA).

Marcadores de massa molecular de ácidos nucléicos usados nas eletroforeses em gel de agarose foram λ DNA/*HindIII*, ϕ X174/*HaeIII* (New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, USA) e *Gene Ruler Express DNA ladder* (Fermentas).

Marcadores de massa molecular de proteínas, usados nas eletroforeses em gel de poliacrilamida, foram os seguintes: *Bench Mark Pre-stained Protein Ladder*, *Bench Mark Protein Ladder* (Invitrogen) e *Low Molecular Weight* (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA).

Todos os demais reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico e com alto grau de pureza.

5. MÉTODOS

5.1 Análises *in silico* da sequência de aminoácidos da proteína CV1897

A presença de domínios e a delimitação dos mesmos na sequência de aminoácidos (número de acesso no *GenBank*: NP_901567) da proteína codificada pela ORF CV1897 de *C. violaceum* ATCC 12472 foi determinada, comparando-se essa sequência com aquelas depositadas nos bancos de proteínas *Pfam* (*Protein Families Database*) (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) (PUNTA *et al.*, [S.d.]), *SMART* (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (LETUNIC, DOERKS; BORK, [S.d.]; SCHULTZ *et al.*, [S.d.]) e *CDD* (*Conserved Domains Database*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (MARCHLER-BAUER *et al.*, [S.d.]).

A predição de peptídeo sinal foi feita pelo programa *SignalP* 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) (PETERSEN *et al.*, [S.d.]) e pelo banco de dados *Exprot* (<http://www.laurentian.ca/NR/rdonlyres/878B67F6-AD4B-41D1-9DB7-C7B8D41BF85D/0/Cviolaceum.txt>) (URSING *et al.*, 2002). Sítios potenciais de *N*- e *O*-glicosilação foram preditos pelos programas *NetNGlyc* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (GUPTA *et al.*, 2004) e *NetOGlyc* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), respectivamente.

5.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificação da sequência de DNA (1.320 pb; Anexo C) da ORF CV1897, que está localizada entre as posições 2.063.569 a 2.064.888 do cromossomo único de *C. violaceum* ATCC 12472, cuja sequência encontra-se depositada no *GenBank* (número de acesso NC_005085).

Para expressão em *E. coli*, dois oligonucleotídeos iniciadores foram projetados de modo a permitir a amplificação da ORF completa (1.320 pb): 5'-CCGCTCGAGAAACTGTCAGCCTTCATCATC-3' (senso) e 5'-CCGCCTAGGTTTCAGCTTGACGCCCCAG-3' (antissenso). Sítios para endonucleases de restrição (sublinhados nas sequências descritas) foram adicionados à extremidade 5' nos iniciadores senso (*Xho*I) e antissenso (*Avr*II), de modo a permitir a inserção do fragmento amplificado no sítio múltiplo de clonagem do vetor pET302/NT-His. Nesse vetor, a expressão da ORF CV1897 está sob o controle do promotor forte *T7lac*, controlado pela RNA

polimerase do bacteriófago T7 e induzível por IPTG. Além disso, a proteína recombinante é produzida como uma proteína de fusão, com uma cauda de histidina (6xHis) localizada na sua extremidade N-terminal.

Para expressão em *P. pastoris*, três oligonucleotídeos iniciadores (dois senso e um antissenso) foram projetados de modo a permitir a amplificação de dois fragmentos: um fragmento (CV1897_{PS+}) correspondendo à sequência completa da ORF 1897 (1.320 pb) e outro fragmento (CV1897_{PS-}), correspondendo a uma sequência parcial (1.266 pb; Anexo D), que excluía os 54 primeiros nucleotídeos, que putativamente codificam um peptídeo sinal N-terminal nativo. Dessa forma, a sequência completa foi amplificada com os iniciadores 5'-CCGGAATTCAAACTGTCAGCCTTCATCATC-3' (senso 1) e 5'-CCGTCTAGAACTTTCAGCTTGACGCCCCAG-3' (antissenso), enquanto que a ORF parcial foi amplificada com os iniciadores 5'-CCGGAATTCGCGCCATGGCAAGCCCG-3' (senso 2) e o antissenso já descrito. Sítios para enzimas de restrição (que estão sublinhados nas sequências anteriormente descritas) foram adicionados à extremidade 5' dos iniciadores senso (*EcoRI*) e antissenso (*XbaI*), de modo a permitir a inserção dos fragmentos amplificados no sítio múltiplo de clonagem do vetor pPICZαA. Ambas as sequências, codificando CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}, foram clonadas em *frame* com a sequência codificadora do fator α de secreção de *Saccharomyces cerevisiae*, para direcionamento da proteína recombinante para o meio de cultura. A proteína recombinante é produzida como uma proteína de fusão, com uma cauda de histidina (6xHis) e um peptídeo contendo o epitopo *c-myc*, localizados na sua extremidade C-terminal. A expressão da proteína de fusão está sob o controle do promotor do gene *AOX1* (da álcool oxidase) de *P. pastoris* (P_{AOX1}), induzível por metanol, e da sequência terminadora da transcrição do mesmo gene (TT_{AOX1}).

Os fragmentos de DNA cujas sequências codificavam a proteína CV1897 com e sem peptídeo sinal nativo foram chamados de CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}, respectivamente. A mesma denominação também foi usada para se referir às próprias proteínas recombinantes, codificadas pelos respectivos fragmentos.

5.3 Amplificação dos fragmentos de DNA CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}

Os fragmentos de DNA CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-} foram amplificados por PCR, a partir de DNA molde de *C. violaceum* ATCC 12472, com os oligonucleotídeos já descritos. As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL (*Axygen Scientific Inc.*, Union City, CA, USA), utilizando uma DNA polimerase termoestável de alta fidelidade, para um

volume final de 20 μL contendo DNA genômico (50 ng), dNTPs (200 μM cada), oligonucleotídeos iniciadores (0,5 μM cada um), tampão HF 1X com MgCl_2 (Finnzymes, Finlândia), *Hot Phusion* DNA polimerase (0,4 U; Finnzymes) e água ultra-pura estéril (q.s.p. 20 μL). Além das amostras testadas na reação de PCR, um controle negativo, que continha todos os componentes da reação exceto o DNA molde, foi sempre usado. O processo de amplificação ocorreu em um termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), programado para uma etapa inicial de desnaturação (98 °C a 3 min), seguida por 35 ciclos de 10 s a 98 °C (desnaturação), 30 s a 65 °C (para iniciadores destinados a clonagem em *E. coli*) ou 68 °C (para iniciadores destinados a clonagem em *P. pastoris*) e 72 °C por 2 min e 30 s (extensão). A última etapa consistiu de uma extensão a 72 °C por 5 min. Posteriormente, uma alíquota do produto final da reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

5.4 Expressão de rCV1897_{PS+} em *Escherichia coli*

5.4.1 Obtenção do vetor recombinante (pET302::CV1897_{PS+}) e transformação genética de *E. coli*

Os produtos da PCR (5.3) foram purificados (kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*, GE Healthcare), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do kit, e em seguida, foram digeridos com *XhoI* (20 U) e *AvrII* (20 U). Ao final da digestão, as enzimas foram inativadas a 80 °C por 20 min e os produtos da digestão foram ligados ao vetor de expressão (pET302/NT-His tratado com *XhoI* e *AvrII*) com T₄ DNA ligase (Promega), de acordo com as especificações do fabricante dessa enzima. A reação foi mantida a 4 °C por aproximadamente 16 h. Em seguida, o produto da reação de ligação (pET302::CV1897_{PS+}) foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F', preparadas como descrito no anexo F.

O plasmídeo recombinante foi introduzido nas células bacterianas por eletroporação. Para tal, a reação de ligação (10 μL) e as células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F' (40 μL) foram misturadas e a suspensão transferida para uma cubeta de eletroporação (Eppendorf), com ranhura de 4 mm de largura. A suspensão de células foi então submetida a um pulso de 2,5 kV, em um eletroporador *Electroporator 2510* (Eppendorf). Imediatamente após a aplicação do pulso, 1 mL de meio SOC pré-aquecido a 37 °C foi adicionado a cubeta, para remoção das células. A suspensão celular assim obtida foi

transferida para um tubo estéril de 15 mL e incubada sob agitação constante (150 rpm) a 37 °C por 1 h. Após a incubação, uma alíquota (100 µL) da cultura foi semeada em meio LB ágar suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL). As placas foram mantidas a 37 °C por aproximadamente 18 h e avaliadas quanto à presença de colônias. Algumas colônias foram selecionadas ao acaso, e cada uma foi inoculada separadamente em caldo LB (5 mL) suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL) e incubadas a 37 °C sob agitação orbital constante (200 rpm) por cerca de 18 h. Uma alíquota (1,5 mL) de cada cultura foi submetida a extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para confirmar a presença do inserto, amostras de DNA plasmidial foram digeridas com *Xho*I e *Avr*II e os produtos da digestão analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

5.4.2 Transformação genética de *E. coli* estirpes BL21(DE3) e ArcticExpress (DE3) com o vetor recombinante pET302::CV1897_{PS+}

Uma alíquota (50 ng) do plasmídeo pET302::CV1897_{PS+} foi usada para transformar 40 µL de células eletrocompetentes (preparadas de acordo com o protocolo descrito no Anexo F) de *E. coli* BL21(DE3) e *ArcticExpress* (DE3), como descrito anteriormente (5.4.1). Após a eletroporação, uma alíquota de 100 µL da cultura foi inoculada em meio LB ágar, suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) para BL21(DE3), e com gentamicina (20 µg/mL) e carbenicilina (100 µg/mL) para *ArcticExpress* (DE3). As placas foram mantidas a 37 °C por aproximadamente 16 h e avaliadas quanto ao crescimento de colônias. Dez colônias foram selecionadas aleatoriamente e cada uma foi inoculada, individualmente, em 5 mL de caldo LB, suplementado com os mesmos antibióticos. As culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação constante (200 rpm) por 18 h. Uma alíquota de cada cultura (850 µL) foi misturada a 150 µL de glicerol 100% (v/v) estéril, e após homogeneização as mesmas foram mantidas a -80 °C.

5.4.3 Indução da expressão de rCV1897_{PS+} a partir de *E. coli* BL21(DE3) e ArcticExpress (DE3)

Células de *E. coli* BL21(DE3) e *ArcticExpress* (DE3), geneticamente transformadas com pET302::CV1897_{PS+} (5.4.2), foram inoculadas em LB ágar suplementado

com os antibióticos apropriados e incubadas a 37 °C por 18 h. Uma colônia isolada de cada estirpe recombinante foi então inoculada em 5 mL de caldo LB suplementado com os antibióticos adequados. As culturas foram mantidas sob agitação constante (180 rpm) a 37 °C por aproximadamente 16 h. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi inoculada em 100 mL de caldo LB (também suplementado com os respectivos antibióticos) e as suspensões foram incubadas novamente a 37 °C sob agitação orbital constante (180 rpm) até que a DO_{600} de cada uma atingisse um valor entre 0,4 e 0,6. Nesse momento, isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado a cada cultura, para uma concentração final de 0,5 mM. Após a adição do indutor, a cultura da estirpe BL21(DE3) foi incubada a 37 °C e a da *ArcticExpress* (DE3) a 12 °C, e permaneceram nessas condições por 24 h, sob agitação orbital constante (180 rpm). Alíquotas de 10 mL foram removidas de cada cultura nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h após a adição de IPTG. As alíquotas foram centrifugadas (6.000 x g, 10 min, 4 °C) para a separação das células do meio de cultura (sobrenadante), o qual foi descartado.

Como indução controle, o mesmo procedimento descrito foi realizado com células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET302/NT-His íntegro.

5.4.4 Lise celular

A lise das células de *E. coli*, obtidas após a indução da expressão de rCV1897_{PS+}, foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Nogueira (1999). As células foram ressuspendidas em 1/10 do volume de cultura original em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M) e lisozima foi adicionada à suspensão para uma concentração final de 100 μ g/mL, seguida de 1/10 do volume de Triton X-100 1% (v/v). A suspensão foi incubada a 30 °C por 15-30 min até que ocorresse a lise das células, evidenciada pelo desenvolvimento de viscosidade. Em seguida, DNase I (para uma concentração final de 20 μ g/g de células) foi adicionada ao lisado, juntamente com MgCl₂ e CaCl₂ para concentrações finais de 8 mM e 10 mM, respectivamente. O lisado foi incubado a 30 °C até a perda total da viscosidade, sendo em seguida centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C para a separação das frações solúvel e insolúvel (pélete).

5.5 Expressão de rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-} em *Pichia pastoris*

5.5.1 Obtenção dos vetores recombinantes pPICZαA::CV1897_{PS+} e pPICZαA::CV1897_{PS-}

Os produtos de PCR dos fragmentos de DNA CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}, obtidos como descrito no item 5.3, foram purificados (kit *illustra*[™] *GFX*[™] *PCR DNA and Gel Band Purification*) e digeridos com *EcoRI* (20 U) e *XbaI* (20 U) por 6 h. Ao final deste período, as enzimas foram inativadas a 80 °C por 20 min e os produtos digeridos foram ligados ao plasmídeo pPICZαA (previamente digerido com as mesmas endonucleases de restrição) com T₄ DNA ligase (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. A reação foi mantida a 4 °C por aproximadamente 16 h. Em seguida, os produtos da reação de ligação (pPICZαA::CV1897_{PS+} e pPICZαA::CV1897_{PS-}) foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F', como descrito anteriormente.

Após a eletroporação das células, uma alíquota de 100 µL das culturas foi inoculada em meio LB *low salt* ágar suplementado com zeocina 25 µg/mL ou bleocina 5 µg/mL.

Algumas colônias isoladas foram selecionadas ao acaso e inoculadas em 5 mL de caldo LB *low salt* e incubadas a 37 °C por 16 h. Das culturas obtidas, alíquotas foram removidas e submetidas a extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para confirmação da presença dos insertos, os plasmídeos foram digeridos com *EcoRI* e *XbaI* (20 U de cada enzima por reação). Os produtos das reações de digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

5.5.2 Linearização dos plasmídeos recombinantes pPICZαA::CV1897_{PS+} e pPICZαA::CV1897_{PS-}

Aproximadamente 20 µg de cada plasmídeo recombinante (pPICZαA::CV1897_{PS+} e pPICZαA::CV1897_{PS-}) foram digeridos com *SacI* (40 U) para linearização. A reação foi incubada em termociclador *PTC-200 Thermo Cycler* (MJ Research, Waltham, MA, USA) a 37 °C por 4 h, e ao final desse período, a enzima foi inativada por incubação a 65 °C por 20 min. Ao término da reação, uma pequena alíquota foi aplicada em gel de agarose 0,8% para verificar a eficiência da linearização.

O restante da amostra foi precipitado pela adição de 1/10 do volume da reação de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13.000 x g por 10 min, a 25 °C, e o precipitado lavado com etanol 80% (v/v). Após a evaporação do etanol, o precipitado foi ressuscitado em 15 µL de água destilada estéril. Este mesmo protocolo também foi utilizado para linearização do plasmídeo pPICZαA íntegro.

5.5.3 Transformação genética de *P. pastoris* GS115 e KM71H com os vetores recombinantes pPICZαA::CV1897_{PS+} e pPICZαA::CV1897_{PS-}.

Os plasmídeos recombinantes e o plasmídeo íntegro (pPICZαA), linearizados com *SacI*, foram introduzidos em células de *P. pastoris* GS115 e KM71H por eletroporação. Em cada transformação, 80 µL da suspensão de células eletrocompetentes, preparadas como descrito no anexo G, foram misturadas com 10 µg do plasmídeo linearizado e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (Eppendorf), com ranhura de 4 mm de largura. A suspensão foi submetida a um pulso de 2,5 kV em um eletroporador *Electroporator* modelo 2510 (Eppendorf). Imediatamente após a aplicação do pulso, as células foram ressuscitadas em 1 mL de sorbitol 1 M e transferidas para um tubo estéril de 15 mL. As células foram mantidas a 30 °C por 1 h, sem agitação e então uma alíquota (100 µL) da cultura foi inoculada em meio YPDS suplementado com zeocina 500 µg/mL. As placas foram incubadas por aproximadamente 72 h a 30 °C e avaliadas quanto ao crescimento de colônias.

Algumas colônias foram selecionadas aleatoriamente, inoculadas individualmente em 5 mL de meio YPD, contendo zeocina 500 µg/mL, e incubadas a 30 °C por 16 h a 200 rpm. De cada cultura assim obtida, uma alíquota (1,5 mL) foi submetida à extração de DNA genômico, seguindo o protocolo de Warner (1996), como descrito no anexo H. A qualidade das preparações foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e a concentração de DNA genômico estimada pela medida da absorbância a 260 nm, de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Para confirmação da integração dos respectivos cassetes de expressão recombinantes ($P_{AOXI}::CV1897_{PS+}::TT_{AOXI}$ e $P_{AOXI}::CV1897_{PS-}::TT_{AOXI}$) no genoma de *P. pastoris* GS115 e KM71H, amostras de DNA genômico (300 ng) dos clones selecionados foram submetidas a reações de PCR, utilizando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores descritos no item 5.2.

5.5.4 Indução da expressão de $rCV1897_{PS+}$ e $rCV1897_{PS-}$ em *P. pastoris* GS115 e KM71H

Clones de *P. pastoris* GS115 e KM71H, geneticamente transformados com os plasmídeos recombinantes foram selecionados para a indução da expressão. Uma colônia isolada de cada clone, crescida em meio YPDS ágar contendo zeocina 500 µg/mL, foi inoculada em 20 mL de BMGY suplementado com zeocina 500 µg/mL. A suspensão foi incubada sob agitação constante (200 rpm) a 30 °C até que atingisse uma DO_{600} entre 8,0 e 12,0.

As células da cultura foram coletadas por centrifugação (3.000 x g por 5 min a 4 °C), lavadas com água destilada estéril e novamente coletadas por centrifugação (3.000 x g por 5 min a 4 °C). Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de indução BMMY contendo zeocina 500 µg/mL, de forma que a DO_{600} fosse igual a 1,0. As culturas foram mantidas sob agitação constante (200 rpm) a 17 °C durante todo o período de indução. Metanol foi adicionado ao meio de cultura a cada 24 h, para uma concentração final de 1% (v/v), para manter a indução da expressão das proteínas recombinantes. Alíquotas de 100 mL foram retiradas a cada 24 h, desde o início da indução (tempo 0 h) até 144 h de cultivo na presença de metanol, para verificação do nível de expressão da quitinase recombinante. Cada alíquota da cultura foi centrifugada (3.000 x g por 5 min a 4 °C), as células foram descartadas e o sobrenadante (*i.e.*, meio de cultura livre de células) foi dialisado exaustivamente contra água destilada, para posterior precipitação de proteínas totais. As amostras coletadas foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e ensaio enzimático.

5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), adaptado para géis montados entre placas de vidro. O gel de empacotamento continha acrilamida 3,5% (m/v) e SDS 1% (m/v), e foi montado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, enquanto que o gel de resolução possuía acrilamida 15% (m/v) e SDS 1% (m/v), montado em tampão Tris-HCl 3 M pH 8,8. As amostras foram diluídas em tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)] e aquecidas a 100 °C por 10 min antes de serem submetidas à corrida eletroforética.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical Dual Gel Caster (Hoefer, São Francisco, USA) sob voltagem constante (100 V) em tampão de corrida [Tris-

HCl 0,025 M pH 8,3, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (m/v)]. Após a corrida, as bandas de proteínas foram coradas com solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,2% (m/v), preparado em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) ou com *Simply Blue Safe Stain* (Invitrogen), e descorados com uma solução de isopropanol 12,5% (v/v), ácido acético 10% (v/v) ou com água (no caso das proteínas terem sido coradas com *Simply Blue Safe Stain*). O kit *Plus One Silver Staining* (GE Healthcare) também foi usado na detecção de proteínas com nitrato de prata, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Alternativamente, a detecção das quitinases recombinantes foi realizada com o kit *InVision His-tag in-gel stain* (Invitrogen), que consiste no reconhecimento da cauda de histidina, presente na proteína recombinante, por um corante fluorescente conjugado ao Ni⁺² (complexo ácido nitrilotriacético). O experimento foi conduzido de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a corrida eletroforética, o gel ficou imerso por 1 h em solução de metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e, em seguida, foi lavado com água destilada. O gel foi então imerso na solução corante, fornecida pelo fabricante, por mais 1 h, e posteriormente, foi lavado com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,8. A revelação das bandas protéicas se deu por exposição à luz UV, em transiluminador *Vilber Lourmat* (Marne-la-Vallée, França).

5.7 Dosagem de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada usando a metodologia descrita por Bradford (1976). A cada 100 µL de amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford e a mistura foi agitada vigorosamente (*vortex*). Após 10 min em repouso, leituras de absorbância a 595 nm foram realizadas em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (Thermo Fischer Scientific - Waltham, MA, USA). A concentração de proteínas foi estimada com base em uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

5.8 Imunodeteção da proteína recombinante imobilizada em membrana (*Western blotting*)

A imunodeteção da proteína recombinante imobilizada em membrana de nitrocelulose foi realizada de acordo com o procedimento originalmente descrito por Towbin e colaboradores (1979). As amostras foram inicialmente submetidas a eletroforese em gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE) e ao final da corrida eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare), em um sistema TE 70 *Semidry Transfer Unit* (Amersham Biosciences). A eficiência da transferência foi verificada por coramento rápido das bandas imobilizadas na membrana com Ponceau [(vermelho de Ponceau 0,2% (m/v), ácido acético 1,0% (v/v)]

A membrana foi então mantida em solução de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tween-20 0,05%, glucose 0,1 M) contendo leite desnatado, por aproximadamente 16 h a 25 °C sob agitação orbital constante de 40 rpm. Após este período, a membrana foi novamente imersa no mesmo tampão de lavagem contendo 5% de leite desnatado e 0,3 µg/mL do anticorpo primário, IgG₁ de camundongo anti-His (Roche Applied Science). A membrana permaneceu em contato com o anticorpo primário por 2 h sob agitação constante, à temperatura ambiente, quando foi submetida a cinco lavagens de dez minutos com tampão de lavagem contendo 5% de leite desnatado, para que fosse eliminado o excesso de anticorpo primário não ligado às proteínas retidas na membrana. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de camundongo complexada a peroxidase; Calbiochem) à solução de lavagem em uma diluição de 1:1.500, onde a membrana permaneceu por duas horas, sob agitação constante. Após um ciclo de mais cinco lavagens de dez minutos, foi feita a imersão da membrana em solução reveladora (Tris-HCl 100 mM pH 7,2, DAB 100 µg/mL, NiCl₂ 400 µg/mL e peróxido de hidrogênio 30 volumes 0,04%) por 10 min na ausência da luz. A reação foi interrompida com a lavagem em água destilada.

5.9 Ensaio de atividade quitinolítica

O ensaio de atividade quitinolítica foi realizado segundo o método colorimétrico descrito por Boller (1992), usando quitina coloidal como substrato. Quitina coloidal foi preparada de acordo com o método descrito por Molano *et al.* (1977), usando anidrido acético não radioativo.

A amostra (250 µL) foi incubada com quitina coloidal 1% (m/v) (250 µL) a 37 °C, por 1 h, sob agitação constante. A reação foi então interrompida por aquecimento (100 °C) em banho-maria por 10 min. Após resfriamento, a mistura foi centrifugada (13.000 x g, 15 min, a 25 °C) e o sobrenadante (300 µL) foi transferido para novo tubo, contendo 10 µL de β-glucuronidase (EC 3.2.1.31) tipo HP-2 (Sigma-Aldrich, USA) ou 10 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2. A mistura foi incubada a 37 °C por 1 h e a reação interrompida por

aquecimento (100 °C, 5 min). Em seguida, 190 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2 e 100 µL de tetraborato de potássio 0,6 M foram adicionados à mistura, que foi novamente aquecida a 100 °C por 5 min. Após resfriamento em banho de gelo, 1 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído 5% (m/v) (preparado em HCl 0,7 M diluído em ácido acético) foi adicionado à mistura reacional e após incubação a 37 °C por 20 min, a absorbância a 585 nm foi determinada, em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (Thermo Fischer Scientific). Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação, uma curva padrão foi utilizada, construída a partir de concentrações conhecidas de GlcNAc, variando de 100 a 500 µM (REISSIG et al., 1955). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc a 37 °C em 1 h de reação, sob as condições descritas acima.

5.10 Purificação das quitinases recombinantes (rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-})

Para a purificação das quitinases recombinantes produzidas em ambos os sistemas heterólogos, induções em maior escala (volumes de 1 L e 2L) foram realizadas, seguindo-se os procedimentos já descritos (itens 5.4.3 e 5.5.4). Nas induções realizadas com *E. coli*, as frações solúvel e insolúvel (corpos de inclusão), e o meio de cultura livre de células foram avaliados, para detecção da quitinase recombinante. Para as induções realizadas com *P. pastoris*, o meio de cultura (contendo a proteína recombinante secretada) foi centrifugado e o sobrenadante livre de células dialisado exaustivamente contra água destilada. Em seguida, as proteínas foram precipitadas pela adição ao material dialisado de sulfato de amônio sólido, sob agitação, para um intervalo de saturação de 0-90%. As amostras foram mantidas em repouso por aproximadamente 18 h, e posteriormente centrifugadas a 12.000 x *g*, por 20 min a 4 °C. O precipitado (F0/90) foi ressuscitado em um pequeno volume de água destilada e dialisado exaustivamente contra água destilada para eliminação do sulfato de amônio. Em seguida, foi centrifugado (12.000 x *g*, por 20 min a 4 °C) para remoção de material insolúvel e o sobrenadante foi submetido a três diferentes tipos de cromatografia, visando a purificação da quitinase recombinante.

5.10.1 Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado

Cromatografia de afinidade a íon metálico imobilizado (IMAC) foi usada para purificar as proteínas recombinantes. Para tal, a fração protéica, obtida como descrito no item

anterior, foi dialisada contra o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM, imidazol 5 mM) e aplicada em uma matriz de *Sepharose* carregada com níquel (*Ni Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra permaneceu em contato com a matriz cromatográfica por aproximadamente 18 h em refrigeração. Proteínas que não interagiram com a matriz (pico I; PI) foram eluídas com o tampão de equilíbrio. Os picos retidos (PII e PIII) foram eluídos com os tampões de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM, imidazol 10 mM) e de eluição (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM, imidazol 100 mM), respectivamente. Para amostras insolúveis, como os corpos de inclusão produzidos em *E. coli*, cloridrato de guanidina 3 M foi adicionado aos três tampões utilizados na cromatografia. Todas as cromatografias foram realizadas a um fluxo de eluição constante de 1 mL/min e todas as frações coletadas foram monitoradas pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (Thermo Fischer Scientific). As frações dos picos obtidos foram juntas e o material foi dialisado exaustivamente contra água destilada e concentrado por ultrafiltração usando um concentrador Vivaspin (GE, Healthcare), com limite de exclusão de 10 kDa.

5.10.2 Cromatografia de afinidade em matriz de quitina

A fração protéica, obtida como descrito no item 5.10, foi dialisada contra tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 (tampão de equilíbrio) e aplicada a uma matriz de quitina (*Chitin Poly-[1→4]-β-D-N-acetyl-glucosamine, Practical Grade From Crab Shells C-7170*, Sigma, USA), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra permaneceu em contato com a matriz cromatográfica por aproximadamente 18 h em refrigeração. Após este período, a fração de proteínas não retidas na matriz (PI) foi eluída com o tampão de equilíbrio e as proteínas retidas na matriz (PII e PIII) foram eluídas com ácido acético 100 mM e 500 mM, respectivamente. Os picos obtidos foram dialisados contra água destilada. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min e a cromatografia foi monitorada pela absorbância a 280 nm.

5.10.3 Cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de *Phenyl Sepharose CL-4B*

A matriz *Phenyl Sepharose CL-4B* (Amersham Biosciences) foi inicialmente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2, contendo sulfato de amônio 1 M. A fração protéica, obtida como descrito no item 5.10, foi dialisada contra o mesmo tampão e aplicada na coluna, permanecendo em contato com a matriz por 2 h. As proteínas não retidas

na matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio, enquanto que as proteínas retidas foram eluídas com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2 contendo concentrações decrescentes de sulfato de amônio (0,8 M; 0,6 M; 0,4 M e 0,2 M) e, finalmente, com água destilada. Os picos obtidos foram dialisados contra água destilada. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min e a cromatografia foi monitorada pela absorbância a 280 nm.

5.11 Caracterização bioquímica e estrutural das quitinases recombinantes

5.11.1 Ensaio de atividade quitinásica em gel

O ensaio de atividade quitinásica em gel, ou zimograma, foi realizado conforme metodologia descrita por Trudel e Asselin (1989), com algumas modificações. Um gel de poliacrilamida 15% foi preparado conforme já descrito, substituindo-se a água do gel de resolução por etileno-glicol-quitina 0,01%. A amostra a ser submetida à corrida eletroforética foi diluída em tampão de amostra contendo SDS (1 µg/µL), mas sem β-mercaptoetanol. Após a corrida, o gel foi imerso em tampão de renaturação [(acetato de sódio 50 mM pH 5,2, contendo Triton X-100 1% (v/v)] e incubado a 37 °C por 24 h. Após esse período, o gel foi lavado três vezes com água destilada (30 s cada) e, em seguida, tratado por 2 h com Calcoflúor MR 28 0,01% (m/v) em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,9. A visualização das bandas foi feita por exposição a luz UV, em um transiluminador.

5.11.2 Ensaio enzimático com substratos sintéticos

A atividade hidrolítica da proteína recombinante foi determinada usando-se análogos cromogênicos de oligômeros de GlcNAc, marcados com *p*-nitrofenol (Sigma-Aldrich). Os substratos sintéticos utilizados foram *p*-nitrofenil-*N*-acetil-β-D-glucosamina, *p*-nitrofenil-β-D-*N,N'*-diacetilquitobiose e *p*-nitrofenil-β-D-*N,N',N''*-triacetilquitotriose, dissolvidos em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, para uma concentração de 1 mg/mL.

A atividade hidrolítica foi determinada pela mensuração da liberação de *p*-nitrofenol dos substratos (TRONSMO; HARMAN, 1993; FRANDBERG; SCHNURER, 1994), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante dos mesmos.

O experimento foi realizado em duplicata, em placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato. A quitinase recombinante CV1897 foi utilizada na concentração de 0,6 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2. A cada poço foram adicionados 90 µL de

substrato e 10 μL da rCV1897, resultando em uma concentração de 6 $\mu\text{g}/\text{poço}$. Uma solução de *p*-nitrofenol 0,05 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (diluído em carbonato de sódio 0,4 M) foi usada como padrão. Os controles negativos foram 100 μL de cada substrato, na ausência da enzima e os controles positivos da reação foram 90 μL de cada substrato acrescidos de 10 μL de uma quitinase de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,48 mg/mL . A placa foi então incubada a 37 °C por 30 min e, em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de carbonato de sódio 0,4 M (solução de parada). A adição da solução básica de parada causa ionização do *p*-nitrofenol liberado para a forma amarelada do íon *p*-nitrofenol. As absorvâncias foram determinadas a 405 nm em leitor de ELISA. A atividade hidrolítica foi expressa em U/mL e foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade (U / mL)} = \frac{(A_{405\text{amostra}} - A_{405\text{branco}}) \times 0,05 \times 0,3 \times fd \times 1000}{A_{405\text{padrão}} \times T \times V_{\text{enzima}}}$$

Onde 0,05 era a concentração ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) de *p*-nitrofenol na solução padrão; 0,3 era o volume (em mL) final da reação, após a adição da solução de parada; *fd* era o fator de diluição; T o tempo de reação (em minutos) e V_{enzima} era o volume da amostra (em mL).

Neste ensaio, uma unidade foi definida pela liberação de 1 nmol de *p*-nitrofenol de um substrato apropriado por hora a pH 5,2, a 37 °C.

5.11.3 Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal

A amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e após a corrida eletroforética, a proteína foi eletrotransferida do gel para uma membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF; Millipore), em um sistema TE 70 *Semidry Transfer Unit* (Amersham Biosciences). Em seguida, a membrana foi imersa em metanol absoluto por 5 s e transferida para uma solução de *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,1% (m/v) preparada em metanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Após 5 min, a membrana foi descorada em solução de metanol 50% (v/v). Um segmento de membrana contendo a banda de interesse foi recortado e submetido ao sequenciamento N-terminal. O sequenciamento NH_2 -terminal foi realizado por degradação de Edman (1950), em um sequenciador automático de proteínas (modelo PPSQ-213A, Shimadzu, Japão), sob as condições recomendadas pelo fabricante.

5.11.4 Revelação de glicoproteínas pelo método de Schiff

A revelação de glicoproteínas foi realizada pelo método de Schiff, segundo a metodologia descrita por Alfenas (1998). Inicialmente, a quitinase recombinante foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e após a corrida o gel foi imerso em solução de TCA 10% durante 30 min e, posteriormente, em solução de ácido periódico 1% (v/v) e ácido acético 3% (v/v), por 1 h a 25 °C. Em seguida, o gel permaneceu em contato com a solução de Schiff (Sigma-Aldrich), no escuro, por 50 min, e foi descorado com solução de metabissulfito de potássio 0,5% (m/v).

5.11.5 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da quitinase recombinante

Alíquotas de uma solução de proteína recombinante (1 mg/mL) foram submetidas por 30 min a diferentes temperaturas (de 30 °C a 100 °C), em banho-maria, e após cada tratamento, foram resfriadas e a atividade quitinolítica residual foi determinada, usando quitina coloidal como substrato (como descrito no item 5.9).

5.11.6 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da quitinase recombinante

Para se avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática, uma solução da proteína recombinante (1 mg/mL) foi dialisada por 1 h contra tampões com diferentes valores de pH (de 2 a 10). Os tampões utilizados foram: Glicina-HCl 50 mM pH 2; Glicina-HCl 50 mM pH 3; Acetato de sódio 50 mM pH 4; Acetato de sódio 50 mM pH 5; Fosfato de sódio 50 mM pH 6; Fosfato de sódio 50 mM pH 7; Tris-HCl 50 mM pH 8; Glicina-NaOH 50 mM pH 9 e Glicina-NaOH 50 mM pH 10. Após a diálise, o ensaio enzimático utilizando quitina coloidal como substrato foi realizado, como descrito no item 5.9.

5.11.7 Espectro de Dicroísmo Circular (DC)

As medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco Corporation, Japão), em cubetas cilíndricas de quartzo com caminho ótico de 0,1 cm. Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 200 nm a 250 nm sob N₂ constante. A análise da composição da estrutura secundária da quitinase recombinante foi

feita por desconvolução do espectro de CD usando o software K2D2 conforme descrito por Perez-Iratxeta e Andrade-Navarro (2008).

A influência da temperatura sobre a estabilidade estrutural da proteína purificada (0,2 mg/mL) também foi avaliada por CD. A proteína foi dissolvida em água destilada estéril e foi incubada, por 20 min, em diferentes temperaturas, variando de 10 °C a 90 °C com intervalos de 10 °C. Em seguida, as medidas de CD foram realizadas e os espectros obtidos foram analisados em relação a possíveis mudanças conformacionais na proteína induzidas pela temperatura.

5.11.8 Espectro de Fluorescência

Para os ensaios de fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo de 0,5 mL com caminho óptico de 1 cm e as medidas foram feitas no fluorímetro ISS K₂ *Multifrequency Phase Fluorometer*. A proteína recombinante estava na concentração de 0,055 mg/mL, em água destilada, e foi excitada nos comprimentos de onda de 280 nm e 295 nm. Com o intuito de avaliar o espectro de emissão de fluorescência, a amostra foi monitorada no intervalo de 305 nm a 450 nm.

5.11.9 Espectrometria de massa

Amostras da proteína recombinante produzida em *P. pastoris* foram analisadas por espectrometria de massa, usando a técnica de ionização por eletropulverização (*electrospray, ESI*). As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (*ultra performance liquid chromatography, UPLC*) nanoACQUITY acoplado a um espectrômetro de massa *Synapt HDMS ESI-Q-TOF* (Waters, Milford, MA, USA).

Inicialmente, a amostra de proteína (100 µg) foi dissolvida em 20 µL de bicarbonato de amônio 50 mM e incubada a 80 °C, por 15 min. Em seguida, 5 µL de ditioneitol (DTT) 100 mM foram adicionados à solução, e a mesma foi aquecida a 60 °C por 30 min. Após resfriamento a temperatura ambiente, 5 µL de iodoacetamida (IAA) 300 mM foram adicionados à solução, que foi homogeneizada em *vortex*. A reação de alquilação foi incubada no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min. Ao final desse intervalo, 1 µg de tripsina (Promega) foi adicionado à amostra e a digestão ocorreu em estufa, a 37 °C, por

aproximadamente 16 h. A amostra foi centrifugada a 13.000 x g, por 30 min, a 6 °C, e o sobrenadante foi transferido para frascos apropriados (*Waters Total Recovery vial*; Waters).

O experimento qualitativo da amostra digerida foi realizado em espectrômetro de massas do tipo ESI-Q-TOF acoplado a um NanoUPLC, usando uma coluna de fase reversa nanoAcquity C18 UPLC BEH de 100 mm x 75 µm x 1.7 µm com um gradiente de 0% até 40% (v/v) de acetonitrila, contendo ácido fórmico 0,1% (v/v), a um fluxo de 600 nL/min. A coluna foi alimentada com 50 ng de amostra, contendo as proteínas digeridas.

Para todas as medições, o espectrômetro de massas foi operado no modo 'V', com uma potência de resolução de, pelo menos, 12.000 m/z. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por *electrospray* no modo ESI(+) através da fonte *NanoLockSpray*. O canal de coleta da amostra analisada foi fechado a cada 30 s para passagem do íon de referência contendo o peptídeo GFP (Glu-fibrinopeptide).

O espectrômetro de massa foi calibrado com uma solução de GFP (500 fmol/ml) injetada pelo spray de referência da fonte *NanoLockSpray*. O íon duplamente carregado ($[M + 2H]^{2+}$) foi usado para a calibração de um ponto inicial (L_{eff}), e a fragmentação de íons MS/MS do GFP foi usada para obter a calibração final do instrumento.

A aquisição independente de dados (MS^E) foi realizada para alternar automaticamente entre MS padrão (3 eV) e energias elevadas de colisão MS^E (12-40 eV) na célula de colisão com gás argônio. A célula de colisão foi ajustada para 1 eV, utilizando um tempo de varredura de 1 s, para as acelerações de alta e baixa energia de colisão, com tempo de voo (TOF-0a) MS^E de 50-3000 m/z. A RF *offset* (perfil MS) foi ajustada de forma que os dados de LC/MS foram efetivamente adquiridos de 50-2000 300-3000 m/z.

A identificação de proteínas e análises qualitativas foram geradas com o uso de algoritmos dedicados e busca em banco de dados espécie-específicos. As bases de dados utilizadas foram randomizadas ao acaso durante as consultas ao banco de dados e anexadas ao banco de dados original para acessar a taxa de identificação falso-positivo. Para um processamento de espectros e busca no banco de dados adequados, foi utilizado o pacote *ProteinLynxGlobalServer* (PLGs) v.2.4.

5.12 Atividade antifúngica contra fungos filamentosos

5.12.1 Cultivo dos fungos

Os fungos (*Colletotrichum musae*; *C. lindemuthianum*; *C. gloeosporioides*; *Fusarium solani*; *F. oxysporum*; *Penicillium herquei* e *Rhizoctonia solani*;) foram cultivados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) estéril, em placas de Petri (100 x 15 mm). As culturas foram renovadas por transferência de *pellets* de uma placa contendo o fungo (estoque) para outra contendo somente o meio de cultivo. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. As culturas foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 h (claro/escuro).

5.12.2 Obtenção da suspensão de conídios

Suspensões de conídios foram obtidas de acordo com a metodologia estabelecida por Melo e colaboradores (1997), com algumas modificações. Os conídios foram coletados a partir da adição de 10 mL de água destilada estéril sobre o micélio de cada fungo. Para liberação de conídios, movimentos suaves na superfície do micélio foram realizados com auxílio de alça de Drigalski. Para a retirada de hifas, as suspensões obtidas foram filtradas em nylon de malha fina. Os conídios foram contados com auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60). As suspensões foram ajustadas para concentrações de 2×10^5 conídios/mL ou 4×10^6 conídios/mL.

5.12.3 Efeito da rCV1897_{PS+} sobre o crescimento fúngico em meio líquido

Para avaliar o efeito da rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris* sobre o crescimento micelial, o ensaio foi conduzido conforme metodologia descrita por Broekaert e colaboradores (1990), com algumas adaptações. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno, de fundo chato (estéreis), contendo 96 poços. A cada poço foram adicionados 100 μL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) estéril e 10 μL da suspensão de conídios (2×10^5 conídios/mL). As placas foram incubadas por, aproximadamente, 12 h, na ausência de luz, a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao final desse período, que correspondia ao tempo necessário, em média, para germinação dos conídios, 100 μL de uma solução estéril da proteína recombinante (em uma concentração de 0,3 mg/mL, em tampão acetato de sódio

50 mM pH 5,2) foram adicionados em cada poço ou 100 μ L de tampão acetato 50 mM pH 5,2 (controle negativo).

As placas de microtitulação foram novamente incubadas sob as condições já descritas e o crescimento vegetativo foi avaliado pela medida da absorbância a 630 nm em leitor de ELISA (EL_X 800 BIO-TEK Instruments), a intervalos de 4 h, até 72 h após a adição da proteína recombinante. A avaliação do potencial antifúngico da proteína foi feita pela análise comparativa das curvas de crescimento vegetativo dos fungos na presença e ausência da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.12.4 Efeito da rCV1897_{PS+} sobre a germinação dos conídios

O ensaio de inibição da germinação de conídios foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno, conforme metodologia de Broekaert e colaboradores (1990), como descrito anteriormente, porém, a proteína (na concentração de 0,3 mg/mL) e a suspensão de conídios (2×10^5 conídios/mL) foram acrescentados ao meio de cultivo simultaneamente.

5.12.5 Ensaio de permeabilidade de membrana de conídios utilizando iodeto de propídeo

O fluoróforo iodeto de propídeo foi utilizado para determinar a integridade das membranas dos conídios de *P. herquei*. Para este ensaio, 100 μ L da rCV1897_{PS+} (0,3 mg/mL), dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 ou 100 μ L do controle negativo (somente tampão) foram adicionados a microtubos contendo 100 μ L de suspensão de conídios (4×10^6 conídios/mL). Após 24 ou 48 h de incubação da proteína com os conídios, à temperatura ambiente, iodeto de propídeo foi adicionado para uma concentração final de 1 mM. Após 30 min a 37 °C, sob agitação suave, a capacidade da rCV1897_{PS+} em destruir a parede celular e, conseqüentemente, romper a membrana dos conídios foi visualizada em microscópio óptico, utilizando filtro de fluorescência (Olimpus System Microscope BX 60). Foram considerados conídios permeabilizados aqueles onde os núcleos fluoresceram quando comparados com o controle negativo.

5.13 Atividade antifúngica contra *Candida tropicalis*

Neste ensaio foram utilizadas sete cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol (FLC), isoladas de amostras sanguíneas. As cepas foram provenientes da Coleção de Leveduras do LABEL/FF/UFC (Laboratório de Bioprospecção e Experimentação de Leveduras da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará). As cepas foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida foram semeadas em CHROMagar Candida[®] (Himedia) para avaliação da pureza.

5.13.1 Efeito sobre o crescimento e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O efeito da quitinase recombinante (rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-}) sobre o crescimento das cepas de *C. tropicalis* foi avaliado por meio do teste de microdiluição em caldo, realizado de acordo com o procedimento descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). Para tal, o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,165 M (Sigma) foi utilizado. As amostras a serem testadas foram submetidas a diluições seriadas em RPMI 1640 (pH 7,0), em uma placa de microtitulação, de tal forma que a concentração das mesmas variou de 64 a 0,125 µg/mL. Para comparação, o antifúngico FLC (Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brasil), dissolvido em água destilada, também foi usado, no mesmo intervalo de concentração (de 64 a 0,125 µg/mL). Em seguida, uma suspensão de células de *C. tropicalis* preparada em meio RPMI 1640 foi adicionada a cada poço, para uma concentração final de 1-5 x 10³ UFC/mL. As microplacas foram incubadas por 24 h a 35 °C ± 2 °C e ao final desse período foram avaliadas quanto ao crescimento das culturas.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da proteína capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o verificado no controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo.

Um possível efeito sinérgico entre a quitinase recombinante e o FLC foi avaliado pela técnica de *checkerboard* (ENDO, 2007; ODDS, 2003). Dessa forma, as cepas foram expostas a concentrações variadas (64-0.125 µg/mL) de rCV1897_{PS+} ou rCV1897_{PS-}, combinadas com uma concentração fixa (8 µg/mL) de FLC. O crescimento das culturas foi avaliado após 24 h da adição da suspensão de células às diluições da proteína na presença de FLC, e a CIM 50 foi determinada. As cepas de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei*

ATCC 6258 foram usadas como controle (DA SILVA *et al.*, 2011). A avaliação da interação entre FLC e a proteína recombinante foi determinada pelo cálculo da concentração inibitória fracionária (FICI):

$$FICI = \frac{[FC]}{[CFS]} + \frac{[PR]}{[PRS]}$$

Onde [FC] e [PR] são as concentrações do FLC e da proteína recombinante que apresentaram ação quando combinados, enquanto que [CFS] e [PRS] são as concentrações de FLC e da proteína recombinante nas quais se verificou efeito antifúngico quando os mesmos foram avaliados isoladamente. De acordo com o valor de FICI, o efeito da combinação foi classificado como sinergismo (SIN; $FICI < 0,5$), indiferença (IND; $0,5 < FICI \leq 4,0$) ou antagonismo (ANT; $FICI > 4,0$) (ENDO, 2007; ODDS, 2003).

5.13.2 Efeito da quitinase recombinante combinada com FLC sobre a integridade da membrana plasmática e viabilidade celular

5.13.2.1 Preparação da suspensão de leveduras

Cepas de *C. tropicalis* sensíveis e resistentes ao FLC foram utilizadas nos ensaios. As suspensões celulares foram preparadas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial. As células foram coletadas por centrifugação (1.600 x g por 10 min a 4 °C) e lavadas duas vezes com uma solução salina 0,85% (1.200 x g por 5 min a 4°C), e então ressuspensas (~10⁶ células/mL) com tampão HEPES {ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazínil]-etanosulfônico} pH 7,2 suplementado com glicose 2% (m/v). As células de cada cepa foram então expostas a: FLC 64 µg/mL; rCV1897_{PS+} ou rCV1897_{PS-} 64 µg/mL; e ao co-tratamento proteína recombinante (rCV1897_{PS+} ou rCV1897_{PS-}) 0.25 µg/mL + FLC 8 µg/mL). As células foram incubadas por 24 h, a 35 °C e então submetidas às análises. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes (Pina-Vaz e Rodrigues, 2010; Pina-Vaz *et al.* 2005).

5.13.2.2 Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular

Neste ensaio, a integridade da membrana e viabilidade celular das cepas foram avaliadas. Uma alíquota de 50 µL da suspensão celular foi recolhida após 24 h de incubação com as drogas e incubada com a solução de iodeto de propídeo (2 µg/mL em PBS) por 5 min na ausência de luz a 37 °C. A fluorescência celular foi determinada usando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) e o software CytoSoft 4.1. Foram avaliados dez mil eventos. (Joung et al., 2007; MILITÃO *et al.*, 2006; Pinkerton et al., 2010).

RESULTADOS

6.1 Análises *in silico* da sequência da proteína CV1897

A ORF CV1897 (1.320 nucleotídeos) de *C. violaceum* ATCC 12472 codifica uma proteína (CV1897) com 439 resíduos de aminoácidos. A comparação da sequência de aminoácidos da proteína CV1897 com os bancos de dados de domínios *Pfam*, *CDD* e *SMART* revelaram que a mesma possui um domínio de ligação à quitina (resíduos 27 a 59) do tipo 3 (ChtBD3) e um domínio catalítico (CatD) da família GH19 (resíduos 123 a 379) em sua estrutura primária (Figura 3).

A presença de um peptídeo sinal e de seu provável sítio de clivagem foram preditos por meio da ferramenta *SignalP* (Figura 4A) e pelo banco de dados *Exprot* (Figura 4B). As duas análises indicaram a presença de um peptídeo sinal N-terminal com 18 resíduos de aminoácidos, e um sítio de clivagem para peptidase sinal I foi predito entre os resíduos Ala¹⁸ e Ala¹⁹.

6.2 Expressão em *Escherichia coli*

6.2.1 Obtenção do vetor recombinante pET302::CV1897_{PS+} e transformação de *E. coli* BL21(DE3) e ArcticExpress (DE3)

DNA genômico de *C. violaceum* foi utilizado como molde para amplificação por PCR da ORF CV1897, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos, objetivando a clonagem no vetor pET302/NT-His. A eletroforese em gel de agarose 1% do fragmento amplificado revelou a presença de uma banda específica com tamanho aproximado de 1.320 pb (Figura 5), o que está coerente com o tamanho da ORF CV1897, de acordo com a sequência depositada no banco de dados *GenBank*.

Os produtos amplificados foram purificados, digeridos com *AvrII* e *XhoI*, e ligados no vetor pET302/NT-His. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *E. coli* TOP10F' e os transformantes foram selecionados em meio com carbenicilina. Quatro colônias isoladas, resistentes a carbenicilina, foram selecionadas e amostras de DNA plasmidial foram obtidas de cada uma. Digestão dessas amostras com *AvrII* e *XhoI* e análise por eletroforese em gel de agarose revelou que três desses quatro clones continham o plasmídeo recombinante pET302::CV1897_{PS+}, como evidenciado pela presença de duas bandas de DNA, uma banda

MKLSAFIILSLLPLPALAAPWQARAIYQKGQTVQWQGRDWQAKWPTRGET 50
PGANPKGSWIAHVDGAMRKLDDAAPVPTLQQALQHEAELTNNDFFRKVK 100
ASIRTLSNEQVEQVAPGRAANPVNVERRVERLLPSAKWDYYFSRRDASYTY 150
TRFLQAVAKFPGVCDDYGDGRDADAI CRHSLATMFAHFGQETGNHDASDT 200
VPQWRQGLAYLRMGCADSGSACGYNTECNDPVFNKVVWTCGKNPDGSWKK 250
YYGRGAKQLSYNYNYGPFSSQAMNNGDQSVLLQNPDLVASTWLNLASATFF 300
FVYPQPPKPSMLHVIDGTWVPNAADKAAGAGNNFATTIQIINGECGGGTE 350
RQAAQNRIDYKQFAHDLGWDYGGEQLSCANMQRFTSASSAAYNIYWEKD 400
WQWQHDYQCQLVSYQTPYSALQAGNYQRCVEDNNGVKKL 439

Figura 3 – Sequência de aminoácidos codificada pela ORF CV1897 de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. Em vermelho está destacado o domínio de ligação à quitina (resíduos de 27 a 59), e em azul o domínio catalítico (resíduos de 123-379). Os resíduos sombreados em verde são atuantes na catálise e em amarelo, uma sequência conservada nos membros da família GH19. A identificação e delimitação dos domínios foram realizadas pela comparação da sequência com o banco de dados *CDD*.

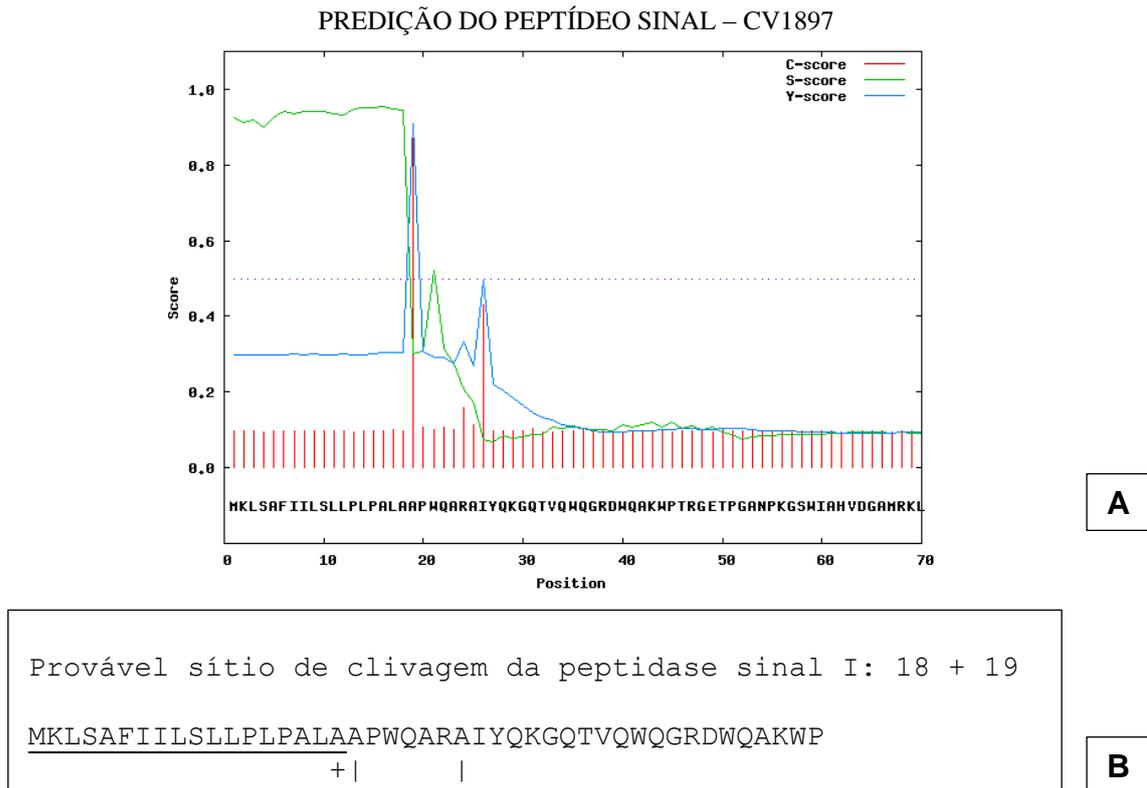


Figura 4 – Predição de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF CV1897 de *C. violaceum* ATCC 12472. A presença de peptídeo sinal foi realizada utilizando a ferramenta *SignalP* (A) e o banco de dados *Exprot* (B). Em ambas as análises, o sítio de clivagem mais provável para peptidase sinal I foi predito entre os resíduos Ala¹⁸ e Ala¹⁹.

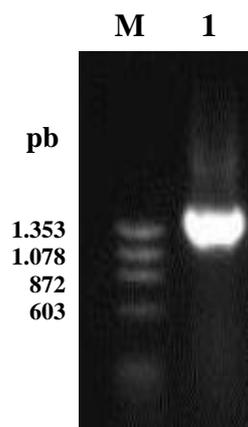


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR. A ORF CV1897 foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472, usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a clonagem e expressão em *E. coli*. Poço 1: alíquota (5 µL) da reação de PCR; poço M: marcador ϕ X174 DNA/*Hae III* Fragments, 300 ng (Biolabs).

maior correspondente ao vetor pET302/NT-His (cerca de 5.700 pb) e outra menor com cerca de 1.320 pb, correspondente ao inserto (Figura 6, poço 1, 2 e 4).

Para expressar a rCV1897_{PS+} em *E. coli*, amostras do plasmídeo recombinante pET302::CV1897_{PS+} foram então introduzidas nas estirpes BL21(DE3) e *ArcticExpress* (DE3), e os transformantes selecionados e identificados como descrito na Metodologia (5.4.1).

6.2.2 Indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *E. coli* BL21(DE3) e *ArcticExpress* (DE3)

Um clone de *E. coli* BL21(DE3) transformado com pET302::CV1897_{PS+} foi cultivado em meio apropriado, a 37 °C, e a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de IPTG (concentração final de 0,5 mM) à cultura, como descrito em 5.4.3. Análise por SDS-PAGE de amostras da fração celular insolúvel, obtidas após a lise de células coletadas durante o cultivo na presença de IPTG, revelaram uma banda com massa molecular aparente de 51 kDa, que se acumulou em altos níveis (a julgar pela intensidade e espessura dessa banda no gel) a partir de 2 h após a adição do indutor e foi detectada até 24 h após o início da indução (Figura 7).

A ORF CV1897 de *C. violaceum* ATCC 12472 codifica uma proteína com 439 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita (calculada a partir da sequência) de 49.206,91 kDa (massa monoisotópica). Considerando que a proteína recombinante é produzida com um segmento adicional de 11 resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminal (HHHHHHVNSLE; massa = 1.382,63 Da), codificado pelo vetor de expressão, e com um dipeptídeo extra (PR; 271,16 Da) na extremidade C-terminal (codificado no sítio de restrição para *AvrII*, adicionado ao iniciador antisense de modo a permitir a inserção da ORF no sítio múltiplo de clonagem do vetor), a massa molecular esperada para a proteína de fusão seria de 50.860,7 Da (*i.e.*, aproximadamente 50,9 kDa), que é bem próximo da massa molecular aparente de 51 kDa, detectada no gel de poliacrilamida. Isso sugere fortemente que essa banda de 51 kDa detectada na fração intracelular insolúvel, corresponde de fato à rCV1897_{PS+}.

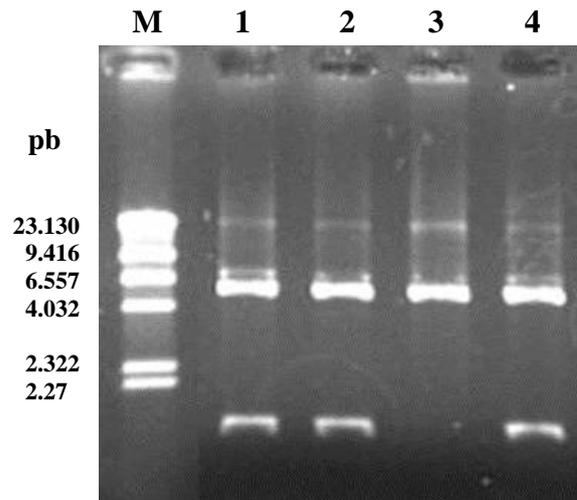


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com *AvrII* e *XhoI*. Amostras de DNA plasmidial putativamente recombinante (pET302::CV1897_{PS+}) foram purificadas de clones (poços 1 a 4) de *E. coli* TOP10F' e digeridas com *AvrII* e *XhoI*. Poço M: marcador λ DNA/Hind III *Fragments*, 300 ng (Biolabs).

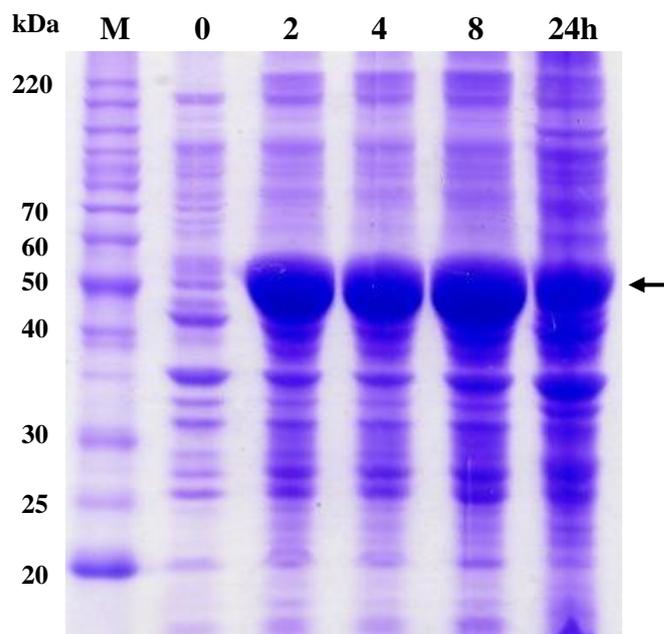


Figura 7 – Indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *E. coli* evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE). Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor pET302::CV1897_{PS+} foram induzidas com IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas nos tempos indicados (0, 2, 4, 8 e 24 h após o início da indução). As células foram coletadas por centrifugação, lisadas e o lisado foi centrifugado. O precipitado (fração intracelular insolúvel) foi resuspenso em tampão de amostra para SDS-PAGE e uma alíquota foi analisada por eletroforese. As bandas de proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue*. A banda de 51 kDa que corresponde à proteína recombinante está indicada por uma seta. Poço M: marcador *Benchmark Protein Ladder*.

Por outro lado, essa proteína com peso molecular aparente de 51 kDa não foi detectada na fração intracelular solúvel (Figura 8), do lisado celular, e nem na fração contendo as proteínas secretadas para o meio extracelular (Figura 9). Esse resultado indica que a proteína recombinante foi produzida principalmente na forma de corpos de inclusão, devendo estar presente na fração intracelular solúvel e/ou no meio extracelular em níveis muito baixos, além do limite de detecção do corante (*Coomassie Brilliant Blue*).

Amostras da fração solúvel e do meio livre de células foram dialisadas exaustivamente contra água e analisadas por ensaio enzimático. Não houve detecção de atividade quitinásica na fração solúvel do lisado celular de *E. coli* BL21(DE3), transformada com o plasmídeo de expressão íntegro, e induzida com IPTG. Entretanto, alguma atividade quitinásica (33,6 U/mg) foi detectada na fração intracelular solúvel de *E. coli* transformada com o plasmídeo recombinante pET302::CV1897_{PS+} (Figura 10). Essa atividade quitinásica foi detectada apenas 24 h após a adição de IPTG à cultura. Isso sugere que alguma proteína recombinante produzida após a indução com IPTG se acumulou intracelularmente de forma solúvel e funcional. Não houve detecção de atividade quitinásica no meio de cultura livre de células, indicando que a quitinase recombinante não foi secretada para o meio extracelular (Figura 11).

Pelo fato da quitinase recombinante expressa em *E. coli* BL21(DE3) ter sido produzida principalmente na forma de corpos de inclusão insolúveis no citoplasma bacteriano, a estirpe *ArcticExpress* (DE3) foi avaliada como hospedeiro de expressão, com o objetivo de se tentar aumentar a concentração de proteína recombinante na fração solúvel.

A indução da expressão de rCV1897_{PS+} em células de *E. coli ArcticExpress* (DE3) foi realizada a 12 °C, na presença de IPTG 0,5 mM. Frações obtidas da cultura após 0, 1, 5 e 20 h da adição do indutor foram analisadas por SDS-PAGE, para monitoramento da expressão da proteína recombinante (Figuras 12 e 13). Nessas análises, a quitinase recombinante não foi detectada na fração intracelular solúvel (Figura 12) e nem na fração contendo as proteínas secretadas para o meio extracelular (Figura 13), mesmo após 20 h do início da indução com IPTG 0,5 mM. Entretanto, na fração intracelular insolúvel, uma banda com massa molecular aparente de 51 kDa foi detectada após 20 h de indução, indicando que a quitinase rCV1897_{PS+} foi produzida nos corpos de inclusão no interior bacteriano.

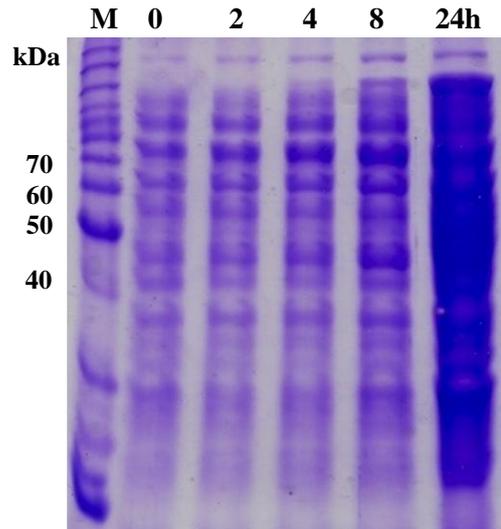


Figura 8 – Indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *E. coli* evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE). Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor pET302::CV1897_{PS+} foram induzidas com IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas nos tempos indicados (0, 2, 4, 8 e 24 h após o início da indução). As células foram coletadas por centrifugação, lisadas e o lisado centrifugado. O sobrenadante (fração intracelular solúvel) foi diluído em tampão de amostra para SDS-PAGE e uma alíquota foi analisada por eletroforese. As bandas de proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue*. Poço M: marcador *BenchMark Protein Ladder*.

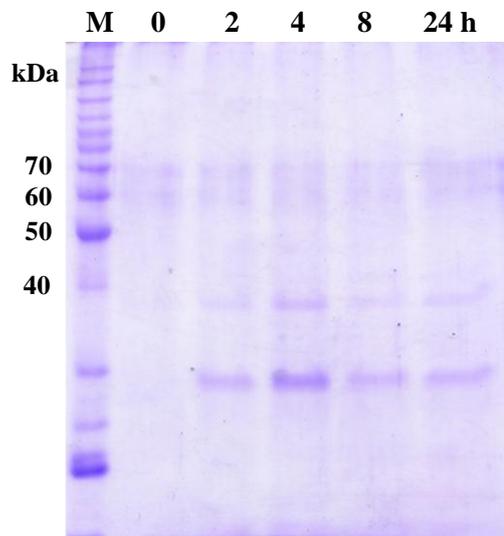


Figura 9 – Indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *E. coli* evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE). Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor pET302::CV1897_{PS+} foram induzidas com IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas nos tempos indicados (0, 2, 4, 8 e 24 h após o início da indução). As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi diluído em tampão de amostra para SDS-PAGE e uma alíquota foi analisada por eletroforese. As bandas de proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue*. Poço M: marcador *BenchMark Protein Ladder*.

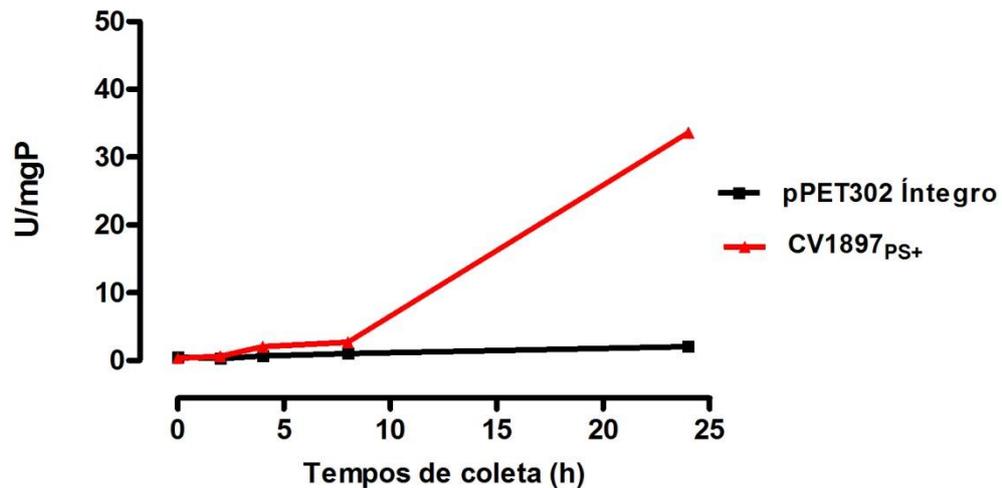


Figura 10 – Atividade quitinásica específica (U/mg) da fração intracelular solúvel de *E. coli* BL21(DE3) transformada com pET::CV1897_{PS+}. Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET::CV1897_{PS+} foram cultivadas na presença de IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas com 0, 2, 4, 8 e 24 h do início da indução. As células foram coletadas por centrifugação, lisadas e o lisado centrifugado. O sobrenadante (fração intracelular solúvel) foi então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

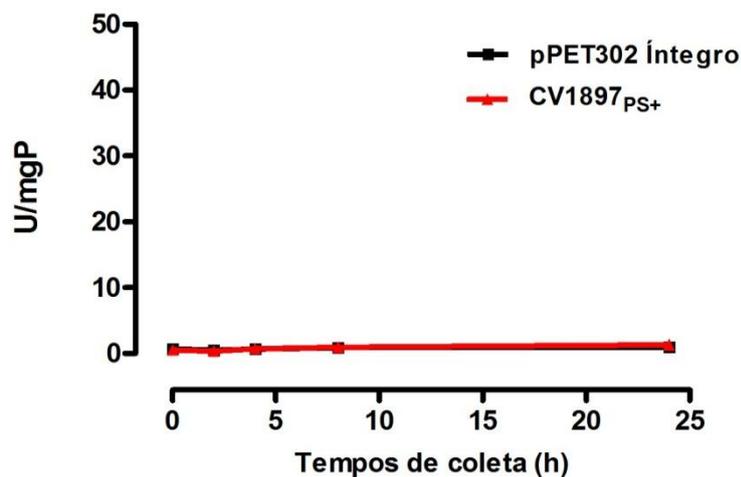


Figura 11 – Atividade quitinásica específica (U/mg) da fração secretada por células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET::CV1897_{PS+}. Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET::CV1897_{PS+} foram cultivadas na presença de IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas com 0, 2, 4, 8 e 24 h do início da indução. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

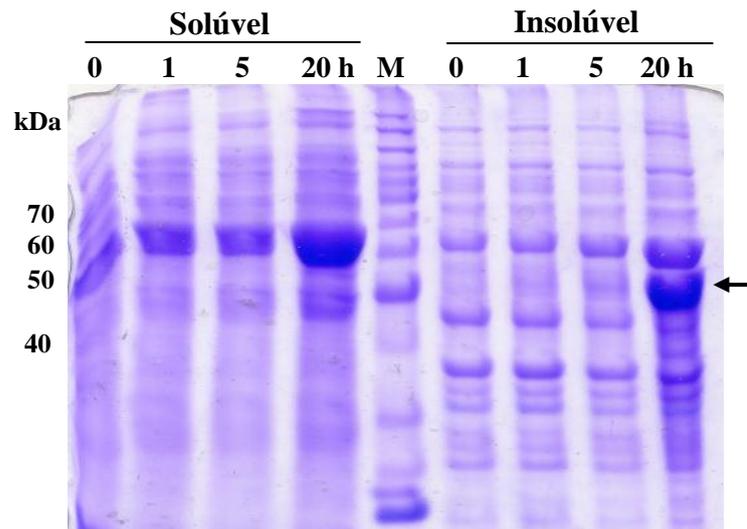


Figura 12 – Indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *E. coli* evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE). Células de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformadas com o vetor pET302::CV1897_{PS+} foram induzidas com IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas nos tempos indicados (0, 1, 5 e 20 h após o início da indução). As células foram coletadas por centrifugação, lisadas e o lisado centrifugado. O precipitado (fração intracelular insolúvel) e o sobrenadante (fração intracelular solúvel) foram resuspendidos em tampão de amostra para SDS-PAGE e uma alíquota foi analisada por eletroforese. As bandas de proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue*. A banda de 51 kDa que corresponde à proteína recombinante está indicada por uma seta. Poço M: marcador *BenchMark Protein Ladder*.

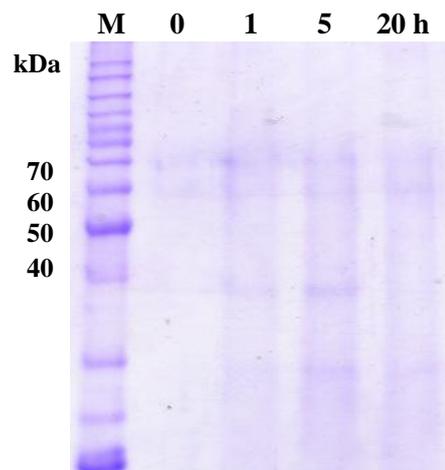


Figura 13 – Indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *E. coli* evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (SDS-PAGE). Células de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformadas com o vetor pET302::CV1897_{PS+} foram induzidas com IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas nos tempos indicados (0, 1, 5 e 20 h após o início da indução). As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi diluído em tampão de amostra para SDS-PAGE e uma alíquota foi analisada por eletroforese. As bandas de proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue*. Poço M: marcador *BenchMark Protein Ladder*.

Amostras da fração solúvel e do meio de cultura livre de células foram dialisadas exaustivamente contra água e analisadas por ensaio enzimático. O resultado obtido indicou que a expressão da quitinase recombinante foi induzida pelo IPTG (0,5 mM), uma vez alguma atividade quitinásica (31,7 U/mg) foi detectada na fração solúvel de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformada com o plasmídeo recombinante pET302::CV1897_{PS+}. Nenhuma atividade quitinásica foi detectada na fração solúvel de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformada com o plasmídeo de expressão íntegro, e induzida com IPTG nas mesmas condições (Figura 14). Dessa forma, pode-se concluir que a quitinase foi expressa de uma forma funcional na fração solúvel, embora não tenha sido visualizada por SDS-PAGE, em virtude da baixa concentração. Além disso, não houve detecção de atividade quitinásica no meio de cultura livre de células, indicando que, quando expressa a partir de *E. coli ArcticExpress* (DE3), a quitinase recombinante não foi secretada para o meio extracelular (Figura 15).

6.2.3 Purificação de rCV1897_{PS+} produzida em *E. coli*

A indução da expressão da quitinase rCV1897 em *E. coli* foi realizada em maior escala (1 L) com a estirpe BL21(DE3), sob as mesmas condições descritas anteriormente. O tempo de coleta das células foi de 24 h após a adição de IPTG à cultura, devido a maior atividade quitinásica detectada nesse instante (Figura 10). Ao final da indução, a cultura foi centrifugada e as células foram lisadas para a separação das frações intracelulares solúvel e insolúvel.

O método de purificação utilizado foi cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. A fração solúvel, previamente dialisada contra o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 500 mM, foi aplicada em matriz de *Sepharose* carregada com níquel. Porém, não foi possível a detecção da quitinase recombinante. O resultado obtido deve ser devido ao baixo nível da proteína na fração intracelular solúvel.

Dessa forma, uma segunda tentativa de purificação foi realizada com a fração insolúvel. Os corpos de inclusão foram solubilizados com cloridrato de guanidina 3 M e aplicados em matriz de *Sepharose* carregada com níquel. Cloridrato de guanidina 3 M foi adicionado em todos tampões utilizados nesta cromatografia. Nessas condições, a quitinase recombinante foi eluída com imidazol 100 mM (PIII, Figura 16), e essa fração, quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentou uma banda proteica com massa molecular aparente de aproximadamente 51 kDa (Figura 17).

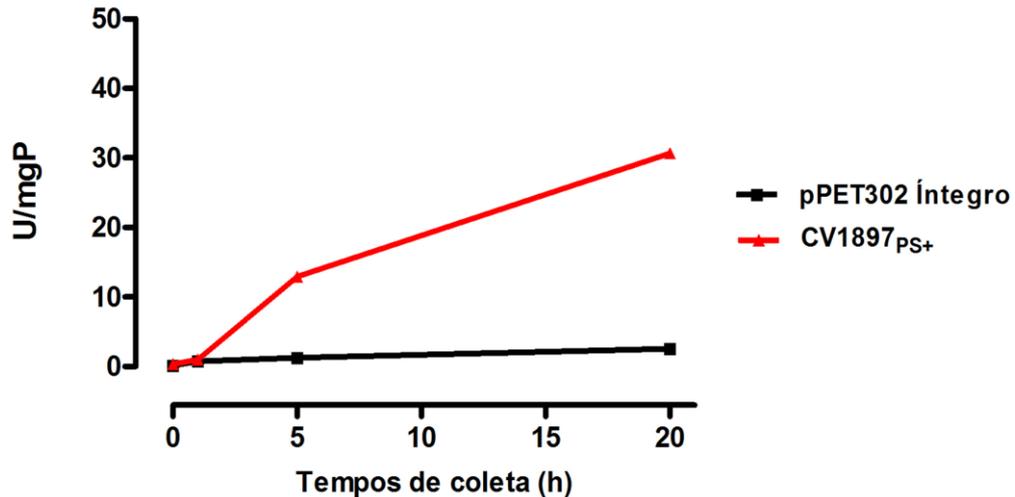


Figura 14 – Atividade quitinásica específica (U/mg) da fração intracelular solúvel de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformada com pET::CV1897_{PS+}. Células de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformadas com pET::CV1897_{PS+} foram cultivadas na presença de IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas com 0, 1, 5 e 20 h do início da indução. As células foram coletadas por centrifugação, lisadas e o lisado centrifugado. O sobrenadante (fração intracelular solúvel) foi então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

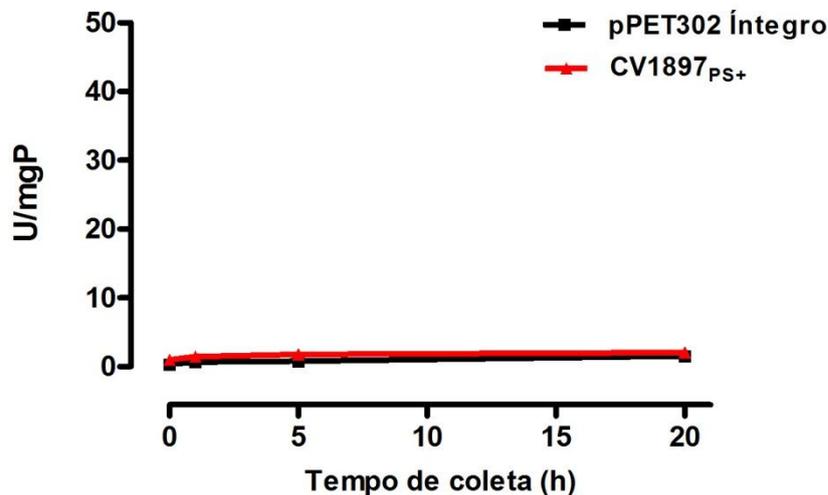


Figura 15 – Atividade quitinásica específica (U/mg) da fração secretada por células de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformadas com pET::CV1897_{PS+}. Células de *E. coli ArcticExpress* (DE3) transformadas com pET::CV1897_{PS+} foram cultivadas na presença de IPTG 0,5 mM e amostras da cultura foram removidas com 0, 1, 5 e 20 h do início da indução. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

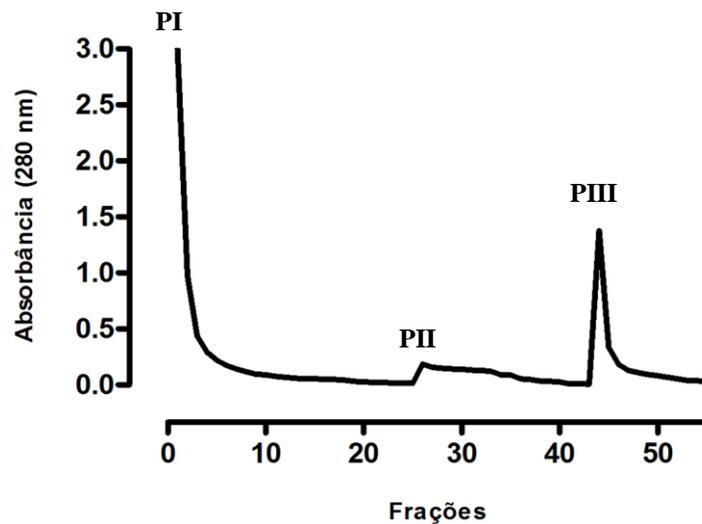


Figura 16 – Purificação de rCV1897_{PS+} por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Corpos de inclusão de células de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com pET302::CV1897_{PS+} e induzidas com IPTG 0,5 mM por 8 h, foram solubilizados em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM, imidazol 5 mM) e a solução aplicada à matriz cromatográfica (*Ni Sepharose 6 Fast Flow*), equilibrada com o mesmo tampão. Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com tampão de equilíbrio (PI), após o que a matriz foi lavada com tampão de equilíbrio contendo imidazol 10 mM (PII). A proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição contendo imidazol 100 mM (PIII).

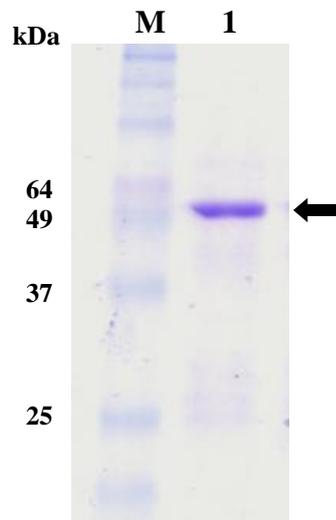


Figura 17 – SDS-PAGE de rCV1897_{PS+} purificada. A proteína recombinante foi produzida em *E. coli* BL21(DE3) e purificada por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado em matriz *Ni Sepharose 6 Fast Flow*, a partir de corpos de inclusão solubilizados com cloridrato de guanidina 3 M. As bandas de proteína foram reveladas com *Coomassie Brilliant Blue*. Poço 1: rCV1897_{PS+} (a banda de 51 kDa está indicada por uma seta). Poço M: marcador *BenchMark Protein Ladder*.

Após a purificação, a fração contendo a quitinase recombinante purificada foi dialisada exaustivamente contra água destilada e em seguida, contra tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, para eliminação do cloridrato de guanidina e como tentativa de *refolding* da proteína. Após a diálise, a rCV1897_{PS+} foi analisada por ensaio enzimático. Entretanto, não houve detecção de atividade quitinásica após a tentativa de *refolding* da proteína recombinante.

Tendo em vista que a rCV1897_{PS+} foi produzida em *E. coli* majoritariamente de forma insolúvel e inativa, um sistema alternativo de expressão heteróloga (*i.e.*, células de *Pichia pastoris*) foi avaliado para expressão da quitinase recombinante.

6.3 Expressão em *Pichia pastoris*

As análises realizadas com os programas *SignalP* e *Exprot* indicaram a presença de um peptídeo sinal na sequência de aminoácidos da proteína CV1897 (item 6.1). Esse peptídeo, juntamente com o fator α de secreção de *Saccharomyces cerevisiae*, presente no plasmídeo de expressão pPICZ α A, poderiam atrapalhar a secreção da proteína recombinante pela levedura hospedeira. Desse modo, a expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* foi realizada usando duas versões da ORF CV1897, uma versão completa (codificando toda a proteína, incluindo o peptídeo sinal nativo) e outra parcial (codificando um produto sem o peptídeo sinal endógeno).

6.3.1 Obtenção do vetor recombinante pPICZ α A::CV1897_{PS+} e transformação de *P. pastoris* GS115 e KM71H

A amplificação da ORF CV1897_{PS+} por PCR, a partir de DNA genômico de *C. violaceum* com *primers* desenhados para clonagem no vetor pPICZ α A, produziu uma única banda, com tamanho aproximado de 1.320 pb, como revelado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 18), o que está coerente com o tamanho da ORF CV1897.

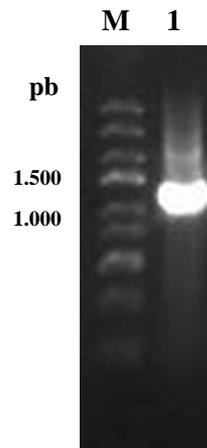


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos amplificados por PCR. O fragmento de DNA CV1897_{PS+} foi amplificado a partir do DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472, usando iniciadores específicos para a clonagem em *P. pastoris*. Poço 1: alíquota (5 µL) da reação de PCR; Poço M: marcador *GeneRuler™ Express DNA Ladder*, 300 ng (Fermentas).

O produto amplificado por PCR foi digerido com *XbaI* e *EcoRI* e ligado ao vetor pPICZ α A com T₄ DNA ligase. Os produtos da ligação foram inseridos em *E. coli* TOP10F' e os transformantes foram selecionados em meio com zeocina. Seis clones resistentes a zeocina foram selecionados ao acaso e amostras de DNA plasmidial foram obtidas de cada um. Digestão dessas amostras com *XbaI* e *EcoRI* e análise dos produtos por eletroforese em gel de agarose 0,8% revelou que os seis clones analisados continham o plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV1897_{PS+}, como sugerido pela presença de duas bandas de DNA, uma banda maior correspondendo ao vetor (cerca de 3.600 pb) e outra menor, correspondendo ao inserto (1.320 pb) (Figura 19).

O plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV1897_{PS+} foi linearizado com *SacI* e introduzido em células eletrocompetentes de *P. pastoris*. Seis clones de *P. pastoris* GS115 e cinco de KM71H resistentes a zeocina (500 μ g/mL) foram selecionados ao acaso e submetidos a extração de DNA genômico, para confirmação da presença do cassete de expressão P_{AOX1}::CV1897_{PS+}::TT_{AOX1}. A análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos para o fragmento CV1897_{PS+}, revelou uma banda de DNA com cerca de 1.320 pb nas reações contendo amostras de DNA genômico dos seis clones de *P. pastoris* GS115 e cinco clones de KM71H resistentes a zeocina (Figura 20). Por outro lado, nenhuma banda foi obtida na reação de PCR contendo DNA genômico de um clone de *P. pastoris* GS115 transformado com o plasmídeo íntegro, usado como controle negativo.

6.3.2 Obtenção do vetor recombinante pPICZ α A::CV1897_{PS-} e transformação de *P. pastoris* KM71H

A ORF parcial (CV1897_{PS-}), codificando uma proteína sem o peptídeo sinal N-terminal nativo, também foi amplificada por PCR, utilizando DNA genômico de *C. violaceum* como molde, uma DNA polimerase de alta fidelidade e iniciadores específicos para a clonagem no vetor pPICZ α A. A reação resultou na amplificação de uma banda de DNA com cerca de 1.260 pb (Figura 21), que está de acordo com o tamanho do fragmento CV1897_{PS-}. O produto amplificado foi digerido com *XbaI* e *EcoRI* e ligado no vetor pPICZ α A. Os produtos da ligação foram introduzidos em *E. coli* TOP10F' e os transformantes foram selecionados em meio com zeocina. Amostras de DNA plasmidial foram purificadas de seis clones obtidos pela seleção com zeocina, e a presença do inserto nessas amostras foi verificada por digestão com *XbaI* e *EcoRI*.

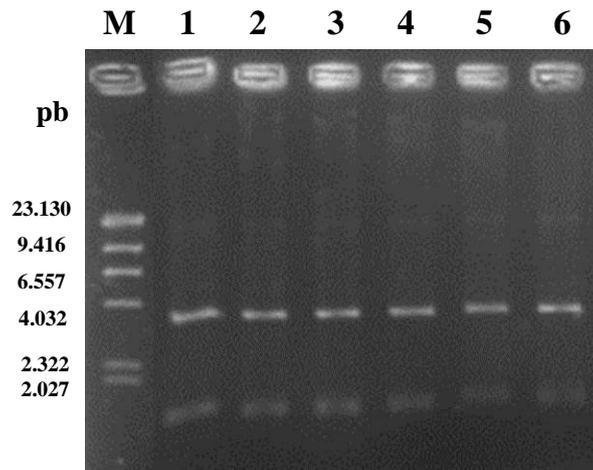


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com *EcoRI* e *XbaI*. Amostras de DNA plasmidial putativamente recombinante (pPICZ α A::CV1897_{PS+}) foram purificadas de clones de *E. coli* TOP10F', digeridas com *XbaI* e *EcoRI* e analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (poços 1 a 6). Poço M: marcador λ DNA/*Hind* III *Fragments*, 300 ng (Biolabs).

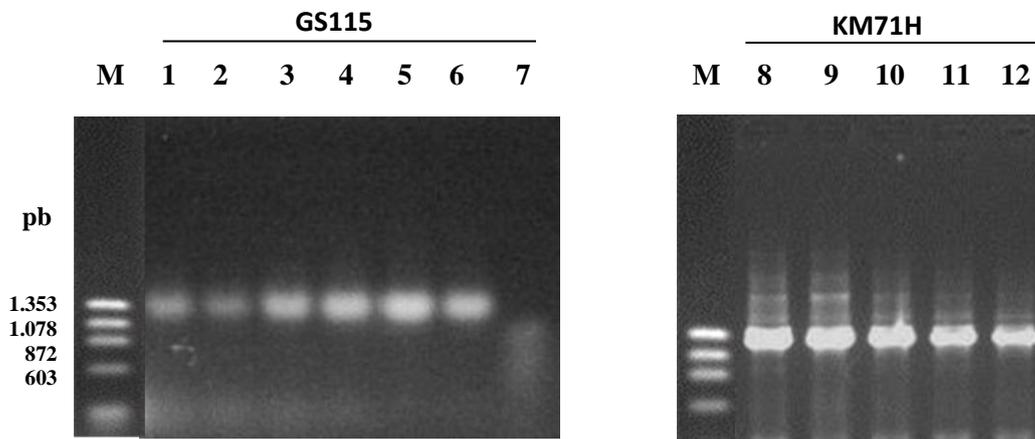


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR. Amostras de DNA genômico foram purificadas de clones de *P. pastoris* GS115 e KM71H, putativamente transformados com o cassete de expressão P_{AOX1}::CV1897_{PS+}::TT_{AOX1}, e submetidas a reação de PCR, com *primers* específicos. Aliquotas (5 μ L) das reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Poços 1 a 6: produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico de clones da estirpe GS115; Poço 7: produto de PCR obtido de DNA genômico de um clone de *P. pastoris* GS115 transformado com pPICZ α A íntegro; Poços 8 a 12: produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico de clones da estirpe KM71H. Poço M: marcador ϕ X174 DNA/*Hae* III *Fragments*, 300 ng.

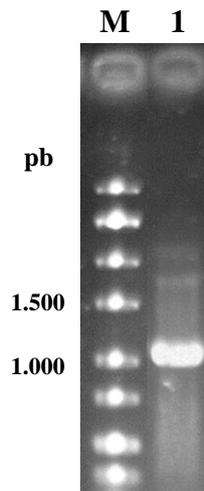


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos amplificados por PCR. Um fragmento de DNA correspondendo à ORF parcial CV1897 (CV1897_{PS-}) foi amplificado a partir do DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472, com oligonucleotídeos iniciadores específicos, para clonagem em *P. pastoris*. Poço 1: alíquota (5 μ L) da reação de PCR. Poço M: marcador *GeneRuler™ Express DNA Ladder*, 300 ng (Fermentas).

A eletroforese em gel de agarose 0,8% revelou que quatro dos seis clones analisados (Figura 22, poços 1, 3, 4 e 5) continham o plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV1897_{PS-}, como sugerido pela presença de duas bandas de DNA, uma banda maior correspondendo ao vetor (cerca de 3.600 pb) e outra menor, correspondendo ao inserto (1.260 pb). Dois dos seis clones amostrados apresentaram apenas uma banda com o tamanho esperado do vetor de expressão (Figura 22, poços 2 e 6).

O plasmídeo recombinante pPICZ α A::CV1897_{PS-} foi linearizado com *Sac*I, introduzido em células de *P. pastoris* KM71H por eletroporação e os transformantes foram selecionados em meio contendo zeocina 500 μ g/mL. Seis clones resistentes a zeocina foram selecionados ao acaso e amostras de DNA genômico foram purificadas dos mesmos. Quando submetidas a reações de PCR com iniciadores específicos para o fragmento CV1897_{PS-}, uma banda com cerca de 1.260 pb foi obtida a partir de todas as amostras (Figura 23), sugerindo que os seis clones selecionados continham o cassete de expressão recombinante integrado em seu genoma. Por outro lado, nenhuma banda foi obtida na reação de PCR contendo DNA genômico de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com o plasmídeo íntegro, usado como controle negativo.

6.3.3 Expressão de rCV1897_{PS+} em *P. pastoris* GS115 e KM71H

A expressão de rCV1897_{PS+} em *P. pastoris* foi induzida cultivando-se clones recombinantes na presença de metanol como única fonte de carbono, condição para indução do promotor do gene *AOX1*. Como controle negativo, um clone de *P. pastoris* transformado com o vetor pPICZ α A íntegro foi utilizado.

Seis clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 (A-F) e cinco clones recombinantes da estirpe KM71H (B-F) foram avaliados quanto a sua capacidade em expressar a proteína recombinante (CV1897_{PS+}). Alíquotas das culturas foram coletadas a cada 24 h após o início da indução, centrifugadas e o meio de cultura livre de células foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação). Nas frações assim obtidas, os seguintes parâmetros foram determinados: atividade quitinásica total e atividade quitinásica específica.

O clone A da estirpe GS115 apresentou o maior valor de atividade quitinásica total (390 U) no meio de cultura, 120 h após o início da indução (Figura 24). Na estirpe KM71H o clone E exibiu o maior valor de atividade quitinásica total (260 U), e esse valor também foi detectado 120 h após o início do cultivo na presença de metanol (Figura 25).

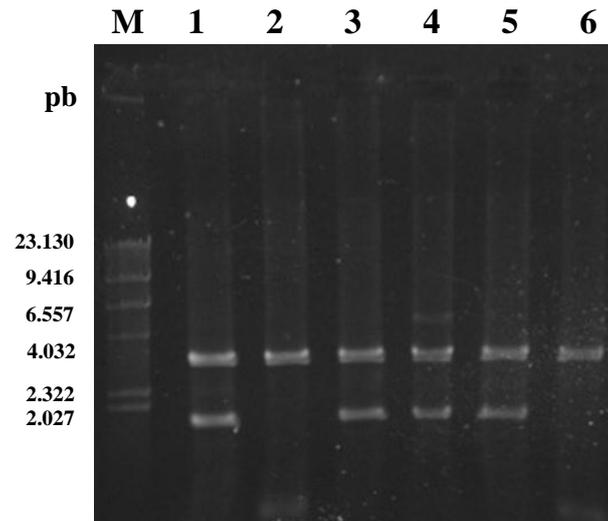


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA plasmidial digeridas com *EcoRI* e *XbaI*. Amostras de DNA plasmidial putativamente recombinante (pPICZ α A::CV1897_{PS-}) foram purificadas de clones de *E. coli* TOP10F', digeridas com *XbaI* e *EcoRI* e analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (poços 1 a 6); Poço M: marcador λ DNA/Hind III *Fragments*, 300 ng (Biolabs).

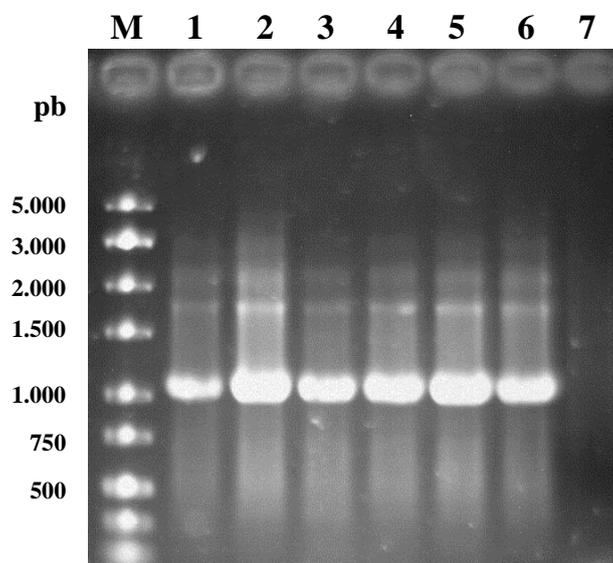


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR. Amostras de DNA genômico foram purificadas de clones de *P. pastoris* KM71H, putativamente transformados com o cassete de expressão P_{AOXI}::CV1897_{PS-}::TT_{AOXI}, e submetidas a reação de PCR, com *primers* específicos. Alíquotas (5 μ L) das reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (poços 1 a 6); Poço 7: alíquota (5 μ L) da reação de PCR de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZ α A íntegro; Poço M: marcador *GeneRuler™ Express DNA Ladder*, 300 ng (Fermentas).

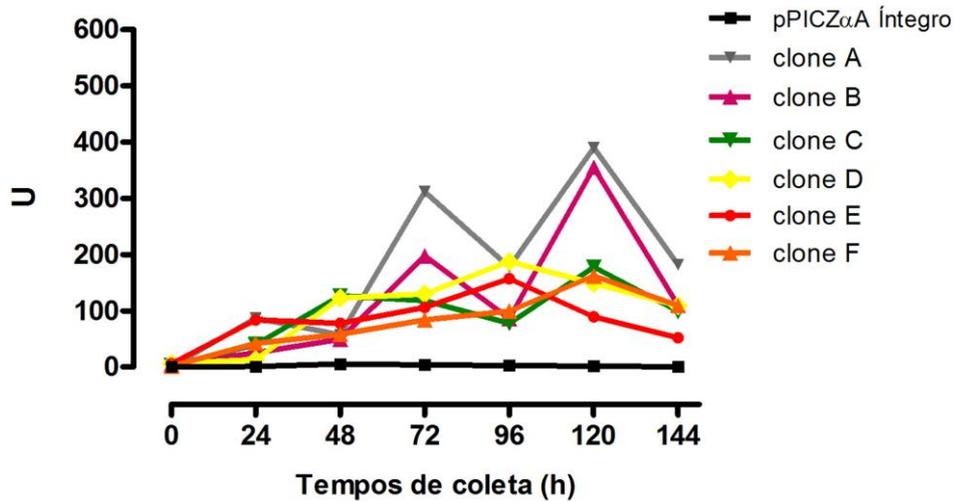


Figura 24 – Atividade quitinásica total do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *Pichia pastoris* GS115. Clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas, de 0 até 144 h após o início da indução. Um clone transformado com pPICZ α A sem inserto foi usado como controle negativo. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

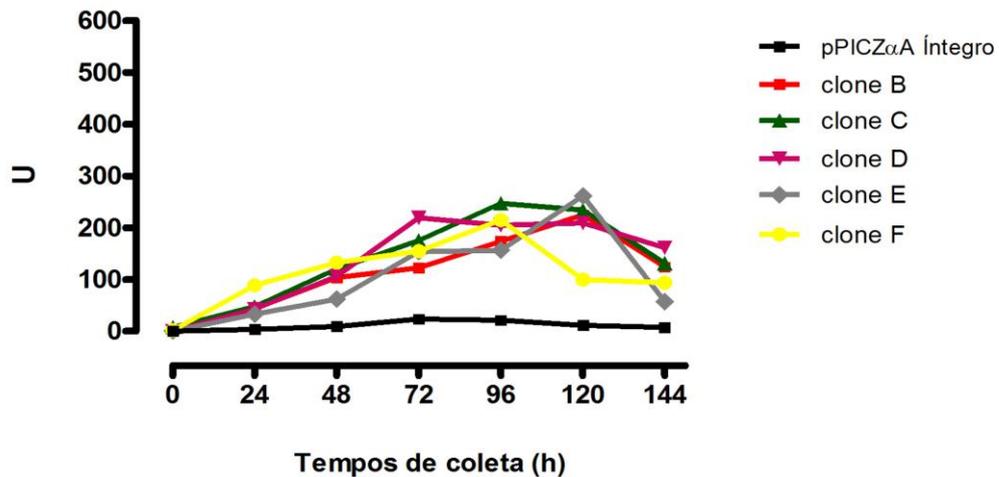


Figura 25 – Atividade quitinásica total do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *Pichia pastoris* KM71H. Clones recombinantes de *P. pastoris* KM71H (B-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas, de 0 até 144 h após o início da indução. Um clone transformado com pPICZ α A sem inserto foi usado como controle negativo. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

Já em relação à atividade quitinásica específica detectada no meio de cultura livre de células, os clones da estirpe KM71H apresentaram atividade superior aos da estirpe GS115 (Figuras 26 e 27). O tempo ótimo de expressão da rCV1897_{PS+} em *P. pastoris* KM71H foi definido em 96 h de indução, para o clone D, uma vez que nesse momento de coleta foi observada a maior atividade quitinásica específica (1.958,23 U/mg).

Esses resultados sugerem que a quitinase CV1897_{PS+} foi produzida e secretada para o meio extracelular nas duas diferentes estirpes de *P. pastoris*, o que é reforçado pelo fato de nenhuma atividade quitinásica ter sido detectada no meio de cultura livre de células dos clones usados como controle negativo (*i.e.*, transformadas com o vetor íntegro), mantidos nas mesmas condições.

As frações do meio de cultura livre de células, concentradas por precipitação com sulfato de amônio, obtidas dos clones recombinantes de *P. pastoris*, foram então analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), com o objetivo de se detectar alguma banda que correspondesse à rCV1897_{PS+}.

A massa molecular predita para a proteína CV1897_{PS+}, calculada a partir da sequência de aminoácidos (439 resíduos), é de aproximadamente 49,2 kDa. Entretanto, a massa molecular esperada para a rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris* e secretada para o meio de cultura seria de ~52,4 kDa. Esse valor leva em conta a ausência do resíduo Met1 e a presença de resíduos de aminoácidos extras, nas extremidades N-terminal (EAEAEF) e C-terminal (VLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH) da proteína recombinante. Na sequência N-terminal EAEAEF, os primeiros quatro resíduos são codificados pelo vetor (EAEA) e os dois resíduos seguintes (EF) são codificados no sítio para *EcoRI*, adicionado ao *primer* senso usado durante a amplificação da ORF. A sequência N-terminal EAEA estaria presente na proteína recombinante secretada, assumindo-se um correto processamento do fator α de secreção de *S. cerevisiae* pela protease Kex2 de *P. pastoris* e ausência de clivagem pela protease Ste13. A sequência adicional na extremidade C-terminal inclui: dois resíduos (VL) codificados pelo sítio de restrição para *XbaI* presente no *primer* reverso (usado para amplificar a ORF) e os *tags* codificados no vetor pPICZ α A, o epítipo *c-myc* (EQKLISEEDL) e a cauda com seis resíduos consecutivos de histidina (HHHHHH), separados por um *linker* (NSAVD).

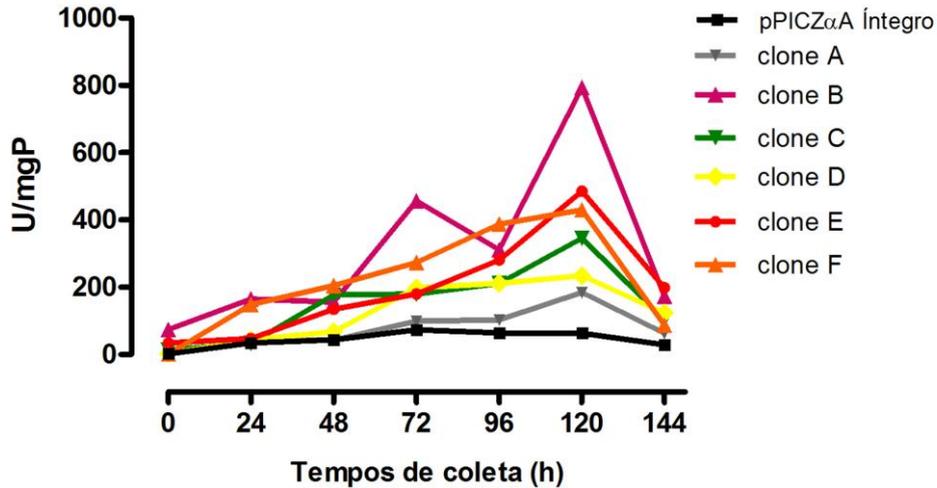


Figura 26 – Atividade quitinásica específica do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *Pichia pastoris* GS115. Clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas a cada 24 h, de 0 h até 144 h após o início da indução. Um clone transformado com pPICZαA sem inserto foi usado como controle negativo. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

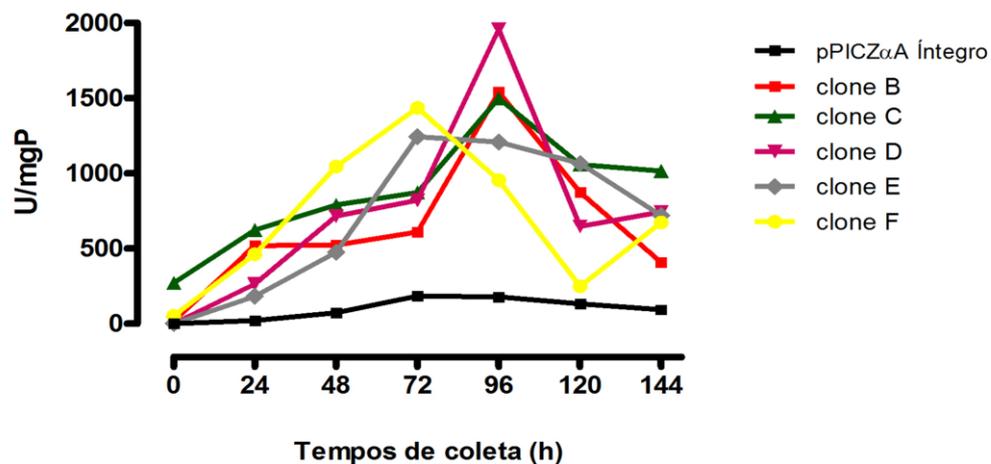


Figura 27– Atividade quitinásica específica do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897_{PS+} em *Pichia pastoris* KM71H. Clones recombinantes de *P. pastoris* KM71H (B-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas a cada 24 h, de 0 h até 144 h após o início da indução. Um clone transformado com pPICZαA sem inserto foi usado como controle negativo. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

Entretanto, quando as amostras obtidas do meio de cultura livre de células, durante a indução dos clones recombinantes de ambas as estirpes de *P. pastoris*, foram submetidas a eletroforese (SDS-PAGE), nenhuma banda proeminente com massa molecular aparente em torno de 52,4 kDa foi evidenciada, mesmo após coramento com nitrato de prata (Figuras 28 e 29). Este resultado sugeriu que a quitinase recombinante estava sendo produzida em baixos níveis, além do limite de detecção do corante.

6.3.4 Expressão de rCV1897_{PS-} em *P. pastoris* KM71H

Um clone recombinante de *P. pastoris* KM71H foi avaliado quanto a sua capacidade em expressar a proteína rCV1897_{PS-}. Alíquotas da cultura foram coletadas a cada 24 h após o início da indução, centrifugadas e o meio de cultura livre de células foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação).

Para confirmar a presença e a funcionalidade da proteína recombinante secretada, os seguintes parâmetros foram determinados: atividade quitinásica total e atividade quitinásica específica. A atividade quitinásica total (U) na fração secretada da cultura do clone recombinante aumentou continuamente a partir de 24 h, atingindo um valor máximo em 72 h (533,9 U), decrescendo a partir desse momento da indução (Figura 30).

A atividade quitinásica específica (U/mg) na fração secretada da cultura do clone recombinante também aumentou continuamente a partir de 24 h, atingindo um valor máximo em 72 h (513,64 U/mg), e a partir desse momento diminuiu continuamente (Figura 31). Dessa forma, o tempo ótimo para indução de expressão da rCV1897_{PS-} em *P. pastoris* KM71H foi definido em 72 h de indução, uma vez que nesse momento de coleta foram observados os maiores valores de atividade quitinásica total e específica.

Esses resultados sugerem que a quitinase rCV1897_{PS-} foi produzida e secretada para o meio extracelular a partir de células de *P. pastoris* KM71H, o que é suportado pela ausência de atividade quitinolítica no meio extracelular da cultura usada como controle negativo (células de *P. pastoris* KM71H transformadas com o vetor íntegro), mantida nas mesmas condições.

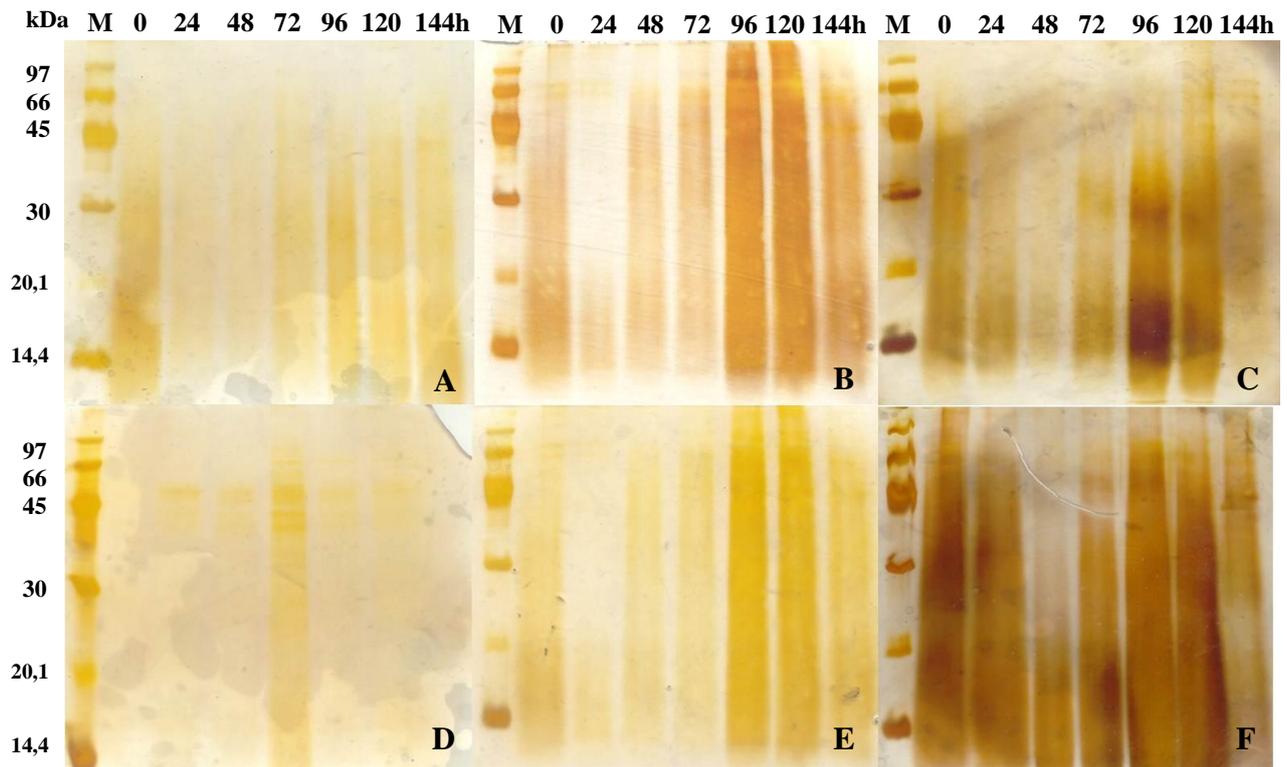


Figura 28 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Clones recombinantes de *P. pastoris* GS115 (A-F) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas a cada 24 h, de 0 h até 144 h (como indicado) após o início da indução. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido à corrida eletroforética. Os géis foram corados com nitrato de prata. Os géis (designados de A a F) correspondem às amostras coletadas dos clones de A a F, respectivamente. Poço M: marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

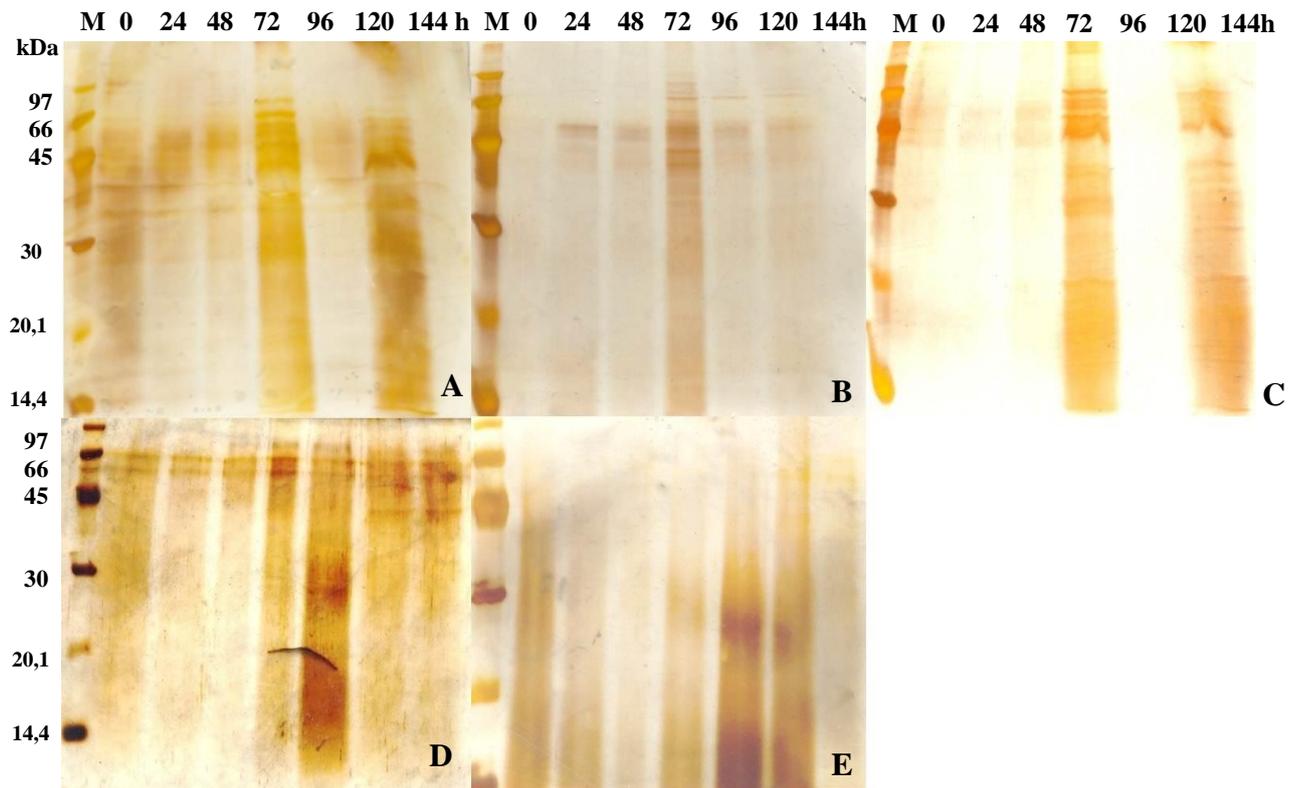


Figura 29 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Clones recombinantes de *P. pastoris* KM71H (A-E) foram cultivados na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas a cada 24 h, de 0 h até 144 h (como indicado) após o início da indução. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido à corrida eletroforética. Os géis foram corados com nitrato de prata. Os géis (designados de A a E) correspondem às amostras coletadas dos clones de B a F, respectivamente. Poço M: marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

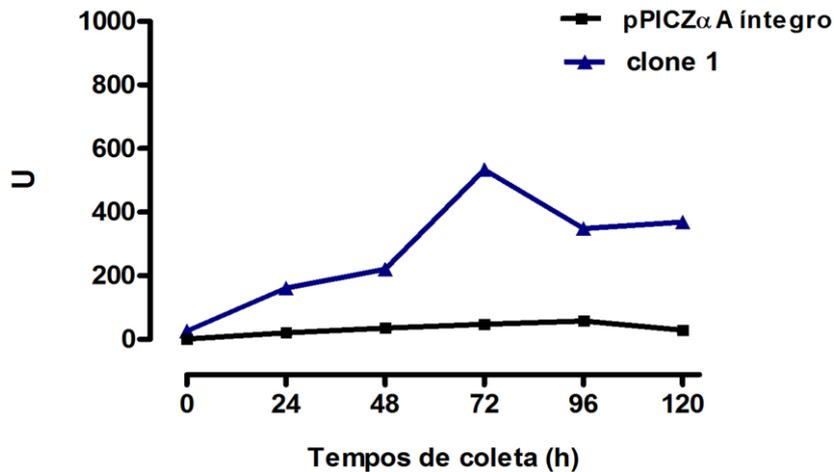


Figura 30 – Atividade quitinásica total do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897_{PS-} em *Pichia pastoris* KM71H. Um clone recombinante de *P. pastoris* KM71H foi cultivado na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas a cada 24 h, de 0 h até 120 h após o início da indução. Um clone transformado com pPICZ α A sem inserto foi usado como controle negativo. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

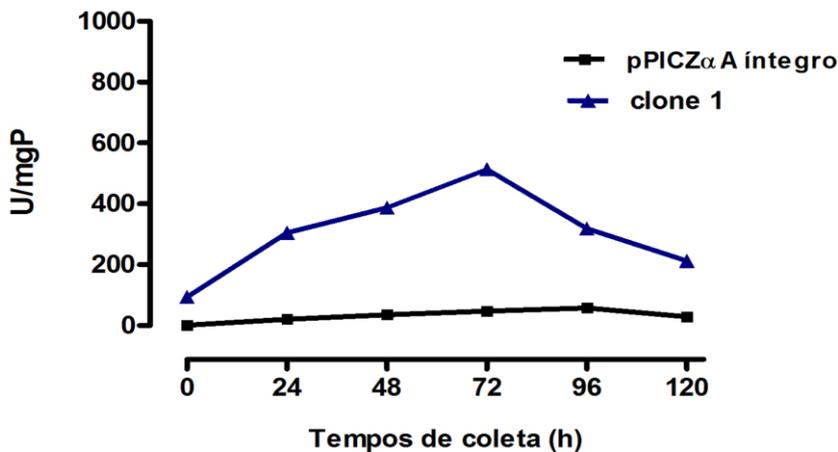


Figura 31 – Atividade quitinásica específica do meio de cultura livre de células, durante a indução da expressão de rCV1897_{PS-} em *Pichia pastoris* KM71H. Um clone recombinante de *P. pastoris* KM71H foi cultivado na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas a cada 24 h, de 0 h até 120 h após o início da indução. Um clone transformado com pPICZ α A sem inserto foi usado como controle negativo. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido a ensaio para determinação de atividade quitinásica, usando quitina coloidal como substrato, como descrito na metodologia. Uma unidade (U) de atividade quitinolítica = 1 nmol GlcNac/mL/h.

Para se tentar detectar alguma banda de proteína que correspondesse à rCV1897_{PS-}, as frações do meio de cultura livre de células, concentradas por precipitação com sulfato de amônio, obtidas durante a indução do clone recombinante de *P. pastoris* KM71H, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), como mostrado na Figura 32. A ORF parcial CV1897 (1.260 pb) de *C. violaceum* ATCC 12472 codifica uma proteína com 420 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita (calculada a partir da sequência) de aproximadamente 47,3 kDa. Entretanto, a massa molecular esperada para a rCV1897_{PS-} produzida em *P. pastoris* e secretada para o meio de cultura seria de 50,7 kDa. Esse valor leva em conta a presença de resíduos de aminoácidos extras, nas extremidades N-terminal (EAEAEF) e C-terminal (VLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH) da proteína recombinante. Na sequência N-terminal EAEAEF, os primeiros quatro resíduos são codificados pelo vetor (EAEA) e os dois resíduos seguintes (EF) são codificados no sítio para *EcoRI*, adicionado ao *primer* senso usado durante a amplificação da ORF.

A sequência N-terminal EAEA estaria presente na proteína recombinante secretada, assumindo-se um correto processamento do fator α de secreção de *S. cerevisiae* pela protease Kex2 de *P. pastoris* e ausência de clivagem pela protease Ste13. A sequência adicional na extremidade C-terminal inclui: dois resíduos (VL) codificados pelo sítio de restrição para *XbaI* presente no *primer* reverso (usado para amplificar a ORF) e os *tags* codificados no vetor pPICZ α A, o epítipo *c-myc* (EQKLISEEDL) e a cauda com seis resíduos consecutivos de histidina (HHHHHH), separados por um *linker* (NSAVD).

A eletroforese das amostras do meio de cultura, obtidas durante a indução do clone recombinante de *P. pastoris* KM71H, revelou uma banda com massa molecular aparente de 50 kDa, que foi detectada a partir de 48 h de indução e estava presente até 120 h após o início do cultivo na presença de metanol (Figura 32). Esse resultado indicou que a proteína rCV1897_{PS-}, desprovida do peptídeo sinal nativo, foi produzida com sucesso em células da levedura *P. pastoris*, sendo secretada para o meio cultura de forma ativa.

6.3.5 Purificação de rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris*

A indução da expressão de rCV1897_{PS+} foi realizada em maior escala (2 L de meio de cultura) com o clone D da estirpe KM71H, sob as mesmas condições descritas anteriormente. O tempo de coleta do meio de cultura foi de 96 h, devido a maior atividade quitinásica específica detectada nesse momento da indução (Figura 27). Ao final da indução,

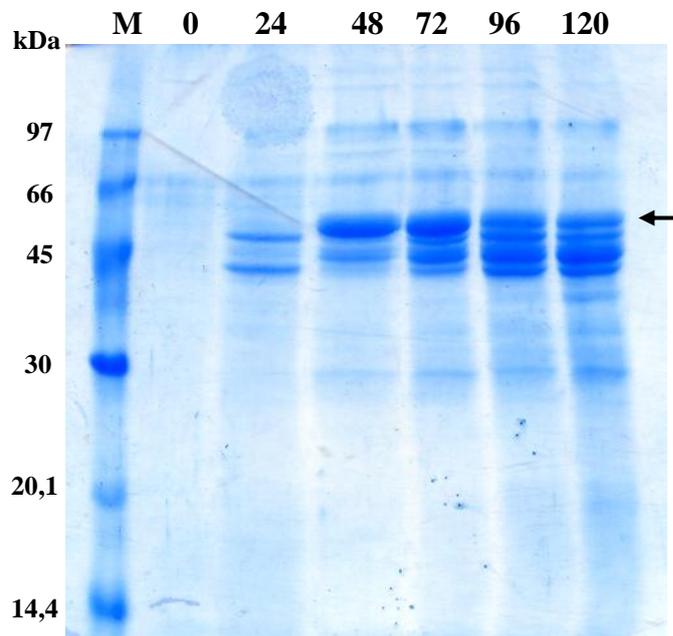


Figura 32 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Um clone recombinante de *P. pastoris* KM71H, transformado com o cassete de expressão $P_{AOXI}::CV1897_{PS+}::TT_{AOXI}$, foi cultivado na presença de metanol 1% (v/v) e amostras do meio de cultura foram obtidas a cada 24 h, de 0 h até 120 h (como indicado) após o início da indução. As amostras do meio de cultura foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura livre de células) foi dialisado contra água destilada, concentrado por precipitação com sulfato de amônio (90% de saturação) e então submetido à corrida eletroforética. O gel foi corado com *Simply Blue Safe Stain* (Invitrogen). Poço M: marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

as proteínas presentes no meio de cultura livre de células foram precipitadas com sulfato de amônio e submetidas a cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Três picos (PI, PII e PIII) foram obtidos, que foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo imidazol 5 mM (PI) e tampão de equilíbrio contendo imidazol 10 mM (PII) e 100 mM (PIII), respectivamente (Figura 33). A fração PIII exibiu atividade quitinolítica (frente a quitina coloidal) e quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), apresentou duas bandas com massas moleculares aparentes de aproximadamente 51,4 kDa e 43,2 kDa (Figura 34). Essas duas bandas foram evidenciadas tanto por coramento com *Coomassie Brilliant Blue* (Figura 34A) e como também pelo corante *InVision His-tag in-gel*, que é específico para a cauda de histidina presente na extremidade C-terminal da proteína recombinante (Figura 34B). O rendimento de rCV1897_{PS+} pura foi de 1,8 mg por litro de cultura (Tabela 1).

O segundo método de purificação utilizado foi cromatografia de afinidade em matriz de quitina, com o objetivo de separar as duas bandas referentes à rCV1897_{PS+}. A amostra da proteína recombinante, obtida por meio da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, foi dialisada contra tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e aplicada em matriz de quitina previamente, equilibrada com o mesmo tampão. Entretanto, a proteína recombinante não interagiu com a matriz, sendo eluída com o tampão de equilíbrio no início do processo cromatográfico (dados não mostrados). Dessa forma, a cromatografia de afinidade em matriz de quitina foi descartada como método de purificação da rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris*.

A cromatografia de interação hidrofóbica também foi avaliada como método alternativo para purificação de rCV1897_{PS+}. A amostra contendo a proteína recombinante, obtida por meio da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, foi aplicada a matriz de *Phenyl-Sepharose CL4B*, na presença de sulfato de amônio 1 M. Nessa condição, rCV1897_{PS+} interagiu com o gel e foi eluída apenas quando a matriz foi lavada com água (dados não mostrados). Essa fração eluída com água possuía atividade hidrolítica sobre quitina coloidal e ao ser analisada por SDS-PAGE apresentou duas bandas com massas moleculares aparentes de 43,2 e 51,4 kDa, tanto para a amostra tratada com β-mercaptoetanol como para a amostra não tratada, antes de ser submetida à corrida eletroforética (Figura 35). Esse resultado mostrou que as duas bandas interagiram da mesma forma com a matriz hidrofóbica, não sendo possível a separação das mesmas.

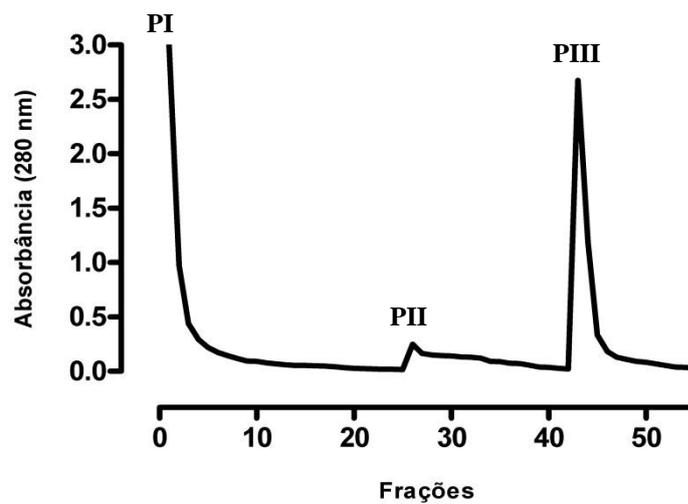


Figura 33 – Purificação de rCV1897_{PS+} por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Fração F0/90 do meio livre de células de *Pichia pastoris* KM71H, transformadas com o cassete de expressão P_{AOXI}::CV1897_{PS+}::TT_{AOXI} e induzidas com metanol 1% por 96 h, foi aplicada à matriz cromatográfica (*Ni Sepharose 6 Fast Flow*), equilibrada com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM). Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com tampão de equilíbrio (PI), após o que a matriz foi lavada com tampão de equilíbrio contendo imidazol 10 mM (PII). A proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição contendo imidazol 100 mM (PIII).

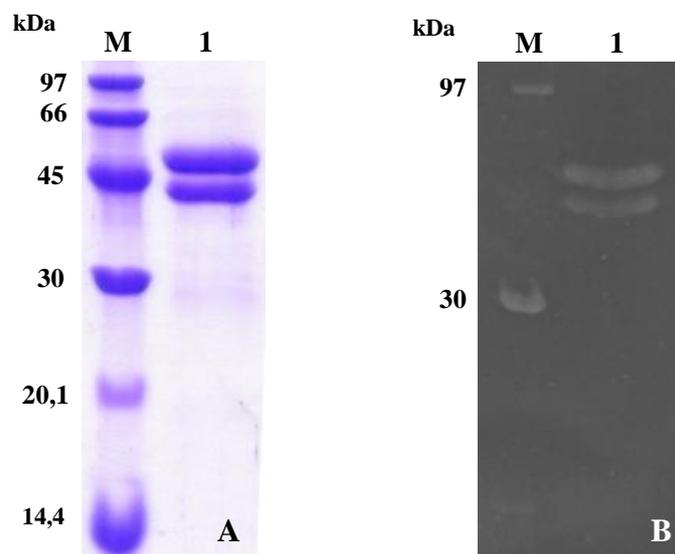


Figura 34 – SDS-PAGE de rCV1897_{PS+} purificada. A proteína recombinante foi produzida em *P. pastoris* KM71H e purificada por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado em matriz *Ni Sepharose 6 Fast Flow*, a partir da fração F0/90 do meio livre de células. (A) As bandas de proteína foram reveladas com *Coomassie Brilliant Blue*. (B) Detecção com kit *InVision His-tag in-gel Stain*. Poço 1: rCV1897_{PS+}. Poço M: marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

Tabela 1 – Purificação de CV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris*¹ por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado

	<i>Proteína Total (mg)</i>	<i>Atividade Total (U*)</i>	<i>Atividade Específica (U*/mgP)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Purificação (fold)</i>
Meio livre de células	56,7	17.573,0	293,1	100	1
F0/90	23,4	10.211,8	579,2	41,2	2,0
PIII**	1,8	2.134,7	815,2	3,3	2,8

¹: dados obtidos a partir de 1 L de cultura (induzida com metanol a 17 °C por 72 horas)

* 1 U = 1 nmol GlcNac/mL/h

**Pico da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, contendo rCV1897_{PS+}.

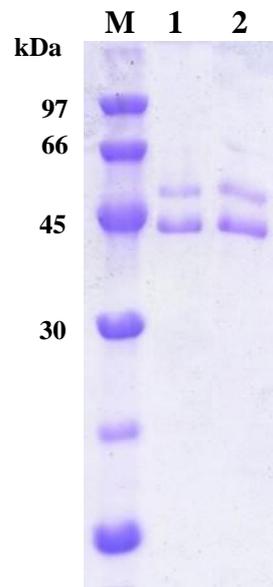


Figura 35 – SDS-PAGE de rCV1897_{PS+} purificada. A proteína recombinante foi produzida em *P. pastoris* KM71H e purificada por cromatografia de interação hidrofóbica a partir da amostra proveniente da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. As bandas de proteína foram reveladas com *Coomassie Brilliant Blue*. Poço 1: rCV1897_{PS+} na presença de β-mercaptoenol. Poço 2: rCV1897_{PS+} na ausência de β-mercaptoenol. Poço M: marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

6.3.6 Purificação de rCV1897_{PS-} produzida em *P. pastoris*

A indução da expressão de rCV1897_{PS-}, correspondendo à proteína desprovida do peptídeo sinal nativo, também foi realizada em maior escala (2 L de meio de cultura), sob as mesmas condições descritas anteriormente. O tempo de coleta do meio de cultura foi de 72 h, devido a maior atividade quitinásica específica detectada nesse instante (Figura 31). Ao final da indução, as proteínas presentes no meio de cultura livre de células foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio e submetidas a cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. O perfil cromatográfico consistiu de três picos (PI, PII e PIII), que foram eluídos com tampão de equilíbrio contendo imidazol 5 mM (PI) e tampão de equilíbrio contendo imidazol 10 mM (PII) e 100 mM (PIII), respectivamente (Figura 36), semelhante ao observado anteriormente durante a purificação de rCV1897_{PS+}. Ensaio enzimático usando quitina coloidal como substrato revelou que a quitinase recombinante rCV1897_{PS-} estava presente na fração eluída com imidazol 100 mM (PIII) (Figura 36), como também foi observado na purificação de rCV1897_{PS+}.

Quando a fração PIII contendo a quitinase recombinante foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), duas bandas com massas moleculares aparentes de 44 e 50 kDa foram visualizadas, tanto por coramento com *Coomassie Brilliant Blue* (Figura 37A) como também pelo corante *InVision His-tag in-gel* (Figura 37B), demonstrando que ambas as bandas possuíam a cauda de histidina (Figura 37B).

Os resultados obtidos com a purificação de rCV1897_{PS-} foram semelhantes ao encontrados na purificação de rCV1897_{PS+}. O rendimento de rCV1897_{PS-} purificada foi de 2,1 mg por litro de cultura (Tabela 2).

6.4 Imunodeteção das quitinases recombinantes (rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-})

Em análises por *Western blotting*, as duas bandas com massas moleculares aparentes em torno de 43-44 kDa e 50-51 kDa, obtidas após a purificação das duas versões (CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}) da quitinase, produzidas em *P. pastoris*, foram reconhecidas especificamente por anticorpo de camundongo anti-His (Figura 38). Esses resultados confirmaram que essas bandas são referentes às proteínas CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-} contendo a cauda de histidina.

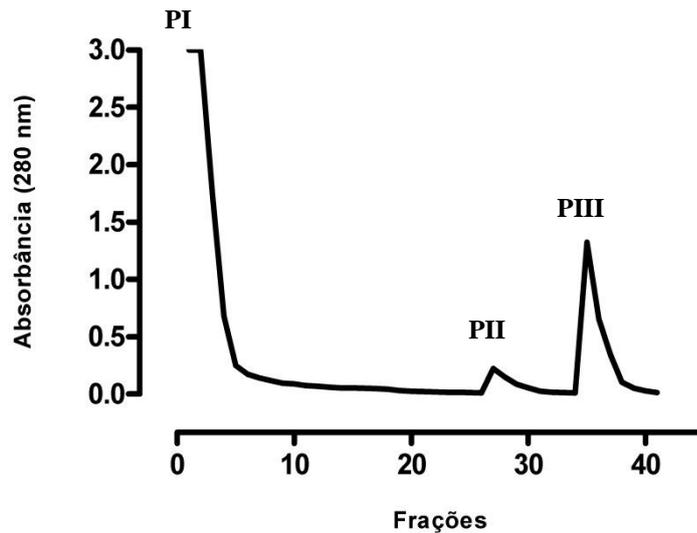


Figura 36 – Purificação de rCV1897_{PS-} por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Fração F0/90 do meio livre de células de *Pichia pastoris* KM71H, transformadas com o cassete de expressão P_{AOXI}::CV1897_{PS-}::TT_{AOXI} e induzidas com metanol 1% por 72 h, foi aplicada à matriz cromatográfica (*Ni Sepharose 6 Fast Flow*), equilibrada com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM). Proteínas que não se ligaram à matriz foram eluídas com tampão de equilíbrio (PI), após o que a matriz foi lavada com tampão de equilíbrio contendo imidazol 10 mM (PII). A proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição contendo imidazol 100 mM (PIII).

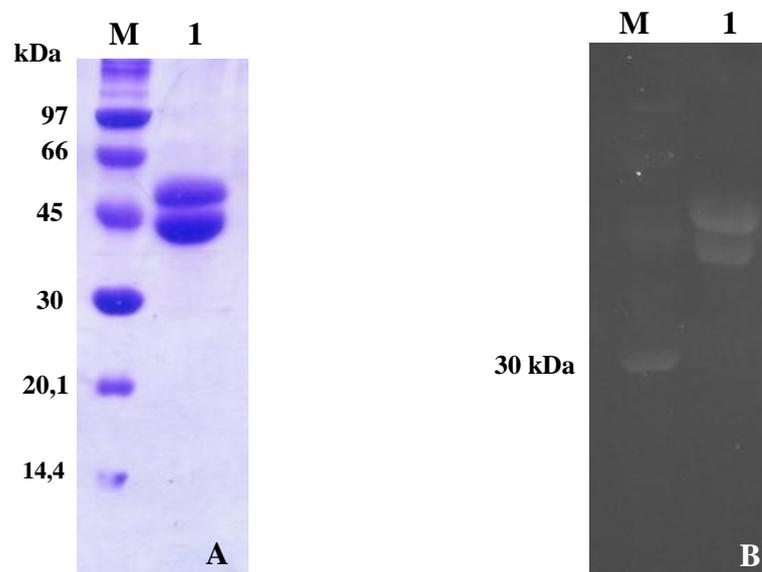


Figura 37 – SDS-PAGE de rCV1897_{PS-} purificada. A proteína recombinante foi produzida em *P. pastoris* KM71H e purificada por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado em matriz *Ni Sepharose 6 Fast Flow*, a partir da fração F0/90 do meio livre de células. (A) As bandas de proteína foram reveladas com *Coomassie Brilliant Blue*. (B) Detecção com *kit InVision His-tag in-gel Stain*. Poço 1: rCV1897_{PS-}. Poço M: marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

Tabela 2 – Purificação de CV1897_{PS-} produzida em *P. pastoris*¹ por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado

	<i>Proteína Total (mg)</i>	<i>Atividade Total (U*)</i>	<i>Atividade Específica (U*/mgP)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Purificação (fold)</i>
Meio livre de células	48,8	15.810,0	322,1	100	1
F0/90	13,2	8.181,8	682,7	27,1	2,1
PIII**	2,1	1.785,3	931,4	4,3	2,9

¹: dados obtidos a partir de 1 L de cultura (induzida com metanol a 17 °C por 96 horas)

* 1 U = 1 nmol GlcNac/mL/h

**Pico da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, contendo rCV1897_{PS-}.

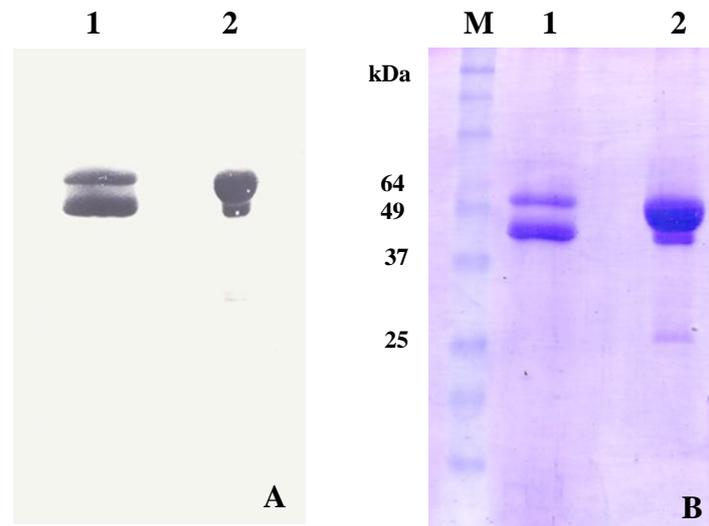


Figura 38 – Imunodeteção das quitinases (rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-}) produzidas em *P. pastoris*. (A) Detecção das quitinases por *Western blotting*. (B) Análise por SDS-PAGE de rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-} reveladas com *Coomassie Brilliant Blue*. Poço M: marcador *Low Molecular Weight* (GE Healthcare). Poço 1: rCV1897_{PS+}. Poço 2: rCV1897_{PS-}.

6.5 Caracterização bioquímica e estrutural das quitinases recombinantes produzidas em *Pichia pastoris*

6.5.1 Ensaio de atividade quitinásica em gel

As quitinases recombinantes (CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}) produzidas em *P. pastoris* foram solubilizadas após liofilização, e ambas as bandas características de cada uma se mostraram ativas contra o substrato glicol quitina, um derivado solúvel da quitina, como observado pela detecção da atividade quitinásica em gel, ilustrada na Figura 39.

6.5.2 Ensaio enzimático na presença e ausência de β -glucuronidase

Este ensaio enzimático foi realizado com rCV1897_{PS+}, utilizando quitina coloidal como substrato. Quando realizado na ausência de β -glucuronidase, não foi detectada nenhuma atividade quitinásica. Este resultado demonstra que rCV1897 é uma endoquitinase e cliva o polímero de quitina de forma randômica em seu interior, produzindo quitooligômeros. O mesmo ensaio foi realizado com a quitinase de *Streptomyces griseus*, como controle positivo, que possui atividade endo e exoquitinásica (Tabela 3).

6.5.3 Ensaio enzimático com substratos sintéticos

Este ensaio foi realizado com a rCV1897_{PS+} e tem por base a hidrólise enzimática de diferentes substratos sintéticos pela quitinase testada. Os substratos sintéticos utilizados foram 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo, 4-nitrofenil N,N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo e 4-nitrofenil β -D-N,N',N''-triacetilquitotriose.

A quitinase de *Streptomyces griseus* apresentou-se ativa contra 4-nitrofenil N-N'-diacetil- β -D-quitobiosídeo (9.925 U/mg) e 4-nitrofenil β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriose (8.862,5 U/mg), não sendo possível detectar atividade contra o 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminídeo. A quitinase rCV1897_{PS+} não foi capaz de hidrolisar os substratos testados (Tabela 3).

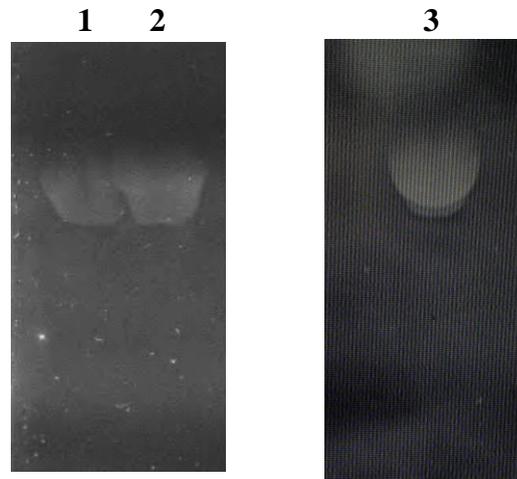


Figura 39 – Atividade quitinásica em gel da quitinases (rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-}) produzidas em *P. pastoris*. Poço 1: 40 µg da rCV1897_{PS+}. Poço 2: 80 µg da rCV1897_{PS+}. Poço 3: 80 µg da rCV1897_{PS-}.

Tabela 3 - Especificidade da quitinase rCV1897_{PS+} por substratos. A atividade específica da enzima (U/mg proteína) foi medida usando-se quitina coloidal e substratos sintéticos. A quitinase de *Streptomyces griseus* foi utilizada para comparação.

Substrato	rCV1897	Quitinase de <i>Streptomyces griseus</i>
Quitina coloidal*		
(+) β-glucuronidase	1.544,22	20.153,84
(-) β-glucuronidase	0	1.504,18
4-nitrophenil N-acetil-β-D-glucosaminídeo**	0	0
4-nitrophenil N-N'-diacetil-β-D-quitobiosídeo	0	9.925,0
4-nitrophenil-β-D-N,N',N''-triacetilquitotriose	0	8.862,0

* Para ensaios usando quitina coloidal, uma unidade foi definida por 1 nmol de GlcNAc/mg/hora.

** Para ensaios usando substratos sintéticos, uma unidade de atividade específica foi definida pela liberação de 1 nmol de 4-nitrophenol/mg/hora, pH 5,2 a 37 °C.

6.5.4 Determinação da sequência de aminoácidos N-terminal

O sequenciamento de aminoácidos N-terminal, por meio da técnica de degradação de Edman, foi realizado para as duas bandas detectadas no gel de eletroforese, referentes às quitinases recombinantes (CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}) expressas em *P. pastoris*.

Para rCV1897_{PS+}, uma sequência de 23 resíduos de aminoácidos foi obtida para a banda de 51,4 kDa, e uma sequência de 31 resíduos foi obtida para a banda de 43,2 kDa. As sequências alinharam-se totalmente com a sequência deduzida a partir da ORF CV1897, como ilustrado na Figura 40.

Já para a rCV1897_{PS-}, a sequência de 31 resíduos de aminoácidos obtida foi a mesma para as duas bandas (51 e 44 kDa). Esta sequência obteve 100% de identidade com a deduzida a partir da ORF CV1897 (Figura 41).

6.5.5 Verificação de N-glicosilação na quitinase recombinante

A sequência deduzida de aminoácidos da quitinase CV1897 foi analisada com o uso da ferramenta *NetNGlyc*, para uma busca de sítios putativos para N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr). Como observado na Figura 42, nenhum sítio potencial para N-glicosilação foi encontrado na sequência da proteína.

6.5.6 Verificação de O-glicosilação na quitinase recombinante

A sequência deduzida de aminoácidos da quitinase CV1897 também foi analisada com o uso da ferramenta *NetOGlyc*, para uma busca de sítios putativos para O-glicosilação (Ser ou Thr). Como observado na Figura 43, um sítio potencial de O-glicosilação (Thr⁷⁹) foi predito.

Para confirmar se a CV1897_{PS+} foi produzida em *P. pastoris* de forma glicosilada, o gel de proteínas foi revelado pelo método de Schiff. A quitinase recombinante não foi revelada com o reagente, sugerindo que a rCV1897_{PS+} não foi produzida na levedura de forma glicosilada (dados não mostrados).

EAEAEF KLSAFIIL **SLLPLPALAAPWQARAIYQKGQT** VQWQGRDWQAKWPTRGETPGANPKG
 SWIAHVDGAMRKL **DDAAPVPTLQQALQHEAELTNNDFFRKVKA** SIRTLSNEQVEQVAPGRAA
 NPVNRRRVERLLPSAKWDYYFSRRDASYTYTRFLQAVAKFFPGVCDDYGDGRDADAICRHSLAT
 MFAHFGQETGNHDASDTPVQWRQGLAYLREMGCADSGSACGYNTECNDPVFNKVWTCGKNPDG
 SWKKYYGRGAKQLSYNYNYGPF'SQAMNNGDQSVLLQNPDLVASTWLNLASATFFFVYPQPPKP
 SMLHVIDGTWVPNAADKAAGAGNNFATTIQI INGECGGGTERQAAQNRIDYKQFAHDLGWDY
 GGEQLSCANMQRFTSASSAAYNIYWEKDWQWQHDIYQCQLVSYQTPYSALQAGNYQRCVEDNNG
 VKLK **VEQKLISEEDLNSAVD** HHHHHH

Legenda:

- Sítios de clivagem Kex2 e Ste13
- Aminoácidos adicionados para o sítio de clonagem
- Epítipo *c-myc*
- Cauda de poli-histidina

Sequência N-terminal da banda de 51,4 kDa de CV1897_{PS+}

SLLPLPALAAPWQARAIYQKGQT

Sequência N-terminal da banda de 43,2 kDa de CV1897_{PS+}

DDAAPVPTLQQALQHEAELTNNDFFRKVKA

Figura 40 – Sequência N-terminal de rCV1897_{PS+} obtida por degradação de Edman. Em vermelho estão representadas as sequências N-terminal obtidas para as duas bandas de rCV1897_{PS+}.

EAEAEFAPWQARAIYQKGQTVQWQGRDWQAKWPTRGETPGANPKGSWIAHVDGAMRKL**DDAA**
PPVPTLQQALQHEAELTNNDFFRKVKASIRTLSENEQVEQVAPGRAANPVNRRVERLLPSAKW
 DYYFSRRDASYTYTRFLQAVAKFPVCDDYGDGRDADAICRHSLATMFAHFGQETGNHDASDT
 VPQWRQGLAYLREMGCADSGSACGYNTECNDFVNKVVWTCGKNPDGSKWKKYGRGAKQLSYNY
 NYGPFSSQAMNNGDQSVLLQNPDLVASTWLNLASATFFFVYPQPPKPSMLHVIDGTWVPNAADK
 AAGAGNNFATTIQIINGECGGGTERQAAQNRIDYYKQFAHDLGWDYGGEQQLSCANMQRFTSAS
 SAAYNIIWEKDWQWQHDYQCQLVSYQTPYSALQAGNYQRCVEDNWGVKLV**LEQKLI**SEEDLN
SAVDHHHHHH

Legenda:

- Sítios de clivagem Kex2 e Ste13
- Aminoácidos adicionados para o sítio de clonagem
- Epítipo *c-myc*
- Cauda de poli-histidina

Sequência N-terminal das duas bandas (51 e 42,8 kDa) de CV1897_{PS}.

DDAAPPVPTLQQALQHEAELTNNDFFRKVKA

Figura 41 – Sequência N-terminal de rCV1897_{PS} obtida por degradação de Edman. Em vermelho está representada a sequência N-terminal obtida para as duas bandas de rCV1897_{PS}.

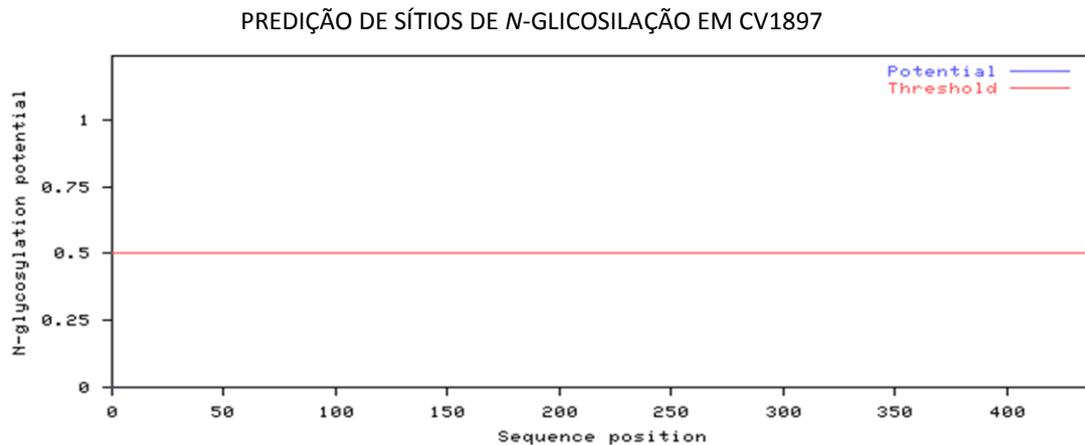
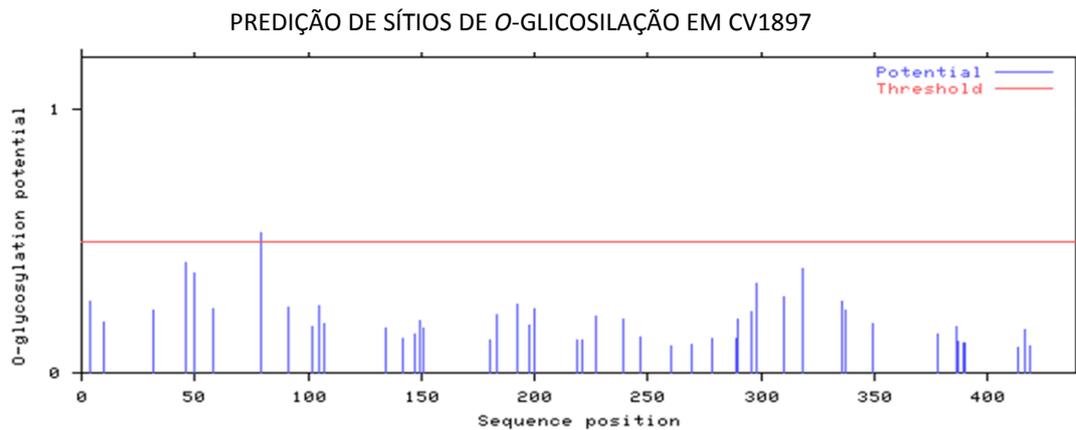


Figura 42 – Resultado da análise da sequência de aminoácidos de CV1897 pelo software *NetNGlyc*.



MKLSAFI ILSLLPLPALAAPWQARAIYQKGQTVQWQGRDWQAKWPTRGETPGANPKGSWIAHVVDGAMR
 KLDDAAPPVPTLQQALQHEAELTNNDFFRKVKASIRTL SNEQVEQVAPGRAANPVNVRRVERLLPSAK
 WDYYFSRRDASYTYTRFLQAVAKFPGVCCDDYGDGRDADAICRHSLATMFAHFQGETGNHDASDTPVQW
 RQGLAYLREMGCADSGSACGYNTECNDPVFNKVVWTCGKNPDGSKKYYGRGAKQLSYNYNGPFSQAM
 NNGDQSVLLQNPDLVASTWLNLASATFFFVYPQPPKPSMLHVIDGTWVPNAADKAAGAGNNFATTIQI
 INGECGGGTERQAAQNRIIDYKQFAHDLGWDYGGEQLSANMQRFTSASSAAYNIYWEKDWQWQHDIYQ
 CQLVSYQTPYSALQAGNYQRCVEDNWGVKLLK

Figura 43 – Resultado da análise da sequência de aminoácidos de CV1897 pelo software *NetOGlyc*. Na sequência deduzida de aminoácidos da CV1897 apresentada abaixo do gráfico, o sítio predito de *O*-glicosilação (thr⁷⁹) está sombreado em amarelo.

6.5.7 Espectrometria de massa

A fim de avaliar se houve alguma modificação na sequência de aminoácidos, as quitinases recombinantes (CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}) produzidas em *P. pastoris* foram digeridas com tripsina e submetidas à análise por espectrometria de massa.

Os peptídeos encontrados foram identificados como sendo parte da quitinase de *C. violaceum* ATCC 12472, como mostrado na figura 44. Nenhuma diferença foi encontrada entre os peptídeos obtidos (Anexos I e J) e a sequência da proteína, deduzida da sequência de nucleotídeos.

6.5.8 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da rCV1897

A atividade quitinásica relativa da rCV1897_{PS+} foi analisada quando incubada a diferentes temperaturas (30 a 100 °C, com intervalos de 10 °C), durante 30 minutos. Através do gráfico representado na figura 45, foi observado que a rCV1897_{PS+} mostrou-se ativa quando tratada com temperaturas de até 40 °C, quando a enzima exibiu 93,7% de sua atividade máxima, registrada a 30 °C. Tratamentos de 30 minutos em temperaturas a partir de 50 °C foram suficientes para inativação enzimática, provavelmente por causar alguma alteração estrutural da proteína, levando a um estado conformacional que impossibilita a atividade enzimática.

6.5.9 Efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV1897

O efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV1897_{PS+} foi analisado utilizando-se tampões com pH variando de 2 a 10. Como pode ser observado na figura 46, rCV1897_{PS+} apresentou-se ativa na faixa de pH de 3 a 9. A maior atividade enzimática foi observada em pH 5, sendo este considerado o pH ótimo para a quitinase recombinante. Em pH 6, rCV1897_{PS+} manteve 83% da atividade e, em pH 7, manteve aproximadamente 54%.

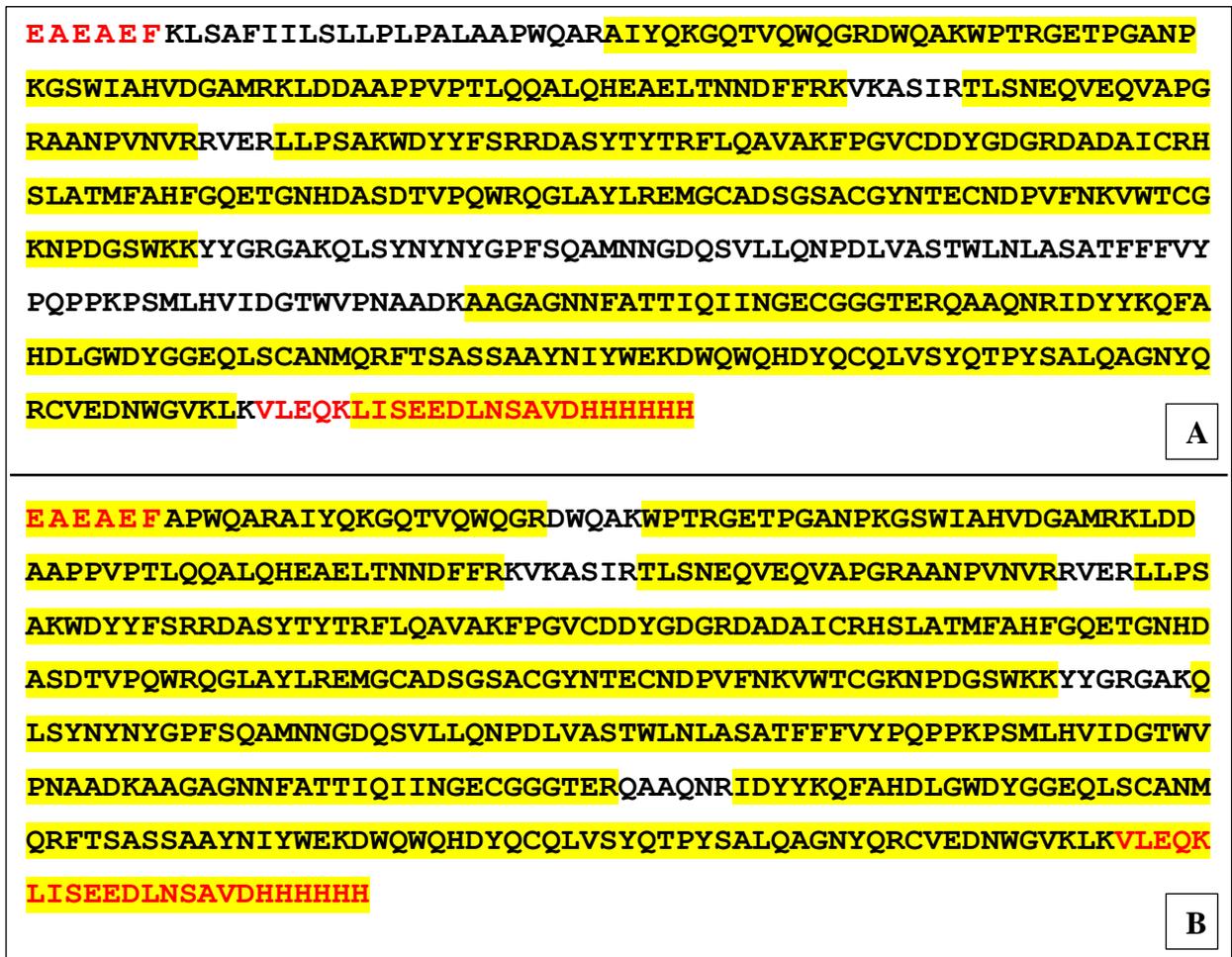


Figura 44 – Resíduos identificados por espectrometria de massa das amostras de rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-} produzidas em *P. pastoris* e digeridas com tripsina. (A) Sequência deduzida da rCV1897_{PS+}. (B) Sequência deduzida da rCV1897_{PS-}. Os resíduos sombreados em amarelo foram identificados por espectrometria de massa. Em vermelho, resíduos codificados nos vetores de expressão utilizados.

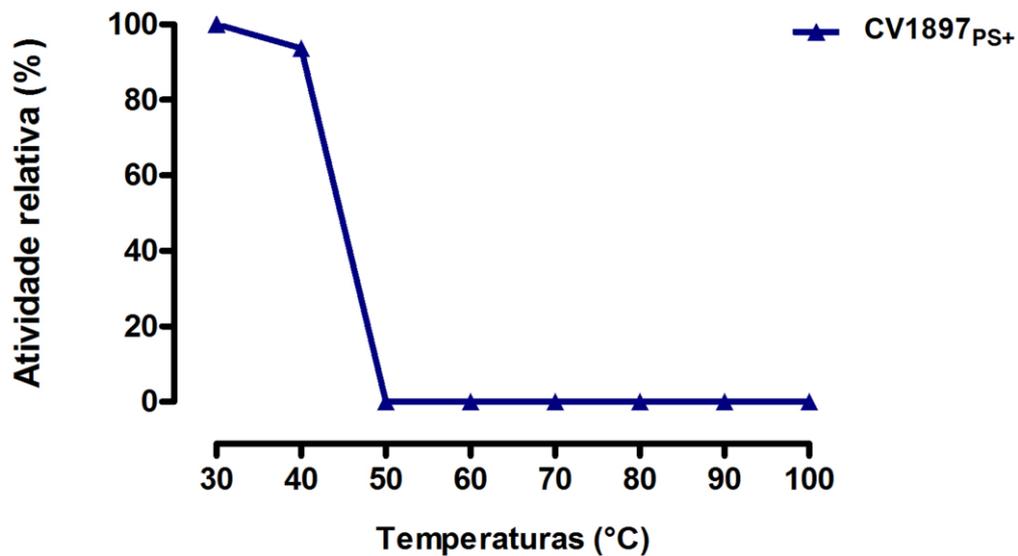


Figura 45 – Atividade relativa da quitinase rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris*, após incubação em diferentes temperaturas (30 a 100 °C) durante 30 min.

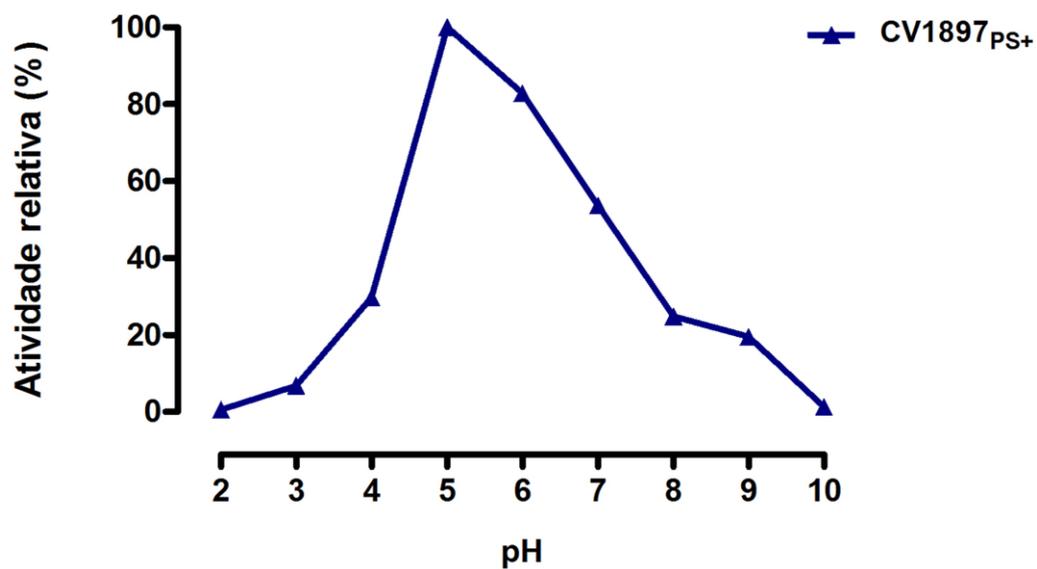


Figura 46 – Efeito do pH na atividade enzimática relativa da quitinase rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris*.

6.5.10 Espectro de Dicroísmo Circular (CD)

A partir dos dados obtidos por CD, foi possível verificar que na estrutura secundária de rCV1897_{PS+}, produzida em *P. pastoris*, predominam arranjos em α -hélice (37%), possuindo também 26% do seu conteúdo de folhas- β e 38% de estrutura desordenada.

A espectroscopia de dicroísmo circular é bastante usada para acompanhar a estabilidade da proteína quando submetida a condições desnaturantes, pois os espectros da proteína enovelada e desnaturada são bem diferentes. A transição para a desnaturação pode ser facilmente observada nas figuras 48 e 49, onde a estabilidade térmica de rCV1897_{PS+} (0,2 mg/mL) foi avaliada. A proteína foi incubada, por 20 minutos, em diferentes temperaturas, variando de 10 a 90 °C com intervalos de 10 °C, e os espectros obtidos foram analisados. A desnaturação de rCV1897_{PS+} foi observada em temperaturas a partir de 50 °C, quando o espectro tende a zero (Figura 47).

Pelos gráficos de desnaturação térmica, ilustrados na figura 48, observa-se que a partir de aproximadamente 45 °C já ocorre a desnaturação de 50% das moléculas de rCV1897_{PS+}. Todos os pontos acima da curva indicam que a proteína está totalmente desnaturada.

Este resultado foi observado com clareza nos espectros obtidos entre as temperaturas de 40 a 50 °C (Figura 49). O resultado obtido está de acordo com o efeito da temperatura analisado por meio da atividade enzimática de rCV1897_{PS+}, onde o tratamento com temperaturas a partir de 50 °C por 30 minutos levaram à ausência de atividade quitinásica.

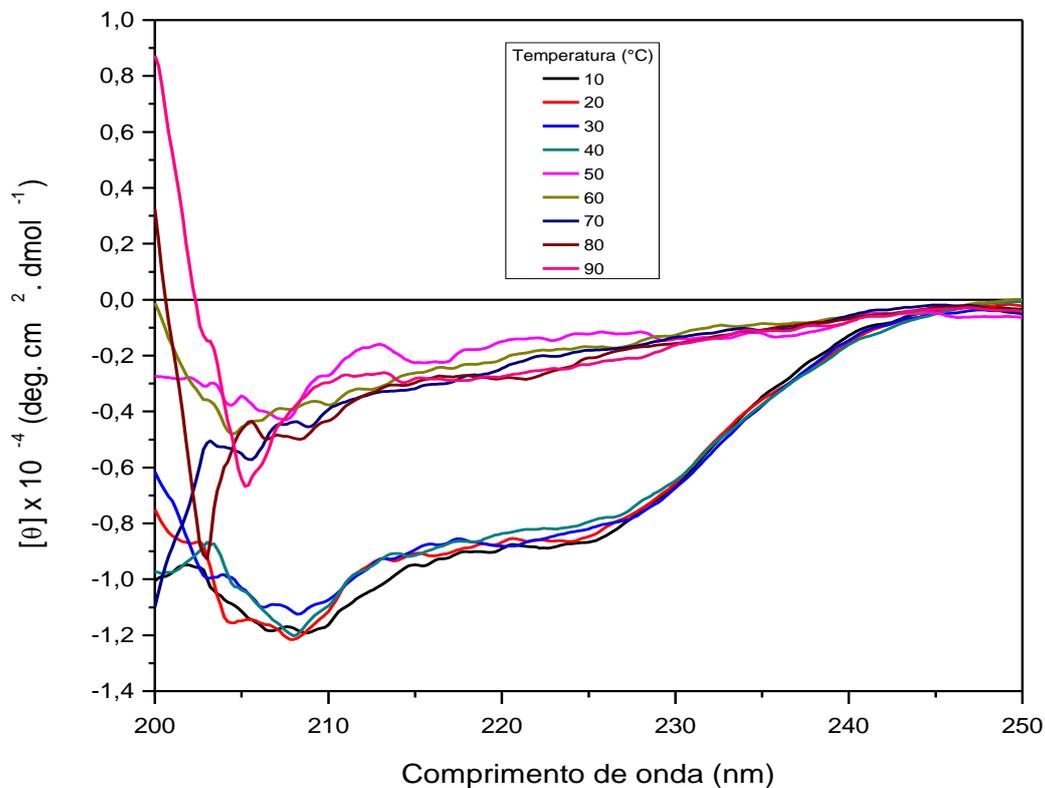


Figura 47 – Efeito da temperatura na estrutura secundária de rCV1897_{PS+} medido por dicroísmo circular. Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho ótico. rCV1897_{PS+} foi incubada por 20 minutos em diferentes temperaturas (10-90 °C), de 10 em 10 °C, a uma concentração de 0,2 mg/mL.

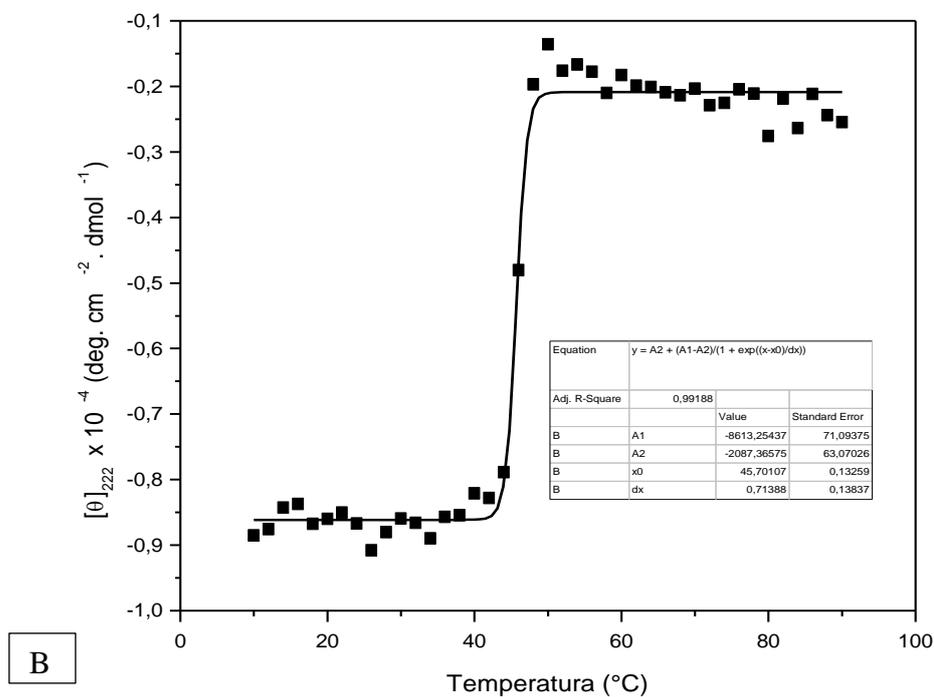
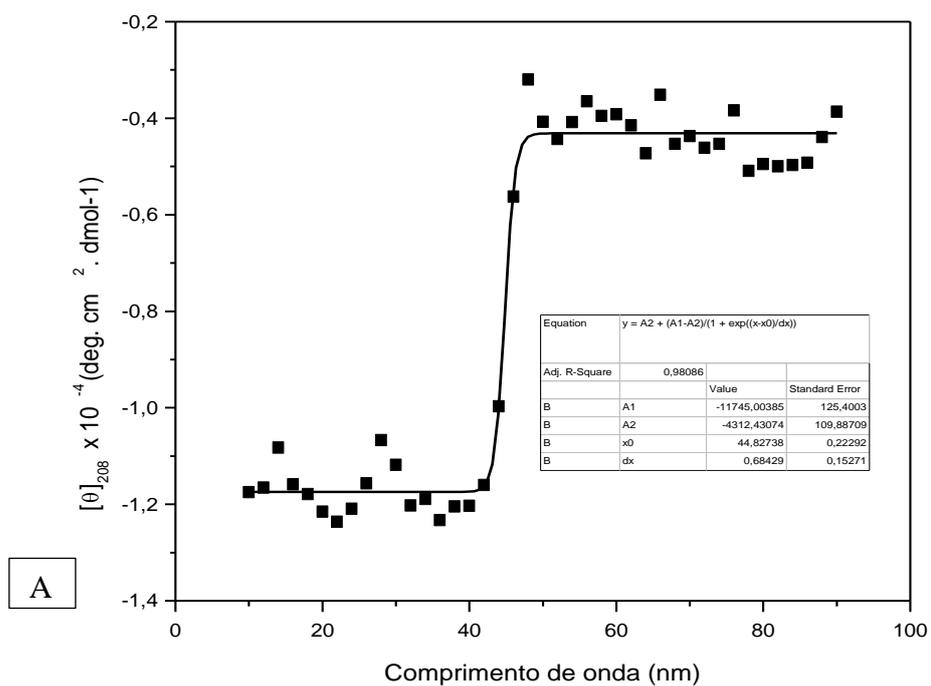


Figura 48 – Espectro de dicroísmo circular da rCV1897_{PS+} em função da temperatura. Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho ótico. Os sinais a 208 (A) e 222 nm (B) foram medidos e cada ponto ilustrado é a média de pelo menos 3 medidas independentes.

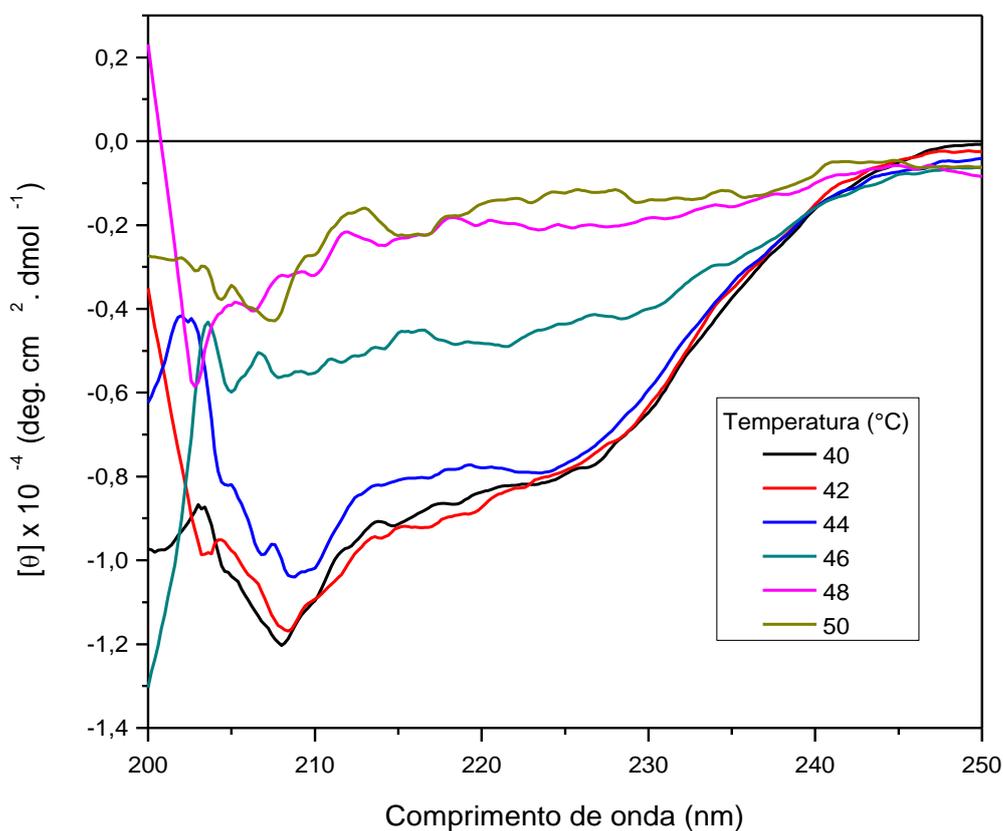


Figura 49 – Efeito da temperatura na estrutura secundária da rCV1897_{PS+} medido por dicroísmo circular. Medidas de dicroísmo circular foram obtidas usando um espectropolarímetro Jasco J-815, com célula de 0,1 cm de caminho ótico. rCV1897_{PS+} foi incubada por 20 minutos em diferentes temperaturas (40-50 °C), de 2 em 2 °C, a uma concentração de 0,2 mg/mL.

6.5.11 Espectro de Fluorescência

Os resultados obtidos para a rCV1897_{PS+} indicaram que a mesma foi produzida em *P. pastoris* em sua conformação enovelada, uma vez que os espectros de fluorescência obtidos após excitação a 280 nm (Figura 50A) e a 295 nm (Figura 50B) apresentaram um máximo de emissão em 330 nm. Estes espectros, relacionados à excitação dos resíduos de triptofano (285 a 305 nm), são um indicativo de que rCV1897_{PS+} está na conformação nativa, pelo máximo apresentado (330 nm), pois mostram que os resíduos de triptofano estão localizados no interior da proteína, não estando expostos à solução aquosa.

6.6 Atividade biológica

6.6.1 Atividade antifúngica sobre fungos filamentosos

Este ensaio teve como objetivo avaliar o efeito de rCV1897_{PS+}, produzida em *P. pastoris*, sobre a germinação de conídios e crescimento micelial dos fungos *Colletotrichum musae*; *C. lindemuthianum*; *C. gloeosporioides*; *Fusarium solani*; *F. oxysporum*; *Penicillium herquei* e *Rhizoctonia solani*. De acordo com os resultados ilustrados na figura 53, a dose de 30 µg de rCV1897_{PS+} causou uma inibição de 81% do crescimento de *P. herquei* até o tempo de 24 h (Figura 51A) e uma inibição de 28% do crescimento do fungo *C. lindemuthianum* (Figura 51B). A quitinase recombinante não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento micelial dos demais fungos testados.

O efeito de rCV1897_{PS+} sobre a germinação de conídios dos diferentes fungos pode ser observado na figura 52. A quitinase recombinante foi capaz de inibir totalmente a germinação dos conídios de *P. herquei* na dose de 30 µg até o tempo de 48 h (Figura 52A). Em doses menores (15 µg; 7,5 µg e 3,75 µg) de rCV1897_{PS+}, a inibição da germinação dos conídios foi de aproximadamente 68% (Figura 53A). Nestas concentrações, o efeito da quitinase sobre a germinação dos conídios não foi dose-dependente. Para confirmar que o efeito sobre a germinação de conídios de *P. herquei* era causado pela atividade enzimática de rCV1897_{PS+}, a mesma foi submetida a um tratamento térmico de 100 °C por 10 min e novamente analisada. A amostra tratada dessa forma não apresentou efeito inibitório sobre a germinação de *P. herquei*, sugerindo que o efeito da proteína recombinante sobre a germinação de conídios depende, pelo menos em parte, da ação hidrolítica da mesma sobre a quitina (Figura 53B).

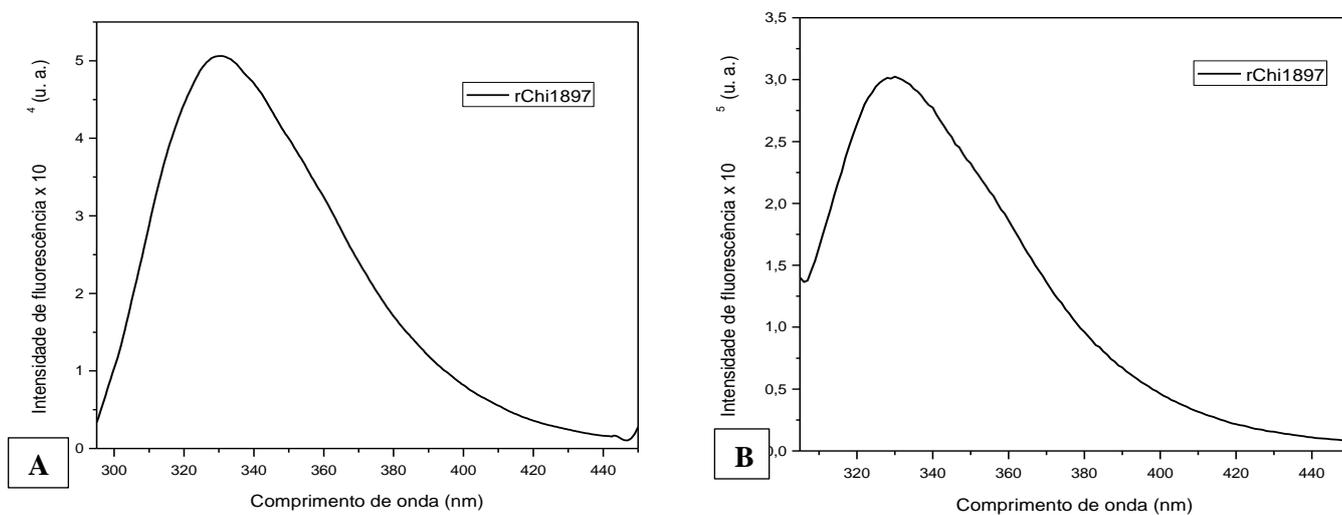


Figura 50 – Espectros de fluorescência da rCV1897_{PS+}. Os espectros foram obtidos em fluorímetro ISSK2, utilizando-se cubeta de 0,5 mL, com caminho ótico de 1 cm. A proteína recombinante foi aplicada em uma concentração de 0,055 mg/mL, dissolvida em água ultrapura. (A) Excitação a 280 nm; (B) Excitação a 295 nm.

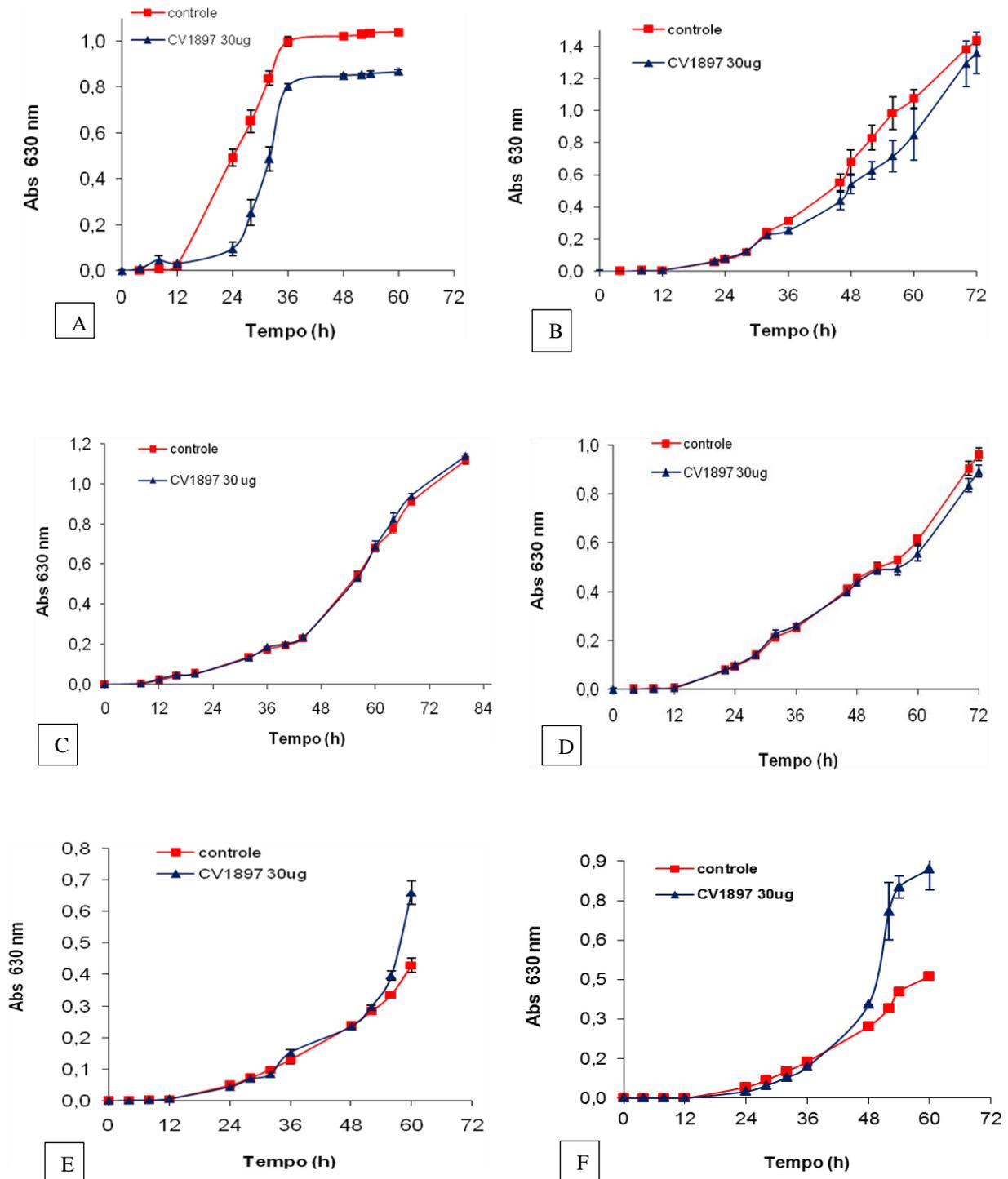


Figura 51 – Efeito da rCV1897_{PS+} sobre o crescimento fúngico. (A) *Penicillium herquei*; (B) *Colletotrichum lindemuthianum*; (C) *C. gloeosporioides*; (D) *C. musae*; (E) *Fusarium oxysporum*; (F) *F. solani*.

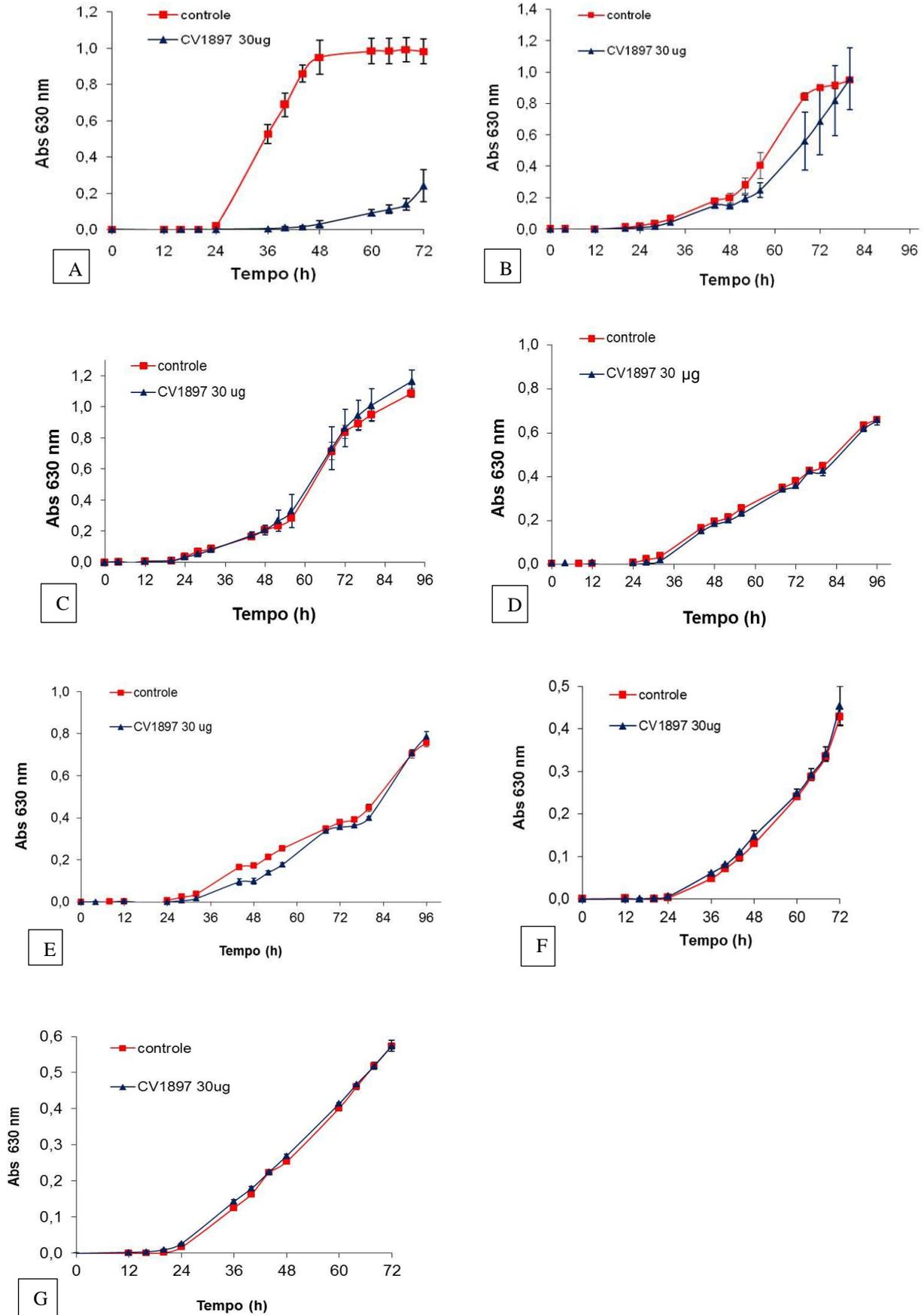


Figura 52 – Efeito da rCV1897_{PS+} sobre a germinação de conídios dos fungos. (A) *Penicillium herquei*; (B) *Colletotrichum lindemuthianum*; (C) *C. gloeosporioides*; (D) *C. musae*; (E) *Fusarium oxysporum*; (F) *F. solani*; (G) *Rhizoctonia solani*.

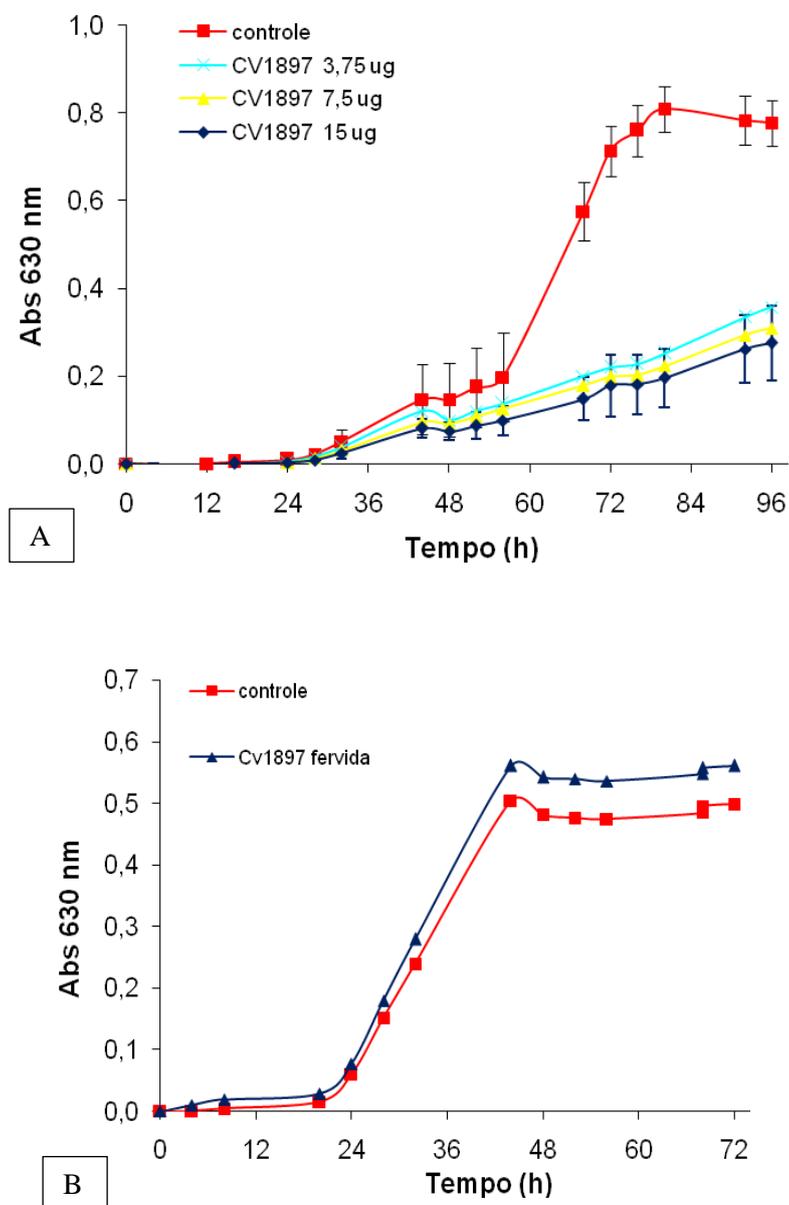


Figura 53 – Efeito de diferentes concentrações da rCV1897_{PS+} sobre a germinação de conídios do fungo *Penicillium herquei*. (A) 3,75; 7,5 e 15 µg da rCV1897_{PS+}; (B) rCV1897_{PS+} fervida.

A dose de 30 μg de rCV1897_{PS+} também causou inibição de aproximadamente 33% na germinação dos conídios de *C. lindemuthianum* (Figura 52B). Nenhum efeito inibitório foi observado sobre a germinação de conídios dos demais fungos testados.

Os maiores efeitos da quitinase recombinante foram verificados sobre a germinação de conídios e o crescimento micelial do fungo *P. herquei*. Portanto, um ensaio para avaliar o efeito da proteína recombinante sobre a permeabilidade da membrana desse fungo foi realizado, utilizando iodeto de propídio. Como evidenciado na figura 54 (C e D), rCV1897_{PS+}, na concentração de 0,3 mg/mL, danificou a membrana plasmática de conídios de *P. herquei*, quando esses foram expostos à proteína por 24 h.

6.6.2 Atividade antifúngica sobre *Candida tropicalis*

A avaliação da atividade antifúngica das duas formas da quitinase recombinante (CV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-}), produzidas em *P. pastoris*, foi determinada frente a diferentes cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol (CIM > 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a mais baixa concentração que produziu 50% de redução do crescimento das células fúngicas, após 24 h de incubação com diferentes diluições da proteína.

O efeito frente às cepas de *C. tropicalis* está descrito nas Tabelas 4 e 5. Não houve redução do crescimento celular em nenhuma cepa de *C. tropicalis* quando estas foram expostas ao FLC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou às proteínas recombinantes (rCV1897_{PS+} ou rCV1897_{PS-}) (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) isoladamente. Por outro lado, a co-exposição das cepas de *C. tropicalis* à uma das formas de quitinase recombinante (rCV1897_{PS+} ou rCV1897_{PS-}) + FLC (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) causou redução no crescimento das mesmas. Quando combinadas com FLC 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tanto rCV1897_{PS+} como rCV1897_{PS-} apresentaram CIM de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (para a cepa 1) ou 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (para as cepas 2, 3, 4, 5, 6 e 7). Como demonstrado nas Tabelas 4 e 5, as associações rCV1897_{PS+} + FLC e rCV1897_{PS-} + FLC atuaram de forma sinérgica contra todas as cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, com um FICI < 0,5.

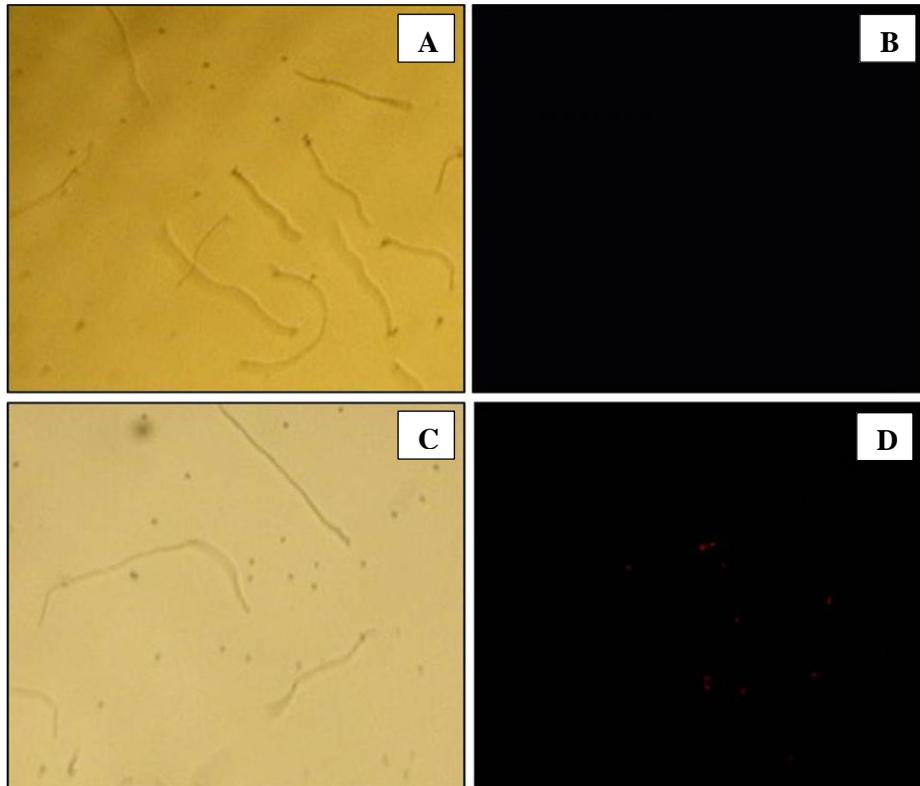


Figura 54 – Ensaio de permeabilidade de membrana dos conídios de *Penicillium herquei*. Os conídios foram incubados com a quitinase rCV1897_{PS+} (0,3mg/mL) (C, D) ou com o controle negativo, tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 (A, B) por 24 horas a 27 °C. Iodeto de propídio (1 mM) foi utilizado para determinar a integridade das membranas dos conídios.

Tabela 4: Avaliação da atividade antifúngica de CV1897_{PS+} contra cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol, isoladas no Ceará.

Cepas ^a	MIC (µg/mL) ^b				ΣFICI	Interpretação ^c
	MIC		Combinação - MIC			
	FLC	CV1897 _{PS+}	FLC	CV1897 _{PS+}		
<i>C. tropicalis</i> 1	>64	>64	8.0	0.25	0.129	SIN
<i>C. tropicalis</i> 2	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 3	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 4	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 5	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 6	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 7	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN

^aCepas resistentes ao fluconazol de *Candida tropicalis* isoladas a partir de amostras biológicas.

^b FLC - Fluconazol; CV1897_{PS+} - Proteína recombinante. O MIC foi definido como a concentração mais baixa que produziu uma redução de 50% no crescimento de células de fungos após 24h de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo NCCLS M27-A3. O intervalo de FLC variou 64-0,125 µg / mL, e o intervalo de CV1897_{PS+} variou 64-0,125 µg / mL. MICs representam médias geométricas de pelo menos três CIMs determinadas em dias diferentes^c. O efeito sinérgico da FLC e CV1897_{PS+} foi calculado com base FICI (índice de concentração inibitória fracional) ($FICI = [FC] / CFS + [QC] / CQS$), em que [FC] e [CQS] são as concentrações de FLC e CV1897_{PS+} que apresentaram ação quando combinado; [SFC] e [CAS] são as concentrações dos mesmos fármacos que atuam sozinhos. A interpretação foi realizada de acordo com o valor do FICI <0,5 = sinergismo (SIN); 0,5 <FICI ≤ 4,0 = indiferença (IND) e FICI > 4,0 = antagonismo (ANT).

Tabela 5: Avaliação da atividade antifúngica de CV1897_{PS.} contra cepas de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol, isoladas no Ceará.

Cepas ^a	MIC (µg/mL) ^b				ΣFICI	Interpretação ^c
	MIC		Combinação - MIC			
	FLC	CV1897 _{PS.}	FLC	CV1897 _{PS.}		
<i>C. tropicalis</i> 1	>64	>64	8.0	0.25	0.129	SIN
<i>C. tropicalis</i> 2	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 3	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 4	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 5	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 6	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN
<i>C. tropicalis</i> 7	>64	>64	8.0	0.125	0.127	SIN

^a Cepas resistentes ao fluconazol de *Candida tropicalis* isoladas a partir de amostras biológicas.

^b FLC - Fluconazol; CV1897_{PS.} - Proteína recombinante. O MIC foi definido como a concentração mais baixa que produziu uma redução de 50% no crescimento de células de fungos após 24h de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo NCCLS M27-A3. O intervalo de FLC variou 64-0,125 µg / mL, e o intervalo de CV1897_{PS.} variou 64-0,125 µg / mL. MICs representam médias geométricas de pelo menos três CIMs determinadas em dias diferentes^c. O efeito sinérgico da FLC e CV1897_{PS.} foi calculado com base FICI (índice de concentração inibitória fracional) ($FICI = [FC] / CFS + [QC] / CQS$), em que [FC] e [CQS] são as concentrações de FLC e CV1897_{PS.} que apresentaram ação quando combinado; [SFC] e [CAS] são as concentrações dos mesmos fármacos que atuam sozinhos. A interpretação foi realizada de acordo com o valor do FICI <0,5 = sinergismo (SIN); 0,5 <FICI ≤ 4,0 = indiferença (IND) e FICI > 4,0 = antagonismo (ANT).

6.7 Avaliação de alterações morfológicas e danos na membrana celular

As cepas de *C. tropicalis* sensíveis a FLC não exibiram alterações morfológicas quando expostas por 24 h a uma das formas da quitinase (CV1897_{PS+} ou CV1897_{PS-}), na concentração de 64 µg/mL. Entretanto, alterações morfológicas foram detectadas quando células dessas cepas foram expostas por 24 h à combinação rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,5 µg/mL + FLC 8 µg/mL, como revelado por citometria de fluxo (Figura 55A). As modificações encontradas nas células das cepas sensíveis a FLC são compatíveis com a presença de morte celular.

Com relação às células de *C. tropicalis* resistentes a FLC, não foram detectadas alterações morfológicas quando estas foram tratadas por 24 h com FLC 64 µg/mL apenas) ou com uma das formas da quitinase recombinante (CV1897_{PS+} ou CV1897_{PS-}) 64 µg/mL. Por outro lado, alterações morfológicas foram observadas nas células dessas cepas resistentes quando estas foram expostas por 24 h ao tratamento quitinase rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,25 µg/mL + FLC 8 µg/mL (Figura 55A).

Nas cepas sensíveis a FLC, a exposição das células a FLC 64 µg/mL ou à combinação rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,5 µg/mL + FLC 8 µg/mL resultou em danos na membrana das células, como revelado por meio do ensaio com iodeto de propídio (Figura 55B). Por outro lado, nas células de *C. tropicalis* resistentes a FLC, a perda da integridade da membrana foi somente observada no co-tratamento por 24 h com rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,25 µg/mL + FLC 8 µg/mL (Figura 55C).

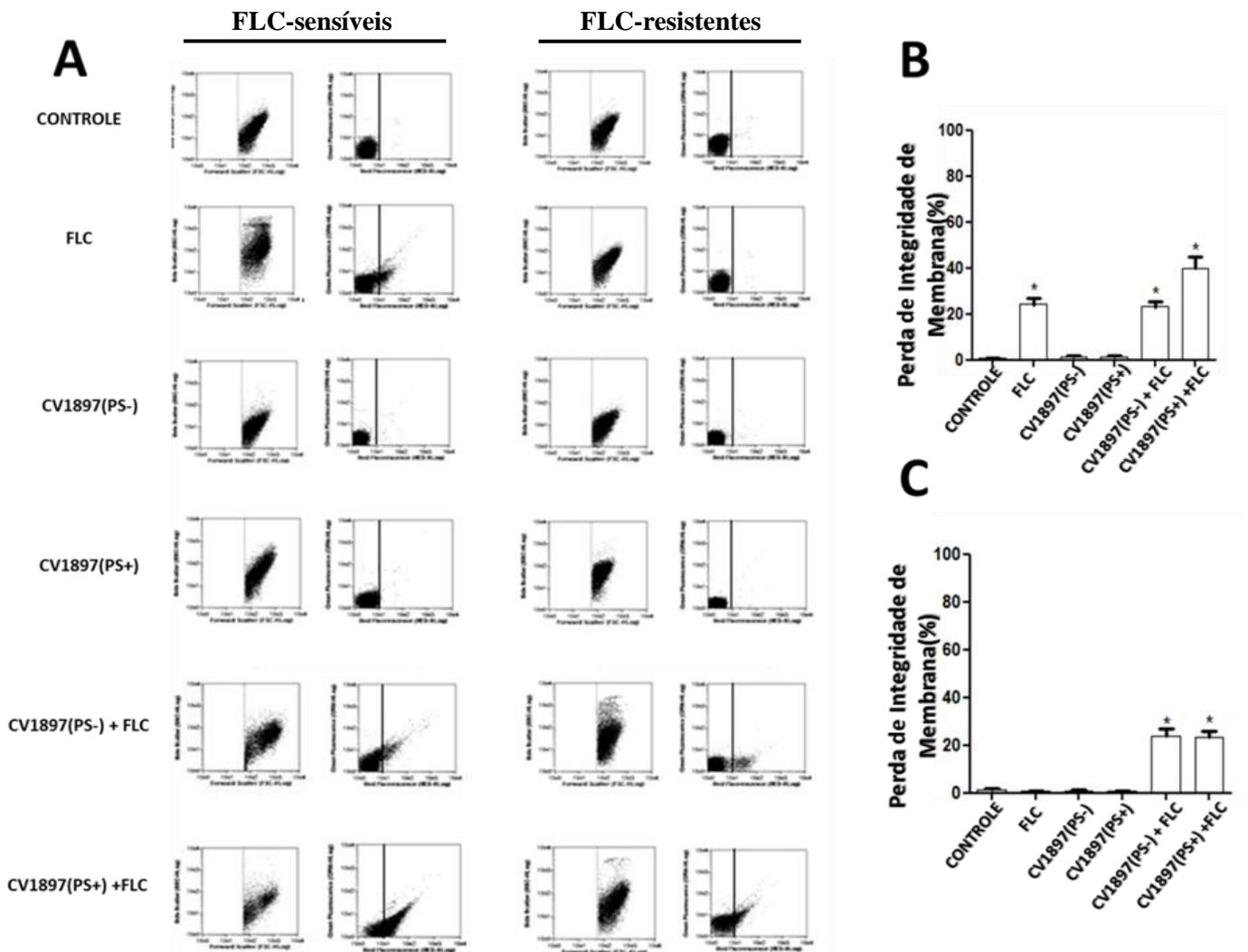
Cepas de *Candida tropicalis*

Figura 55 - Análise por citometria de fluxo para avaliação das alterações morfológicas e danos na membrana após exposição de fluconazol e quitinasas (CV1897_{PS+}; CV1897_{PS-}) (64µg/mL) em cepas de *C. tropicalis* FLC-sensível e FLC-resistente. (A) As cepas de *C. tropicalis* FLC-sensível (B) e FLC-resistente (C) foram co-tratadas com as quitinasas (CV1897_{PS+}; CV1897_{PS-}) (0,25 µg/mL) e fluconazol (8µg/ml), por um período de 24 horas, usando Iodeto de Propídeo.

7. DISCUSSÃO

Diversos microrganismos possuem a habilidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, submetidos a diversas condições de estresse. Essa competência reside em uma versatilidade nutricional e metabólica que constitui uma intrincada rede de mecanismos de adaptação. Dessa forma, genomas de microrganismos constituem uma fonte de novas biomoléculas que podem ter aplicações em diferentes áreas biotecnológicas. *C. violaceum* é uma bactéria de vida livre que habita água e solos em áreas tropicais e subtropicais de diversos continentes (DURÁN, 2010). Visando a elucidação dos mecanismos e estratégias relacionadas à sua adaptabilidade a diferentes ambientes, assim como uma melhor exploração do seu potencial biotecnológico, o genoma da *C. violaceum* estirpe ATCC 12472 foi completamente sequenciado por um consórcio de laboratórios, integrantes do Projeto Genoma Brasileiro (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

A anotação do genoma revelou diversos genes relacionados à resposta a condições de estresse, motilidade, patogenicidade e com potencial aplicação em diversas áreas. Dentre as ORFs que codificam produtos de interesse para a agricultura, estão várias quitinases, que provavelmente são responsáveis pela capacidade da *C. violaceum* de sobreviver com a quitina como única fonte de carbono e nitrogênio (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Quitinases são de grande interesse biotecnológico, pois podem ser utilizadas na bioconversão da quitina em derivados úteis, serem exploradas no biocontrole de fungos e insetos patogênicos, além de serem empregadas em cuidados com a saúde humana, como por exemplo, no uso de preparações oftálmicas com quitinases e microbicidas (GOMAA, 2012). Alguns produtos da bioconversão da quitina, como os quito-oligossacarídeos, possuem importância médica, com ação antitumoral, anti-inflamatória e antifúngica (AAM *et al.*, 2010). Além disso, monômeros de GlcNAc podem ser usados como adoçantes e suplementos nutricionais (HUANG *et al.*, 2012).

A degradação da quitina em escala industrial depende de reações químicas envolvendo ácidos fortes e os fluidos resultantes destas reações são poluentes ambientais. Por isso, enzimas quitinolíticas bacterianas têm sido exploradas para o uso na produção enzimática de GlcNAc e seus derivados de forma que não prejudique o meio ambiente (HUANG *et al.*, 2012).

Para que seja feito uso das propriedades destas enzimas é preciso obter as mesmas em estado de elevado grau de pureza e homogeneidade e também em grande quantidade. Devido às quitinases serem expressas em bactérias em pequenas quantidades, o

processo de purificação das mesmas é bastante complexo. Além disso, a exploração de *C. violaceum* pode ser limitada, uma vez que pode atuar como um patógeno oportunista em animais e até no homem. Dessa forma, a expressão heteróloga seria uma alternativa viável para a produção dessas proteínas de uma forma rápida e com maior rendimento protéico, sendo, portanto, útil para o estudo e caracterização das quitinases de *C. violaceum*. Os sistemas heterólogos produzem proteínas com uma sequência de aminoácidos definida e permitem que a relação entre sequência e função da proteína possa ser explorada (LUO et al., 2005; RAMLI et al, 2011).

Inicialmente, a análise *in silico* foi feita por comparação com os bancos de dados de domínios *Pfam*, *CDD* e *Smart*. A ORF CV1897 codifica uma quitinase com 439 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 49.2 kDa. A mesma possui um domínio de ligação à quitina de 45 resíduos de aminoácidos (19 a 62) na região N-terminal e um domínio catalítico constituído por 249 resíduos de aminoácidos (131 a 379) na região C-terminal. As quitinases são constituídas por domínios que podem ser arrançados de diferentes formas em distintas proteínas. Os domínios mais importantes são aqueles envolvidos na catálise da hidrólise das ligações glicosídicas (domínio catalítico) e na ligação da enzima ao substrato (domínio de ligação a carboidrato) (GORTARI; HOURS, 2008).

No domínio catalítico da quitinase CV1897, os resíduos de aminoácidos responsáveis pela catálise são dois resíduos de glutamato (Glu¹⁹¹ e Glu²¹³) e um resíduo de serina (Ser²⁶⁰). De acordo com Ubhayasekera e colaboradores (2007), o Glu¹⁹¹ seria o ácido geral (doador de prótons) do mecanismo de inversão, característico da família GH19, enquanto o Glu²¹³ seria a base geral, ativando a molécula de água para o ataque nucleofílico do carbono anomérico do açúcar e estabilizando o intermediário carregado. Este ataque resulta na inversão da configuração anomérica do produto. Uma sequência conservada (²⁶²-NYNYG) em membros da família GH19 também foi identificada no domínio catalítico (UBHAYASEKERA et al., 2007).

Um peptídeo sinal (resíduos 1 a 18) no N-terminal foi predito pela ferramenta *SignalP* e pelo banco de dados *Exprot*, sugerindo que a proteína codificada pela ORF CV1897 é sintetizada como uma pré-proteína, presumivelmente alvo para a via secretória de *C. violaceum*. Os peptídeos sinais bacterianos normalmente consistem de 15 a 30 resíduos de aminoácidos (PUGSLEY, 1993).

A ferramenta online para busca de peptídeo sinal *SignalP* também foi utilizada para analisar as sequências de aminoácidos das quitinases CV2935 de *C. violaceum* (LOBO,

2009), Chi58 de *Sanguibacter* sp (YONG et al., 2006) e CHI II de *Glaciozyma antarctica* (RAMLI et al., 2011). Os resultados indicaram um possível peptídeo de sinal N-terminal com 23 resíduos de aminoácidos para a CV2935 e a Chi58. Já para a CHI II, uma sequência N-terminal deduzida de 19 aminoácidos continha uma sequência típica de peptídeo sinal.

Após a análise *in silico* da quitinase CV1897, o primeiro sistema de expressão heteróloga escolhido foi a bactéria *E. coli*, que tem sido bastante usada como hospedeiro para a expressão de proteínas recombinantes, por ser um organismo geneticamente bem conhecido, e por apresentar uma rápida taxa de multiplicação, fácil cultivo e relativo baixo custo (HUANG; LIN; YANG, 2012).

A clonagem da sequência codificadora completa da quitinase (CV1897_{PS+}) de *C. violaceum* foi realizada no vetor pET302/NT-His, obtendo-se três clones de *E. coli* TOP10F' transformados o plasmídeo recombinante pET302::CV1897_{PS+}. A sequência clonada no vetor pET302/NT-His está sob o controle de sinais de transcrição e tradução do bacteriófago T7, e a expressão é induzida fornecendo uma fonte de RNA polimerase T7 na célula hospedeira. As estirpes utilizadas como hospedeiras de expressão possuem em seu genoma uma cópia do gene da RNA polimerase T7 sob o controle do promotor *lacUV5*, cuja expressão é induzida por IPTG.

A expressão da quitinase (rCV1897_{PS+}) foi realizada nas estirpes de *E. coli* BL21 (DE3) e ArcticExpress (DE3), a partir de plasmídeos recombinantes pET302::CV1897_{PS+}. As estirpes utilizadas são de alto nível de expressão e deficientes em dois genes (*ompT* e *lon*) que codificam proteases que poderiam degradar as proteínas recombinantes. BL21 (DE3) é a linhagem mais utilizada para expressão heteróloga e ArcticExpress(DE3) é uma derivada desta linhagem.

Após a indução da expressão da quitinase (rCV1897_{PS+}) em células de *E. coli* BL21 (DE3), a mesma foi detectada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na fração insolúvel, formando os corpos de inclusão. As proteínas podem ser expressas em *E. coli* de diferentes maneiras: secretadas para o meio extracelular ou espaço periplasmático, e intracelular, de forma solúvel ou formando os corpos de inclusão, que são agregados de proteínas insolúveis e inativas (HUANG; LIN; YANG, 2012).

A ORF CV1897 de *C. violaceum* codifica uma quitinase com 439 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita (calculada a partir da sequência) de aproximadamente 49.2 kDa. Quitinases de diferentes organismos possuem massas moleculares de aproximadamente 40 a 80 kDa, como as de *Clonostachys rosea* (43.8 kDa), *Chaetomium cupreum* (58 kDa) e *Vibrio* sp (79.4 kDa) (RAMLI et al, 2011).

A massa molecular aparente detectada na fração insolúvel, após coramento do gel com *Coomassie Brilliant Blue*, foi de 51 kDa. Considerando que a proteína recombinante é produzida com um segmento adicional (de 1.409,5 Da) de 11 resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminal (HHHHHHVNLE), codificados na sequência do vetor de expressão pET302/NT-His, a massa molecular esperada para a proteína de fusão seria de aproximadamente 50.6 kDa. Isso sugere mais fortemente que a proteína com massa molecular aparente de 51 kDa, detectada na fração intracelular insolúvel, corresponde de fato à rCV1897_{PS+}.

Entretanto, essa mesma proteína de 51 kDa não foi detectada na fração intracelular solúvel, nem no meio extracelular. Esse resultado indica que a rCV1897_{PS+} foi produzida principalmente na forma de corpos de inclusão, podendo estar presente na fração intracelular solúvel e/ou no meio extracelular em níveis muito baixos, além do limite de detecção do corante (*Coomassie Brilliant Blue*).

A quitinase de classe I de feijão-de-corda (rVuChi), pertencente à família GH19, foi expressa na mesma estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) e também foi obtida em corpos de inclusão. Após a purificação da proteína recombinante, a mesma não apresentou atividade quitinásica (CORREIA, 2007).

A dificuldade em obter a proteína recombinante na fração celular solúvel também foi relatada por Singh e colaboradores (2007), que clonaram e expressaram uma quitinase de classe VII de trigo. A proteína também foi produzida principalmente em corpos de inclusão.

Após o resultado da eletroforese, amostras da fração solúvel e do meio de cultura foram analisadas por ensaio enzimático. Alguma atividade quitinásica (33,6 U/mgP) foi detectada na fração intracelular solúvel, apenas 24 h após a adição de IPTG à cultura. Isso sugere que alguma proteína recombinante produzida após a indução com IPTG se acumulou intracelularmente de forma solúvel e funcional. Não houve detecção de atividade quitinásica no meio de cultura livre de células, indicando que a quitinase recombinante não foi secretada para o meio extracelular.

Os resultados demonstram que o putativo peptídeo sinal de 18 aminoácidos na sequência da quitinase analisada não foi reconhecido pela bactéria *E. coli*. Ao contrário da CV1897, a quitinase CV2935 de *C. violaceum* foi expressa em *E. coli* e teve seu peptídeo sinal intrínseco reconhecido e clivado pela célula hospedeira, sendo secretada para o meio extracelular após 24 horas de cultivo, com massa molecular aparente de 43 kDa, de acordo com o esperado para a rCV2935 madura (LOBO, 2009).

As quitinases recombinantes de *Sanguibacter* sp. e de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 expressas em *E. coli* também foram secretadas para o meio extracelular, sugerindo que as mesmas tiveram seus peptídeos sinais reconhecidos e clivados pela célula hospedeira (YONG et al., 2006; BARBOZA-CORONA et al., 2008).

Ghasemi e colaboradores (2011) produziram duas quitinases recombinantes de *Bacillus pumilus* SG2 que foram secretadas para o meio extracelular. Entretanto, quando os autores clonaram a região codificadora das proteínas, sem a região dos peptídeos sinais, as mesmas ficaram retidas no citoplasma de *E. coli* M15.

A secreção de proteínas para o meio de cultura em *E. coli* tem algumas vantagens sobre a produção intracelular, como a baixa concentração de proteínas nativas e de endotoxinas e uma menor ação de proteases. Essas vantagens facilitam a purificação e a qualidade das proteínas produzidas (HUANG; LIN; YANG, 2012). Entretanto, a presença de um peptídeo sinal não garante a secreção da proteína recombinante, pois outros fatores também influenciam, como o estresse do hospedeiro, a própria sequência sinal, e o tipo de proteína a ser secretada (CHOI; LEE, 2004).

Para a obtenção da proteína intracelular solúvel, algumas estratégias podem ser utilizadas, como a redução na temperatura de indução, a otimização das condições de indução e a co-expressão de chaperonas moleculares (MAKINO; SKRETAS; GEORGIU, 2011; HUANG; LIN; YANG, 2012).

Huang e colaboradores (2012) produziram cinco diferentes quitinases da bactéria *Chitiniphilus shinanonensis* de forma solúvel em *E. coli*. Uma quitinase da bactéria *Serratia marcescens* B4A (Chit62) também foi expressa de forma solúvel e ativa em *E. coli* (BABASHPOUR et al., 2012).

Como a rCV1897_{PS+} foi produzida em *E. coli* BL21 (DE3) principalmente na forma de corpos de inclusão insolúveis, a estirpe de *E. coli* ArcticExpress (DE3) foi utilizada com o objetivo de se obter a quitinase na fração intracelular solúvel. Essa estirpe expressa constitutivamente as chaperonas Cpn10 e Cpn60 da bactéria *Oleispira antarctica*, que conferem uma melhora no processamento das proteínas, aumentando o rendimento das proteínas recombinantes solúveis e ativas. Além da co-expressão de chaperonas moleculares, a estratégia de redução na temperatura da indução (12° C) também foi utilizada.

Entretanto, a quitinase recombinante foi detectada por eletroforese apenas na fração insolúvel, indicando que a mesma foi produzida principalmente nos corpos de inclusão no interior bacteriano. Alguma atividade quitinásica (30,7 U/mgP) foi detectada na fração intracelular solúvel, indicando que alguma proteína recombinante também se acumulou

intracelularmente de forma solúvel e funcional. Não houve detecção de atividade quitinásica no meio de cultura, sugerindo que a mesma não foi secretada para o meio extracelular.

Os corpos de inclusão são relativamente homogêneos em sua composição, em alguns casos, a proteína recombinante representa mais que 90% das proteínas totais presentes (HUANG; LIN; YANG, 2012). A quitinase de classe I de feijão-de-corda (rVuChi) foi expressa na estirpe ArcticExpress (DE3) com a proteína de fusão tiorredoxina (Trx), que é solúvel em *E. coli*, possibilitando o aumento da solubilidade da proteína de interesse. Porém, a rVuChi-Trx também foi produzida em corpos de inclusão (LANDIM, 2011).

Buscando a obtenção da quitinase (rCV1897_{PS+}) pura, as frações intracelulares solúvel e insolúvel foram submetidas à cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Uma característica do vetor de expressão pET302/NT-His utilizado na clonagem é a expressão da proteína recombinante na forma de uma proteína de fusão, possuindo uma cauda de seis resíduos de histidina consecutivos na sua extremidade N-terminal. Isso possibilita a purificação da mesma por cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado, uma vez que o componente imidazólico da histidina apresenta afinidade por metais.

Quando a fração solúvel foi aplicada em matriz de *Sepharose*, não foi possível a detecção da quitinase recombinante, que pode ser devido ao baixo nível da proteína nesta fração. Por outro lado, quando os corpos de inclusão solubilizados com cloridrato de guanidina 3 M foram aplicados em matriz, a rCV1897_{PS+} foi purificada. Após a eliminação do agente desnaturante, não houve detecção de atividade quitinásica. A solubilização dos corpos de inclusão com agentes caotrópicos, como a uréia e o cloridrato de guanidina, pode afetar a integridade das proteínas. O renovelamento dos corpos de inclusão em proteínas ativas representa um desafio porque para a obtenção de um bom rendimento é necessária a otimização das etapas de *refolding* para cada proteína alvo (HUANG; LIN; YANG, 2012).

Tendo em vista que a rCV1897_{PS+} foi produzida em *E. coli* de forma insolúvel e inativa, e que diferentes etapas de *refolding* nem sempre produzem a proteína na sua forma ativa, foi utilizada a alternativa de produzir a quitinase recombinante em outro sistema de expressão (*Pichia pastoris*).

A levedura metilotrófica *P. pastoris* tem se tornado cada vez mais popular como hospedeira para expressão de proteínas recombinantes. Características como fácil manipulação, capacidade de ser cultivada em altas densidades de células, por ser um organismo eucarioto capaz de realizar modificações pós-traducionais e ter relativo baixo custo entre sistemas eucariontes, explicam a utilização crescente desse sistema de expressão de proteínas heterólogas (DALY; HEARN, 2005).

Já foi relatada na literatura a expressão de quitinases de diferentes organismos em *P. pastoris*, tais como: dos fungos *Aspergillus fumigatus* (JAQUES et al., 2003), *Chaetomium globosum* (LIU et al., 2008), *Chaetomium cupreum* (WANG; YANG, 2009), *Limonium bicolor* (LIU et al., 2010), *Trichoderma atroviride* (ARRIAGA, et al., 2010) e da levedura *Glaciozyma antarctica* (RAMLI et al., 2011), dos insetos *Lacania oleracea* (FITCHES et al., 2004) e *Bombyx mori* (FAN et al., 2011), das plantas *Oryza sativa* (TRUONG et al., 2003), *Bambusa oldhamii* (KUO et al., 2008) e *Vigna unguiculata* (LANDIM, 2011), e até de uma quitinase humana (GOODRICK, et al., 2001).

Poucas quitinases bacterianas foram produzidas na levedura *P. pastoris*, o único trabalho publicado é o da endoquitinase da bactéria psicrófila da Antártica *Sanguibacter antarctius* (rChi21702) (LEE et al., 2010). Diferentes quitinases de *C. violaceum*, todas pertencentes à família GH18, também já foram produzidas por essa levedura (TEIXEIRA, 2011; MEDEIROS, 2012; LOBO, 2012).

A expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser intracelular ou secretada. A secreção requer a presença de uma sequência sinal na proteína expressa para o devido endereçamento na via secretória. O sinal de secreção (fator α) de *S. cerevisiae* tem sido usado com sucesso. Uma grande vantagem de obter a proteína secretada é que *P. pastoris* secreta um nível muito baixo de proteínas, fazendo com que a proteína recombinante compreenda a maioria do total de proteínas secretadas no meio (CREGG; VEDVICK; RASCHKE, 1993).

Como o resultado da análise com a ferramenta *SignalP* indicou a presença de um putativo peptídeo sinal intrínseco da proteína CV1897, esse peptídeo, juntamente com o fator α de secreção de *S. cerevisiae*, presente no plasmídeo de expressão pPICZ α A, poderiam atrapalhar a secreção da proteína recombinante pela levedura hospedeira. Desse modo, a clonagem e expressão da proteína recombinante foram realizadas com a sequência completa e parcial (sem o peptídeo sinal intrínseco da proteína).

A indução da expressão de CV1897_{PS+} foi realizada nas estirpes de *P. pastoris* GS115 e KM71H. A quitinase recombinante não foi detectada no meio extracelular quando o mesmo foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. A massa molecular predita da ORF CV1897 é de 49.2 kDa. Entretanto, a massa molecular esperada para a rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris* e secretada para o meio de cultura seria de 52.4 kDa. Esse valor leva em conta a ausência do resíduo Met1 e a presença de resíduos de aminoácidos extras, nas extremidades N-terminal e C-terminal da proteína recombinante.

Após o resultado da eletroforese, o meio livre de células foi analisado por ensaio enzimático. A estirpe GS115 apresentou a maior atividade quitinásica total (390 U), 120 h

após o início da indução e já a estirpe KM71H apresentou maior atividade quitinásica específica (1.958, 23 U/mgP) em 96 horas de indução. Apesar de não ter sido detectada por eletroforese, as análises por ensaio enzimático confirmaram a produção e secreção da rCV1897_{PS+} em *P. pastoris*.

Fan e colaboradores (2007) realizaram um estudo comparativo com uma quitinase do fungo *Beauveria bassiana* (Bbchit1). A fim de obter essa enzima em grandes quantidades e na sua forma ativa, o gene *Bbchit1* foi expresso em *E. coli* e *P. pastoris*. A produção de Bbchit1 recombinante foi detectada em *E. coli*, porém, localizada principalmente em corpos de inclusão. Já em *P. pastoris*, Bbchit1 foi secretada de forma solúvel e ativa para o meio de cultura.

Teixeira (2011) relatou a expressão da quitinase CV3316 de *C. violaceum*, pertencente à família GH18, em *P. pastoris*. Clones da estirpe GS115 apresentaram melhores resultados que os da estirpe KM71H, com um pico de atividade quitinásica total (1.234,08 U) e específica (9.649,38 U/mgP) após 96 horas de indução. O tempo ótimo de expressão da quitinase CV2935 de *C. violaceum* em *P. pastoris* KM71H também foi de 96 horas de indução, uma vez que foi observada maior atividade quitinásica específica (LOBO, 2012).

Liu e colaboradores (2010) expressaram uma quitinase de *L. bicolor* (Lbchi31) em *P. pastoris*, que foi detectada por eletroforese a partir de 96 horas na estirpe GS115 e 72 horas em KM71H. Já as quitinases dos fungos *C. cupreum* e *Beauveria bassiana*, produzidas em *P. pastoris* GS115, foram detectadas por eletroforese após 120 e 48 horas, respectivamente (WANG; YANG, 2009; FAN et al., 2007).

A rCV1897_{PS-} foi produzida apenas na estirpe de *P. pastoris* KM71H. Uma banda com massa molecular aparente de 50 kDa foi detectada por eletroforese a partir de 48 horas de indução, sugerindo que a quitinase recombinante foi produzida em *P. pastoris* e secretada para o meio cultura. A massa molecular predita da ORF parcial CV1897 é de 47.3 kDa. Entretanto, a massa molecular esperada para a rCV1897_{PS-} produzida em *P. pastoris* seria de 50.7 kDa. Esse valor leva em conta a presença de resíduos de aminoácidos extras nas extremidades N-terminal e C-terminal da proteína recombinante.

Os resultados apresentados pelo ensaio enzimático mostraram que a atividade quitinásica total de rCV1897_{PS-} aumentou continuamente a partir de 24 horas, atingindo seu valor máximo em 72 horas (533,9 U), quando então foi diminuída a partir de 96 h de indução. A atividade quitinásica específica também aumentou a partir de 24 horas, atingindo seu valor máximo em 72 horas (513,64 U/mgP), quando então foi diminuída a partir de 96 h de

indução. Esse decréscimo da atividade enzimática pode ser devido à ação de enzimas proteolíticas secretadas pela levedura.

Da mesma forma que a rCV1897_{PS-}, diferentes quitinases desprovidas de seus peptídeos sinais têm sido produzidas em sistemas heterólogos. A endoquitinase da bactéria *S. antarctius* (rChi21702) foi clonada e expressa com sucesso em *P. pastoris* sem os 25 resíduos de aminoácidos de um putativo peptídeo sinal (LEE et al., 2010). Lobo (2012) também relatou a produção da quitinase CV2935 de *C. violaceum*, desprovida de seu peptídeo sinal de 23 resíduos de aminoácidos, de forma solúvel e ativa em *P. pastoris*.

Fan e colaboradores (2011) produziram a quitinase do inseto *B. mori* na sua sequência completa (Bmchi) e sem a região C-terminal (o equivalente ao domínio de ligação à quitina para essa proteína - Bmchi Δ C). Nesse trabalho, o autor relata uma maior atividade quitinásica para Bmchi, evidenciando a importância desse domínio para o correto funcionamento da enzima.

Com os resultados obtidos nas análises enzimáticas, o tempo ótimo de expressão em *P. pastoris* foi determinado para as quitinases rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-}. Dessa forma, induções em larga escala foram realizadas objetivando a purificação dessas proteínas recombinantes.

As quitinases foram purificadas por meio de cromatografia de afinidade em níquel imobilizado, uma vez que as mesmas foram produzidas como proteínas de fusão, possuindo uma cauda de seis resíduos de histidina consecutivos na sua extremidade N-terminal. Em análise por eletroforese, foram observadas duas bandas com massas moleculares aparentes de 43,2 e 51,4 kDa para a rCV1897_{PS+} e de 44 e 50 kDa para a rCV1897_{PS-}. As duas bandas foram detectadas pelo o kit *InVision His-tag in-gel Stain*, comprovando que as mesmas possuem a cauda de histidina. Cromatografias de afinidade em matriz de quitina e de interação hidrofóbica foram realizadas na tentativa da separação das duas bandas, entretanto, não foi possível a separação das mesmas, pois as duas proteínas interagiram da mesma forma com os dois tipos de matriz. Em análises por imunodeteção, as duas bandas obtidas após a purificação das quitinases produzidas em *P. pastoris* foram reconhecidas especificamente por anticorpos de camundongo anti-His. Esses resultados confirmam mais uma vez que as duas bandas referentes às proteínas CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-} possuem a cauda de histidina.

Resultados semelhantes foram obtidos por Fan e colaboradores (2007), Kuo e colaboradores (2008) e Landim (2011), quando expressaram quitinases em células de *P. pastoris* e observaram a presença de duas bandas com massas moleculares diferentes.

O rendimento das quitinases puras foi de 1,8 mg/L (rCV1897_{PS+}) e 2,1 mg/L (rCV1897_{PS-}). As quitinases bacterianas produzidas em *P. pastoris* apresentaram rendimentos variados, como a rChi21702 de *S. antarcticus* (1 mg/L), a CV3316 (1,2 mg/L) e CV2935 (44 mg/L) de *C. violaceum* (LEE et al., 2010; TEIXEIRA, 2011; LOBO, 2012).

A massa molecular de CV1897, calculada a partir da sua sequência de aminoácidos é de 49,2 kDa. Entretanto, a massa molecular esperada para a rCV1897_{PS+} produzida em *P. pastoris* seria de 52,4 kDa, levando em conta a ausência do resíduo Met1 e a presença de resíduos de aminoácidos extras, nas extremidades N-terminal e C-terminal da proteína recombinante. Por meio do sequenciamento de aminoácidos N-terminal, uma sequência de 23 resíduos de aminoácidos foi obtida para a banda de 51,4 kDa e uma sequência de 31 resíduos foi obtida para a banda de 43,2 kDa. O resultado mostrou que a proteína foi clivada em dois sítios diferentes pela levedura *P. pastoris*, resultando na produção de duas proteínas com massas moleculares diferentes. Considerando as sequências obtidas para as bandas de 51,4 e 43,2 kDa, as massas moleculares esperadas para as mesmas seriam de 50,9 e 44,1 kDa, confirmando que as duas bandas detectadas por eletroforese correspondem a duas isoformas de rCV1897_{PS+}. Para analisar se a CV1897_{PS+} estava sendo produzida de forma glicosilada, o gel de proteínas foi revelado pelo método de Schiff, entretanto, a quitinase recombinante não foi revelada com o reagente, sugerindo que a rCV1897_{PS+} não foi glicosilada.

Já para a rCV1897_{PS-}, foi obtida uma sequência de 31 resíduos de aminoácidos idêntica para as duas bandas (50 e 44 kDa), que foi a mesma da proteína de massa aparente de 43,2 kDa da rCV1897_{PS+}. Considerando a sequência obtida, a massa molecular esperada seria de 44 kDa. Portanto, para explicar a massa molecular aparente da banda de 50 kDa, especulou-se a hipótese da mesma ser uma forma glicosilada de rCV1897_{PS-}. Para tentar esclarecer isso, uma análise *in silico* foi realizada com os softwares *NetNGlyc* e *NetOGlyc*, para verificar se a sequência de aminoácidos de CV1897 possuía possíveis sítios de *N*-glicosilação e/ou *O*-glicosilação. De acordo com essas análises, a sequência deduzida de aminoácidos de CV1897 possui um sítio de *O*-glicosilação em potencial: Thr⁷⁹ (assumindo que o 1º resíduo da proteína é a metionina inicial) e nenhum sítio potencial para *N*-glicosilação. Assim, é possível de fato que a banda com massa molecular aparente de 50 kDa corresponda a isoforma de rCV1897_{PS-} na qual esse sítio potencial de *O*-glicosilação foi reconhecido pela levedura e modificado pela adição covalente de um oligossacarídeo.

A glicosilação é uma das modificações pós-traducionais realizadas por *P. pastoris*, e normalmente as cadeias de açúcar adicionadas são mais curtas que as de *S.*

cerevisiae, tornando *P. pastoris* uma hospedeira mais atraente para a expressão de proteínas recombinantes (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A fim de avaliar se houve alguma modificação na sequência de aminoácidos, as quitinases recombinantes (CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}) produzidas em *P. pastoris* foram submetidas à análise por espectrometria de massa. Todos os peptídeos encontrados foram identificados como sendo parte da quitinase CV1897 de *C. violaceum* ATCC 12472. Na análise dos peptídeos obtidos para a CV1897_{PS+}, observou-se a presença de um resíduo de *N*-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) no resíduo de aminoácido Ser²⁴⁷. Já na análise de CV1897_{PS-}, observou-se que a presença de GlcNAc em três diferentes resíduos de aminoácidos (Thr¹⁸³, Thr¹⁹², Ser¹⁹⁸), além de três *O*-glicanos em outros diferentes resíduos (Thr³², Thr²³⁹, Ser²⁴⁷). Esse três *O*-glicanos aumentariam a massa molecular aparente da proteína em 4.703 Da (4,7 kDa). Dessa forma, a adição covalente desses oligossacarídeos poderia justificar a diferença das duas bandas (50 e 44 kDa) de CV1897_{PS-}, considerando que a banda de massa molecular aparente de 50 kDa corresponda a isoforma glicosilada.

A rCV1897_{PS+} apresentou atividade exclusivamente endoquitinásica contra quitina coloidal. No ensaio realizado com o substrato glicol quitina, um derivado solúvel da quitina, as duas proteínas obtidas para rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-} mostraram-se ativas. Diferentes quitinases pertencentes à família GH19 foram capazes de hidrolisar este substrato, como a rVuChi de *Vigna unguiculata* (LANDIM, 2011) e a OsChia1b de *Oryza sativa* (MIZUNO et al., 2008b). Da mesma forma, quitinases bacterianas de *Serratia* sp., *B. thuringiensis* (Chia) e *C. violaceum* (CV2935), pertencentes à família GH18, também mostraram-se ativas contra glicol quitina (KIM et al., 2007; LIU et al., 2010; LOBO, 2012).

Por outro lado, a quitinase rCV1897_{PS+} não foi capaz de hidrolisar os substratos sintéticos solúveis 4-nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosaminídeo, 4-nitrofenil *N,N'*-diacetil- β -D-quitobiosídeo e 4-nitrofenil β -D-*N,N',N''*-triacetilquitotriose. Da mesma forma, a rVuChi de *V. unguiculata*, da família GH19, não mostrou-se ativa contra os substratos testados (LANDIM, 2011). Já uma endoquitinase de *Salmonella enterica* e as quitinases CV2935, CV3316 e CV2736 de *C. violaceum*, pertencentes à família GH18, conseguiram hidrolisar o 4-nitrofenil *N,N'*-diacetil- β -D-quitobiosídeo e o 4-nitrofenil β -D-*N,N',N''*-triacetilquitotriose (LOBO, 2012; TEIXEIRA, 2011; MEDEIROS, 2012). Nestes substratos sintéticos, o *p*-nitrofenol está posicionado na extremidade redutora. Portanto, uma das possíveis explicações para o resultado obtido é que o mecanismo de ação de rCV1897_{PS+} pode ocorrer pelo reconhecimento do resíduo de GlcNAc posicionado na extremidade redutora, o que justifica a

ausência de atividade, uma vez que o *p*-nitrofenol pode não ser reconhecido pelo sítio catalítico.

Em relação à estabilidade térmica da rCV1897_{PS+}, a mesma mostrou-se ativa em temperaturas de até 40 °C, quando a enzima exibiu 93,7% de sua atividade máxima, registrada a 30 °C. Temperaturas a partir de 50 °C foram suficientes para inativação enzimática, provavelmente por causar desnaturação da proteína.

Diferentes quitinases bacterianas nativas e recombinantes já foram avaliadas quanto a sua termoestabilidade, como a rCV2935 de *C. violaceum*, produzida em *E. coli* e *P. pastoris*, que mostrou-se ativa em temperaturas de até 60 °C. Comparando as duas proteínas recombinantes, foi observado que a rCV2935 expressa em *P. pastoris* foi mais termoestável, retendo cerca de 50% de atividade quitinásica após incubação a 60 °C, enquanto que a rCV2935 expressa em *E. coli* reteve apenas cerca de 28% após incubação nessa mesma temperatura por 30 min. Lobo (2012) atribui essa diferença possivelmente devido a glicosilação presente na enzima produzida por *P. pastoris*, uma vez que cadeias de oligossacarídeos influenciam em aspectos como solubilidade da proteína e estabilidade térmica.

Wang e colaboradores (2009) avaliaram a estabilidade térmica de uma quitinase isolada de *Bacillus cereus* TKU006, que foi ativa de 25 °C a 55 °C. A mesma apresentou 50% de sua atividade máxima a 60 °C e foi completamente inativada a 80 °C. Uma quitinase recombinante de *Bacillus atrophaeus* SC081 (SCChi-1) apresentou atividade ótima em 50 °C e foi considerada termoestável, retendo mais de 80% de sua atividade inicial entre 40 °C e 60 °C durante 1 hora (CHO et al., 2011).

Uma quitinase recombinante de *Serratia proteamaculans*, expressa em *E. coli*, mostrou-se ativa em uma ampla faixa de temperatura (4 – 70 °C) com sua atividade máxima em 55 °C (MEHMOOD et al., 2009). Da mesma forma, a quitinase rChit62 de *S. marcescens* expressa em *E. coli*, apresentou atividade ótima em 55 °C. As duas enzimas são consideradas termoestáveis, assim como as de *Bacillus licheniformis* (60 °C), *Oerskovia xanthineolytica* (50-55 °C) e outras espécies de *Serratia* (BABASHPOUR et al., 2012).

Lee e colaboradores (2010), estudando uma endoquitinase da bactéria psicrófila *S. antarcticus* expressa em *P. pastoris*, identificaram que a mesma apresentou temperatura ótima de atividade em 37°C. A proteína recombinante apresentou 63% de sua atividade máxima a 10 °C e 44% a 0 °C. A estabilidade térmica observada está coerente para uma enzima produzida por um organismo psicrófilo, que vive em ambientes de temperaturas baixas.

O efeito do pH sobre a atividade enzimática da rCV1897_{PS+} foi analisado em mais um ensaio de caracterização da proteína recombinante. A mesma apresentou-se ativa na faixa de pH de 3,0 a 9,0, com atividade ótima observada em pH 5,0. A rCV1897_{PS+} manteve 83% de sua atividade máxima em pH 6,0 e 54% em pH 7,0.

Muitos trabalhos na literatura relatam que as quitinases bacterianas são funcionais em amplas faixas de pH (4,0-8,0), com atividade ótima em pH 4,0 para *Aeromonas* sp. 10S-24 (UEDA et al., 1995), pH 5,0 para *Bacillus cereus* TKU006 (WANG et al., 2009), pH 5,5 para *Bacillus* sp. WY22 (WOO; PARK, 2003) e *S. proteamaculans* (MEHMOOD et al., 2009) e pH 6,0 para *Enterobacter* sp.G-1 (PARK et al., 1997).

Ao contrário do relatado para a maioria das quitinases bacterianas, a rCV2935 de *C. violaceum* produzida em *E. coli* e *P. pastoris* apresentou atividade máxima em pH 3,0. Já a rCV3316, mostrou-se ativa no intervalo de pH de 5,0 a 9,0, com atividade ótima em pH 5,0 (TEIXEIRA, 2011).

Uma quitinase isolada de *B. cereus* TKU006 apresentou-se ativa no intervalo de pH de 3,0 a 11,0 e um pH ótimo de 5 (WANG et al., 2009). Duas quitinases de *Bacillus pumilus* SG2 expressas em *E. coli* M15, apresentaram atividade quitinásica no intervalo de pH de 4,5 a 6,5 e o pH ótimo das enzimas recombinantes foi de 6 e 6,5, respectivamente (GHASEMI et al., 2011).

Mehmood e colaboradores (2009) produziram uma quitinase de *S. proteamaculans* em *E. coli*, que mostrou-se ativa em uma ampla faixa de pH (4,5 – 9,0) e atividade ótima em pH 5,5. A quitinase rChit62 de *S. marcescens* apresentou resultados semelhantes, mostrando-se ativa no intervalo de pH de 5,0 a 8,0 e atividade máxima em pH 6,0 (BABASHPOUR et al., 2012).

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é bastante usada para acompanhar a estabilidade da proteína quando submetida a condições desnaturantes. Quando estas condições aumentam, a estabilidade da proteína reduz e ela se desenrola (RAMOS; FERREIRA, 2005). A técnica de CD é conveniente para acompanhar a desnaturação porque o espectro da proteína enovelada e a conformação aleatória são bem diferentes.

A desnaturação de rCV1897_{PS+} foi observada em temperaturas a partir de 50 °C, quando a proteína foi incubada, por 20 minutos, em temperaturas variando de 10 a 90 °C com intervalos de 10 °C. O resultado obtido está de acordo com o efeito da temperatura analisado por meio da atividade enzimática de rCV1897_{PS+}, onde o tratamento com temperaturas a partir de 50 °C por 30 minutos levaram à ausência de atividade quitinásica. Pelos gráficos de

desnaturação térmica, observou-se que a partir de 45 °C já ocorre a desnaturação de 50% das moléculas de rCV1897_{PS+}.

A partir dos dados obtidos por CD, foi possível verificar que na estrutura secundária de rCV1897_{PS+}, produzida em *P. pastoris*, predominam arranjos em α -hélice (37%), possuindo também 26% do seu conteúdo de folhas- β e 38% de estrutura desordenada. O resultado obtido foi igual ao encontrado para a quitinase de *V. unguiculata* (rVuChi) (LANDIM, 2011) e o conteúdo de α -hélice também foi semelhante ao obtido para duas quitinases extraídas do látex de mamão (*Carica papaya*) (40% de α -hélice), todas pertencentes à família GH19 (HUET et al., 2006).

A espectroscopia de fluorescência foi usada para analisar a estrutura terciária da proteína em solução. Os resultados obtidos para a rCV1897_{PS+} indicaram que a mesma foi produzida em *P. pastoris* em sua conformação nativa, uma vez que os espectros de fluorescência obtidos após excitação a 280 nm e a 295 nm apresentaram um máximo de emissão em 330 nm. Estes espectros, relacionados à excitação dos resíduos de triptofano (285 a 305 nm), são um indicativo de que rCV1897_{PS+} está na conformação enovelada, pelo máximo apresentado (330 nm), mostrando que os 16 resíduos de triptofano estão interiorizados ou parcialmente expostos na superfície da proteína, não estando completamente expostos à solução aquosa.

Após os ensaios de caracterização bioquímica e estrutural de CV1897, a capacidade antifúngica da mesma foi avaliada em diferentes ensaios. Como as quitinases são enzimas capazes de hidrolisar quitina, um biopolímero insolúvel presente na parede celular de fungos, as mesmas podem ser utilizadas no controle de fungos fitopatogênicos e leveduras de importância médica.

Doenças fúngicas causam uma considerável perda no rendimento de muitas culturas de plantas (CEASAR; IGNACIMUTHU, 2012). Sabendo que o método mais usado no controle de doenças vegetais causadas por fungos é o uso de agentes químicos, que causam significativa poluição ambiental, estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação das quitinases devem ser realizados, para que estas proteínas possam ser utilizadas como ferramentas no controle de doenças causadas por fungos em plantas.

A parede celular dos fungos é uma estrutura complexa formada por quitina, glucanos, lipídeos e peptídeos incorporados em uma matriz protéica. A quitina constitui 22 a 44% da parede celular dos fungos. Várias classes de proteínas antifúngicas estão envolvidas na inibição da síntese da parede celular dos fungos ou na ruptura da estrutura desta parede, e

outras agem na estrutura da membrana, resultando na lise celular (SELITRENNIKOFF et al., 2001; SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008).

Enzimas bacterianas tais como glucanases, quitinases e quitosanases, individualmente ou em combinação, hidrolisam efetivamente a parede celular de fungos fitopatogênicos. A aplicação destas enzimas na parede celular de fungos é, portanto, uma promessa para o controle eficiente de doenças de plantas como uma alternativa aos fungicidas químicos sintéticos (NEERAJA et al., 2010).

A quitinase rCV1897_{PS+}, produzida em *P. pastoris*, foi avaliada sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de diferentes fungos fitopatogênicos. A dose de 30 µg de proteína recombinante causou a inibição de 81% do crescimento de *P. herquei* até o tempo de 24 horas e de 28% de *C. lindemuthianum*. A mesma não apresentou efeito sobre o crescimento micelial dos demais fungos testados.

Kawase e colaboradores (2006) sugeriram que as quitinases da família GH19, que apresentam efeito sobre o crescimento do micélio, atacam a quitina presente nas extremidades das hifas, uma vez que as quitinases desta família possuem uma atividade baixa contra quitina cristalina. A quitina recém-sintetizada, presente nas extremidades, ainda não está firmemente cristalizada, por isso pode ser utilizada como substrato por estas quitinases.

Da mesma forma, a quitinase de classe I recombinante de *V. unguiculata* (rVuChi), pertencente à família GH19, na dose de 100 µg, apresentou efeito sobre o crescimento de *P. herquei*, com um retardo de aproximadamente 50% (LANDIM, 2011). Uma quitinase de cevada, também da família GH19, apresentou atividade antifúngica *in vitro*, nas doses de 100 e 300 contra seis fungos fitopatogênicos (*Botrytis cinerea*; *Bipolaris oryzae*; *Pestalotia theae*; *Alternaria sp.*; *Curcuvularia lunata* e *Rhizoctonia solani*), dentre os 15 fungos testados (KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).

A quitinase rCV1897_{PS+} foi capaz de inibir totalmente a germinação dos conídios de *P. herquei* na dose de 30 µg até o tempo de 48 horas. Em doses menores (15; 7,5 e 3,75 µg), a inibição foi de 68%. A rCV1897_{PS+} (30 µg) causou inibição de aproximadamente 33% na germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*. Por outro lado, nenhum efeito inibitório foi observado sobre a germinação de conídios dos demais fungos testados. Os maiores efeitos da quitinase recombinante foram verificados sobre o fungo *P. herquei*, portanto, um ensaio de permeabilidade da membrana foi realizado utilizando iodeto de propídio. O efeito de rCV1897_{PS+} (0,3 mg/mL) sobre os conídios de *P. herquei* foi evidenciado pela fluorescência apresentada com o uso de iodeto de propídio, que facilitou a identificação dos conídios mortos pela ação desta proteína.

Resultados semelhantes foram encontrados para a quitinase de *V. unguiculata* (rVuchi), que foi capaz de inibir totalmente a germinação dos conídios de *P. herquei* na dose de 100 µg até o tempo de 48 horas (LANDIM, 2011).

Uma quitinase de classe I recombinante de cevada, da família GH19, foi capaz de inibir totalmente a germinação de escleródios de *R. solani*. Os escleródios foram incubados com 300 µg da quitinase recombinante por 2 dias. Os escleródios assim tratados e, posteriormente, transferidos para meio BDA, foram incapazes de germinar, mesmo após quatro dias do cultivo (KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).

O efeito antifúngico de diferentes quitinases bacterianas, pertencentes à família GH18, também já foram relatados. Uma quitinase recombinante de *S. proteamaculans*, expressa em *E. coli*, inibiu a germinação de esporos e o crescimento das hifas dos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *Aspergillus niger*. A enzima inibiu a germinação dos esporos em 98 e 94% e o crescimento das hifas em 72 e 61%, para *F. oxysporum* e *A.niger*, respectivamente (MEHMOOD et al., 2009).

Ghasemi e colaboradores (2011) relataram a clonagem e expressão de duas quitinases de *Bacillus pumilus* SG2 em *Escherichia coli* M15. As enzimas recombinantes purificadas mostraram atividade antifúngica contra *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma reesei*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris* sp por meio de atividades em placas de BDA.

O efeito da quitinase rCV1897_{PS+} sobre o crescimento do fungo *P. herquei* pode estar relacionado ao diferente conteúdo de quitina presente na parede celular de cada fungo. A atividade inibitória das quitinases está relacionada com a proporção de quitina presente na parede celular de cada fungo. Aqueles fungos cuja proporção de quitina na parede celular for menor, serão menos susceptíveis às quitinases, visto que este é o único substrato presente na parede sobre o qual a enzima pode atuar. Quanto mais facilmente a quitinase interagir com seu substrato na parede celular do fungo, maior será a velocidade da hidrólise da quitina e, conseqüentemente, maior será a inibição sobre o fungo (YAN et al., 2008).

Além do efeito contra fungos fitopatogênicos, as quitinases podem ser utilizadas no controle de leveduras de importância médica, como *Candida albicans* e *C. tropicalis*.

Nos últimos 30 anos, houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) em seres humanos. As IFIs são caracterizadas por taxas elevadas de morbidade e mortalidade, as quais podem ser atribuídas em parte à dificuldade de diagnóstico, prevenção e tratamento. (BASSETTI et al., 2011; FOURNIER et al., 2011; PETRIKKOS, et al., 2007)

Das espécies de *Candida* spp. isoladas, a *C. albicans* continua sendo a mais prevalente. No entanto, nas duas últimas décadas, o número de infecções devido a *Candida* não *albicans* tem aumentado significativamente com o aumento da prevalência de espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. (CHI et al., 2011; GAMARRA et al., 2010; RAJESHKUMAR e SUNDARARAMAN, 2012).

O tratamento das micoses sistêmicas é um dos principais problemas no campo da micologia médica, onde essas infecções afetam pacientes com fatores predisponentes. Os antifúngicos disponíveis apresentam com frequência efeitos secundários e colaterais, pois sua margem terapêutica é estreita limitando assim sua utilização e podem ainda induzir a resistência fúngica, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. (RUIZ-CAMPS e CUENCA-ESTRELLA, 2009).

Grande parte dos antifúngicos não se pode aplicar à prática médica devido sua toxicidade em células humanas. São conhecidas centenas de moléculas com atividade antifúngica, mas somente uma dezena dessas é aplicável ao tratamento das micoses sistêmicas (RUIZ-CAMPS e CUENCA-ESTRELLA, 2009).

Dessa forma, a avaliação do potencial de ação das quitinases pode ajudar para que as mesmas possam ser utilizadas no controle de doenças causadas por fungos em humanos. Nesse sentido, avaliou-se a atividade antifúngica das quitinases recombinantes (CV1897_{PS+} e CV1897_{PS-}), produzidas em *P. pastoris*, frente a diferentes cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol. Os antifúngicos azólicos, como o fluconazol, bloqueiam etapas importantes da biossíntese do ergosterol da célula fúngica, o mecanismo molecular é a inibição da enzima citocromo p450 14- α -demetilase, essa inibição resulta em um aumento da permeabilidade celular com consequente inibição do crescimento e reprodução (WARRILOW et al., 2010).

A análise dos resultados permitiu observar que as associações rCV1897_{PS+} + FLC e rCV1897_{PS-} + FLC atuaram de forma sinérgica contra todas as cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, com um FICI < 0,5.

Sabendo do potencial antifúngico das quitinases rCV1897_{PS+} e rCV1897_{PS-}, as alterações morfológicas e os danos na membrana celular da levedura causados por estas proteínas foram avaliados utilizando a citometria de fluxo. Com relação às cepas de *C. tropicalis* sensíveis ao FLC, os resultados obtidos mostraram que alterações morfológicas foram detectadas quando células dessas cepas foram expostas por 24 h à combinação rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,5 μ g/mL + FLC 8 μ g/mL, como revelado por citometria de fluxo. As modificações encontradas nas células das cepas sensíveis a FLC são compatíveis com a presença de morte celular.

Com relação às células de *C. tropicalis* resistentes a FLC, alterações morfológicas foram observadas nas células dessas cepas quando estas foram expostas por 24 h ao tratamento quitinase rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,5 µg/mL + FLC 8 µg/mL.

Nas cepas sensíveis a FLC, a exposição das células a FLC 64 µg/mL ou à combinação rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,5 µg/mL + FLC 8 µg/mL resultou em danos na membrana das células, como revelado por meio do ensaio com iodeto de propídio. Por outro lado, nas células de *C. tropicalis* resistentes a FLC, a perda da integridade da membrana foi somente observada no co-tratamento por 24 h com rCV1897 (PS+ ou PS-) 0,5 µg/mL + FLC 8 µg/mL).

O fato das quitinases recombinantes não apresentarem efeitos quando testadas isoladamente, pode está relacionada com a composição da parede celular da levedura. Como o exemplo de *C. albicans*, que tem a quitina como um componente menor, variando de 0,6 a 9%, enquanto os β-glucanos são o principal constituinte, responsável por 47-60% da parede celular (CHAFFIN et al., 1998). A presença de β-glucanos em grande quantidade na porção mais externa da célula pode dificultar o acesso da enzima à quitina (NETEA et al., 2008).

Uma quitotriosidase humana recombinante, produzida em células de ovário de hamster chinês, inibiu o crescimento dos fungos *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus niger* (GORDON-THOMSON et al., 2009). A quitinase humana (AMCase) recombinante, produzida em *E. coli*, também foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum* (CHEN; SHEN; WU, 2009). Han e colaboradores (2009) isolaram uma quitinase de *Streptomyces* sp. DA11 (34 kDa) e avaliaram seu potencial antifúngico. A enzima mostrou-se ativa ao inibir o crescimento dos fungos *C. albicans* e *A. niger*.

O potencial antifúngico de CV1897 de *C. violaceum* foi confirmado em diferentes ensaios. Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação desta quitinase devem ser feitos, para que esta proteína possa ser utilizada como ferramenta no controle de doenças causadas por fungos em plantas e em humanos.

8. CONCLUSÃO

A quitinase CV1897 de *Chromobacterium violaceum*, pertencente à família 19 das glicosil-hidrolases, foi expressa em dois sistemas heterólogos: *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. A enzima foi produzida principalmente em corpos de inclusão na bactéria *E. coli* e foi secretada de forma solúvel na levedura *P. pastoris*. A mesma mostrou-se ativa contra substratos solúveis e insolúveis, além de apresentar atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos: *Penicillium herquei* e *Colletotrichum lindemuthianum* e leveduras de importância médica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B.B.; HEGGSET, E.B.; NORBERG, A.N.; SØRLIE, M.; VÅRUM, K.M.; EIJSINK, V.G.H. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1482-1517, 2010.

ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v.150, p. 2029-2035, 2004.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Ed. Universidade Federal de Viçosa (UFV), 199 p., 1998.

ARRIAGA, S.; ACOSTA-MUNGUÍA, J.A.; PÉREZ-MARTÍNEZ, A.S.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.D.; BARBA DE LA ROSA, A.P. Coupling aerobic biodegradation of methanol vapors with heterologous protein expression of endochitinase Ech42 from *Trichoderma atroviride* in *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9661-9965, 2010.

BABASHPOUR, S.; AMINZADEH, S.; FARRAKHI, H.; KARKHANE, A.; HAGHBEEN, K. Characterization of a chitinase (Chit62) from *Serratia marcescens* B4A and its efficacy as a bioshield against plant fungal pathogens. **Biochem Genet**, v. 50, p. 722-735, 2012.

BARR, K.A.; HOPKINS, S.A.; SREEKRISHNA, K. Protocol for efficient secretion of HAS developed from *Pichia pastoris*. **Pharmaceutical Engineering**, v. 12, p. 48-51, 1992.

BARBOZA-CORONA, J.E.; REYES-RIOS, D.M.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BIDESHI, D.K. Molecular and Biochemical Characterization of an Endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-73. **Molecular Biotechnology**, v. 39, p. 29–37, 2008.

BARRETO, E. S.; TORRES, A.R.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, A.T.R.; ASTOLFI-FILHO, S.; HUNGRIA, M. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. **Journal Ind Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 783–790, 2008.

BASSETTI, M.; TARAMASSO, L.; NICCO, E.; MOLINARI, M.P.; MUSSAP, M.; VISCOLI, C. Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility and Outcome of Nosocomial Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. **PLOS ONE**, v. 6, n. 9, e24198, 2011.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and β -1,3-glucanases, in: S.J. Gurr, M.J. McPherson, D.J. Bowles (Eds.), **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**, Oxford University Press, New York, v. II, p. 23-30, 1992.

BOOT, R.G.; BLOMMAART, E.F.C.; SWART, E.; VAN DER VLUGT, K.G.; BIJL, N.; MOE, C.; PLACE, A.; AERTS, J.M.F.G. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. **J Biol Chem**, v. 276, p. 6770–6778, 2001.

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

BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, p. 61-66, 1990.

BROMBERG, N.; DREYFUSS, J.L.; REGATIERI, C.V.; PALLADINO, M.V.; DURÁN, N.; NADER, H.B.; HAUN, M.; JUST, G.Z. Growth inhibition and proapoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chem Biol Interact**, n. 186, p. 43–52, 2010.

CEASAR, S.A.; IGNACIMUTHU, S. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. **Biotechnol Lett**, v. 34, p. 995-1002, 2012.

CEREGHINO, G.P.L.; CEREGHINO, J.L.; ILGEN, C.; CREGG, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, n.13, p. 329–332, 2002.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J.P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans* : Identification, Function, and Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 130-180, 1998.

CHEN, L; SHEN, Z; WU, J. Expression, purification and *in vitro* antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. **Clin Exp Dermatol**, v. 34, p. 55-60, 2009.

CHI, H.W., YANG, Y.S., SHANG, S.T., CHEN, K-H., YEH, K-M., CHANG, F-Y., LIN, J-C. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 5, p. 369-375, 2011.

CHO, E.K.; CHOI, I.S.; CHOI, Y.J. Overexpression and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus atrophaeus* SC081 in *Escherichia coli*. **BMB reports**, v. 44, n. 3, p. 193-198, 2011.

CHOI, J.H.; LEE, S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 625-635, 2004.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876-885, 2006.

CHUANG, H.H.; LIN, H.Y.; LIN, F.P. Biochemical characteristics of C-terminal region of recombinant chitinase from *Bacillus licheniformis* – implication of necessity for enzyme properties. **FEBS Journal**, v. 275, p. 2240-2254, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 9, p. 270-277, 1998.

COTTRELL, M.T.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2553-2557, 1999.

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

CREGG, J.M.; CEREGHINO, J.L.; SHI, J.; HIGGINS, D.R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p.23-52, 2000.

CORREIA, T.O. **Quitinase de classe I de feijão-de-corda (*Vigna unguiculat*): estudo preliminar da expressão do gene, clonagem, expressão e purificação em *Escherichia coli* BL21(λ)DE3 e determinação da estrutura através da modelagem por homologia**. Dissertação. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 90p. Fortaleza, Ceará, 2007.

DA SILVA, C. R.; CAMPOS, R.S.; SANTOS NETA, M.A.; ÂNGELO, M.R.F.; MAGALHÃES, H.I.F.; CAVALCANTI, B.C.; MORAES, M.O., MACEDO, D.S.; NOBRE-JÚNIOR, H.V. Susceptibility to caspofungin of *Candida* spp. strains isolated in Ceará, Northeastern Brazil. **J Mycol Med**. 21:273-276. 2011.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; TIWARI, R.P.; HOONDAL, G.S. Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its application in protoplast production. **Curr Microbiol**, v. 51, p. 1-9, 2005b.

DALY, R.; HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

DE CARVALHO, D. D.; COSTA, F.T.M.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. **Toxicol Vitro**, n. 20, p. 1514–1521, 2006.

DE LA VEGA, L.M.; BARBOZA-CORONA, J.E.; AGUILAR-USCANGA, M.G.; RAMÍREZ-LEPE, M. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. **Can J Microbiol**, v. 52. N. 7, p. 651-657, 2006.

DEHESTANI, A.; KAZEMITABAR, K.; AHMADIAN, G.; JELODAR, N.B.; SALMANIAN, A.H.; SEYEDI, M.; RAHIMIAN, H.; GHASEMI, S. Chitinolytic and antifungal activity of a *Bacillus pumilus* chitinase expressed in *Arabidopsis*. **Biotechnol Lett**, v. 32, p. 539-546, 2010.

DEMAIN, A.L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 297-306, 2009.

DRISS, F.; KALLASSY-AWAD, M.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 945-953, 2005.

DURÁN, N.; ERAZO, S; CAMPOS, V. Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 55, p. 231-234, 1983.

DURÁN, N., ANTONIO, R.V., HAUN, M. AND PILLI, R.A. Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 10, p. 686-690, 1994.

DURÁN, N.; RETTORI, D.; MENCK, C.F.M. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? Perspectivas farmacológicas e industriais na era pós-genômica. **Biociência**, n. 20, p. 38-43, 2001.

DURÁN, N.; MENCK, C.F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, n. 27, p. 201-222, 2001.

DURÁN, N.; JUST, G.Z.; MELO, P.S.; DE AZEVEDO, M.B.M.; SAUZA BRITO, A. R. M.; ALMEIDA, A.B.A.; HAUN, M. Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with β -cyclodextrin. **Can J Physiol Pharmacol**, n. 81, p. 387-396, 2003.

DURÁN, M; FALJONI-ALARIO, A.; DURÁN, N. *Chromobacterium violaceum* and Its Important Metabolites – review. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 6, p. 535-547, 2010.

DURÁN, M; PONEZI, A.N.; FALJONI-ALARIO, A.; TEIXEIRA, M.F.S.; JUSTO, G.Z.; DURÁN, N. Potential applications of violacein: a microbial pigment. **Med Chem Res**, v. 21, p. 1524-1532, 2012.

EDMAN, G.M.; WANG, J.L. Preparation of phenyl thiohydantoins from some natural amino acids. **Acta Chemica Scandinavica**, v.4, p. 277-282. 1950.

ENDO, E.H. **Efeito sinérgico do extrato bruto e frações de Punica granatum contra Candida albicans e sinergismo com o Fluconazol**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, 2007.

FAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, X.; PEI, X.; GUO, S.; PEI, Y. Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 56, p. 93-99, 2007.

FAN, Y.; GUO, S; PEI, X.; ZHANG, Y.; LUO, Z.; PEI, Y. Effects of chitin binding domain on enzymatic properties and insecticidal activity of *Bombyx mori* chitinase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 1551-1558, 2011.

FANG, W; AZIMZADEH, P; ST LEGER, R.J. Strain improvement of fungal insecticides for controlling insect pests and vector-borne diseases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2012.

FERREIRA, C.V.; BOS, C.L.; VERSTEEG, H.H.; JUST, G.Z.; DURÁN, N.; PEPPELENBOSCH, M.P. Molecular mechanisms of violacein-mediated human leukemia cell death. **Blood**, n.104, p. 1459-1464, 2004.

FITCHES, E.; WILKINSON, H.; BELL, H.; BOWN, D.P.; GATEHOUSE, J.A.; EDWARDS, J.P. Cloning, expression and functional characterization of a chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 1037-1050, 2004.

FORSYTH, W.G.C.; HAYWARD, A.C.; ROBERTS, J.B. Occurrence of poly-beta-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. **Nature**, v. 182, p. 800-801, 1958.

FOURNIER, P.; SCHWEBEL, C.; MAUBON, D.; VESIN, A.; LEBEAU, B.; FORONI, L, HAMIDFAR-ROY, R.; CORNET, M, TIMSIT, J.M.; PELLOUX, H. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2880-2886, 2011.

FRANDBERG, E.; SCHNURER, J. Evaluation of a chromogenic chito-oligosaccharide analogue, p-nitrophenyl-beta-D-N,N'-diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria. **J Appl Bacteriol**, v. 76, n. 3, p. 259-263, 1994.

FRANKOWSKI, J.; LORITO, M.; SCALA, F.; SCHIMID, R.; BERG, G.; BAHL, H. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Arch Microbiol**, v. 176, p. 421-426, 2001.

FUNKHOUSER, J.D.; ARONSON JR, N.N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 97, p. 1-16, 2007.

GAMARRA, S.; ROCHA, E.M.; ZHANG, Y.Q.; PARK, S.; RAO, R.; PERLIN, D.S. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p.1753-1761, 2010.

GHASEMI, S.; AHMADIANA, G.; SADEGHIA, M.; ZEIGLERB, D.R.; RAHIMIANC, H.; GHANDILIA, S.; NAGHIBZADEHA, N.; DEHESTANI, A. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 225-231, 2011.

GOMAA, E.Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n.1, p. 103-111, 2012.

GORTARI, M.C.; HOURS, R.A. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. **Mycological Progress**, v. 7, p. 221-238, 2008.

GRANGEIRO, T.B.; JORGE, D.M.M.; BEZERRA, W.M.; VASCONCELOS, A.T.R.; SIMPSON, A.J.G. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 117-133, 2004.

GOODAY, G.W. Diversity of roles of chitinases in nature. **Chitin and chitosan**, p. 191-202, 1995.

GOODRICK, J.C.; XU, M.; FINNEGAN, R.; SCHILLING, B.M.; SCHIAVI, S.; HOPPE, H.; WAN, N.C. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 6, p. 492-497, 2001.

GORDON-THOMSON, C.; KUMARI, A.; TOMKINS, L.; HOLFORD, P.; DJORDJEIC, J.T.; WRIGHT, L.C.; SORRELL, T.C.; MOORE, G.P.M. Chitotriosidase and gene therapy for fungal infections. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, p. 1116 – 1125, 2009.

GOURSON, C.; BENHADDOU, R.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; VERNEUIL, B.; BRANLAND, P.; CHAUVELON, G.; TRIBAULT, J. F.; SAULNIER, L. Valorization of maize bran to obtain biodegradable plastic films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 74, p. 3040–3045, 1999.

GRAHAM, L.S.; STICKLEN, M.B. Plant chitinases. **Can J Bot**, v. 72, p. 1057-1083, 1994.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **NetNGlyc; Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.** Em preparação, 2004. Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>. Acesso em agosto de 2011.

HAN, Y.; YANG, B.; ZHANG, F.; MIAO, X.; LI, Z. Characterization of Antifungal Chitinase from Marine *Streptomyces* sp. DA11 Associated with South China Sea Sponge *Craniella Australiensis*. **Mar Biotechnol**, v. 11, p. 132-140, 2009.

HART, P.J.; PFLUGER, H.D.; MONZINGO, A.F.; HOLLIS, T.; ROBERTUS, J.D. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 248, p. 402-413, 1995.

HASSAN, F.; MEENS, J.; JACOBSEN, H.; KIESECKER, H. A family 19 chitinase (Chit30) from *Streptomyces olivaceoviridis* ATCC 11238 expressed in transgenic pea affects the development of *T. harzianum* in vitro. **Journal of Biotechnology**, v.143, p. 302-308, 2009.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** v. 280, p. 309-316, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino- acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788. 1993.

HOLLAK, C.E.M.; VAN WEELY, S.; VAN OERS, M.H.J.; AERTS, J.M.F.G. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity: a novel Hallmark of Gaucher disease. **J Clin Invest**, v. 93, p. 1288-1292, 1994.

HOSHINO, T. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1463–1475, 2011.

HOWARD, M.B. ; EKBORG, N.A. ; WEINER, R.M. ; HUTCHESON, S.W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 627-635, 2003.

HUANG, C.; WANG, T.; CHUNG, S; CHEN, C. Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 82-88, 2005.

HUANG, C.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **J Ind Microbial Biotechnol**, v.39, p. 383-399, 2012.

HUANG, L.; SHIZUME, A.; NOGAWA, M.; TAGUCHI, G.; SHIMOSAKA, M. Heterologous expression and functional characterization of a novel chitinase from the chitinolytic bacterium *Chitiniphilus shinanonensis*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 76, n. 3, p. 517-522, 2012.

HUET, J.; WYCKMANS, J.; WINTJENS, R.; BOUSSARD, P.; RAUSSENS, V.; VANDENBUSSCHE, G.; RUYSSCHAERT, J.M.; AZARKAN, M.; LOOZE, Y. Structural characterization of two papaya chitinases, a family GH19 of glycosyl hydrolases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 3042-3054, 2006.

HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M.F.; GUIMARÃES, C.T.; JARDIM, S.N.; GOMES, E.A.G.; VASCONCELOS, A.T.R. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 102-116, 2004.

ISELI, B.; ARMAND, S.; BOLLER, T.; NEUHAUS, J.M.; HENRISSAT, B. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. **FEBS Letters**, v. 382, p. 186-188, 1996.

JACH, G.; LOGEMANN, S.; WOLF, G.; et al. Expression of a bacterial chitinase leads to improved resistance of transgenic tobacco plants against fungal infection. **Biopractice**, v. 1, p. 33-40, 1992.

JANG, M.; LEE, Y.; CHO, Y.; CHOI, Y.; KIM, C.; LEE, Y. Overexpression and characterization of a novel chitinase gene from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. BK1. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.42, p.339-344, 2005.

JAQUES, A.K.; FUKAMIZO, T.; HALL, D.; BARTON, R.C.; ESCOTT, G.M.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C.A.; ADAMS, D.J. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. **Microbiology**, v. 149, n.10, p. 2931-2939, 2003.

JOUNG, Y. H.; KIM, H. R.; LEE, M. K.; PARK, A. J. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. **The British Infection Societ**. 54: 504-508, 2007.

KADOKURA, K.; SAKAMOTO, Y.; SAITO, K.; IKEGAMI, T.; HIRANO, T.; HAKAMATA, W.; OKU, T.; NISHIO, T. Production and secretion of a recombinant *Vibrio parahaemolyticus* chitinase by *Escherichia coli* and its purification. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**., v.71, n.11, p. 2848-2851, 2007.

KAWASE, T.; YOKOKAWA, S.; SAITO, A.; FUJII, T.; NIKAIDOU, N.; MIYASHITA, K.; WATANABE, T. Comparison of Enzymatic and Antifungal Properties between Family 18 and 19 Chitinases from *S. coelicolor* A3(2). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n.4, p. 988-998, 2006.

KEYHANI, N.O.; ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1473, p.108-122, 1999.

KIM, H.S.; TIMMIS, K.N.; GOLYSH, P.N. Characterization of a chitinolytic enzyme from *Serratia* sp. KCK isolated from kimchi juice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1275-1283, 2007.

KIRUBAKARAN, S.I.; SAKTHIVEL, N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 52, p. 159-166, 2007.

KODACH, L.L.; BOS, C.L.; DURÁN, N.; PEPPELENBOSH, M.P.; FERREIRA, C.V.; HARDWICK, J.C.H. Inhibition of akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells by violacein abrogates 5-fluorouracil chemoresistance. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 508-516, 2006.

KUO, C.J.; LIAO, Y.C.; YANG, J.H.; HUANG, L.C.; CHANG, C.T.; SUNG, H.Y. Cloning and Characterization of an Antifungal Class III Chitinase from Suspension-Cultured Bamboo (*Bambusa oldhamii*) Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.23, p. 11507-11514, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 22, p. 680-685, 1970.

LAN, X.; ZHANG, X.; HU, J.; SHIMOSAKA, M. Cloning, expression, and characterization of a chitinase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.70, n.10, p. 2437-2442, 2006.

LANDIM, Patricia Gadelha de Castro. **Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica**. Tese (doutorado em Bioquímica), 164 p Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.

LEE, Y.S.; PARK, I.H.; YOO, J.S.; CHUNG, S.Y.; LEE, Y.C.; CHO, Y.S.; AHN, A.C.; KIM, C.M.; CHOI, Y-L. Cloning, purification, and characterization oh chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2734-2741, 2007.

LEE, S.G.; KOH, H.Y.; HAN, S.J.; PARK, H.; NA, D.C.; KIM, I.L.; LEE, H.K.; YIM, J.H. Expression of recombinant endochitinase from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. **Protein Expression and Purification**, v. 71, p. 108-114, 2010.

LEON, L.L.; MIRANDA, C.C.; DE SOUZA, A.O.; DURÁN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from chromobacterium violaceum. **J Antimicrobial Chemother**, v. 48, p. 449-450, 2001.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D302-D305.

LI, D.C. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v.161, p. 345-360, 2006.

LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GAO, X.; ILANGOVAN, K.; SUZARA, V.V.; DUZGUNES, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 142, p. 105–124, 2007.

LIU, Z.H.; YANG, Q.; HU, S.; ZHANG, J.D.; MA, J. Cloning and characterization of a novel chitinase gene (chi46) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. **Appl Microbial Biotechnol**, v. 80, p. 241-252, 2008.

LIU, D.; CAIA, J.; XIE, C.C.; LIU, C.; CHEN, Y.H. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. colmeri, and its biocontrol potential. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 46, p.252–256, 2010.

LIU, Z.H.; WANG, Y.C.; QI, X.T.; YANG, C.P. Cloning and characterization of a chitinase gene Lbchi31 from *Limonium bicolor* and identification of its biological activity. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 5, p. 2447-2453, 2010.

LOBO, M.D.P. **Purificação parcial de uma quitinase funcional de *Chromobacterium violaceum* produzida em *Escherichia coli***. Monografia (Graduação). Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, 65p. Fortaleza, Ceará, 2009.

LOBO, M.D.P. **Caracterização bioquímica, biológica e estrutural de uma quitinase recombinante de *Chromobacterium violaceum***. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 156p. Fortaleza, Ceará, 2012.

LOPES, S.C.P.; BLANCO, Y.C.; JUSTO, G.Z.; NOGUEIRA, P.A.; RODRIGUES, F.L.S.; GOELNITZ, U.; WUNDERLICH, G.; FACCHINI, G.; BROCCHI, M.; DURAN, N.; COSTA, F.T.M. Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits Plasmodium Growth *In Vitro* and *In Vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n.5, p. 2149–2152, 2009.

LUO, S.; ZHANGSUN, D.; TANG, K. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratomyxa lanigera* Zehntner. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 69, p. 184-191, 2005.

MAKINO, T.; SKRETAS, G.; GEORGIU, G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. **Microbial Cell Factories**, v.10, n. 32, 2011.

MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B. *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database issue, p. D225-229.

MARTINEZ, R.; VELLUDO, M.A.SL.; DOS SANTOS, V.R.; DINAMARCO, P.V. *Chromobacterium violaceum*: INFECTION IN BRAZIL. A CASE REPORT. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, n.2, p. 111-113, 2000.

MATROUDI, S.; ZAMANI, M.R.; MOTALLEBI, M. Molecular cloning of chitinase 33 (chit33) gene from *Trichoderma atroviride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 433-437, 2008.

MEDEIROS, S. **Expressão heteróloga de uma glicosil hidrolase da família 18 (CV2736) de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris* com potencial antibacteriano**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 121p. Fortaleza, Ceará, 2012.

MEHMOOD, M.A.; XIAO, X.; HAFEEZ, F.Y.; GAI, Y.; WANG, F. Purification and characterization of a chitinase from *Serratia proteamaculans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1955-1961, 2009.

MELO, A.M.Y.; MAIA, L.C.; MORGADO, L.B. Fungos micorrízicos arbusculares em bananeira cultivados no vale do submédio São Francisco. **Acta Botanica Brasílica**, v. 11, p. 115-121, 1997.

MELO, P.S.; JUST, G.S.; DE AZEVEDO, M.B.M.; DURÁN, N.; HAUN, M. Violacein and its β -cyclodextrin complexes induces apoptosis and differentiation in HL60 cells. **Toxicology**, n. 186, p. 217-225, 2003.

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

MIDDELBERG, A.P.J. Preparative protein refolding. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 437-443, 2002.

MILITAO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, 78: 2409-2417, 2006.

MIZUNO, R.; ITOH, Y.; NISHIZAWA, Y.; KEZUKA, Y.; SUZUKI, K.; NONAKA, T.; WATANABE, T. Purification and characterization of a rice class I chitinase, OsChia1b, produced in *Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 893-895, 2008.

MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 648-656, dez 1977.

NAKAMURA, Y.; ASADA, C.; SAWADA, T. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. **Biotechnol Bioprocess Eng**, v. 8, p. 37-40, 2003.

NAZARI, B.; SAITO, A.; KOBAYASHI, M.; MIYASHITA, K.; WANG, Y.; FUJI, T. High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, p. 623-635, 2011.

NEERAJA, C.; ANIL, K.; PURUSHOTHAM, P.; SUMA, K.; SARMA, P.; MOERSCHBACHER, B.M.; PODILE, A.R. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 231-241, 2010.

NETEA, M.G.; BROWN, G.D.; KULLBERG, B.J.; GOW, N.A.R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 67-78, 2008.

NISHIYAMA, Y.; NOISHIKI, Y.; WADA, M. X-ray Structure of Anhydrous β -Chitin at 1 Å Resolution. **Macromolecules**, v. 44, n. 4, p. 950-957, 2011.

NOGUEIRA, N.A.P. **Purificação e Caracterização biológica da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli***. Tese. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 139p. Fortaleza, Ceará. 1999.

ODDS, F. C. Coccidioidomycosis: flying conidia and severed heads. **Mycologist**, 17: 37- 40, 2003.

PARK, J.K.; MORITA, K.; FUKUMOTO, I.; YAMASAKI, Y.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; MATSUDA, H. Purification and characterization of the chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 684-689, 1997.

PARK, S.M.; KIM, D.H.; TRUONG, N.H.; ITOH, Y. Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oryza sativa* L.). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 6, p. 697-702, 2002.

PARK, S.K.; KIM, C.W.; KIM, H.; JUNG, J.S.; HARMAN, G.E. Cloning and high-level production of a chitinase from *Chromobacterium* sp. and the role of conserve dor nonconserved residues on its catalytic activity. **Biotechnologically relevant enzymes and proteins**, v. 74, p. 791-804, 2007.

PATIL, R S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 26, p. 473–483, 2000.

PEREZ-IRATXETA, C.; ANDRADE-NAVARRO, M.A. K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **BMC Structural Biology**, v. 8, p. 25, 2008.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. VON; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-786.

PETRIKKOS, G; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, n. 2, p. 108–117, 2007.

PINA-VAZ C.; RODRIGUES A. G. Molecular and Cell Biology Methods for Fungi. **Methods in Molecular Biology**, v.638, 2010.

PINA-VAZ C.; RODRIGUES A. G.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RICARDO, E.; MARDH, P.A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **J Antimicrob Chemother**, 56:678-685, 2005.

PINKERTON, D.M.; BANWELL, M.G.; GARSON, M.J.; KUMAR, N.; DE MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; BARROS, F.W.A.; PESSOA, C. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines C and E–J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. **Chemistry & Biodiversity**. 7: 1311-1324. 2010.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.

PRAKASH, N.A.U.; JAYANTHI, M.; SABARINATHAN, R.; KANGUEANE, P.; MATHEW, L.; SEKAR, K. Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 70, p. 466-478, 2010.

PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D290-D301.

PUGSLEY, A.P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 57, p. 50–108, 1993.

RAHAM, S.K.; RINALDI, S. IKUO, N.; MASAHIRO, M. Production transgenic potato exhibiting enhanced resistance to fungal infections and herbicide applications. **Plant Biotechnol Rep**, v. 2, p. 13-20, 2008.

RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, M. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – status quo. **Mycoses**, v.55, n.3, p.60-73, 2012.

RAMLI, A.N.M.; MAHADI, N.M.; RABU, A.; MURAD, A.M.A.; BAKAR, F.D.A.; ILLIAS, R.M. Molecular cloning, expression and biochemical characterization of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma Antarctica* PI12. **Microbial Cell Factories**, v.10, n. 94, 2011.

RAMOS, C.H.I.; FERREIRA, S.T. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. **Protein and Peptide Letter**, v. 12, p. 213-222, 2005.

REISSIG, J.L.; SROMENGER, J.L.; LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. **Biological Chemistry**, v. 217, p.959-966, 1955.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistêmico. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v.27, n.6, p.353–362, 2009.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiol Rev**, v. 11, p. 317-338, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.

SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, PEER; PONTING, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 5857-5864.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SHAKHBAZAU, A.V. Expression and inheritance of bacterial endochitinase transgene in tobacco plants. **Dokl. NAN Belarusi**, n.49, v.5, p. 86-88, 2005.

SHAKHBAZAU, A.V.; KARTEL, N.A. Chitinases in bioengineering research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, n. 8, p. 881-889, 2008.

SIKORSKI, P.; HORI, R.; WADA, M. Revisit of a-chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1100–1105, 2009.

SINGH, A.; KIRUBAKARAN, I.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, v. 56, p. 100-109, 2007.

SIQUEIRA, I.C.; DIAS, J.; RUF, H. *Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1443-1445, 2005.

SMITH, A. D. & HUNT, R. J. Solubilization of gold by *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 35, p.110–116, 1985.

SNEATH, P.H.A.; WHELAN, J.P.F.; SINGH, R.B.; EDWARDS, D. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*, **The Lancet**, v. 265, p. 276–277, 1953.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, 2005.

SOUZA, C.P.; ALMEIDA, B.C.; COLWELL, R.R.; RIVERA, I.N.G. The importance of chitin in the marine environment. **Mar Biotechnol**, v. 13, p. 823-830, 2011.

STEINBUCHER, A., DEBZI, E.M., MARCHESSAULT, R.H., TIMM, A. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 39, p. 443–449, 1993.

STREICHER, H, SHARON, N. Recombinant plant lectins and their mutants. **Methods in Enzimology**, vol 363, p.47-77, 2003.

STREICHSBIER, F. Utilization of chitin as sole carbon and nitrogen source by *Chromobacterium violaceum*. **Microbiology letters**,v.19, p. 129-132, 1983.

STRONG, F.M Isolation of violacein, **Science**, v. 100, n. 28, 1944.

SVITIL, A.L.; NÍ CHADHAIN, S.M.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitin. **Appl Environ Microbiol**, v.63, n.2, p. 408-413, 1997.

TEIXEIRA, C. S. **Expressão de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris*: purificação e caracterização parcial da proteína recombinante.** Dissertação

(Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 110p. Fortaleza, Ceará, 2011.

TOWBIN , H. STAEHENLIN, T, GORDON, J. Eletrophoresis transfer of proteins from polyacrilamide gel to nitrocellulose sheet: produces and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**, v. 76, p.4350-4354, 1979.

TRONSMO, A., HARMAN, G. E. Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase and endochitinase in solutions and on gels. **Anal Biochem**, v. 208, p. 74-79, 1993.

TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel eletrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 178, p. 362-366, 1989.

TRUONG, N.H.; PARK, S.M.; NISHIZAWA, Y.; WATANABE, T.; SASAKI, T.; ITOH, Y. Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 5, p. 1063-1070, 2003.

UBHAYASEKERA, W.; TANG, C.M.; HO, S.W.T.; BERGLUND, G.; BERGFORS, T.; CHYE, M.L.; MOWBRAY, S.L. Crystal structures os a family 19 chitinase from *Brassica juncea* show flexibility of binding cleft loops. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 3695-3703, 2007.

UBHAYASEKERA, W. Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. **Polymer International**, v. 60, p. 890-896, 2011.

UDAYA PRAKASH, N.A.; JAYANTHI, M.; SABARINATHAN, R.; KANGUEANE, P.; LAZAR MATHEW; SEKAR, K. Evolution, Homology Conservation, and Identification of Unique Sequence Signatures in GH19 Family Chitinases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 70, n. 5, p. 466-478, 2010.

UEDA, M.; FUJIWARA, A.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M. Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp, 10S-24. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 2162-2164, 1995.

URSING, B. M.; ENCKEVORT, F. H. J. VAN; LEUNISSEN, J. A. M.; SIEZEN, R. J. EXProt: a database for proteins with an experimentally verified function. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 50-51, 2002.

VAIDYA, R.; ROY, S.; MACMIL, S.; GANDHI, S.; VYAS, P.; CHHATPAR, H.S.; Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. **Biotechnol Lett**, v. 25, p.715-717, 2003.

VASCONCELOS, A.T.R.; DE ALMEIDA, D.F., HUNGRIA M., GUIMARAES C.T., ANTONIO R.V., ALMEIDA F.C., DE ALMEIDA L.G.P., DE ALMEIDA R., ALVES-GOMES J.A., ANDRADE E.M., ARARIPE J., DE ARAUJO M.F.F., ASTOLFI S., AZEVEDO V., BAPTISTA A.J., BATAUS L.A.M., BATISTA J.D., BELO A., VAN DEN BERG C., BOGO M., BONATTO S., BORDIGNON J., BRIGIDO M.M., BRITO C.A., BROCCHI M., BURITY H.A., CAMARGO A.A., CARDOSO D.D., CARNEIRO N.P., CARRARO D.M., CARVALHO, C.M.B., CASCARDO J.C.M., CAVADA B.S.,

CHUEIRE L.M.O., CRECZYNSKI-PASA T.B., DA CUNHA N.C., FAGUNDES N., FALCAO C.L., FANTINATTI F., FARIAS L.P., FELIPE M.S.S., FERRARI L.P., FERRO J.A., FERRO M.T., FRANCO G.R., DE FREITAS N.S.A., FURLAN L.R., GAZZINELLI R.T., GOMES E.A., GONCALVES P.R., GRANGEIRO T.B., GRATTAPAGLIA D., GRISARD E.C., HANNA E.S., JARDIM S.N., LAURINO J., LEI L.C.T., LIMA L.F.A., LOUREIRO M.D., DE LYRA M.D.C.P., MADEIRA H.M.F., MANFIO G.P., MARANHAO A.Q., MARTINS W.S., DI MAURO S.M.Z., DE MEDEIROS S.R.B., MEISSNER R.D., MOREIRA M.A.M., DO NASCIMENTO F.F., NICOLAS M.F., OLIVEIRA J.G., OLIVEIRA S.C., PAIXAO R.F.C., PARENTE J.A., PEDROSA F.D.P., PENA S.D.J., PEREIRA J.O., PEREIRA M., PINTO L.S.C., PINTO L.D., PORTO J.I.R., POTRICH D.P., RAMALHO-NETO C.E., REIS A.M.M., RIGO L.U., RONDINELLI E., DO SANTOS E.B.P., SANTOS F.R., SCHNEIDER M.P.C., SEUANEZ H.N., SILVA A.M.R., DA SILVA A.L.D., SILVA D.W., SILVA R., SIMOES I.D., SIMON D., SOARES C.M.D., SOARES R.D.A., SOUZA E.M., DE SOUZA K.R.L., SOUZA R.C., STEFFENS M.B.R., STEINDEL M., TEIXEIRA S.R., URMENYI T., VETTORE A., WASSEM R., ZAHA A., SIMPSON A.J.G. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **PNAS**, v. 100, n. 20, p.11660-11665, 2003.

VEGA, K.; KALKUM, M. Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, 2012.

WANG, Y.J.; YANG, Q. Cloning and expression of a novel chitinase chi58 from *Chaetomium cupreum* in *Pichia pastoris*. **Biochemical Genetics**, v. 47, n.7-8, p. 547-558, 2009.

WANG, S.L.; CHAO, C.H.; LIANG, T.W.; CHEN, C.C. Purification and Characterization of Protease and Chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and Conversion of Marine Wastes by These Enzymes. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 334-344, 2009.

WARNER, S.A.J. Genomic DNA isolation and lambda library construction. In: FOSTER, G.D.; TWELL, D. **Plant gene isolation: principles and practice**. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England. p. 51-73, 1996.

WARRILOW, A.G.S.; MARTEL, C.M.; PARKER, J.E.; MELO, N.; LAMB, D.C.; NES, W.D.; KELLY, D.E.; KELLY, S.L. Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14 α -Demethylase (CaCYP51). **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.4235-4245, 2010.

WATANABE, T.; KOBORI, K.; MIYASHITA, K.; FUJII, T.; SAKAI, H.; USCHIDA, M.; TANAKA, H. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 268, p. 18567-18572, 1993.

WATANABE, T.; KANAI, R.; KAWASE, T.; TANABE, T.; MISUTOMI, M.; SAKUDA, S.; MIYASHITA, K. Family 19 chitinase of *Streptomyces* species: characterization and distribution. **Microbiology**, v. 145, p. 3353-3363, 1999.

WOO, C.J.; PARK, H.D. An extracellular *Bacillus* sp. chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 409-412, 2003.

YAN, R.; HOU, J.; DING, D.; GUAN, W.; WANG, C.; WU, Z.; LI, M. In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. **Journal of Basic Microbiology** v. 48, p. 293–301, 2008.

YANG, C.Y.; HO, Y.C.; PANG, J.C.; HUANG, S.S.; TSCHEN, J. S.M. Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel *Bacillus subtilis* isolate from Taiwan potato field. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2008.07.039, 2008.

YANG, C.H.; LI, Y.H.. Chromobacterium violaceum infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, p. 435- 441, 2011.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 335-347, 2007.

YONG, T.; HONG, J.; ZANG-FU, L.; LI, Z.; XIU-QIONG, D.; KE, T.; SHI-GUI, L. Cloning and expression of a chitinase gene from *Sanguibacter* sp. C4. **Acta Genetica Sinica**, v. 33, n.11, p. 1037-1046, 2006.

10. ANEXOS

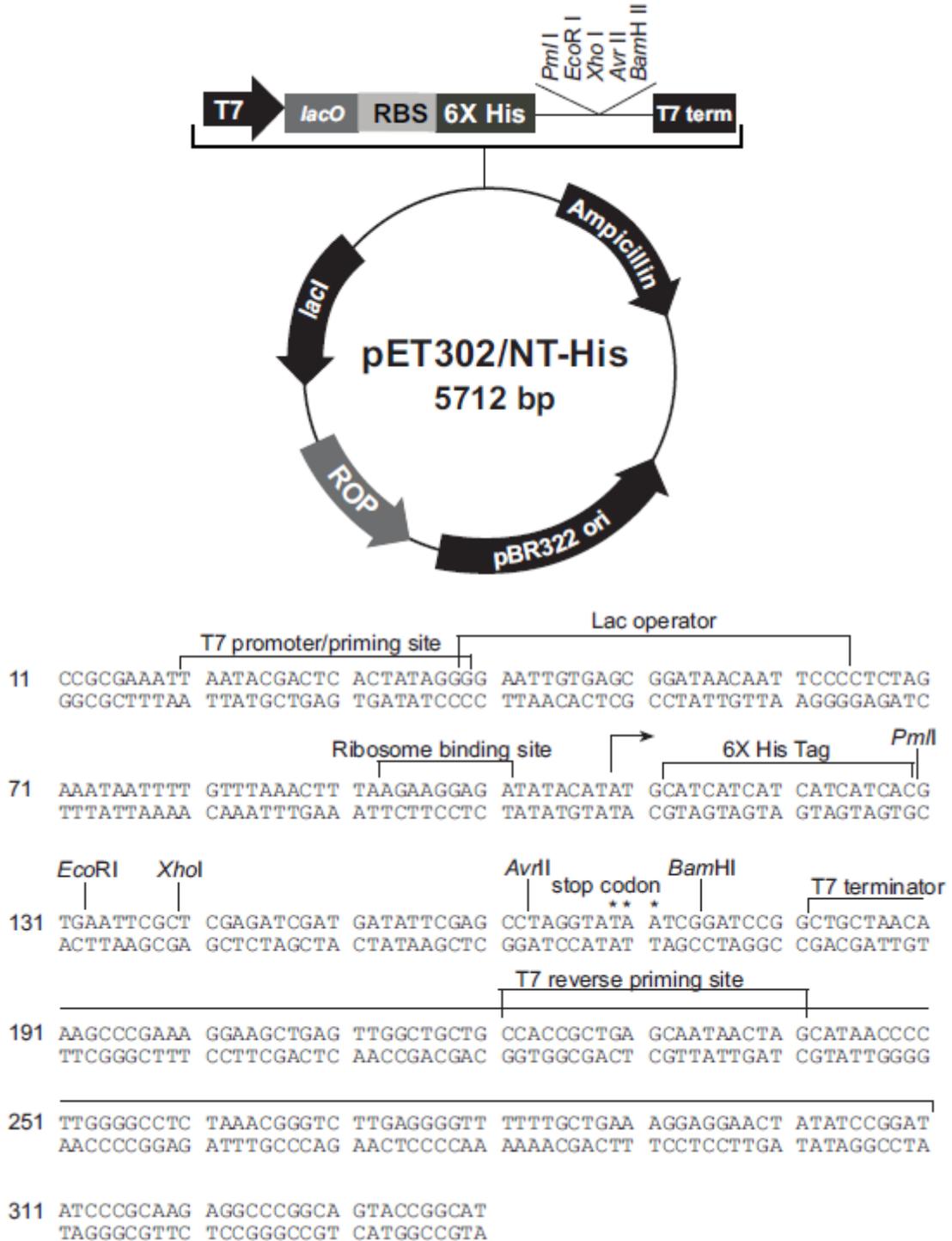
Anexo A. Vetor de expressão de *Escherichia coli*

Diagrama do vetor de expressão pET302/NT-His com indicação das posições dos sítios de restrição e detalhamento do sítio múltiplo de clonagem.

Anexo B. Vetor de expressão em *Pichia pastoris*

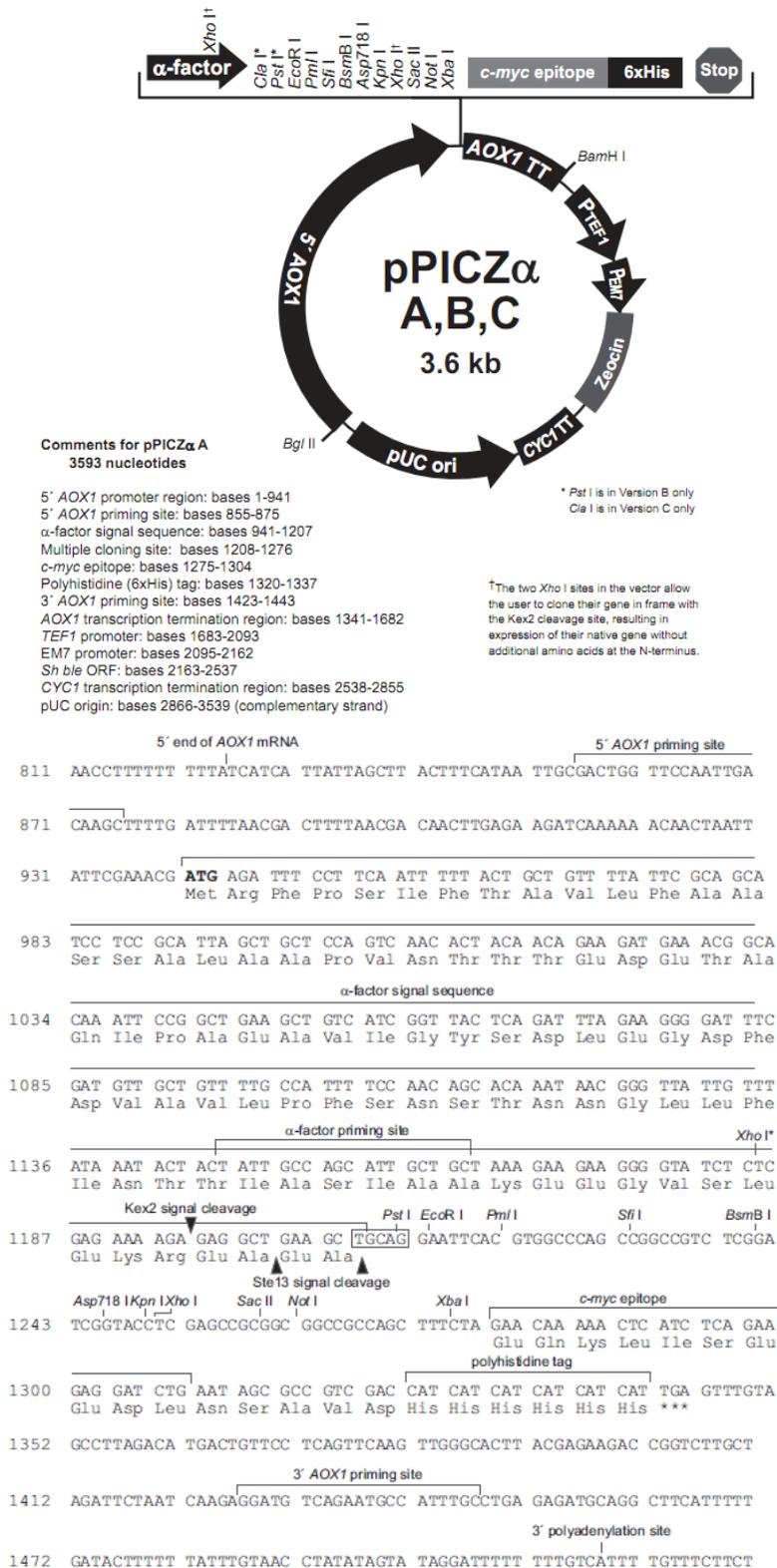


Diagrama do vetor de expressão pPICZαA, com indicação das posições dos sítios de restrição e detalhamento do sítio múltiplo de clonagem.

Anexo C. Sequência de nucleotídeos completa da ORF CV1897

```
CTATTTGAGCTTGACGCCCCAGTTGTCCTCGACGCAGCGCTGGTAGTTGCCTGCCTGCAAGGCGCTGTAC
GGCGTCTGGTAGCTGACCAGCTGGCACTGGTAGTCGTGCTGCCACTGCCAGTCCTTTTCCAGTAGATGT
TGTAGGCGGGCGGAGCTGGCCGAGGTGAAGCGCTGCATATTGGCGCAGGACAGCTGCTCGCCGCCGTAGTC
CCAGCCCAGGTCATGGGCGAACTGCTTGTAGTAGTCGATGCGGTTTTTGCGCCGCCCTGGCGCTCGGTGCCG
CCGCCGCATTCGCCGTTGATGATCTGGATGGTGGTGGCGAAGTTGTTGCCGGCGCCGGCCGCCCTTGTCCG
CGGCGTTGGGCACCCAGGTGCCATCAATCACATGCAGCATGGATGGCTTGGGCGGGCTGCCGATAGACGAA
GAAGAAGGTGGCGGAGGCGAGGTTGAGCCAGGTGCTGGCCACCAGGTCCGGGTTTTGCAGCAGCACCCGAC
TGGTCGCCGTTGTTTCATCGCCTGCGAGAACGGACCGTAGTTGTAGTTGTACGACAGCTGCTTGGCGCCGC
GGCCGTAGTATTTCTTCCAGCTGCCGTCGGGGTTCTTGCCGCAGGTCCATACCTTGTGAACACCCGGATC
GTTGCACTCGGTGTTGTAACCGCAGGCGCTGCCGCTGTCGGCGCAGCCCATCTCGCGCAGGTAGGCCAGG
CCCTGCCGCCATTGCGGCACGGTGTGCTGCGTGGCGTGGTGGTGGCGGTTTTCTGGCCGAAGTGGGCGAACA
TGGTGGCGAGGCTATGGCGGCAGATGGCATCGGCGTGGCGGCCGTCGCCGTAGTCGTGCGAGACGCCGGG
GAATTTGGCCACCGCCTGCAGGAAGCGGGTGTAGGTGTAGCTGGCGTGGCGGGGCTGAAGTAATAGTCC
CATTTGGCCGACGGCAGCAGCCGCTCGACGCGGGCGCACGTTGACCGGATTGGCGGGCGGGCCCGGGGCCA
CCTGTTCCACCTGCTCGTTGGACAGCGTGGGATGGAAGCCTTACCTTGGCGGAAGAAGTCGTTGTTGGT
CAGCTCGGCCTCGTGTGCAAGGCCTGTTGCAGCGTGGGACCGGGGGCGGGCGTCCAGCTTGCGC
ATGGCGCCATCGACATGGGCGATCCAGGAGCCCTTGGGATTGGCTCCCGGCGTTTTCGCCGCGGGTGGGCC
ACTTGGCTTGCAGTCGCGGCCCTGCCACTGCACTGTCTGGCCCTTCTGATAGATGGCGCGGGCTTGCCA
TGGCGCGGCCAGGGCGGGGAGCGGCAACAGGGACAGGATGATGAAGGCTGACAGTTTCAT
```

Anexo D. Sequência de nucleotídeos, sem a região codificadora do putativo peptídeo sinal, da ORF CV1897

```
CTGCAAGGCGCTGTACGGCGTCTGGTAGCTGACCAGCTGGCACTGGTAGTCGTGCTGCCACTGCCAGTCC
TTTTCCCAGTAGATGTTGTAGGCGGGCGAGCTGGCCGAGGTGAAGCGCTGCATATTGGCGCAGGACAGCT
GCTCGCCGCCGTAGTCCCAGCCCAGGTCATGGGCGAACTGCTTGTAGTAGTCGATGCGGTTTTTGCGCCGC
CTGGCGCTCGGTGCCGCCGCCGATTCGCCGTTGATGATCTGGATGGTGGTGGCGAAGTTGTTGCCGGCG
CCGGCCGCTTGTCCGCGGGCGTTGGGCACCCAGGTGCCATCAATCACATGCAGCATGGATGGCTTGGGCG
GCTGCGGATAGACGAAGAAGAAGGTGGCGGAGGGCAGGTTGAGCCAGGTGCTGGCCACCAGGTCCGGGTT
TTGCAGCAGCACCGACTGGTCGCCGTTGTTTCATCGCCTGCGAGAACGGACCAGTGTAGTTGTAGTTGTACGAC
AGCTGCTTGGCGCCGCGGCCGTAGTATTTCTTCCAGCTGCCGTCGGGGTTCTTGCCGCAGGTCCATACCT
TGTTGAACACCGGATCGTTGCACTCGGTGTTGTAACCGCAGGCGCTGCCGCTGTCGGCGCAGCCCATCTC
GCGCAGGTAGGCCAGGCCCTGCCGCCATTGCCGGCACGGTGTGCTGGCGTCGTGGTTGCCGGTTTTCTTG
CCGAAGTGGGCGAACATGGTGGCGAGGCTATGGCGGCAGATGGCATCGGCGTCGCGGCCGTCGCCGTAGT
CGTCGCAGACGCCGGGAATTTGGCCACCGCCTGCAGGAAGCGGGTGTAGGTGTAGCTGGCGTCGCGGGC
GCTGAAGTAATAGTCCCATTTGGCCGACGGCAGCAGCCGCTCGACGCGGCGCACGTTGACCGGATTGGCG
GCGCGGCCCGGGGCCACCTGTTCCACCTGCTCGTTGGACAGCGTGCAGGATGGAAGCCTTCACCTTGCAGGA
AGAAGTCGTTGTTGGTCAGCTCGGCCCTCGTGCTGCAAGGCCGTGTTGCAGCGTCGGGACCGGGGGCGCGGC
GTCATCCAGCTTGCATGCGCATGGCGCCATCGACATGGGCGATCCAGGAGCCCTTGGGATTGGCTCCCGGCGTT
TCGCCGCGGGTGGGCCACTTGGCTTGCCAGTCGCGGCCCTGCCACTGCACTGTCTGGCCCTTCTGATAGA
TGGCGCGGGCTTGCCATGGCGCGGCCAGGGCGGGGAGCGGCAACAGGGACAGGATGATGAAGGCTGACAG
TTTCAT
```

Anexo E. Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos

1. **2xYT:**

triptona 1,6%
extrato de levedura 1%
NaCl 0,5%
pH 7,0

2. **GYT:**

glicerol 10%
extrato de levedura 0,125%
triptona 0,25%
pH 7,0

3. **SOC:**

triptona 2%
extrato de levedura 0,5%
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM
MgCl₂ 10 mM
glucose 20 mM
pH 7,0

4. **LB**

triptona 1%
NaCl 1%
extrato de levedura 0,5%
pH 7,0

5. **LB ágar**

triptona 1%
NaCl 1%
extrato de levedura 0,5%
ágar 1,6%
pH 7,0

6. **LB low salt ágar:**

triptona 1%
NaCl 0,5%
extrato de levedura 0,5%
ágar 2%
pH 7,0

7. YPD:

extrato de levedura 1%
peptona 2%
glucose 2%

8. YPDS-ágar:

extrato de levedura 1%
peptona 2%
sorbitol 18,2%
glucose 2%
ágar 2%

9. BMGY:

extrato de levedura 1%
peptona 2%
YNB 1,34%
glicerol 1%
biotina 0,00004%

10. BMMY:

extrato de levedura 1%
peptona 2%
YNB 1,34%
metanol 0,5%
biotina 0,00004%

Anexo F. Preparação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli*

Células eletrocompetentes foram preparadas de acordo com o protocolo fornecido pelo prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro – UNESP/Jaboticabal. Uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 10 mL de meio 2xYT contendo estreptomicina 30 µg/mL e incubada à 37°C por 16 h sob agitação orbital constante de 180 rpm. Da cultura obtida, uma alíquota de 5 mL foi inoculada em 500 mL de meio 2xYT estéril, e novamente incubada nas condições anteriormente descritas, até que a densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) da mesma atingisse um valor entre 0,4 - 0,6. A cultura foi mantida em banho de gelo por 30 min e posteriormente centrifugada a 3.200 g, 4°C, por 15 min em uma centrífuga de bancada Eppendorf 5810R. As células foram lavadas duas vezes com glicerol 10% gelado e estéril e então ressuspensas em meio GYT. Alíquotas de 50 µL foram distribuídas em microtubos estéreis que foram armazenados a -80°C para uso posterior.

Anexo G. Preparação de células eletrocompetentes de *Pichia pastoris*

Uma alíquota de uma cultura-estoque de *Pichia pastoris* mantida a -80 °C, foi inoculada em meio YPD ágar e incubada a 30 °C por 4-5 dias. Uma colônia isolada foi então selecionada e inoculada em 5 mL de meio YPD e a mesma incubada a 30 °C com agitação orbital (180 rpm) por 18 h. Uma alíquota (0,5 mL) da cultura obtida foi transferida para 50 mL de meio YPD fresco, e incubada a 30 °C, 200 rpm, até que uma DO₆₀₀ de 1,3 – 1,5 fosse atingida. Nesse instante, a cultura foi centrifugada a 2.000 x g, por 5 min, a 4 °C, o meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas em 12 mL de meio YPD com HEPES (10 mL de YPD, 2 mL de tampão HEPES 1 M, pH 8,0, DTT 0,02 M). As células foram lavadas duas vezes com água milliQ estéril e uma vez com sorbitol 1 M gelado. As células foram coletadas por centrifugação (2.000 x g, por 5 min, a 4 °C) e o pélete ressuspendido em 1 mL de sorbitol 1 M gelado. Alíquotas de 80 µL dessa suspensão foram armazenadas à -80 °C para uso posterior.

Anexo H. Extração de DNA genômico de *P. pastoris*

A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de Warner (1996). Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio YPD, contendo zeocina 500 µg/mL, e incubada a 30 °C, por 16 h, a 200 rpm. Desta cultura, uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para microtubo e centrifugada a 12.000 x g, por 3 min, a 25 °C. O meio de cultura foi descartado e as células lavadas com 800 µL de água ultrapura estéril. As células foram novamente coletadas por centrifugação a 13.000 x g, por 3 min, a 25 °C, e resuspensas em 600 µL de tampão CTAB 2x (Tris-HCl 100 mM pH 8; CTAB 2%; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M), contendo β-mercaptoetanol 0,2% (v/v), pré-aquecido a 60 °C. A suspensão foi incubada a 60 °C por aproximadamente 16 h. Após essa etapa, um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) foi adicionado e o material foi centrifugado por 30 min a 13.000 x g, a 25 °C. A fase aquosa (superior) foi recuperada e transferida para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 2/3 do volume de isopropanol 100%, para precipitação dos ácidos nucléicos. O material foi incubado a 4 °C por 1 h e, em seguida, centrifugado por 5 min a 13.000 x g, a 25 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e coletado novamente por centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e, após evaporação do etanol, o precipitado foi ressuspense em 50 µL de água ultrapura estéril contendo RNase A (20 µg/mL).

Anexo I. Peptídeos da proteína rCV1897_{PS+} de *Chromobacterium violaceum* identificados por Espectrometria de massa

Nº	Precursor MH+ (Da)	z	Peptide MH+ (Da)	MH+ Error (Da)	Sequence	Modifications
1	370,2061	1,0	370,2085	-0,0024	(R)QGLA(Y)	
2	386,1988	1,0	386,2034	-0,0046	(K)GQTV(Q)	
3	402,231	1,0	402,2347	-0,0037	(L)PSAK(W)	
4	409,2151	1,0	409,2194	-0,0043	(Y)FSR(R)	
5	437,1667	1,0	437,1667	0,0	(R)DASY(T)	
6	438,2293	1,0	438,2347	-0,0054	(I)YQK(G)	
7	439,2246	1,0	439,23	-0,0054	(T)YTR(F)	
8	444,2208	1,0	444,2241	-0,0033	(K)GSWI(A)	
9	465,1724	1,0	465,1769	-0,0045	(K)WDY(Y)	
10	465,2114	1,0	465,2126	-0,0012	(W)TCGK(N)	Carbamidomethyl C (2)
11	477,2443	1,0	477,2456	-0,0013	(D)GSWK(K)	
12	486,216	1,0	486,2195	-0,0035	(R)DADAI(C)	
13	487,2951	1,0	487,2987	-0,0036	(P)VNVR(R)	
14	515,3128	1,0	515,3188	-0,0060	(L)LPSAK(W)	
15	532,2823	1,0	532,2878	-0,0055	(D)WQAK(W)	
16	538,2136	1,0	538,2144	-8,0E-4	(R)DASYT(Y)	
17	540,2722	1,18	540,2776	-0,0054	(Y)TYTR(F)	
18	549,2414	1,0	549,245	-0,0036	(V)DGAMR(K)	
19	559,2935	1,53	559,2947	-0,0012	(Q)AAQNR(I)	
20	565,2413	1,0	565,2399	0,0014	(V)DGAMR(K)	Oxidation M (4)
21	567,2936	1,0	567,2885	0,0051	(R)AANPVN(V)	
22	572,2799	1,0	572,2827	-0,0028	(Y)YFSR(R)	
23	583,3148	1,37	583,3198	-0,0050	(T)PGANPK(G)	
24	586,3032	1,41	586,3096	-0,0064	(V)PQWR(Q)	
25	622,353	1,0	622,3559	-0,0029	(R)AIYQK(G)	
26	628,3987	1,49	628,4028	-0,0041	(R)LLPSAK(W)	
27	635,3801	1,47	635,3875	-0,0074	(G)LAYLR(E)	
28	647,3091	1,56	647,3148	-0,0057	(R)DWQAK(W)	
29	664,3017	1,46	664,3083	-0,0066	(H)VDGAMR(K)	Oxidation M (5)
30	674,3315	1,0	674,3369	-0,0054	(V)QWQGR(D)	
31	683,337	2,0	683,3399	-0,0029	(R)IDYYK(Q)	
32	687,3166	1,0	687,3533	-0,0367	(R)QAAQNR(I)	
33	694,3103	1,56	694,3155	-0,0052	(R)RDASYT(Y)	
34	701,3434	1,64	701,3505	-0,0071	(R)IDYYK(Q)	
35	735,3375	1,04	735,3461	-0,0086	(D)YYFSR(R)	
36	750,3542	1,8	750,3604	-0,0062	(K)VWTCGK(N)	Carbamidomethyl C (4)
37	773,4025	1,0	773,4053	-0,0028	(T)VQWQGR(D)	
38	776,4364	1,91	776,4665	-0,0301	(R)FLQAVAK(F)	
39	785,364	1,86	785,3723	-0,0083	(A)HVDGAMR(K)	
40	786,3415	2,0	786,3417	-2,0E-4	(K)NPDGSWK(K)	
41	803,3626	1,74	803,3682	-0,0056	(K)NPDGSWK(K)	

42	820,3593	1,7	820,3618	-0,0025	(R)DADAICR(H)	Carbamidomethyl C (6)
43	820,4651	1,0	820,4676	-0,0025	(R)QGLAYLR(E)	
44	828,3953	1,0	828,3999	-0,0046	(K)GQTVQWQ(G)	
45	840,4653	1,0	840,4686	-0,0033	(R)AANPVNVR(R)	
46	850,3706	1,0	850,373	-0,0024	(W)DYFYSR(R)	
47	852,4133	2,0	852,421	-0,0077	(R)GETPGANPK(G)	
48	870,4277	2,0	870,4316	-0,0039	(R)GETPGANPK(G)	
49	885,4066	1,0	885,4213	-0,0147	(K)GQTVQWQG(R)	
50	931,4577	2,0	931,4632	-0,0055	(K)NPDGSWKK(Y)	
51	958,4229	2,0	958,4265	-0,0036	(R)DASYTYTR(F)	
52	960,4015	1,0	960,388	0,0135	(R)CVEDNWGV(K)	Carbamidomethyl C (1)
53	969,4873	2,0	969,4935	-0,0062	(W)IAHVDGAMR(K)	
54	976,4343	1,91	976,4371	-0,0028	(R)DASYTYTR(F)	
55	1036,4434	1,79	1036,4523	-0,0090	(K)WDYFYSR(R)	
56	1059,5195	1,93	1059,533	-0,0135	(K)GQTVQWQGR(D)	
57	1088,4753	2,0	1088,483	-0,0077	(R)CVEDNWGVK(L)	Carbamidomethyl C (1)
58	1106,4869	1,95	1106,4937	-0,0067	(R)CVEDNWGVK(L)	Carbamidomethyl C (1)
59	1114,5194	3,0	1114,5276	-0,0082	(R)RDASYTYTR(F)	
60	1122,498	2,0	1122,4885	0,0096	(T)ECNDPVFNK(V)	Carbamidomethyl C (2)
61	1132,5328	1,98	1132,5382	-0,0054	(R)RDASYTYTR(F)	
62	1155,5684	2,33	1155,5728	-0,0045	(S)WIAHVDGAMR(K)	
63	1242,597	2,72	1242,6049	-0,0078	(G)SWIAHVDGAMR(K)	
64	1258,5927	2,79	1258,5997	-0,0071	(G)SWIAHVDGAMR(K)	Oxidation M (10)
65	1297,6012	3,0	1297,6106	-0,0094	(K)GSWIAHVDGAMR(K)	Oxidation M (11)
66	1299,628	2,45	1299,6263	0,0017	(K)GSWIAHVDGAMR(K)	
67	1315,6239	2,46	1315,6212	0,0027	(K)GSWIAHVDGAMR(K)	Oxidation M (11)
68	1327,5717	2,74	1327,5787	-0,0071	(L)NSAVDHHHHHH(-)	
69	1357,5319	1,94	1357,5479	-0,016	(K)FPGVCDDYGDGR(D)	Carbamidomethyl C (5)
70	1410,7056	2,87	1410,7124	-0,0068	(K)WPTRGETPGANPK(G)	
71	1527,754	2,0	1527,7762	-0,0222	(R)TLSNEQVEQVAPGR(A)	
72	1645,8542	2,0	1645,8373	0,0169	(R)LLPSAKWDYFYSR(R)	
73	1737,8077	1,99	1737,8119	-0,0041	(R)FTSASSAAYNIYWEK(D)	
74	1813,8002	2,92	1813,7749	0,0253	(S)EEDLNSAVDHHHHHH(-)	
75	2114,999	2,83	2114,9963	0,0026	(R)FLQAVAKFPGVCDDYGDGR(D)	Carbamidomethyl C (12)
76	2126,9612	3,85	2126,975	-0,0138	(K)LISEEDLNSAVDHHHHHH(-)	
77	2158,891	2,89	2158,8918	-8,0E-4	(K)FPGVCDDYGDGRDADAICR(H)	Carbamidomethyl C (5), Carbamidomethyl C (18)
78	2254,9722	3,0	2254,957	0,0151	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASD(T)	
79	2356,0244	3,0	2356,0046	0,0198	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDT(V)	
80	2455,069	3,63	2455,073	-0,0041	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDTV(P)	
81	2471,0627	3,66	2471,068	-0,0052	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDTV(P)	Oxidation M (6)
82	2479,162	2,41	2479,163	-0,0011	(K)AAGAGNNFATTIQIINGECG GGTER(Q)	Carbamidomethyl C (19)
83	2583,123	2,76	2583,114	0,0091	(K)QFAHDLGWDYGGEQLSCA NMQR(F)	Carbamidomethyl C (17)

84	2599,1206	2,8	2599,109	0,0118	(K)QFAHDLGWYGGGQQLSCA NMQR(F)	Carbamidomethyl C (17), Oxidation M (20)
85	2683,0217	2,23	2683,0166	0,0053	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVFNK(V)	Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
86	2699,0237	2,38	2699,0115	0,0122	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVFNK(V)	Oxidation M (2), Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
87	2957,4314	3,0	2957,4639	-0,0325	(R)KLDDAAPVPTLQQALQHE AELTNND(F)	
88	3040,3818	2,92	3040,3755	0,0064	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDTPQWR(Q)	
89	3056,379	3,88	3056,3704	0,0085	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDTPQWR(Q)	Oxidation M (6)
90	3147,4824	3,0	3147,4985	-0,016	(K)AAGAGNNFATTIQIINGECG GGTERQAAQNR(I)	Carbamidomethyl C (19)
91	3150,5735	2,95	3150,549	0,0245	(K)LDDAAPVPTLQQALQHEA ELTNNDFFR(K)	
92	3278,656	4,0	3278,644	0,0119	(R)KLDDAAPVPTLQQALQHE AELTNNDFFR(K)	
93	3278,6597	5,0	3278,644	0,0157	(K)LDDAAPVPTLQQALQHEA ELTNNDFFR(K)	
94	3430,382	3,53	3430,354	0,0281	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVFNKVWTCGK(N)	Oxidation M (2), Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17), Carbamidomethyl C (28)
95	3633,6482	2,96	3633,624	0,024	(K)DWQWQHDIYQCQLVSYQT PYSALQAGNYQR(C)	Carbamidomethyl C (10)
96	3841,6838	4,53	3841,7195	-0,0355	(R)DADAICRHSLATMFAHFGQ ETGNHDASDTPQWR(Q)	Carbamidomethyl C (6)
97	5352,4263	3,95	5352,418	0,0082	(R)FTSASSAAYNIYWEKDWQ WQHDIYQCQLVSYQT PYSALQAGNYQR(C)	Carbamidomethyl C (25)
98	1737,8048	2,0	1737,7902	0,0146	(K)VWTCGKNPDGSWK(K)	Carbamidomethyl C (4), O-GlcNac ST (11)

Anexo J. Peptídeos da proteína rCV1897_{ps} de *Chromobacterium violaceum* identificados por Espectrometria de massa

Nº	Precursor MH+ (Da)	z	Peptide MH+ (Da)	MH+ Error (Da)	Sequence	Modifications
1	2683,018	2,41	2683,0166	0,0015	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVFNK(V)	Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
2	3040,3862	2,95	3040,3755	0,0107	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDTPQWR(Q)	
3	3633,6448	3,06	3633,624	0,0207	(K)DWQWQHHDYQCQLVSYQT PYSALQAGNYQR(C)	Carbamidomethyl C (10)
4	2158,91	2,89	2158,8918	0,018	(K)FPGVCDDYGDGRDADAICR (H)	Carbamidomethyl C (5), Carbamidomethyl C (18)
5	1059,5333	1,94	1059,533	3,0E-4	(K)GQTVQWQGR(D)	
6	2699,0254	2,6	2699,0115	0,0139	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVFNK(V)	Oxidation M (2), Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
7	1132,5367	2,05	1132,5382	-0,0014	(R)RDASYTYTR(F)	
8	3278,611	4,0	3278,644	-0,0329	(R)KLDDAAPPVPTLQQALQHE AELTNNDFFR(K)	
9	1410,7155	2,77	1410,7124	0,0030	(K)WPTRGETPGANPK(G)	
10	1106,4966	1,96	1106,4937	0,0030	(R)CVEDNWGVK(L)	Carbamidomethyl C (1)
11	1315,622	2,3	1315,6212	7,0E-4	(K)GSWIAHVDGAMR(K)	Oxidation M (11)
12	840,4679	1,86	840,4686	-7,0E-4	(R)AANPVNVR(R)	
13	976,4393	1,75	976,4371	0,0022	(R)DASYTYTR(F)	
14	1299,634	2,44	1299,6263	0,0077	(K)GSWIAHVDGAMR(K)	
15	1036,4531	1,89	1036,4523	8,0E-4	(K)WDYYFSR(R)	
16	7687,6084	4,94	7687,7407	-0,132	(K)QLSYNYNGPFSQAMNNG DQSVLLQNPDLVASTWLNLAS ATFFFVYPQPPKPSMLHVIDGT WVPNAADK(A)	
17	3056,346	4,04	3056,3704	-0,0244	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDTPQWR(Q)	Oxidation M (6)
18	701,352	1,38	701,3505	0,0015	(R)IDYYK(Q)	
19	750,363	1,62	750,3604	0,0026	(K)VWTCGK(N)	Carbamidomethyl C (4)
20	931,4621	2,0	931,4632	-0,0011	(K)NPDGSWKK(Y)	
21	628,4042	1,34	628,4028	0,0014	(R)LLPSAK(W)	
22	820,4666	1,76	820,4676	-0,0010	(R)QGLAYLR(E)	
23	2599,1174	2,92	2599,109	0,0085	(K)QFAHDLGWYDYGGEQLSCA NMQR(F)	Carbamidomethyl C (17), Oxidation M (20)
24	3649,641	3,16	3649,6138	0,0273	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDTPQWR(Q)	O-GlcNac ST (5), O-GlcNac ST (14), O-GlcNac ST (20)

25	1737,8265	2,0	1737,8119	0,0146	(R)FTSASSAAYNIYWEK(D)	
26	3414,3772	2,96	3414,359	0,0183	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVFNKVVWTCGK(N)	Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17), Carbamidomethyl C (28)
27	2583,126	3,0	2583,114	0,0119	(K)QFAHDLGWYDYGGEQLSCA NMQR(F)	Carbamidomethyl C (17)
28	1534,7137	2,81	1534,7108	0,0030	(K)VWTCGKNPDGSWK(K)	Carbamidomethyl C (4)
29	1357,5458	1,0	1357,5479	-0,0020	(K)FPGVCCDDYGDGR(D)	Carbamidomethyl C (5)
30	3084,3918	4,47	1687,83	0,0127	(K)GQTVQWQGRDWQAK(W)	O-Glycosylation (3)
31	5352,433	5,0	5352,418	0,0149	(R)FTSASSAAYNIYWEKDWQ WQHDYQCQLVSYQTPYSALQ AGNYQR(C)	Carbamidomethyl C (25)
32	3150,524	2,0	3150,549	-0,0252	(K)LDDAAPPVPTLQQALQHEA ELTNNDFFR(K)	
33	2479,1602	2,0	2479,163	-0,0030	(K)AAGAGNNFATTIQIINGECG GGTER(Q)	Carbamidomethyl C (19)
34	2115,0068	2,88	2114,9963	0,0104	(R)FLQAVAKFPGVCCDDYGDGR (D)	Carbamidomethyl C (12)
35	3278,6562	3,0	3278,644	0,0122	(K)LDDAAPPVPTLQQALQHEA ELTNNDFFR(K)	
36	1527,7775	3,0	1527,7762	0,0013	(R)TLSNEQVEQVAPGR(A)	
37	2598,129	2,91	1534,7108	0,0112	(K)VWTCGKNPDGSWK(K)	Carbamidomethyl C (4), O-Glycosylation (3)
38	3047,0369	4,0	803,3682	-0,0039	(K)NPDGSWK(K)	O-Glycosylation (5)
39	514,2629	1,0	514,262	9,0E-4	(K)GQTVQ(W)	
40	828,4004	1,0	828,3999	5,0E-4	(K)GQTVQWQ(G)	
41	885,4246	1,0	885,4213	0,0033	(K)GQTVQWQ(R)	
42	1041,5184	2,0	1041,5225	-0,0041	(K)GQTVQWQGR(D)	
43	1002,5067	2,0	1002,5116	-0,0049	(G)QTVQWQGR(D)	
44	874,454	1,25	874,453	0,0010	(Q)TVQWQGR(D)	
45	773,4061	1,0	773,4053	8,0E-4	(T)VQWQGR(D)	
46	674,3396	1,01	674,3369	0,0027	(V)QWQGR(D)	
47	360,2005	1,0	360,199	0,0015	(W)QGR(D)	
48	828,4007	1,73	828,3999	8,0E-4	(K)WPTRGET(P)	
49	1393,6901	3,0	1393,6859	0,0042	(K)WPTRGETPGANPK(G)	
50	1224,6357	2,04	1224,633	0,0026	(W)PTRGETPGANPK(G)	
51	1127,5795	2,0	1127,5804	-9,0E-4	(P)TRGETPGANPK(G)	
52	444,2278	1,0	444,2241	0,0037	(K)GSWI(A)	
53	1281,6161	3,0	1281,6157	4,0E-4	(K)GSWIAHVDGAMR(K)	
54	1297,6104	3,0	1297,6106	-3,0E-4	(K)GSWIAHVDGAMR(K)	Oxidation M (11)
55	1242,6074	2,71	1242,6049	0,0026	(G)SWIAHVDGAMR(K)	
56	1258,5999	2,75	1258,5997	1,0E-4	(G)SWIAHVDGAMR(K)	Oxidation M (10)
57	1155,5747	2,18	1155,5728	0,0019	(S)WIAHVDGAMR(K)	
58	1171,573	2,24	1171,5677	0,0053	(S)WIAHVDGAMR(K)	Oxidation M (9)
59	969,4921	2,0	969,4935	-0,0014	(W)IAHVDGAMR(K)	
60	985,4884	2,0	985,4884	0,0	(W)IAHVDGAMR(K)	Oxidation M (8)
61	872,4063	1,98	872,4043	0,0020	(I)AHVDGAMR(K)	Oxidation M (7)
62	801,3672	1,88	801,3672	0,0	(A)HVDGAMR(K)	Oxidation M (6)

63	648,3141	1,0	648,3134	7,0E-4	(H)VDGAMR(K)	
64	664,3073	1,0	664,3083	-0,0010	(H)VDGAMR(K)	Oxidation M (5)
65	549,2464	1,0	549,245	0,0014	(V)DGAMR(K)	
66	565,245	1,0	565,2399	0,0051	(V)DGAMR(K)	Oxidation M (4)
67	450,2125	1,0	450,2129	-4,0E-4	(D)GAMR(K)	Oxidation M (3)
68	913,4218	1,3	913,4163	0,0055	(L)TNNDFFR(K)	
69	812,3671	1,0	812,3686	-0,0015	(T)NNDFFR(K)	
70	545,263	1,0	545,2566	0,0064	(R)TLSNE(Q)	
71	673,318	1,0	673,3151	0,0029	(R)TLSNEQ(V)	
72	901,4297	1,65	901,4262	0,0035	(R)TLSNEQVE(Q)	
73	1296,6276	2,0	1296,643	-0,0154	(R)TLSNEQVEQVAP(G)	
74	627,3606	1,0	627,3573	0,0033	(E)QVAPGR(A)	
75	823,4438	2,0	823,4421	0,0017	(R)AANPVNVR(R)	
76	769,4333	1,47	769,4315	0,0018	(A)ANPVNVR(R)	
77	698,3953	1,37	698,3944	9,0E-4	(A)NPVNVR(R)	
78	584,3534	1,01	584,3515	0,0019	(N)PVNVR(R)	
79	487,3033	1,0	487,2987	0,0046	(P)VNVR(R)	
80	388,2312	1,0	388,2303	9,0E-4	(V)NVR(R)	
81	515,3227	1,0	515,3188	0,0039	(L)LPSAK(W)	
82	402,2359	1,0	402,2347	0,0012	(L)PSAK(W)	
83	465,1783	1,0	465,1769	0,0014	(K)WDY(Y)	
84	628,2455	1,0	628,2402	0,0053	(K)WDYY(F)	
85	850,3737	1,0	850,373	7,0E-4	(W)DYFSR(R)	
86	735,3482	1,01	735,3461	0,0021	(D)YYFSR(R)	
87	572,2865	1,0	572,2827	0,0038	(Y)YFSR(R)	
88	4092206	1,0	409,2194	0,0012	(Y)FSR(R)	
89	430,2056	1,0	430,2045	0,0011	(R)RDAS(Y)	
90	593,2682	1,0	593,2678	4,0E-4	(R)RDASY(T)	
91	1114,5305	3,0	1114,5276	0,0029	(R)RDASYTYTR(F)	
92	437,169	1,0	437,1667	0,0023	(R)DASY(T)	
93	538,2172	1,0	538,2144	0,0028	(R)DASYT(Y)	
94	701,2766	1,0	701,2777	-0,0011	(R)DASYTY(T)	
95	802,3352	1,0	802,3254	0,0098	(R)DASYTYT(R)	
96	958,4276	2,0	958,4265	0,0011	(R)DASYTYTR(F)	
97	861,4132	1,88	861,4101	0,0031	(D)ASYTYTR(F)	
98	790,3737	1,14	790,373	7,0E-4	(A)SYTYTR(F)	
99	703,3407	1,03	703,341	-3,0E-4	(S)YTYTR(F)	
100	540,2793	1,0	540,2776	0,0017	(Y)TYTR(F)	
101	439,2327	1,0	439,23	0,0027	(T)YTR(F)	
102	2139,9226	3,0	2139,9302	-0,0076	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD AS(D)	
103	2270,9485	3,0	2270,952	-0,0034	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASD(T)	Oxidation M (6)
104	2372,0183	3,07	2371,9995	0,0187	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD ASDT(V)	Oxidation M (6)
105	2471,079	3,38	2471,068	0,0111	(R)HSLATMFAHFGQETGNHD	Oxidation M (6)

					ASDTV(P)	
106	3312,4272	3,0	3312,4387	-0,0115	(L)ATMFAHFGQETGNHDASD TVPQWR(Q)	O-GlcNac ST (2), O-GlcNac ST (11), O-GlcNac ST (17)
107	586,3067	1,0	586,3096	-0,0029	(V)PQWR(Q)	
108	2291,8054	2,0	2291,7944	0,0109	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPV(F)	Oxidation M (2), Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
109	2422,8755	2,0	2422,868	0,0075	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVF(N)	Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
110	2438,8567	2,0	2438,8628	-0,0061	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVF(N)	Oxidation M (2), Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
111	2681,0098	3,0	2681,0007	0,0089	(R)EMGCADSGSACGYNTECN DPVFNK(V)	Oxidation M (2), Carbamidomethyl C (4), Carbamidomethyl C (11), Carbamidomethyl C (17)
112	732,3525	2,0	732,3498	0,0027	(K)VWTCGK(N)	Carbamidomethyl C (4)
113	1516,7064	3,0	1516,7002	0,0062	(K)VWTCGKNPDGSWK(K)	Carbamidomethyl C (4)
114	651,2941	1,0	651,2919	0,0022	(V)WTCGK(N)	Carbamidomethyl C (3)
115	1435,6348	2,12	1435,6423	-0,0075	(V)WTCGKNPDGSWK(K)	Carbamidomethyl C (3)
116	465,2148	1,0	465,2126	0,0022	(W)TCGK(N)	Carbamidomethyl C (2)
117	1249,5664	2,0	1249,563	0,0034	(W)TCGKNPDGSWK(K)	Carbamidomethyl C (2)
118	914,4388	2,0	914,4367	0,0021	(K)NPDGSWK(K)(Y)	
119	392,1856	1,0	392,1816	0,0040	(R)IDY(Y)	
120	588,2705	1,0	588,2664	0,0041	(I)DYK(Q)	
121	2997,346	3,0	2997,3262	0,0199	(K)DWQWQHHDYQCQLVSYQT PYSALQA(G)	Carbamidomethyl C (10)
122	389,1507	1,0	389,149	0,0017	(R)CVE(D)	Carbamidomethyl C (1)
123	960,3924	1,0	960,388	0,0044	(R)CVEDNWGV(K)	Carbamidomethyl C (1)
124	1088,4802	2,0	1088,483	-0,0028	(R)CVEDNWGVK(L)	Carbamidomethyl C (1)
125	946,4709	1,0	946,4629	0,0080	(C)VEDNWGVK(L)	
126	718,3515	1,0	718,3519	-4,0E-4	(E)DNWGVK(L)	
127	489,2867	1,0	489,282	0,0047	(N)WGVK(L)	
128	386,2035	1,0	386,2034	1,0E-4	(K)GQTV(Q)	
129	1404,6566	1,96	1404,6543	0,0023	(-)EAEAEFAPWQAR(A)	
130	2007,9991	2,94	2007,9923	0,0068	(-)EAEAEFAPWQARAIYQK(G)	
131	2126,9897	2,99	2126,975	0,0146	(K)LISEEDLNSAVDHHHHHH(-)	
132	857,5463	1,99	857,5455	8,0E-4	(K)LKVLEQK(L)	
133	616,3709	1,0	616,3665	0,0044	(K)VLEQK(L)	