



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

**BRUNO ROBERTO DA SILVA QUEIROZ**

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA MONOOXIGENASE LÍTICA DE  
POLISSACARÍDEO RECOMBINANTE DE *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*  
QUE APRESENTA ATIVIDADE INIBITÓRIA CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA***

**FORTALEZA**

**2022**

BRUNO ROBERTO DA SILVA QUEIROZ

CARACTERIZAÇÃO DE UMA MONOOXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEO  
RECOMBINANTE DE *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM* QUE APRESENTA  
ATIVIDADE INIBITÓRIA CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- Q42c Queiroz, Bruno Roberto da Silva.  
Caracterização de uma monooxigenase lítica de polissacarídeo recombinante de *Chromobacterium violaceum* que apresenta atividade inibitória contra espécies de *Candida* / Bruno Roberto da Silva Queiroz. – 2022.  
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. LPMO. 2. Atividade peroxidase-like. 3. Quitina. 4. Atividade anti-*Candida*. I. Título.  
CDD 572
-

BRUNO ROBERTO DA SILVA QUEIROZ

CARACTERIZAÇÃO DE UMA MONOOXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEO  
RECOMBINANTE DE *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM* QUE APRESENTA  
ATIVIDADE INIBITÓRIA CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Biologia Molecular.

Aprovada em: 12/09/2022

BANCA EXAMINADORA:

---

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

---

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará, por ceder a estrutura laboratorial e equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo apoio institucional, didático e construtivo, em especial ao coordenador do Programa, Prof. Dr. Cleverson Diniz, por estar sempre à disposição e por seu empenho em atender as demandas estudantis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, por ter aberto as portas do laboratório, pelas oportunidades de aprendizado, pelos ensinamentos, críticas, discussões e sugestões imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos colegas integrantes do Laboratório de Genética Molecular, Filipe, Mayara, Edvar, Suellen e Ednézio, pelas colaborações e excelentes contribuições.

Aos colegas dos Laboratórios de Toxinas Vegetais e Proteínas Vegetais de Defesa em especial a Nadine pela contribuição nos ensaios de atividade antifúngica.

A colega Renata Pinheiro, técnica do laboratório de Biotecnologia Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca por nos ceder as células transformadas para produção de protease TEV.

Ao professor Dr. Celso Shiniti Nagano do Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Proteínas (LEMAP) do Departamento de Engenharia de Pesca, pelas análises de Espectrometria de Massas.

Ao professor Dr. Rômulo Farias Carneiro do Laboratório de Biotecnologia Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca pelas análises de Dicroísmo Circular.

A pesquisadora Dra. Celli Rodrigues Muniz da Embrapa Agroindústria Tropical pelas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A Rafael Guimarães, técnico do Laboratório de Biologia Celular Vegetal, pelas análises de Microscopia de Fluorescência.

As minhas amigas inesquecíveis de graduação, Márcia, Jéssica e Emily, por todo o ânimo e encorajamento, e por sempre me motivar e acreditar em mim.

A minha mãe, meus irmãos e minha prima Williana, por estar ao meu lado durante todo esse processo de formação.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão dos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todas as outras pessoas, que pequei em esquecer, que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

“Somewhere, something incredible is waiting  
to be known.” (SAGAN, 2018)

## RESUMO

As LPMOs (mono-oxigenases líticas de polissacarídeos) constituem uma classe de enzimas, denominadas enzimas auxiliares, que são caracterizadas por seu mecanismo de clivagem oxidativa de polissacarídeos recalcitrantes encontrados na natureza, potencializando as atividades de hidrolases de glicosídeos canônicas. Algumas LPMOs foram identificadas no genoma de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, entre elas a LPMO codificada pela ORF CV2592. Uma análise inicial revelou que essa LPMO apresenta uma estrutura modular, contendo os domínios LPMO\_10 (domínio com atividade “*peroxidase-like*”), GbpA\_2 (domínio de ligação a N-acetil-glicosamina) e ChiA1\_DB (domínio de ligação à quitina). Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar a funcionalidade desta LPMO com relação à atividade “*peroxidase-like*” e seu potencial de inibição sobre células de espécies de *Candida*. Análises *in silico* revelaram que Cv2592 pertence à família AA10 da classe de enzimas de atividades auxiliares. Semelhante às demais LPMOs descritas, Cv2592 apresenta dois resíduos de histidina conservados em seu sítio catalítico, cuja função é coordenar o íon metálico  $\text{Cu}^{+2}$ , essencial para a atividade oxidativa da enzima. A LPMO recombinante fusionada à “*tag*” de solubilidade, proteína SUMO (rCvLPMO-SUMO), foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) e purificada por cromatografia de afinidade à metal imobilizado, exibindo massa molecular aparente de 56 kDa quando analisada por SDS-PAGE. A identidade dessa proteína foi confirmada por espectrometria de massas, que produziu peptídeos com cobertura de 45,3% da sua estrutura primária. A caracterização *in vitro* mostrou que rCvLPMO-SUMO possui atividade peroxidásica sobre o substrato 2,6-dimetoxifenol, demonstrando a funcionalidade do domínio catalítico LPMO\_10. A funcionalidade do domínio de ligação à quitina ChiA1\_DB também foi confirmada por meio de cromatografia de afinidade em matriz de quitina. As condições ótimas para a atividade enzimática foram determinadas em pH 7,0 e temperatura de 50 °C. rCvLPMO-SUMO apresentou estabilidade em relação à variação de pH, mantendo pelo menos 80% de sua atividade após ser submetida a valores extremos de pH (3,0 a 10,0) e temperatura de 60 °C. A atividade da rCvLPMO-SUMO foi inibida completamente na presença de 5 mM dos íons  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ag}^{+}$  e  $\text{Hg}^{+2}$ , SDS 2%, EDTA 5 mM e DTT 100 mM. Análises de dicroísmo circular indicaram uma  $T_m$  de 74,9 °C. rCvLPMO-SUMO apresentou atividade inibitória e letal contra várias estirpes de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciaram danos causados por rCvLPMO-SUMO em células de *Candida parapsilosis*. Análises de viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com iodeto de propídio e DCFH-

DA, respectivamente, revelaram que a proteína causa permeabilização da membrana plasmática e induz a produção de ROS pelas células de *Candida* expostas à rCvLPMO-SUMO.

**Palavras-chaves:** LPMO; atividade *peroxidase-like*; quitina; atividade anti-*Candida*.

## ABSTRACT

LPMOs (lytic polysaccharide monooxygenases) constitute a class of enzymes, called auxiliary enzymes, which are characterized by their mechanism of oxidative cleavage of polysaccharides, enhancing the activities of canonical glycoside hydrolases, involved in the degradation of recalcitrant polysaccharides found in nature. Some LPMOs were identified in the genome of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, including the LPMO encoded by the ORF CV2592. An initial analysis revealed that this LPMO has a modular structure, containing the LPMO\_10 (peroxidase activity), GbpA\_2 (N-acetylglucosamine binding domain) and ChiA1\_DB (chitin binding domain) domains. Thus, the aim of this work was to analyze the functionality of this LPMO in relation to *peroxidase-like* activity and its inhibition potential on *Candida* species. *In silico* analysis revealed that CV2592 belongs to the AA10 family of auxiliary activity enzymes. All LPMOs have two conserved histidine residues in their catalytic site, forming a histidine arm whose function is to coordinate  $\text{Cu}^{2+}$ , which is essential for the oxidative activity of LPMOs. Recombinant LPMO (rCvLPMO-SUMO) fused to the solubility tag SUMO was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified by immobilized metal affinity chromatography, exhibiting an apparent molecular mass of 56 kDa. The identity of this protein was further confirmed by mass spectrometry, which produced peptides covering 45.3% of their primary structure. The *in vitro* characterization showed that rCvLPMO-SUMO has peroxidase activity on the substrate 2,6-dimethoxyphenol, demonstrating the functionality of the LPMO\_10 catalytic domain. The functionality of the chitin binding domain, ChiA1\_DB, was also confirmed by chitin matrix affinity chromatography. The optimal conditions for enzymatic activity were determined at pH 7.0 and temperature of 50 °C. rCvLPMO-SUMO was stable in relation to pH variation, maintaining at least 80% of its activity after being subjected to extreme pH values and a temperature of 60 °C. The rCvLPMO-SUMO activity is completely inhibited in the presence of 5 mM  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  ions and 2% SDS, 5 mM EDTA and 100 mM DTT. Circular dichroism experiments indicate a  $T_m$  of 74.9 °C. rCvLPMO-SUMO presented inhibitory and lethal activities against several strains of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Transmission electron microscopy (TEM) analysis evidenced the damage caused by rCvLPMO-SUMO to *Candida* cells. Cell viability analyzes and ROS production with propidium iodide and DCFH-DA, respectively, revealed that the protein causes permeabilization of the plasma membrane and induces the production of reactive oxygen species by *Candida* cells treated with rCvLPMO-SUMO.

**Keywords:** LPMO; *peroxidase-like* activity; chitin; *anti-Candida* activity.

## LISTA DE FÍGURAS

Figura 1-	Representação da reação catalisada por uma LPMO .....	25
Figura 2-	Estrutura terciária de uma LPMO .....	26
Figura 3-	Estrutura da quitina.....	27
Figura 4-	Representação dos mecanismos de ação de antifúngicos tradicionais sobre alvos celulares.....	31
Figura 5-	Estrutura da parede celular de <i>Candida albicans</i> .....	33
Figura 6-	Predição do peptídeo sinal na sequência primária da CvLPMO.....	53
Figura 7-	Representação dos domínios conservados na sequência primária da CvLPMO.....	54
Figura 8-	Análise em gel de SDS-PAGE da indução piloto da expressão de rCvLPMO-SUMO, para determinação da temperatura ótima de indução.....	55
Figura 9-	Análise em gel de SDS-PAGE de indução piloto da expressão de rCvLPMO-SUMO, para determinação da melhor condição de cultivo.....	57
Figura 10-	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDSPAGE), evidenciando o perfil de proteínas em diferentes extratos.....	59
Figura 11-	Perfil cromatográfico de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) .....	60
Figura 12-	Perfil cromatográfico de cromatografia de afinidade em matriz de quitina.....	61
Figura 13-	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) do resultado da digestão de rCvLPMO-SUMO com a protease TEV.....	63
Figura 14-	Ensaio de atividade “peroxidase-like” de LPMO com rCvLPMO-SUMO purificada.....	64
Figura 15-	Gráfico de atividade “peroxidase-like” de LPMO de rCvLPMO-SUMO.....	64

Figura 16-	Peptídeos trípticos identificados por espectrometria de massas na sequência de rCvLPMO.....	66
Figura 17-	Análise do perfil de estruturas secundárias de rCvLPMO por espectroscopia de dicroísmo circular.....	67
Figura 18-	Curva de desnaturação térmica de rCvLPMO na faixa de 20 a 95 °C.....	67
Figura 19-	Efeito do pH sobre a estabilidade e atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO.....	68
Figura 20-	Efeito da temperatura sobre a estabilidade e atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO.....	69
Figura 21-	Efeito de íons metálicos na atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO.....	70
Figura 22-	Efeito de aditivos químicos na atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO.....	72
Figura 23-	Efeito de rCvLPMO-SUMO na formação (A) e degradação de biofilme (C) em <i>C. albicans</i> ATCC 10231 e sobre a formação (B) e degradação de biofilme (D) em <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.....	75
Figura 24-	Efeito do tempo de exposição a rCvLPMO-SUMO na viabilidade <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	76
Figura 25-	Efeito do tempo de exposição a rCvLPMO-SUMO na viabilidade de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.....	76
Figura 26-	Ensaio de avaliação da integridade da membrana celular em <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> utilizando fluoróforo iodeto de propídio e visualizado em microscópio de fluorescência.....	78
Figura 27-	Ensaio de avaliação de estresse oxidativo em <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> utilizando fluoróforo DCFH-DA (Diacetato 2,7 diclorofluoraceína).....	80
Figura 28-	Microscopia Eletrônica de Transmissão de <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 cultivada na presença de rCvLPMO-SUMO e do controle negativo (água).....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Volume de reagentes para o preparo de géis de poliacrilamida entre placas de vidro.....	42
Tabela 2-	Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS ( <i>liquid chromatography - electrospray ionization – tandem mass spectrometry</i> ) da sequência de aminoácidos de rCV2592, referente a banda de 56 kDa (P2).....	68
Tabela 3-	Resultado dos testes de inibição em diferentes espécies e cepas de <i>Candida</i> com determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	5-fluorocitosina
AA10	Atividades Auxiliares família 10
ATCC	Do inglês - <i>American Type Culture Collection</i>
CAZy	Do inglês - <i>Carbohydrate Active Enzymes</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CD	Do inglês - <i>Circular Dichroism</i>
ChtBD	Domínio de ligação à quitina
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ETS	Extrato total solúvel
ETI	Extrato total insolúvel
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
IPTG	Do inglês <i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i>
IMAC	Do inglês <i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
Kv	Kiloelétronvolts
LB	Luria Bertani
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mgP	Miligramas de proteína
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-terminal	Amino terminal
ORF	Do inglês <i>open read frame</i>
PDB	Do inglês <i>Protein Data Base</i>
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
rCvLPMO	LPMO recombinante de <i>Chromobacterium violaceum</i>
rCvLPMO-SUMO	LPMO recombinante de <i>Chromobacterium violaceum</i> fusionada a SUMO
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
$T_m$	Do inglês <i>Melting temperature</i>
U	Unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultra violeta
TB	Do inglês <i>Terrific Broth Medium</i>
TEV	Do inglês <i>Tobacco Etch Virus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<i>g</i>	Gravitacional
°C	Graus celsius
h	Hora (s)
min	Minuto (s)
nm	Nanômetro
s	Segundo (s)
mL	Mililitro (s)
μL	Microlitro (s)
g	Gramma (s)
mg	Miligramma (s)
μg	Microgramma (s)
ng	Nanogramma (s)
kDa	Quilodáلتon (s)
Da	Dáلتon (s)
v/v	Relação entre volume e volume
m/v	Relação entre massa e volume
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
cm	Centímetro (s)
U	Unidade
<	Menor que
ε	Coeficiente de extinção molar
His	Histidina
Cys	Cisteína

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1	<i>Chromobacterium violaceum</i> .....	22
2.2	LPMO's .....	23
2.3	Quitina .....	27
2.4	Expressão heteróloga de proteínas em <i>Escherichia coli</i> .....	29
2.5	<i>Candida</i> spp .....	30
2.5.1	<i>Patogenicidade e virulência</i> .....	30
2.5.2	<i>Estratégias terapêuticas disponíveis e mecanismos de resistência</i> .....	31
3	HIPÓTESE .....	35
4	OBJETIVOS .....	35
4.1	Objetivo geral .....	35
4.2	Objetivos específicos .....	35
5	MATERIAIS .....	37
5.1	Cepas de bactérias e fungos .....	37
5.2	Plasmídeos e sequências codificadoras .....	37
5.3	Reagentes e demais materiais .....	37
6	MÉTODOS .....	39
6.1	Análises <i>in silico</i> da sequência codificadora da ORF CV2592 .....	39
6.2	Transformação de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) com o plasmídeo pET-SUMO::Cv2592 .....	39
6.3	Otimização das condições de cultivo e indução da ORF Cv2592 .....	39
6.4	Purificação da proteína recombinante .....	40
6.5	Análises por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	41
6.6	Determinação da concentração de proteínas solúveis .....	42
6.7	Coordenação do cobre no sítio ativo de rCvLPMO-SUMO .....	43
6.8	Digestão de rCvLPMO-SUMO com a protease TEV .....	43
6.9	Caracterização bioquímica .....	44
6.9.1	<i>Espectrometria de massas</i> .....	44
6.9.2	<i>Ensaio de atividade LPMO semelhante à peroxidase</i> .....	44
6.9.3	<i>Efeito do pH sobre a atividade enzimática e estabilidade</i> .....	44

6.9.4	<i>Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática e estabilidade</i> .....	45
6.9.5	<i>Efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática</i> .....	45
6.9.6	<i>Análises de Espectroscopia de Dicroísmo Circular</i> .....	45
6.10	<b>Atividades biológicas</b> .....	46
6.10.1	<i>Efeito de CvLPMO sobre o crescimento de Candida spp</i> .....	46
6.10.2	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) de rCvLPMO-SUMO</i> .....	46
6.10.3	<i>Efeito de rCvLPMO-SUMO sobre a formação e degradação de biofilmes de Candida spp</i> .....	47
6.10.4	<i>Efeito do tempo de exposição a rCvLPMO sobre a viabilidade de Candida spp</i> .....	48
6.10.5	<i>Investigação do mecanismo de ação de rCvLPMO-SUMO na inibição de Candida spp</i> .....	49
6.10.5.1	<i>Investigação de integridade membrana celular</i> .....	49
6.10.5.2	<i>Investigação de estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio</i> .....	50
6.10.6	<i>Análise de alterações morfológicas nas células tratadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão</i> .....	50
7	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
7.1	<b>Análises <i>in silico</i> da sequência da ORF CV2592</b> .....	53
7.1.1	<i>Predição de peptídeo sinal</i> .....	53
7.1.2	<i>Predição de domínios</i> .....	54
7.2	<b>Otimização das condições de cultivo</b> .....	55
7.3	<b>Expressão de rCvLPMO-SUMO</b> .....	58
7.4	<b>Purificação de rCvLPMO-SUMO</b> .....	59
7.5	<b>Dosagem de proteínas e rendimento</b> .....	61
7.6	<b>Digestão de rCvLPMO-SUMO com protease TEV</b> .....	62
7.7	<b>Atividade “<i>peroxidase-like</i>” de LPMO</b> .....	63
7.8	<b>Análise por Espectrometria de Massas de rCvLPMO-SUMO</b> .....	65

7.9	<b>Análises de Espectroscopia de Dicroísmo Circular .....</b>	66
7.10	<b>Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de rCvLPMO .....</b>	68
7.11	<b>Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de rCvLPMO-SUMO .....</b>	69
7.12	<b>Efeito dos metais e aditivos químicos sobre a atividade de rCvLPMO ..</b>	70
7.13	<b>Atividades biológicas.....</b>	73
7.13.1	<i>Efeito de rCvLPMO-SUMO sobre o crescimento de Candida .....</i>	73
7.13.2	<i>Efeito de rCvLPMO-SUMO sobre a formação e degradação de biofilmes de Candida .....</i>	74
7.13.3	<i>Efeito do tempo de exposição de rCvLPMO-SUMO sobre a viabilidade celular em Candida .....</i>	76
7.13.4	<i>Investigação do mecanismo de ação de rCvLPMO-SUMO na inibição do crescimento de Candida .....</i>	77
7.13.4.1	<i>Análise de integridade da membrana celular .....</i>	77
7.13.4.2	<i>Estresse oxidativo por produção de espécies reativas de oxigênio .....</i>	79
7.13.5	<i>Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Candida sp tratada com rCvLPMO-SUMO.....</i>	81
8	<b>CONCLUSÕES .....</b>	83
9	<b>PERMISSÕES LEGAIS .....</b>	84
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	85
	<b>APÊNDICE A - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CORRESPONDENTE À PROTEÍNA RECOMBINANTE rCv2592-SUMO .....</b>	98
	<b>APÊNDICE B – MAPA DO PLASMÍDEO SINTÉTICO pET-SUMO-CV2592 .....</b>	99

## 1 INTRODUÇÃO

A bactéria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum*, estirpe ATCC 12472, teve seu genoma sequenciado pela Rede Nacional do Projeto Genoma Brasileiro (*Brazilian National Genome Project Consortium*, 2003) revelando uma vasta quantidade de ORFs (*open reading frames*) relacionadas ao metabolismo geral, codificando proteínas transportadoras de membrana, supostamente responsáveis por sua adaptabilidade aos vários ambientes em que habita (DE VASCONCELOS *et al.*, 2003). O gênero *Chromobacterium* ilustra o abismo existente entre a expansão dos bancos de dados de sequências e o real conhecimento biológico sobre os organismos cujo genoma foi sequenciado. Apesar do rápido aumento do número de espécies e dos diversos genomas disponíveis no NCBI, a maior parte do que se sabe sobre o grupo vêm de estudos experimentais com sua espécie-tipo, *C. violaceum*. Sabe-se que *C. violaceum* apresenta a capacidade de utilizar apenas quitina como fonte de carbono e nitrogênio (LOBO *et al.*, 2013; STREICHSBIER, 1983), mas sua via de degradação de quitina ainda não é conhecida.

A completa caracterização do mecanismo de degradação da quitina em *Chromobacterium violaceum* poderá fornecer subsídios para a produção industrial de quitooligossacarídeos, auxiliar no desenvolvimento de técnicas de combate a pragas agrícolas, como fungos, insetos e nematoides, e ajudar na compreensão dos mecanismos de ciclagem de carbono e nitrogênio em ecossistemas terrestres e aquáticos (LOBO *et al.*, 2013).

LPMOs são enzimas oxidativas da classe das atividades auxiliares segundo classificação do CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Estas proteínas se caracterizam como metalo-enzimas dependentes de  $\text{Cu}^{+2}$ , e apresentam dois resíduos de histidina conservados em todas as LPMOs conhecidas. Os resíduos de histidina conservados formam um cinto de histidina responsável por coordenar o cobre no sítio ativo da enzima (BERNARDI *et al.*, 2020).

Recentemente, as LPMOs foram descritas como potenciais iniciadoras do catabolismo de quitina em diversos organismos (HAMRE *et al.*, 2015). Estas enzimas são capazes de degradar biopolímeros insolúveis e alguns estudos mostram seu potencial uso industrial (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; BEESON *et al.*, 2015). Algumas LPMOs foram descritas, ainda, como fatores de virulência em algumas bactérias (SHUTINOSKI; SCHMIDT; HEUSIPP, 2010; WONG *et al.*, 2012).

No presente estudo, uma LPMO codificada pela ORF CV2592 do genoma de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, foi expressa em *Escherichia coli*, purificada e caracterizada. Sabendo que as LPMOs podem degradar quitina, celulose e vários outros

polissacarídeos, e que a ORF CV2592 codifica uma LPMO putativa da família AA10, hipotetizamos que esta LPMO, denominada neste trabalho como rCvLPMO, é capaz de inibir o crescimento de células da levedura patogênica *Candida* spp. por um mecanismo semelhante ao observado em quitinases que apresentam a capacidade de degradar a quitina da parede celular de fungos, e portanto, carregam grande potencial de aplicação como agente antifúngico (BANANI *et al.*, 2015; KIM; JE, 2010).

## ***Fundamentação teórica***

*Nesta seção serão descritos os fundamentos teóricos necessários à compreensão do estudo das LPMOs e suas atividades bioquímicas e antifúngicas*

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa descrita pela primeira vez no final do século 19 (BOISBAUDRAN, 1882), que domina uma variedade de ecossistemas em regiões tropicais e subtropicais. Esta bactéria é altamente abundante na água e margens do rio Negro, um dos principais componentes da cultura brasileira amazônica, e como resultado tem sido estudada no Brasil nas últimas três décadas. Estes estudos, em geral, têm se concentrado nos mais promissores produtos da bactéria, como o pigmento violaceína, que já foi introduzido como um composto terapêutico na dermatologia (CALDAS, 1990). A violaceína também exibe atividade antimicrobiana contra importantes patógenos tropicais como *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA, 1999) *Trypanosoma cruzi* (DURÁN *et al.*, 1994) e *Leishmania* sp. (LEON *et al.*, 2001), bem como atividades bactericida (DURÁN; MENCK, 2008; LICHSTEIN; VAN DE SAND, 1945), antiviral (DURÁN; MENCK, 2008) e anticâncer (SHIGEMATSU *et al.*, 1994; SILVA MELO SILVYA STUCHI MARIA *et al.*, 2000).

*Chromobacterium violaceum* foi inicialmente isolada no Brasil em uma amostra de água vinda de uma estação de tratamento em Manaus, no Amazonas (CALDAS, 1990). Posteriormente, sua ocorrência foi relatada como bastante frequente em diversos rios da Amazônia Central, com destaque para o rio Negro (GUARIM, 1979; HUNGRIA *et al.*, 2005) ocorrendo também no solo de outros ecossistemas brasileiros, como o Cerrado e a Mata Atlântica (MYERS *et al.*, 2000).

Apesar de atuar geralmente como saprófita de vida livre, existe um crescente número de casos de infecções causadas por *C. violaceum*, sendo considerada um patógeno emergente. O primeiro caso de infecção humana foi registrado na Malásia em 1927 (SNEATH, 1953). Até 2017, aproximadamente 200 casos já foram reportados, com taxa de mortalidade acima de 50%, principalmente em crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017; OKADA *et al.*, 2013; UMADEVI *et al.*, 2013; YANG; LI, 2011). O contágio inicial geralmente ocorre pela pele em contato com água e solos contaminados, levando ao surgimento de pústulas, algumas vezes com coloração roxa, bem como febre e vômito (BROWN; STEIN; MORRELL, 2006; YANG; LI, 2011). Muitos casos evoluem para septicemias fatais, com o desenvolvimento de múltiplos abscessos no fígado, pulmão, baço e até mesmo no cérebro (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002; YANG; LI, 2011). É importante fazer-se notar ainda a ampla resistência a antibióticos e outras drogas que a bactéria apresenta (FANTINATTI-GARBOGGINI, 2004; UMADEVI *et al.*, 2013). Uma

característica marcante da espécie, que posteriormente foi abrangida para todo o gênero, é a secreção do pigmento violaceína, responsável pela coloração violeta do grupo (STOTT *et al.*, 2015). A produção de violaceína está relacionada com *quorum sensing*, permitindo fácil visualização e quantificação do processo. Isso levou a espécie, principalmente a estirpe CV026, a ser considerada modelo de estudo para o mecanismo. Desta forma, diversos inibidores de *quorum sensing* foram descobertos e podem ser utilizados como alternativas aos antibióticos atuais (KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017; MCCLEAN *et al.*, 1997).

Pela importância histórica da pesquisa sobre violaceína e *Chromobacterium violaceum* no país e pelo potencial de seus produtos secundários, ela foi escolhida pelo Projeto Genoma Brasileiro para ter seu genoma completamente sequenciado (DURÁN *et al.*, 1994; DURÁN; MENCK, 2008; LEON *et al.*, 2001). Em 2003, um consórcio de laboratórios brasileiros integrando o projeto foi responsável pelo sequenciamento do genoma da estirpe ATCC 12472 de *C. violaceum*. Este consistia em um único cromossomo circular com 4.751.080 pares de bases, sendo 64,83% de G+C e contendo 4.431 ORFs codificando proteínas. Dessas, muitas estão relacionadas com a capacidade de sobrevivência a diversos ambientes, incluindo oxidases e redutases, e várias vias energéticas alternativas (DE VASCONCELOS *et al.*, 2003).

A quitina é uma fonte alternativa de carbono e nitrogênio (STREICHSBIER, 1983). A secreção de quitinases em *C. violaceum* é regulada por *quorum sensing*, como a violaceína, e provavelmente está relacionada com parte da via quitinolítica na espécie (CHERNIN *et al.*, 1998). Algumas dessas quitinases já foram expressas com sucesso em *Escherichia coli*, com posterior caracterização das proteínas recombinantes (LOBO *et al.*, 2013), assim como caracterização *in silico* de uma N acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (MOURA, 2016).

## 2.2 LPMO's

Cinco quitinases de *Serratia marcescens* foram purificadas por FUCHS e colaboradores (1986). Posteriormente tais proteínas foram caracterizadas como ChiA, ChiB, ChiC1, ChiC2 e CBP21. CBP21 foi inicialmente descrita como uma proteína de ligação à quitina não catalítica, que potencializava a atividade de quitinases em quitina cristalina (SUZUKI *et al.*, 1998; VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2005).

Vaaje-Kolstad e colaboradores (2005) também demonstraram que as proteínas conhecidas como “*chitin-binding proteins*” ou família 33 dos módulos de ligação a carboidrato (CBM33, conforme definido no banco de dados CAZy) aumentam a eficiência das hidrolases de glicosídeo canônicas envolvidas na degradação da quitina (quitinases). A clivagem oxidativa

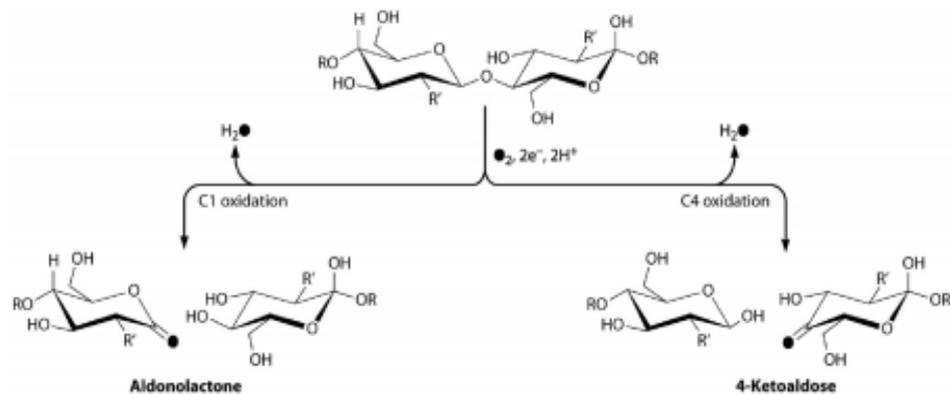
de polissacarídeos por enzimas hoje conhecidas como LPMOs (monooxigenases líticas de polissacarídeo) foi demonstrada pela primeira vez em 2010 por Gustav Vaaje-Kolstad e colaboradores que descreveram um novo mecanismo catalítico em enzimas da família CBP21. Os autores mostraram que a proteína conseguiu degradar quitina cristalina por oxidação, ou seja, o mecanismo de catálise envolvia a transferência de uma molécula de oxigênio. Essa atividade foi inicialmente descrita em integrantes das famílias GH61, quitinases de fungos, e CBM33, que incluía proteínas de ligação à quitina, como CBP21. Atualmente as GH61 e CBM33 foram reclassificadas como AA9 e AA10, respectivamente (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; LEVASSEUR *et al.*, 2013).

Antes da descoberta das LPMOs, o único mecanismo conhecido de clivagem de ligações O-glicosídicas era a hidrólise por enzimas hidrolíticas. Esta consiste em uma reação de dupla decomposição, onde a água é um dos reagentes envolvidos. Em compostos orgânicos, o processo contém diversas etapas, iniciando com a ligação covalente do átomo de oxigênio da água a um carbono do segundo reagente envolvido e geralmente termina com a quebra deste composto (“*Hydrolysis*”, 2016). Na quitina, a reação é catalisada por quitinases. O CAZy (LOMBARD *et al.*, 2014) classifica as LPMOs em quatro famílias das atividades auxiliares (do inglês, “*Auxiliary Activity*”). As famílias AA9, AA11 e AA13 são encontradas em fungos, oxidando celulose, quitina e amido, respectivamente (HARRIS *et al.*, 2010; HEMSWORTH *et al.*, 2013; VU *et al.*, 2014). A família AA10 compreende proteínas encontradas em bactérias, com atividade sobre quitina ou celulose (FORSBERG *et al.*, 2014; VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010). As famílias AA10 e AA9 apresentam um distante ancestral comum, sendo que provavelmente a oxidação de quitina surgiu antes da atividade oxidativa de celulose no grupo (BOOK *et al.*, 2014).

As LPMOs são metaloproteínas dependentes de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) (AACHMANN *et al.*, 2012) que hidroxilam os carbonos C-1 ou C-4 das ligações glicosídicas, dando origem a intermediários instáveis que se decompõem, causando a quebra dessas ligações. O grupo hemiacetal do C-1 hidroxilado produz ácidos aldônicos, enquanto o C-4 hidroxilado gera cetoaldoses através de um hemicetal intermediário (Figura 1) (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017). A hidroxilação utiliza oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), que precisa ser ativado por dois elétrons e dois prótons (VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010), por isso, a reação é inibida na presença de cianeto. Quelantes, como EDTA, também são fortes inibidores, pois roubam os átomos de  $\text{Cu}^{+2}$  do sítio ativo (BEESON *et al.*, 2015; VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010). Sabe-se que seu mecanismo de hidroxilação envolve uma etapa catalítica e a ativação do sítio ativo oxidante, mas os detalhes ainda são desconhecidos (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA,

2017; WALTON; DAVIES, 2016). Alguns autores discutem o uso do termo “líticas”, já que não existem até o momento evidências que a enzima atua diretamente na quebra das ligações, utilizando o nome alternativo monooxigenases de polissacarídeo (em inglês, *polysaccharide monooxygenases*; PMOs) (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; BEESON *et al.*, 2015).

Figura 1 – Representação da reação catalisada por LPMOs.

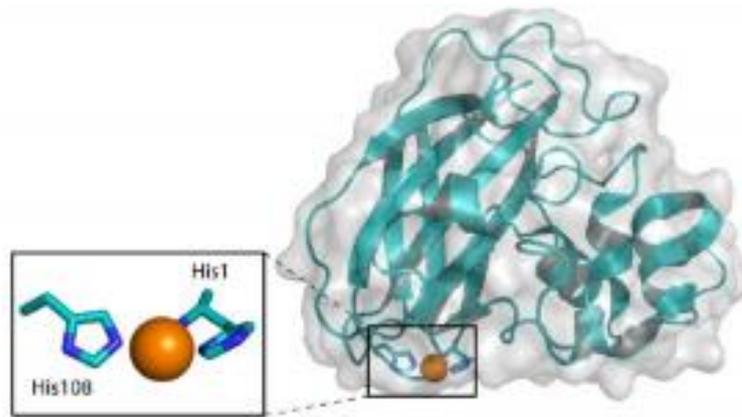


Fonte: Agostoni, Hangasky e Marletta, (2017). Oxidação na posição C-1 produzindo aldonolactona e de C-4 originando 4-cetoaldoses. Em quitina, R indica GlcNAc e R' NHCH<sub>3</sub>CO.

As LPMOs em sua maioria contêm um único domínio, no entanto, existem proteínas com domínios alternativos, como módulos de ligação à carboidratos (CBMs), domínios similares a fibronectina tipo III (FnIII) e hidrolases (HORN *et al.*, 2012). CBMs são classificados em diversas famílias e aumentam a especificidade, facilitando a ligação aos polissacarídeos (CROUCH *et al.*, 2016). As FnIII normalmente medeiam a adesão celular e interações proteína-proteína (POTTS; CAMPBELL, 1996; SANDFORD; MULROY; FOGGENSTEINER, 1999). Em *V. cholerae*, a AA10 GbpA é uma proteína multidomínio, com um domínio catalítico LPMO, dois domínios FnIII e um domínio de ligação à quitina. Os domínios FnIII e LPMO são responsáveis pela interação com a mucina do epitélio intestinal do hospedeiro (WONG *et al.*, 2012). O domínio catalítico e o de ligação à quitina também são importantes pela permanência da bactéria no ambiente aquático, permitindo a ligação ao exoesqueleto de pequenos crustáceos (STAUDER *et al.*, 2012). Os domínios catalíticos de monooxigenases bacterianas apresentam um “β sanduíche”, com um sítio ativo composto por um complexo mononuclear de Cu<sup>+2</sup>(II) com duas histidinas e uma amina N-terminal em uma “braçadeira” de histidina em forma de T, como ilustra a Figura 2 (AACHMANN *et al.*, 2012;

GUDMUNDSSON *et al.*, 2014; VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010). A superfície de interação é plana, permitindo que a proteína clive as ligações glicosídicas sem separar o polímero da matriz cristalina (AACHMANN *et al.*, 2012; AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017). LPMOs de quitina apresentam um local específico para acomodar o grupo acetil (FORSBERG *et al.*, 2014).

Figura 2 – Estrutura terciária de uma LPMO.



Fonte: Agostoni, Hangasky e Marletta, (2017). Na parte inferior da estrutura, encontra-se a superfície de interação com substrato, plana. Em destaque, a “braçadeira” de histidinas ligadas a um  $\text{Cu}^{+2}$ , indicado na ilustração como uma esfera alaranjada.

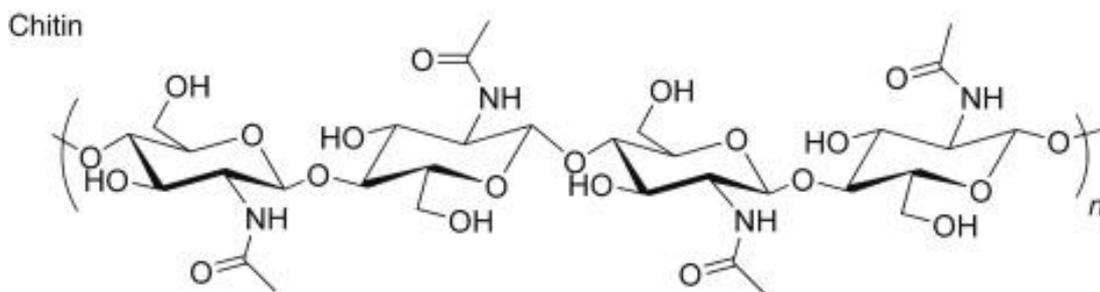
Funcionalmente, as LPMOs criam uma nova terminação na cadeia polissacarídica, onde as quitinases seriam mais ativas que na matriz cristalina (VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010). De maneira alternativa, algumas proteínas no grupo foram descritas com atividade antifúngica (MEHMOOD *et al.*, 2011) e como fatores de virulência, como em *V. cholerae* (WONG *et al.*, 2012). Diversos estudos sugerem a utilização de LPMOs na indústria. Segundo (HARRIS *et al.*, 2010), a adição de monooxigenases em coquetéis de celulase reduz em duas vezes a quantidade de enzima necessária para a conversão de farinha de milho pré-tratada. Outra possibilidade é seu uso na captura de  $\text{O}_2$  para produção de etanol celulósico (BEESON *et al.*, 2015). As LPMOs podem ser também fundamentais para a conversão enzimática de biomassa, como, por exemplo, na produção de derivados de quitina (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). A adição dessas proteínas às reações com quitinases poderia aumentar sua eficiência, diminuindo os custos de produção.

### 2.3 Quitina

A quitina foi inicialmente descrita como um “material” particularmente resistente aos “químicos usuais” por A. Hachett, em 1799 (JEUNIAUX; CORNELIUS, 2016). Entretanto, a descoberta do polímero é conferida à Henri Braconnot, em 1811, a partir de reações realizadas em materiais isolados de diversas espécies de fungos. Braconnot nomeou o novo composto como fungina (BRACONNOT, 1811; MUZZARELLI *et al.*, 2012). ODIER e colaboradores (1823) descobriram a mesma substância em insetos e plantas, modificando seu nome para *chitine* (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; ODIER, 1823). A palavra deriva do grego *khitôn*, que originalmente denominava um tipo de túnica, sendo ainda hoje utilizada na França com esse propósito (*chiton*). Após diversas derivações, o termo passou a indicar qualquer tipo de revestimento, desde armaduras de soldado, até peles de órgãos animais, cascas de frutas, etc. (AVENAS, 2013).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (PURUSHOTHAM *et al.*, 2012), composta por resíduos de N-acetil-D-glucosamina (2-acetamino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose; GlcNAc), unidos por ligações  $\beta$ -(1,4) do tipo O-glicosídica (CLARK; SMITH, 1956; HU *et al.*, 2007; THARANATHAN; KITTUR, 2010). Apresenta estrutura similar à celulose, com um arranjo em microfibrilas. É um polissacarídeo linear, não ramificado, insolúvel, branco, elástico e rígido que apresenta nitrogênio em sua composição. Como a celulose, é um polissacarídeo estrutural (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015). Compõe a epiderme e olhos de artrópodes e cefalópodes (HERRING, 1979; WAGNER *et al.*, 1993), a parede celular de fungos (BLUMENTHAL; ROSEMAN, 1957), o exoesqueleto e tendões de artrópodes (HERRING, 1979), etc., e pode ser utilizada como fonte de nitrogênio e carbono (STREICHSBIER, 1983; STRUSZCZYK, 2006). Sua estrutura é ilustrada na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura da quitina



Fonte: (PATEL; VASHI, 2015)

São encontradas três formas de quitina, que diferem entre si pela forma como suas cadeias se arranjam. A forma  $\alpha$  apresenta suas cadeias alinhadas de modo antiparalelo, enquanto na forma  $\beta$  estão arranjadas paralelamente e na forma  $\gamma$  é composta dos dois tipos de cadeias intercaladas (RUDALL, 1963).  $\alpha$ -Quitina é encontrada na carapaça de caranguejos e camarões,  $\beta$ -quitina é extraída da “pena” (concha interna) de lulas (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010) e diatomáceas (HUNT *et al.*, 2008) e  $\gamma$ -quitina está presente no revestimento estomacal de *Loligo*, um grupo de lulas (THARANATHAN; KITTUR, 2010). Estima-se que aproximadamente 100 bilhões de toneladas de quitina sejam produzidas por ano por insetos, fungos, crustáceos e moluscos (GOODAY, 1990), sendo a maior parte produzida no ambiente marinho (KEYHANI; ROSEMAN, 1999). Existem diversas aplicações para o biopolímero e seus derivados, desde propriedades imunológicas (AAM *et al.*, 2010; PAPPA; GUERINI, 2010), anti-inflamatórias (MINAMI *et al.*, 1998), antioxidantes (JE; KIM, 2006; NGO *et al.*, 2009; XIE; XU; LIU, 2001), antimicrobianas (EL GHAOUTH *et al.*, 1992; LI *et al.*, 2008; SAN-LANG *et al.*, 2002; TSAI; SU, 1999), na remoção de metais pesados (DE OLIVEIRA FRANCO *et al.*, 2004; HOSOBABA *et al.*, 2009; JIANLONG *et al.*, 2001; KUSANO *et al.*, 1999; OSHITA *et al.*, 2008) e muitas outras (AKSU, 2005; HAKIM *et al.*, 2007; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; MUZZARELLI *et al.*, 2012; MUZZARELLI; MUZZARELLI, 2009; PEISELT DA SILVA; PAIS DA SILVA, 2004; RAVI KUMAR, 2000; THARANATHAN; KITTUR, 2010; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015). Por suas diversas vantagens, que incluem ainda biodegradabilidade e biocompatibilidade, essa é uma das fontes de biomassa mais inexploradas do planeta (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; THARANATHAN; KITTUR, 2010).

## 2.4 Expressão heteróloga de proteínas em *Escherichia coli*

As tecnologias do DNA recombinante são exploradas para obtenção de combinações novas de material genético de organismos diferentes, chamado de DNA recombinante. A primeira molécula de DNA recombinante foi preparada por Herbert Boyer e Stanley Cohen em 1973, para produzir um organismo funcional que continha a informação genética de diferentes espécies e as replicava bem (COHEN *et al.*, 1973). Eles introduziram em *E. coli* genes do sapo *Xenopus laevis* e demonstraram que esses genes eram ativamente expressos geração após geração (MORROW *et al.*, 1974).

Muitos são os hospedeiros que podem ser usados para expressão de proteínas recombinantes, como bactérias, leveduras, insetos, plantas e animais. Por mais de duas décadas a bactéria *Escherichia coli* foi e ainda é o hospedeiro mais utilizado para produção de proteínas recombinantes de origem eucariótica e procariótica, pois pode crescer em meios baratos e em condições laboratoriais bem definidas com tempo de replicação muito curto. Como consequência de seu rápido crescimento, a seleção de mutantes é fácil e conveniente. Além disso as células de *E. coli* são altamente competentes em receber moléculas de DNA exógeno e expressar proteínas recombinantes em altas taxas (CRONAN, 2014). Diversos sistemas de expressão estão disponíveis para as mais variadas aplicações. Cerca de 80% das proteínas com estruturas tridimensionais resolvidas submetidas ao banco de dados de estruturas de proteínas (PDB) em 2003 foram expressas em *Escherichia coli* (TERPE, 2006).

A expressão de proteína recombinante é alcançada por meio de diversas etapas, sendo as principais: amplificação do gene alvo por PCR, ligação do gene (inserto) amplificado em um vetor de clonagem, transformação da célula hospedeira com o vetor de clonagem, subclonagem do inserto em vetor de expressão, transformação da célula hospedeira com vetor de expressão, seleção dos clones transformados, e por fim expressão do gene alvo produzindo a proteína recombinante (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018).

## 2.5 *Candida* spp

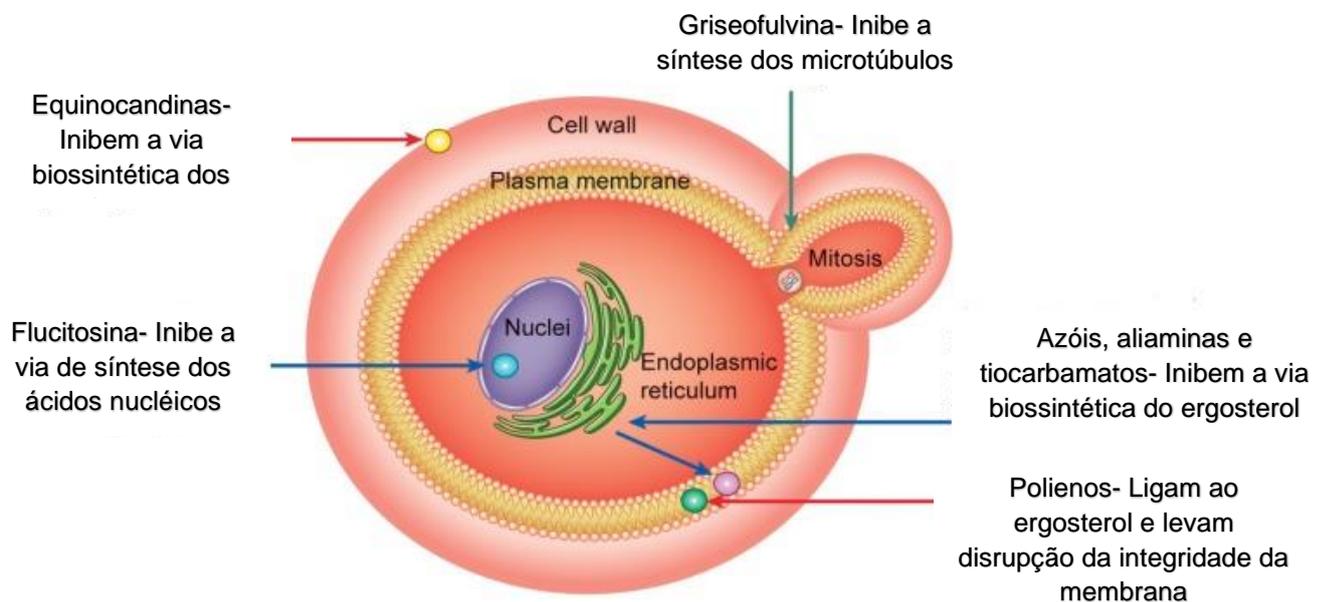
### 2.5.1 Patogenicidade e virulência

As leveduras do gênero *Candida* são fungos de interesse clínico, devido à alta incidência de infecções em populações humanas (PLANTINGA *et al.*, 2012). A *Candida* é um fungo patogênico dimórfico que coloniza as superfícies mucosas de aproximadamente 30% dos indivíduos saudáveis em um determinado momento (BROWN; NETEA, 2007). No entanto, podem causar doenças em um contexto de deficiência imunológica do hospedeiro como pacientes transplantados em uso de imunossupressores, pacientes com AIDS e pessoas submetidas à terapia antibiótica de amplo espectro (ANWAR KHAN; MALIK; SUBHAN KHAN, 2012; INST *et al.*, 2012; MAURYA *et al.*, 2013). O espectro de manifestações clínicas da infecção por *Candida* spp. compreende síndromes clínicas que vão desde infecções mucocutâneas das mucosas oral e vaginal, até candidemia e infecções severas que são frequentemente associadas a uma síndrome séptica (MARÓDI; JOHNSTON, 2007; PFALLER; DIEKEMA, 2010). Embora *C. albicans* seja a espécie mais prevalente como causa de infecções, tem se observado nos últimos anos uma tendência no aumento de infecções por outras espécies de *Candida*, como *C. glabrata* e *C. krusei* (TRICK *et al.*, 2002; WINGARD *et al.*, 1991). Além disso, há relatos recorrentes de resistência aos antifúngicos azólicos, que pode ser uma consequência, em parte, da frequente adoção de terapêuticas antifúngicas como profilaxia em pacientes de alto risco com sistema imunológico deficiente (MARR *et al.*, 2000; PFALLER *et al.*, 2007). A patogenicidade de um microrganismo é determinada pela sua capacidade de causar doença, mediada por múltiplos fatores. A transição do status de microrganismo comensal para patógeno é dependente de um amplo arsenal de fatores de virulência expressos de forma seletiva sob condições predisponentes (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2013). Determinados aspectos da virulência são geneticamente definidos, no entanto, tais fatores são expressos pelos microrganismos apenas em contextos ambientais e fisiológicos favoráveis, tais como adequado teores de nutrientes, atmosfera de oxigênio e temperatura ideal (MAYER; WILSON; HUBE, 2013) .

### 2.5.2 Estratégias terapêuticas disponíveis e mecanismos de resistência

Entre os fármacos antifúngicos disponíveis atualmente, há diversos alvos celulares e classes distintas (figura 4). Os antifúngicos da classe dos azólicos são os prediletos e mais utilizados no tratamento das infecções por *Candida*. Conforme o tipo de infecção, o local anatômico em que ocorre e o perfil de sensibilidade da espécie, antifúngicos de outras classes também podem ser utilizados, tais como equinocandinas, polienos, análogos de nucleosídeos e alilaminas (PAPPAS *et al.*, 2016; PFALLER *et al.*, 2010, 2013). O fluconazol, antifúngico da classe azol, é o mais frequentemente utilizado no tratamento de infecções por *Candida* devido ao seu baixo custo e toxicidade, além de estar disponível sob diversas formulações (PFALLER *et al.*, 2010). Entretanto, há na literatura diversos relatos sobre o desenvolvimento de resistência entre espécies de *Candida*, principalmente em relação aos azólicos, sendo assim essencial determinar os mecanismos de resistência apresentados por fungos tendo como objetivo o desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas para o tratamento de infecções por *Candida* (SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 4: Representação dos mecanismos de ação de antifúngicos tradicionais sobre alvos celulares.



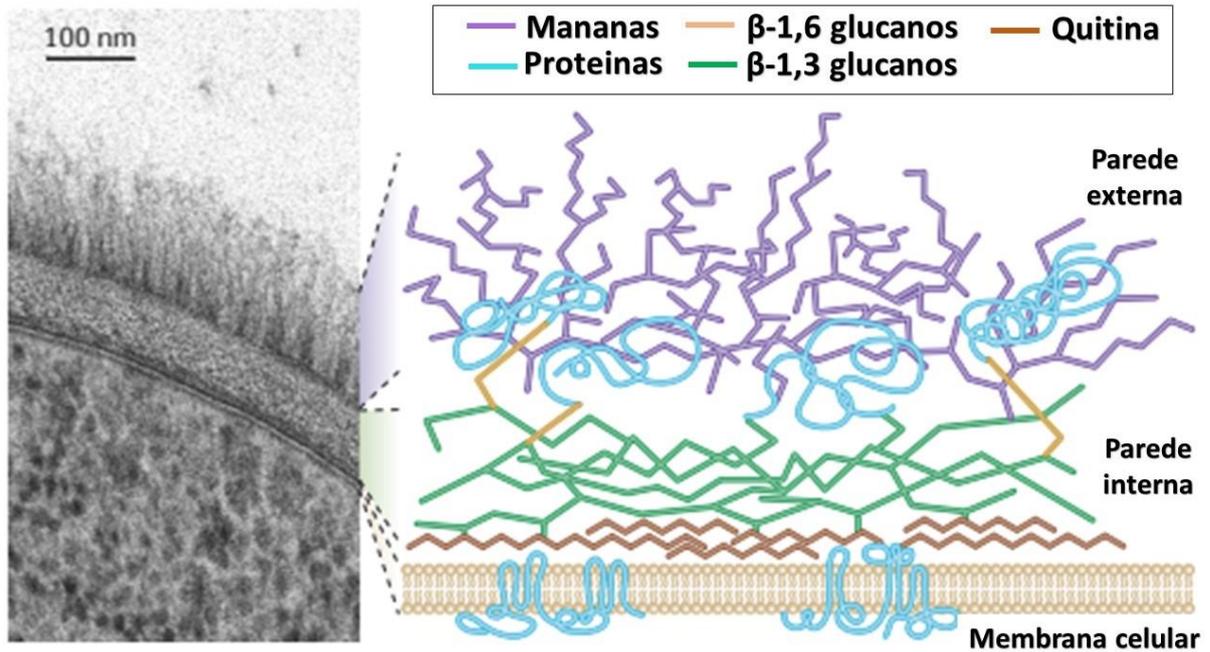
Fonte: Adaptado de SANTOS (2018)

Os azóis inibem a síntese de ergosterol no retículo endoplasmático da célula fúngica. Atuam interferindo na enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, envolvida na

transformação do lanosterol em ergosterol (MAUBON *et al.*, 2014a; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013a). A anfotericina B e outros polienos atuam na membrana fúngica ligando-se ao ergosterol e causando o rompimento da estrutura da membrana, o que promove o extravasamento de constituintes intracelulares como potássio, magnésio e açúcares e, conseqüentemente, a morte celular (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009). A flucitosina (5-FC) é um antifúngico da classe dos análogos de nucleosídeo, sendo este análogo da pirimidina com propriedades fungistáticas, e que ao entrar na célula fúngica por meio do transportador de citosina permease, inibe a enzima timidilato-sintetase, interferindo no DNA. O 5-FC também pode ser convertido em 5-fluorouracil que, por sua vez, pode ser fosforilado em monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina. Sendo este também fosforilado, pode ser incorporado em moléculas de RNA, interferindo assim no processo de tradução celular (MAUBON *et al.*, 2014b; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013b). As equinocandinas são compostos inibidores da enzima  $\beta$ -1,3-D-glucano sintase, impedindo assim a síntese de  $\beta$ -glucano, que está presente na parede celular dos fungos (figura 5). A inibição da  $\beta$ -1,3-D-glucano sintase esgota os polímeros de  $\beta$ -glucano nas células fúngicas, resultando em uma parede celular anormal que é fraca e incapaz de resistir ao estresse osmótico (CHEN; SORRELL, 2007; KUSE *et al.*, 2007). Alilaminas e tiocarbamatos inibem a enzima esqualeno-epoxidase, que participa da síntese do ergosterol. A griseofulvina atua interrompendo a produção do fuso e dos microtúbulos citoplasmáticos, inibindo assim a mitose fúngica (SANTOS *et al.*, 2018). Os medicamentos antifúngicos atualmente disponíveis no mercado para o tratamento de infecções por *Candida* muitas vezes são eficazes, no entanto, apresentam algumas características indesejáveis, como desenvolvimento de cepas resistentes, o que pode comprometer a eficiência do tratamento. A resistência aos antifúngicos guarda relação com três mecanismos distintos: (1) diminuição da concentração intracelular do medicamento por bombas de efluxo da droga, (2) alterações no alvo do medicamento e (3) desvios metabólicos (SANGLARD, 2016). Além disso, há estudos mostrando que esses compostos podem promover efeitos nefrotóxicos (NIEMIROWICZ *et al.*, 2016), teratogênicos (DIMOPOULOU *et al.*, 2017) e cardiotoxicos (KOCH *et al.*, 2015). Assim, é muito importante a busca por novos compostos com atividade antifúngica, permitindo o desenvolvimento de fármacos e/ou tratamentos alternativos (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Nesse sentido, as proteínas de ligação à quitina (CBP) podem ser destacadas devido à sua capacidade de interagir com a quitina, o principal polissacarídeo estrutural da parede celular fúngica (KANOKWIROON *et al.*, 2008). A presença de quitina na parede celular fúngica (figura 5), onde desempenha papel estrutural relevante para a

sobrevivência celular, potencializa a quitina como um alvo promissor para novas drogas antifúngicas (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Figura 5: Estrutura da parede celular de *Candida albicans*.



Fonte: adaptado de GOW *et al.*,(2011). Duas camadas podem ser distinguidas na parede celular de *Candida albicans*. A camada externa é altamente enriquecida com polímeros de manose ligados a O e N (mananas) que são covalentemente associados a proteínas para formar glicoproteínas, enquanto a camada interna contém os polissacarídeos esqueléticos quitina e β-1,3-glucana, que conferem força e forma da célula. As proteínas da parede celular externa estão ligadas a essa estrutura da parede interna predominantemente por remanescentes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que estão ligados ao esqueleto por meio de um β-1,6-glucano mais flexível.

## ***Hipótese e objetivos***

*Nesta seção serão apresentadas a hipótese científica deste trabalho e os objetivos alcançados*

### 3 HIPÓTESE

Tendo em vista que a quitina é um polissacarídeo que desempenha um papel estrutural na parede celular de fungos filamentosos e leveduras, partimos do pressuposto de que enzimas ativas contra este polissacarídeo como as LPMOs, apresentam grande potencial biotecnológico no controle destes microrganismos. Portanto, para a caracterização da LPMO putativa codificada pela ORF CV2592 de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, bem como a avaliação do potencial biotecnológico dessa enzima, a expressão em larga escala da mesma em sistema heterólogo se faz necessária. Desta forma, esta dissertação foi desenvolvida com o propósito de testar as seguintes hipóteses:

1. A LPMO CV2592 de *C. violaceum* pode ser produzida com sucesso utilizando *Escherichia coli* como sistema de expressão heteróloga;
2. A enzima poderá ser purificada a partir do extrato de proteínas intracelulares de *E. coli* e apresentar-se funcional, permitindo sua caracterização bioquímica e biológica;
3. A LPMO é ativa contra *Candida* spp, podendo constituir uma ferramenta biotecnológica no controle deste patógeno.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Expressar de forma solúvel e purificar uma LPMO recombinante de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, a fim de se avaliar a atividade enzimática e antifúngica da proteína recombinante.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Expressar na forma solúvel e purificar a proteína recombinante
- Caracterizar a rCvLPMO-SUMO bioquimicamente
- Avaliar a atividade de rCvLPMO-SUMO contra espécies de *Candida* spp.
- Propor um mecanismo de ação para os efeitos biológicos de rCvLPMO-SUMO sobre *Candida* spp.
- Avaliar possíveis alterações morfológicas nas células de *Candida* expostas a rCvLPMO-SUMO.

## ***Materiais e Métodos***

*Nesta seção serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a expressão, purificação, caracterização bioquímica e atividade anti-Candida de rCvLPMO-SUMO*

## 5 MATERIAIS

### 5.1 Cepas de bactérias e fungos

Células de *E. coli* BL21(DE3) foram utilizadas para expressão da proteína de fusão rCvLPMO-SUMO. As leveduras patogênicas *Candida albicans* estirpe ATCC 10231 e *Candida parapsilosis* estirpe ATCC 22019 foram cedidas pelo Laboratório de Proteínas Tóxicas (Labtox) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. *Candida albicans* (estirpes ATCC 90028, 64129, 44858 e 90029), *Candida parapsilosis* estirpe ATCC 90018 e *Candida tropicalis* (estirpes ATCC 13083 e 750) foram provenientes da coleção do Laboratório de Genética Molecular (LabGeM) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Essas estirpes foram utilizadas nos ensaios de atividade anti-*Candida*. Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor pMAL-c5x:TEV para produção da protease TEV utilizadas neste estudo, foram cedidas pelo Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Proteínas (LEMAP) do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

### 5.2 Plasmídeos e sequências codificadoras

A sequência codificadora sintética referente à ORF CV2592 foi produzida com códons otimizados para expressão em *E. coli*, sendo retirada a sequência correspondente ao peptídeo sinal (Anexos A e B). O inserto foi introduzido em plasmídeo pET-SUMO(Invitrogen™), com o sítio para protease Trombina trocado para um sítio para a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*). Todo o processo de síntese dos genes sintéticos e produção dos plasmídeos de expressão foi realizado pela empresa GenOne Biotechnologies (<http://www.genone.com.br/>).

### 5.3 Reagentes e demais materiais

Para as culturas de bactérias foram utilizados os meios LB ágar e LB caldo adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para a cultura das leveduras e ensaios de atividade antifúngica utilizou-se o meio de cultura sabouraud dextrose ágar para as culturas em placas e sabouraud dextrose caldo para as culturas líquidas, ambos adquiridos da empresa Kasvi® (Curitiba, PR, Brasil). Os antimicrobianos utilizados nos ensaios microbiológicos foram obtidos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Nos experimentos de eletroforese em gel de poli-acrilamida foi utilizado marcador de massa molecular de proteínas PageRuler™ Prestained Protein (Thermo Fisher Scientific™, Rockford, EUA). Para indução

da expressão da proteína recombinante foi utilizado o IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo), um mimetizador molecular da alolactose, metabólito da lactose que induz a transcrição do óperon *lac*, e, por sua vez é utilizado para induzir a expressão de proteínas cujos genes estão sob o controle do operador *lac*. A matriz cromatográfica utilizada para cromatografia de afinidade a cobalto imobilizado foi a HisPur™ Cobalt Resin (Thermo Fisher Scientific™). Para cromatografia de afinidade em matriz de quitina, foi utilizada a quitina Poly-[1 $\rightarrow$ 4]- $\beta$ -D-N-acetyl-glucosamine, Practical Grade de Crab Shells C-7170, (Sigma-Aldrich). Para realização do ensaio de atividade “*peroxidase-like*” de LPMO foi utilizado o reagente 2,6 dimetoxifenol (Sigma-Aldrich). Os reagentes iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) e diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína - DCFH-DA (Sigma-Aldrich) foram utilizados nos ensaios de análise de investigação da integridade da membrana celular e produção de espécies reativas de oxigênio, respectivamente.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Análises *in silico* da sequência codificadora da ORF CV2592

Todas as sequências biológicas foram obtidas do banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O servidor CAZy (<http://www.cazy.org/>) foi utilizado para identificar a monooxigenase lítica. Os servidores SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) foram utilizados para prever a presença de peptídeo sinal. O servidor *Compute pI/Mw tool* ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), integrante da plataforma ExPASy, foi utilizado para calcular a massa molecular e o ponto isoelétrico (pI). A solubilidade de proteínas no ambiente intracelular de *Escherichia coli* foi predita pelo servidor *Recombinant Protein Solubility Prediction*, da University of Oklahoma (<http://www.biotech.ou.edu/>). A arquitetura de domínios foi analisada através do servidor CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>). WEB DiANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) foi utilizado para a predição da presença de pontes dissulfeto na estrutura da proteína.

### 6.2 Transformação de *Escherichia coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo pET-SUMO::Cv2592

O plasmídeo recombinante pET-SUMO::Cv2592 foi introduzido em células de *E. coli*, estirpe BL21(DE3), pelo tratamento com cloreto de cálcio, como descrito por Sambrook *et. al.* (1989). Após a transformação, as células foram recuperadas em 800 µL de meio SOC pré-aquecido à 37°C e mantidas à mesma temperatura por 1 h 30 min. Então, 100 µL das transformações foram aplicados em placas contendo meio LB Ágar suplementado com Canamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 h. Alguns clones transformados foram selecionados e mantidos em estoque contendo glicerol a 15%, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer a -80°C.

### 6.3 Otimização das condições de cultivo e indução da ORF Cv2592

Para otimizar as condições de expressão da proteína recombinante, induções em pequena escala foram realizadas. Foram avaliados os meios de cultura LB caldo, TB caldo e HDM caldo a fim de identificar aquele que propiciasse a melhor produção de proteína recombinante solúvel. As concentrações do indutor foram avaliadas para 0,2, 0,3 e 0,4 mM de IPTG, sendo elegida para induções em larga escala, a menor concentração capaz de induzir a expressão de proteína solúvel. Temperaturas de indução de 20, 25, 30 e 35 °C foram testadas.

Além disso, a influência do etanol na superexpressão de proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3), também foi investigada. Dessa forma, induções em pequena escala foram realizadas nas concentrações de 1 a 5% de etanol seguindo protocolo descrito por (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015). Estabelecidos os parâmetros ideais de expressão, células transformadas com o plasmídeo pET-SUMO::CV2592 foram inoculados em 10 mL de meio LB caldo suplementado com Canamicina (50 µg/mL), e mantidas a 37°C, sob agitação orbital de 180 rpm. Em seguida este pré-inóculo inicial foi inoculado em 500 mL de TB caldo (meio com maior produção de proteína recombinante) suplementado com Canamicina (50 µg/mL) e etanol a 3% (v/v) e incubado a 37 °C, sob agitação orbital de 180 rpm e as células mantidas nestas condições até que a cultura atingisse densidade óptica de aproximadamente 0,5 a 0,6, no comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, a temperatura foi alterada para 30°C e agitação para 130 rpm, passados 30 min a indução da expressão de rCvLPMO foi iniciada com adição de IPTG em uma concentração final de 0,2 mM, por 16 h (DE SOUSA *et al.*, 2017).

Ao término do período de incubação, a cultura foi centrifugada a  $6.000 \times g$ , por 10 min a 4°C. O meio de cultura (sobrenadante) foi descartado, os pellets celulares foram ressuspensos em tampão de lise Tris-HCl (50 mM) contendo NaCl (150 mM), EDTA (2 mM) e glicerol 10% (v/v) e as células foram submetidas à lise celular de acordo com o protocolo descrito por (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A fração solúvel obtida foi dialisada e armazenada em freezer a temperatura de -20°C. Os extratos solúvel e insolúvel foram analisados por SDS-PAGE a fim de se avaliar a expressão da proteína recombinante nas diferentes frações, i.e., solúvel e insolúvel.

#### **6.4 Purificação da proteína recombinante**

Duas estratégias de purificação de rCvLPMO-SUMO foram adotadas, sendo elas a cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) e a cromatografia de afinidade em matriz de quitina. Na primeira estratégia a proteína recombinante foi purificada utilizando a matriz cromatográfica HisPur™ Cobalt Resin (Thermo Fisher Scientific™) contendo cobalto imobilizado, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 300 mM e 10 mM imidazol. Proteínas que não interagiram com a matriz (Pico I; PI) foram eluidas com o tampão de equilíbrio em fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 5 mL por tubo, até que a absorbância a 280 nm do material eluído atingisse valor inferior ou igual a 0,010. Em seguida as proteínas retidas foram então eluidas com tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 150 mM em pH 7,4) em fluxo de 1 mL/min e frações

de 1 mL por tubo de coleta. As frações com  $A_{280} > 0,050$  foram reunidas e dialisadas contra tampão fosfato de sódio 50 mM contendo NaCl 300 mM e glicerol 10% (v/v), utilizando membranas de diálise com *cut off* de 14 kDa.

Para realização da segunda estratégia de purificação, o extrato total de proteínas solúveis foi dialisado contra tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo NaCl 1 M, durante 20 h, e, posteriormente, centrifugado a  $12.000 \times g$ , por 20 min a 4 °C para remover proteínas que se apresentavam insolúveis após a diálise. O sobrenadante límpido foi aplicado a uma matriz de quitina (1,7 cm x 16 cm; *Chitin Poly-[1→4]-β-D-N-acetyl-glucosamine, Pratical Grade From Crab Shells C-7170*, Sigma-Aldrich), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra permaneceu em contato com a matriz cromatográfica por cerca de 16 h, a temperatura de 6-8 °C. Proteínas que não interagiram com a matriz (Pico I; PI) foram eluidas com o tampão de equilíbrio, até que a  $A_{280}$  do eluato fosse menor que 0,050. Em seguida as proteínas retidas (PII) foram eluidas com ácido acético 0,1 M. As frações do PII com  $A_{280} > 0,100$  foram reunidas e dialisadas exaustivamente contra tampão fosfato de sódio 50 mM contendo NaCl 300 mM e glicerol 10% (v/v) utilizando membranas de diálise com *cut off* de 14 kDa. As frações obtidas em cada um dos picos, em ambas as estratégias cromatográficas utilizadas, foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com o protocolo descrito por (Laemmli, 1970).

## **6.5 Análises por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

Proteínas obtidas dos extratos totais, das frações coletadas nos ensaios cromatográficos e/ou a forma purificada da proteína recombinante foram analisadas pela técnica de eletroforese sob condições desnaturantes (SDS) e redutoras ( $\beta$ -mercaptoetanol), segundo (LAEMMLI, 1970). Os géis de empilhamento, na concentração final de 5% de acrilamida, e de separação, na concentração final de 15% de acrilamida, foram preparados de acordo com a tabela abaixo:

**Tabela 1** – Volume de reagentes para o preparo de géis de poliacrilamida entre placas de vidro

Reagentes	Gel de Empilhamento 5%	Gel de Separação 15%
H <sub>2</sub> O destilada	1,7 mL	1,15 mL
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8%)	415 mL	2,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	1,25 mL
Tris-HCl 1,0 M pH6,8	315 µL	-
SDS 10%	25 µL	50 µL
Persulfato de Amônio 10% (p/v)	25 µL	50 µL
TEMED	2,5 µL	2 µL

Fonte: Laemmli (1970)

As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,001% (m/v) e glicerol 10% (v/v)], aquecidas a 100 °C por 10 min, resfriadas à temperatura ambiente e aplicadas ao gel. Quando não usadas imediatamente, estas amostras foram armazenadas em freezer a - 20 °C. As corridas eletroforéticas foram realizadas à tensão final de 120 V e corrente constante de 40 mA, em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v). Após a corrida, a presença das proteínas foi verificada por imersão dos géis em solução corante contendo o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 preparada segundo protocolo descrito por (DYBALLA; METZGER, 2009).

## 6.6 Determinação da concentração de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), com base em curva padrão previamente preparada com albumina sérica bovina (BSA). A leitura das absorbâncias foi realizada no comprimento de onda de 595 nm, em espectrofotômetro, modelo Genesys 10 UV Scanning (Thermo Fisher Scientific) e a concentração de proteínas foi expressa em miligramas de proteína por mililitro de solução (mgP/mL).

### 6.7 Coordenação do cobre no sítio ativo de rCvLPMO-SUMO

rCvLPMO-SUMO foi saturada com cobre ( $\text{Cu(II)SO}_4$ ) por incubação de uma solução de rCvLPMO-SUMO pura em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 com excesso molar de 3 vezes de  $\text{Cu(II)SO}_4$  por 30 min a 4°C. O excesso de cobre que não foi coordenado no sítio ativo foi removido passando 1 mL da solução de proteína através de uma coluna de dessalinização PD MidiTrap G-25 (GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4. Para garantir que nenhum cobre livre fosse incluído na proteína dessalinizada, apenas o primeiro mililitro eluído da coluna foi usado nos experimentos de caracterização. A solução de proteína foi armazenada a -20 °C até uso posterior. O procedimento foi realizado à temperatura ambiente utilizando fluxo por gravidade.

### 6.8 Digestão de rCvLPMO-SUMO com a protease TEV

A fim de obter a proteína recombinante pura sem a proteína “tag” SUMO fusionada, rCvLPMO-SUMO foi digerida utilizando a protease TEV, cujo sítio de clivagem [ENLYFQ|S(G,A)] foi adicionado à sequência do plasmídeo pETSUMO::Cv2592 entre as sequências codificadoras da LPMO e da SUMO (anexo B), com o objetivo de separá-las ao final do processo de purificação. A reação de digestão consistiu de uma solução contendo 1 mg de protease TEV para cada 10 mg de rCvLPMO-SUMO em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, incubada à temperatura de 32° C por 3 h (WAUGH, 2011). A proteína recombinante digerida foi separada da tag SUMO e da protease TEV utilizada na digestão, por meio de cromatografia de afinidade a metal imobilizado utilizando a resina Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). Após a digestão, a proteína recombinante perde a His tag (fusionada a região N terminal da tag de solubilidade SUMO), e por sua vez, também sua capacidade de ligar-se a resina cromatográfica, sendo recuperada na fração de proteínas não adsorvidas após a mistura da digestão ser aplicada na coluna cromatográfica, ficando retidas a protease TEV (possui uma His tag) e a tag de solubilidade proteína SUMO. Em seguida os produtos da digestão foram analisados por SDS-PAGE seguindo o protocolo de Laemmli (1970).

## 6.9 Caracterização bioquímica

### 6.9.1 Espectrometria de massas

A fim de confirmar a expressão da proteína recombinante, as amostras purificadas de LPMO recombinante (obtida intracelularmente) foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, as bandas foram recortadas, digeridas com tripsina e os peptídeos foram extraídos do gel de acordo com Shevchenko *et al* (2007) e submetidas a análise por espectrometria de massas pela técnica de eletropulverização (*electrospray*). As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (Data Dependent Analysis – Análise Dependente de Dados).

### 6.9.2 Ensaio de atividade LPMO semelhante à peroxidase

A atividade peroxidásica de rCvLPMO-SUMO purificada foi analisada conforme relatado por (BRESLMAYR *et al.*, 2018). O ensaio consistiu em uma mistura de reação contendo 860  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de sódio 116 mM (pH 7,5), 100  $\mu\text{L}$  de solução estoque de 2,6-dimetoxifenol a 10 mM (Sigma-Aldrich), 20  $\mu\text{L}$  de solução estoque de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 5 mM e 20  $\mu\text{L}$  de rCv2592-SUMO a 0,2 mgP/mL, perfazendo um volume final de reação de 1000  $\mu\text{L}$ . Para o branco, a enzima foi desnaturada por incubação a 99 °C por 30 min. Esta mistura reacional (ainda sem proteína) foi incubada em banho-maria a 30° C por 15 min. Logo após, a proteína recombinante foi adicionada à mistura reacional e incubada por mais 5 min. Ao final do tempo de incubação, a absorbância foi verificada em espectrofotômetro, modelo Genesys 10 UV Scanning (Thermo Fisher Scientific), no comprimento de onda de 469 nm. Para calcular a atividade *peroxidase-like* de LPMO, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de rCvLPMO-SUMO capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de coerulignona ( $\epsilon_{469} = 53.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por min, sob as condições de reação utilizadas.

### 6.9.3 Efeito do pH sobre a atividade enzimática e estabilidade

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO, foi realizado ensaio conforme descrito no item 6.9.2, em tampão glicina-HCl 100 mM (pH 3,0), em tampão McIlvaine (ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) para faixa de pH 4,0 a 8,0, e em pH 9,0 e 10,0 em tampão glicina-NaOH 100 mM a 30 °C. Após incubação por 1 h à temperatura ambiente, o ensaio enzimático foi conduzido de acordo com o item 6.9.2.

A fim de avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade de rCvLPMO-SUMO, amostras da enzima foram incubadas com os tampões acima descritos por 24 h, à temperatura de 4 °C. Após esse período, as amostras foram dialisadas contra o tampão na qual a proteína apresentou maior atividade e o ensaio enzimático foi realizado conforme descrito no item 6.9.2. A atividade residual foi comparada com a atividade observada no controle negativo no qual a amostra não foi exposta a variações de pH.

#### 6.9.4 *Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática e estabilidade*

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, o ensaio enzimático com a rCvLPMO-SUMO foi conduzido em diferentes temperaturas (30 °C a 80 °C com intervalo de 10 °C).

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a estabilidade, amostras da proteína recombinante foram incubadas em diferentes temperaturas (30 °C a 100 °C com intervalos de 10 °C) por 1 h em banho-maria. Após a incubação, as amostras foram resfriadas e o ensaio de atividade enzimática foi conduzido de acordo com o item 6.9.2.

#### 6.9.5 *Efeito de íons metálicos e agentes químicos sobre a atividade enzimática*

Para avaliar o efeito de íons metálicos e agentes químicos, os ensaios foram conduzidos adicionando soluções de AlCl<sub>3</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CsCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, LaCl<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, AgCl, RbCl e ZnCl para concentração final de 5 mM; EDTA para concentração final de 5 mM; SDS para concentrações finais de 0,5, 1 e 2%; NaCl para concentrações finais de 0,5, 1, 1,5, e 2 M; β-mercaptoetanol para concentração final de 5 mM e DTT para concentração final de 100 mM. A atividade enzimática foi então conduzida de acordo com o item 6.9.2. A atividade da proteína recombinante tratada foi comparada com a atividade do controle, amostra livre de íons e agentes químicos.

#### 6.9.6 *Análises de Espectroscopia de Dicroísmo Circular*

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas em espectropolarímetro Jasco (JASCO, Tokio, Japão), modelo 815, em cubetas cilíndricas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Os espectros foram observados no intervalo de 190-240 nm, sob N<sub>2</sub> constante, com média de 8 varreduras.

A estabilidade térmica também foi avaliada por Espectroscopia de Dicroísmo Circular. Amostras da proteína purificada, na concentração de 0,2 mg/mL, foram submetidas, por 5 min, a diferentes temperaturas entre 20 °C e 95 °C. Em seguida, as amostras foram resfriadas para 20°C e um novo espectro foi gerado, a fim de se observar se a proteína é capaz de retornar a sua estrutura nativa.

## 6.10 Atividades biológicas

### 6.10.1 Efeito de CvLPMO sobre o crescimento de *Candida* spp

Para analisar a capacidade de rCvLPMO-SUMO de inibir o crescimento de células planctônicas de espécies de *Candida*, a técnica de micro diluição em caldo foi utilizada, de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), com modificações. A partir de um cultivo de 24 h das leveduras a serem testadas, realizado em ágar Sabouraud dextrose para as espécies de *Candida*, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial com absorvância de 0,1 no comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em caldo Sabouraud dextrose para obtenção de inóculo final contendo  $1 \times 10^3$  UFC/mL para as espécies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Em microplacas de cultura celular de 96 poços, 100 µL de inóculo foram adicionados a 100 µL da solução de rCvLPMO-SUMO para concentração final de 1 mgP/mL e realizado diluições seriadas nos poços seguintes até a concentração final de 0,007 mgP/mL. Em seguida as placas com as culturas foram incubadas por 24 h a uma temperatura de 35 °C ( $\pm 2$  °C) em estufa de cultura microbiológica. As leituras foram realizadas visualmente pela formação de colônias no fundo dos poços da placa.

### 6.10.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) de rCvLPMO-SUMO

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir completamente o crescimento das células de *Candida*, em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (CLSI, 2008). Para obter a CLM, alíquotas de 5 µL de amostras aplicadas aos poços onde não houve crescimento no ensaio de determinação da CIM, foram inoculadas em meio Sabouraud dextrose ágar (ROMEIRO; ROMEIRO, 2007). Após 24 h de incubação a 35 °C, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e a CLM foi

considerada como a menor concentração de rCvLPMO capaz de matar 99,9% das células testadas (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994). Os testes foram realizados em triplicata.

### 6.10.3 *Efeito de rCvLPMO-SUMO sobre a formação e degradação de biofilmes de Candida spp*

O efeito de rCvLPMO-SUMO sobre a formação de biofilme em *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi avaliado pela quantificação da biomassa produzida pelas células submetidas a ação de rCvLPMO-SUMO conforme metodologia descrita por (ARAÚJO *et al.*, 2019). Células de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram cultivadas em meio caldo Sabouraud dextrose por 24 h a 35 °C. Após o período de incubação, um inóculo contendo uma densidade celular de  $10^6$  UFC/mL foi preparado, por meio de medida de absorvância em comprimento de onda de 600 nm igual a 0,1, que corresponde a uma densidade em torno de  $10^6$  células/mL. Em placas de cultura celular de 96 poços, 100  $\mu$ L do inóculo foram inoculados com a proteína rCvLPMO-SUMO para concentrações finais de 32  $\mu$ g/mL (CIM) e 64  $\mu$ g/mL (CLM) em *Candida albicans* e para concentrações finais de 64  $\mu$ g/mL (CIM) e 128  $\mu$ g/mL (CLM) em *Candida parapsilosis*. Um controle negativo foi preparado utilizando solução salina (NaCl 0,15 M) tamponada com PBS (50 mM) e um controle positivo utilizando fluconazol a uma concentração final de 128  $\mu$ g/mL. As placas com a cultura de células foram incubadas à temperatura de 35°C sob agitação orbital (75 rpm) por 24 h. Após as 24 h, a cultura foi centrifugada a 4.000 g, 4°C, por 10 min, e o meio de cultura foi descartado. Os poços foram lavados duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,15 M) para garantir que apenas o biofilme formado permanecesse nos poços. As placas foram secas em estufa de secagem a 35 °C durante 30 min e em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução aquosa de cristal violeta a 0,4 % (m/v). Após 45 min de incubação, o excesso de cristal violeta foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com solução salina (NaCl 0,15 M). O corante remanescente nos poços, complexado com o biofilme, foi solubilizado com 200  $\mu$ L de uma solução de ácido acético glacial a 33% (v/v). Após 15 min, as leituras de absorvância a 570 nm foram feitas usando um leitor de microplacas automatizado (Epoch, BioTek, EUA). Para o cálculo da inibição da formação de biofilme considerou-se a absorvância registrada nos controles positivo e negativo. Os dados de absorvância registrados para o controle negativo foram considerados como 100% da capacidade de formação de biofilme.

Para avaliar a capacidade de rCvLPMO-SUMO de degradar um biofilme pré-formado, alíquotas de 100  $\mu$ L do inóculo de células ( $10^6$  UFC/mL) foram incubadas em placas

de cultura celular de 96 poços a 35 °C por 24 h sob agitação orbital (75 rpm). Após o período de incubação, o sobrenadante contendo o meio de cultura e as células planctônicas foi descartado e os poços lavados duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,15 M). Ao biofilme formado nos poços foram adicionados 200 µL de uma solução salina estéril (NaCl 0,15 M) tamponada com PBS (50 mM, pH 7,4) contendo rCvLPMO-SUMO para as concentrações finais de 32 µg/mL (CIM) e 64 µg/mL (CLM) para os biofilmes formados por *Candida albicans* e para as concentrações finais de 64 µg/mL (CIM) e 128 µg/mL (CLM) para os biofilmes formados por *Candida parapsilosis*. Um controle negativo foi preparado contendo apenas o inóculo de células e a solução salina estéril (NaCl 0,15 M) tamponada com PBS (50 mM, pH 7,4). O controle positivo foi preparado a partir do inóculo de células e fluconazol na concentração final de 128 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C e em seguida as soluções nos poços foram descartadas, e os poços foram lavados duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,15 M). À biomassa de biofilme remanescente nos poços foi adicionada uma solução de cristal violeta a 0,4% (m/v) e incubado por 15 min sendo em seguida descartado o excesso de corante e os poços lavados duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,15 M), o biofilme complexado com cristal violeta foi dissolvido em solução de ácido acético glacial a 33% (v/v). Após 15 min, as leituras das absorbâncias a 570 nm foram feitas usando um leitor de microplacas automatizado (Epoch, BioTek, EUA). Para o cálculo de degradação de biofilme considerou-se a absorbância registrada nos controles positivo e negativo. Os dados de absorbância registrados para o controle negativo e positivo foram considerados como 0% e 100% respectivamente da capacidade de degradação de biofilme.

#### 6.10.4 *Efeito do tempo de exposição a rCvLPMO sobre a viabilidade de Candida spp.*

O efeito do tempo de exposição foi determinado para as cepas *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, cujo crescimento foi inviável na presença de rCvLPMO-SUMO nas concentrações testadas conforme descrito por (GIL-ALONSO *et al.*, 2015, 2016). As cepas foram previamente cultivadas em meio de cultura caldo Sabouraud por 16 h a 35 °C. A partir desta cultura inicial, foi preparado um inóculo em caldo Sabouraud 2x concentrado com uma densidade celular de 10<sup>3</sup> UFC/mL, e em microtubos estéreis de 2 mL foram adicionados os inóculos e adicionados a proteína rCvLPMO-SUMO para as concentrações finais de 32 µg/mL (CIM) e 64 µg/mL (CLM) em *Candida albicans* e para as concentrações finais de 64 µg/mL (CIM) e 128µg/mL (CLM) em *Candida parapsilosis*. As culturas em microtubos foram incubadas a 35 °C e nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, e 24 h

foram coletadas alíquotas de 5 µL diluídas em série em solução salina (NaCl 0,15 M) e plaqueadas em meio ágar Sabouraud para contagem de células viáveis. Como controle foram utilizadas culturas dos microrganismos testados sem tratamento. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± EPM. A análise de variância foi realizada por meio do pós-teste de Dunnett com  $p < 0,05$ .

#### **6.10.5 Investigação do mecanismo de ação de rCvLPMO-SUMO na inibição de *Candida spp.***

##### **6.10.5.1 Investigação de integridade membrana celular**

Foi investigada a capacidade de rCvLPMO-SUMO atuar causando danos na parede celular, considerando que esta é uma enzima ativa na despolimerização de quitina, um polissacarídeo presente na parede celular de fungos filamentosos e leveduras. Células das leveduras patogênicas *Candida albicans* estirpe ATCC 10231 e *Candida parapsilosis* estirpe ATCC 22019 foram utilizadas neste ensaio. O ensaio consistiu na exposição de células da levedura em suspensão na densidade de  $1 \times 10^6$  células por mililitro em 5 mL de caldo Sabouraud em três grupos distintos. Ao primeiro grupo, controle negativo, nenhum aditivo químico ou tratamento físico foi realizado, ao grupo tratamento foi adicionada a proteína rCvLPMO-SUMO na concentração letal mínima-CLM (64 µg/mL e 128 µg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis* respectivamente), e ao grupo controle positivo foi adicionado etanol para a concentração final de 50% (v/v), e incubados a 35 °C por 4 h. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (4.000 g por 10 min a 4° C), o meio de cultura foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em 50 µL de solução salina estéril (NaCl 0,15 M). Para analisar a integridade da membrana celular conforme descrito por (JEAN STRUELENS *et al.*, 2018; KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014a) foi adicionado à suspensão de células o fluoróforo iodeto de propídio na concentração final de 1 mM e incubada por 15 min ao abrigo da luz para evitar a degradação do fluoróforo. Após o período de incubação, as células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX 60 System; comprimento de onda de excitação, 490 nm; comprimento de onda de emissão, 520 nm). As células com membrana danificada ou permeabilizada foram observadas por emissão de fluorescência vermelha que se dá pela interação do fluoróforo com o DNA das células. Nas células com membrana celular íntegra, o fluoróforo não consegue penetrar nas células e interagir com o DNA, portanto, nestas células não é observada a emissão de fluorescência (ZHANG *et al.*, 2018).

#### 6.10.5.2 Investigação de estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio

O ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio foi realizado usando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), um corante sensível a espécies reativas de oxigênio (ARANDA *et al.*, 2013; MAURYA *et al.*, 2011). Após incubação (4 h, 37 °C) de *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 com 64 µg/mL e 128 µg/mL de rCvLPMO respectivamente, NaCl 0,15 M (controle negativo) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM. Após o período de incubação as células foram coletadas por centrifugação (4.000 g, 4°C por 10 min) e lavadas com NaCl 0,15 M, coletadas por centrifugação, ressuspensas em 50 µL de solução salina estéril (NaCl 0,15 M) e então incubadas com DCFH-DA 10 µM a 37 °C por 30 min. As células foram lavadas duas vezes com NaCl 0,15 M e visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus System BX 60; comprimento de onda de excitação, 488 nm; comprimento de onda de emissão, 525 nm)(ARAÚJO *et al.*, 2019).

#### 6.10.6 Análise de alterações morfológicas nas células tratadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão

O ensaio para verificar possíveis alterações morfológicas foi realizado em *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Células de ambas as espécies foram incubadas com rCvLPMO-SUMO conforme descrito no item 6.10.1. As células tratadas foram preparadas para visualização por microscopia eletrônica de transmissão conforme (JAIANA *et al.*, 2022). Volumes iguais do fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4) e da suspensão de células da levedura na densidade de 10<sup>6</sup> UFC/mL, tratadas com rCvLPMO-SUMO e não tratadas, foram colocados em microtubos de 2 mL, mantendo-se a mistura a 4 °C por toda a noite até o dia seguinte (BOZZOLA *et al.*, 1999). Foram realizadas quatro lavagens nas amostras, em que a primeira foi feita com o fixador e as outras três lavagens com tampão cacodilato de sódio, 0,2 M, pH 7,2. Entre cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 4.000 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante removido. O “pellet” obtido foi ressuspensão na lavagem seguinte. Essas lavagens permitem que contaminantes menores não interfiram no campo de visão, restringindo as observações às células de leveduras. Uma gota do “pellet” obtido na lavagem final foi depositada sobre a grade própria para MET, retirando-se o excesso com papel de filtro após 3 minutos. Em seguida, uma gota do contrastante, ácido fosfotúngstico, foi adicionada; após 3 min, o excesso foi removido. As grades prontas foram encaminhadas ao microscópio eletrônico de transmissão (modelo VEGA3

TESCAN) e visualizadas sob velocidade de aceleração de elétrons de 30 Kv em incrementos acima de 5000x, para que detalhes da morfologia ficassem visíveis.

## ***Resultados e discussão***

*Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho e a discussão destes resultados comparativamente ao estado da arte da pesquisa com LPMOs*

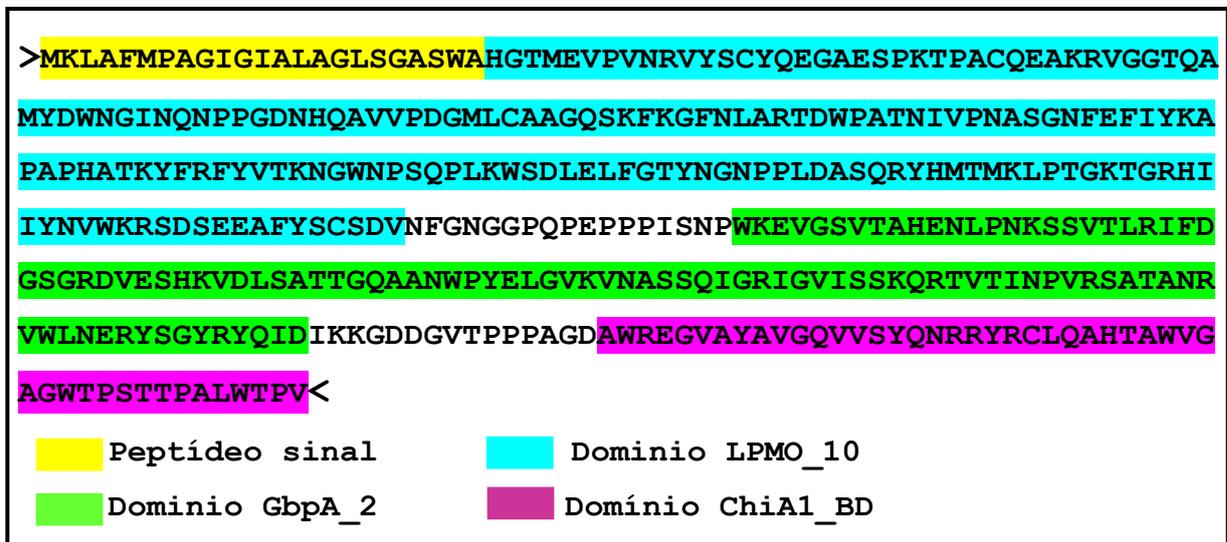


A predição da sequência primária do peptídeo sinal de CvLPMO foi fundamental na projeção dos cassetes de expressão destinados ao vetor pET-SUMO:Cv2592. Nessa estratégia, faz-se a remoção desses resíduos e considera-se apenas a sequência primária da proteína madura, já que o objetivo é que a proteína seja expressa e mantida no ambiente intracelular de *E. coli* para então ser recuperada por meio de lise celular.

### 7.1.2 Predição de domínios

A busca por domínios conservados no CDD (Conserved Domain Database) com a sequência primária (figura 7) da proteína madura mostrou que a LPMO codificada pela ORF CV2592 apresenta um domínio catalítico LPMO\_10 (número de acesso no CDD: [pfam03067](#)) referente aos resíduos 24 a 205 na região N-terminal, seguido por um domínio de ligação a N-acetilglicosamina denominado GbpA\_2 (número de acesso no CDD: [pfam18416](#)) referente aos resíduos 223 a 324, e um domínio de ligação à quitina do tipo 1 denominado ChiA1\_BD (número de acesso no CDD: [cd12214](#)) referente aos resíduos 340 a 386. A proteína é aqui referida como CvLPMO e apresenta ponto isoelétrico e a massa molecular monoisotópica teórica de 9,1 e 42,2 kDa, respectivamente.

Figura 7 - Representação dos domínios conservados na sequência primária da *rCvLPMO*



Fonte: elaborado pelo autor. Na cor amarela está o peptídeo sinal (resíduos 1-23) da *CvLPMO*, na cor azul está representado o domínio LPMO\_10 (resíduos 24-205), na cor verde o domínio GbpA\_2 (resíduos 223-324) e na cor lilás estão os resíduos do domínio de ligação à quitina ChiA1\_DB (resíduos 340-386).

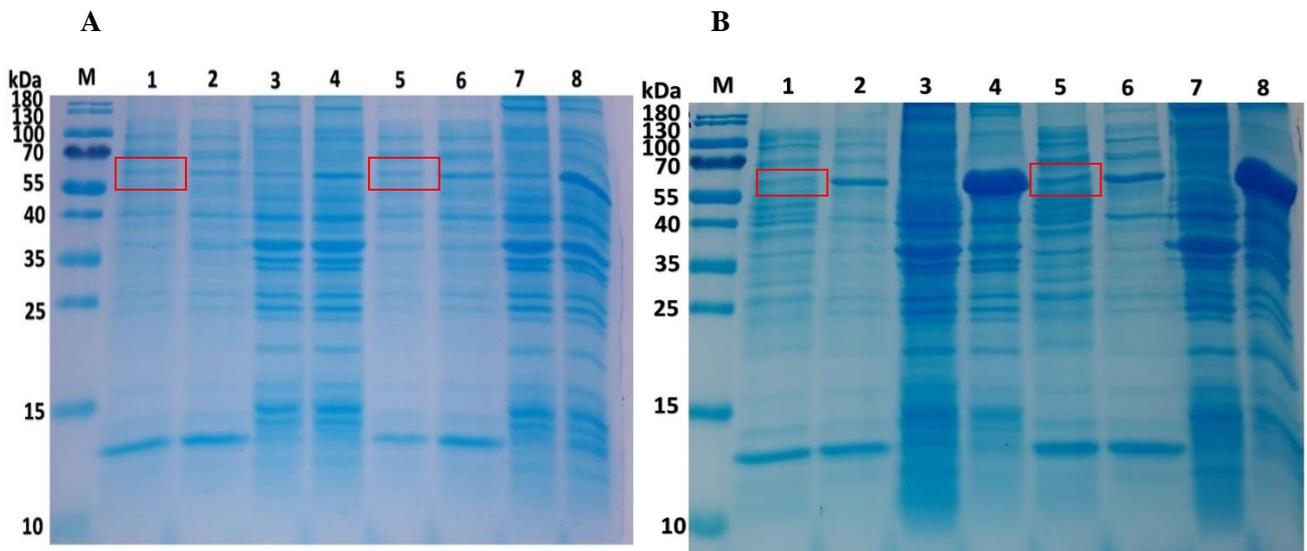
O servidor DiANNA 1.1 web server foi utilizado para predizer a presença de pontes dissulfeto na estrutura de CvLPMO. 5 resíduos de cisteínas em sua estrutura primária e duas

pontes dissulfeto previstas para estrutura tridimensional sendo uma entre os resíduos Cys<sup>37</sup> e Cys<sup>202</sup> (NRVYSCYQEGA - EAFYSCSDVNF) e outra entre os resíduos Cys<sup>87</sup> e Cys<sup>362</sup> (PDGMLCAAGQS - NRRYRCLQAHT) foram detectadas.

## 7.2 Otimização das condições de cultivo

A análise por SDS-PAGE dos extratos totais de proteínas solúveis das induções em diferentes temperaturas revelou diferenças visualmente distinguíveis nos níveis de expressão de rCvLPMO-SUMO. A temperatura de indução de 30 °C produziu o melhor resultado em relação à produção de proteína recombinante solúvel (figura 8-B), quando comparado à indução nas temperaturas de 20 e 25 °C (figura 8-A), no entanto, é visível que mesmo em condições otimizadas de temperatura, uma grande parte da proteína recombinante se mantém insolúvel na forma de corpos de inclusão.

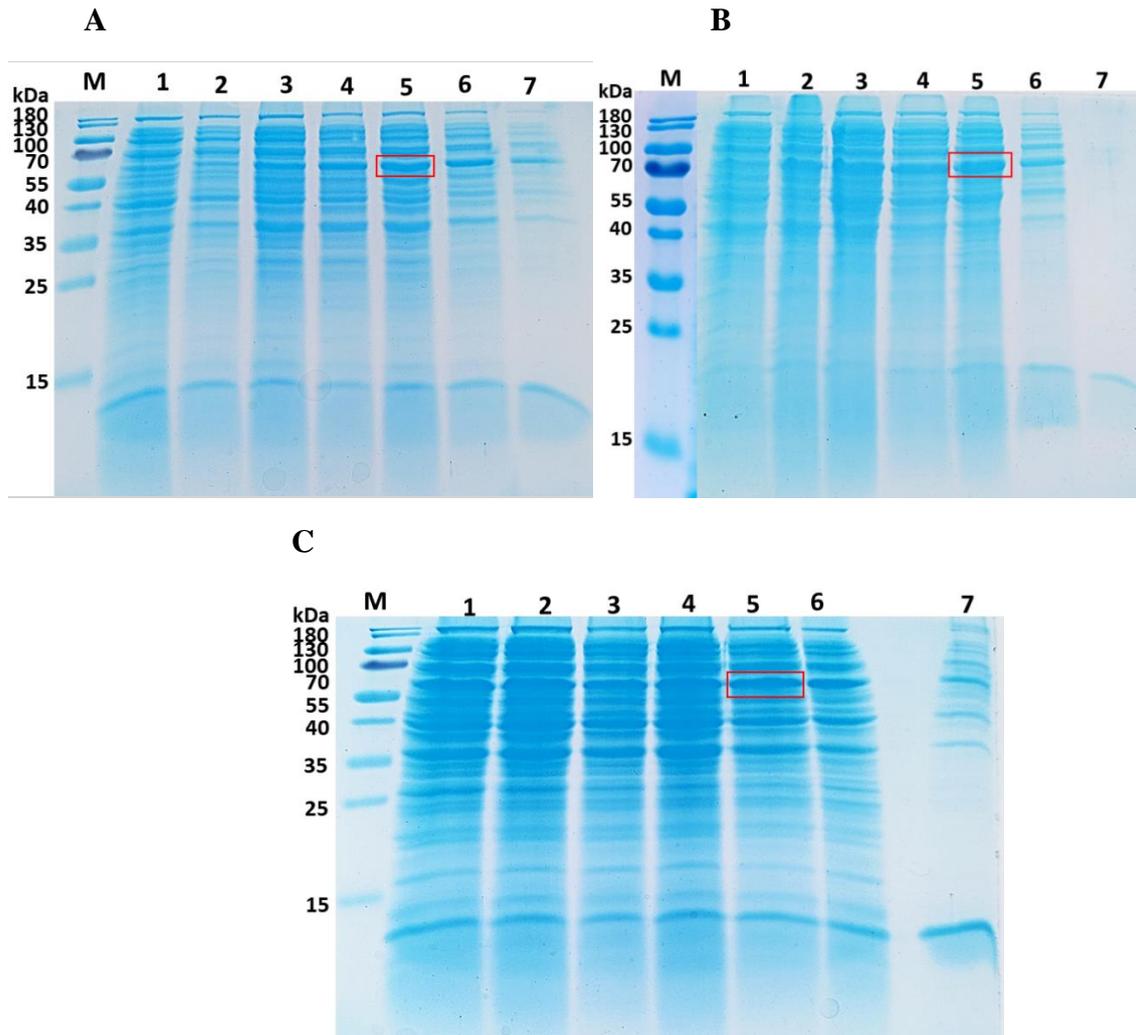
Figura 8: Análise em gel de SDS-PAGE da indução piloto da expressão de rCvLPMO-SUMO, para determinação da temperatura ótima de indução.



**Fonte:** elaborado pelo autor. (A) induções nas temperaturas de 20 e 25 °C em (B) induções nas temperaturas de 30 e 35 °C. Em (A) M-marcador de peso molecular; 1- ETS controle (20°C); 2- ETS induzido (20°C); 3- ETI controle (20°C); 4- ETI induzido(20°C); 5-- ETS controle (25°C); 6- ETS induzido (25°C); 7- ETI controle (25°C); 8- ETI induzido (25°C). (B) M-marcador de peso molecular; 1- ETS controle (30°C); 2- ETS induzido (30°C); 3- ETI controle (30°C); 4- ETI induzido(30°C); 5- ETS controle (35°C); 6- ETS induzido (35°C); 7- ETI controle (35°C); 8- ETI induzido (35°C). Os quadros vermelhos indicam a banda referente a proteína recombinante.

Os diferentes meios de cultura testados (LB caldo, TB e HDM) mostraram performances variadas quanto à produção de proteína recombinante. LB é o meio de cultura mais comumente utilizado para o cultivo de *E. coli*, mas o crescimento celular estaciona em baixa densidade devido à presença de quantidades escassas de carboidratos e cátions bivalentes neste meio de cultura (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Assim, é provável que o aumento da quantidade de peptona ou extrato de levedura e suplementação de cátions bivalentes leve a densidades celulares mais altas (RATON; NEW; WASHINGTON, 2004; STUDIER, 2005). No entanto, outros meios de cultura podem, em casos específicos, apresentar melhores resultados. No caso de rCvLPMO-SUMO, o meio TB (Terrific Broth) apresentou melhor performance na produção de proteína recombinante, isso pode ser explicado pelo fato deste meio ser muito rico em nutrientes, pois sua formulação contém concentrações aumentadas de triptona, extrato de levedura e glicerol como fonte de carbono, e por isso possibilita uma maior densidade celular quando comparado ao LB caldo (SHAFIEE; RABBANI; JAHANIAN-NAJAFABADI, 2017). Em um estudo com um pequeno peptídeo (LI *et al.*, 2009) demonstraram que uma cultura de alta densidade celular utilizando meio Terrific Broth, apresentou uma massa úmida dez vezes maior do que a obtida em caldo LB.

Figura 9: Análise em gel de SDS-PAGE de indução piloto da expressão de rCvLPMO-SUMO, para determinação da melhor condição de cultivo (meio de cultura e concentração de etanol) para produção da proteína recombinante.



Fonte: elaborado pelo autor. (A) induções em meio de cultura LB caldo; (B) induções em meio de cultura TB caldo e em (C) induções em meio HDM caldo. Em (A), (B) e (C) M-marcador de peso molecular; 1- ETS controle- 0% etanol; 2- ETS induzido- 0% etanol; 3- ETS induzido- 1% etanol; 4- ETS induzido- 2% etanol; 5- ETS induzido- 3% etanol; 6- ETS induzido- 4% etanol; 7- ETS induzido- 5% etanol. Os quadros vermelhos indicam a banda referente a proteína recombinante.

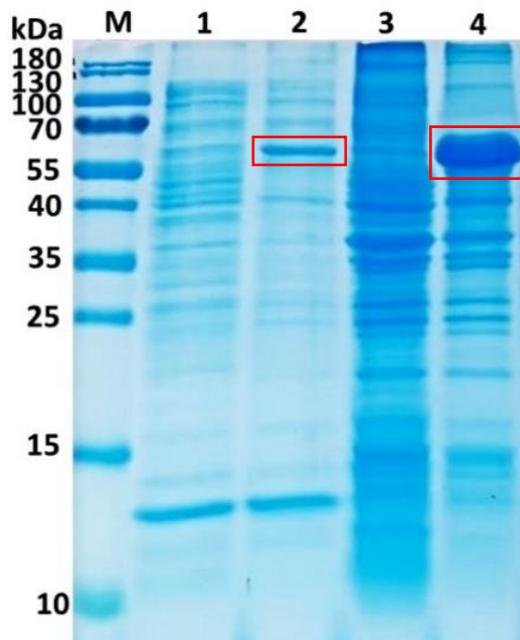
A produção de proteínas recombinantes solúveis em um hospedeiro simples como *E. coli* pode ser um desafio, pois muitas proteínas são expressas e formam corpos de inclusão altamente insolúveis, dificultando a recuperação de proteínas bioativas (SINGHVI *et al.*, 2021). Por este motivo, há um grande interesse no desenvolvimento de protocolos de expressão heteróloga que aumentem a expressão de proteínas solúveis ou a recuperação de proteínas a partir de corpos de inclusão. Dessa forma (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015) desenvolveram um protocolo de expressão de proteínas recombinantes utilizando etanol como agente indutor de superexpressão de proteína solúvel. O mecanismo pelo qual esse aumento de expressão ocorre não é conhecido, mas (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015) sugerem que o etanol pode exercer um efeito semelhante ao choque térmico levando à produção de chaperonas moleculares que podem auxiliar no correto dobramento de proteínas (BARROSO; ELHOLM; FLATMARK, 2003; KUSANO *et al.*, 1999; THOMAS; BANEYX, 1996) e, portanto, acarretando em aumento de expressão de proteína solúvel. O efeito do etanol na superexpressão de *rCvLPMO-SUMO* foi analisado em cada um dos meios testados e a concentração de 3% (v/v) de etanol em meio de cultura Terrific Broth apresentou o melhor resultado em relação a expressão de proteína recombinante na fração solúvel, resultado semelhante ao encontrado por (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015).

### 7.3 Expressão de rCvLPMO-SUMO

Células de *E. coli* BL21 (DE3) foram eficientemente transformadas com o plasmídeo pET-SUMO:CV2592, inoculadas em placas de LB ágar suplementado com Canamicina (50µg/mL) e após 16h de incubação numerosas colônias foram observadas. A expressão da ORF CV2592 codificando a LPMO recombinante foi alcançada com sucesso pela adição de IPTG na concentração de 0,2 mM em meio de cultura TB caldo durante 16 h a temperatura de 30 °C. A atividade “*peroxidase-like*” de LPMO foi detectada no extrato total solúvel de proteínas das células induzidas confirmando a presença da LPMO recombinante na sua forma ativa. Uma pequena atividade no extrato total solúvel de proteínas das induções controle não induzidas foi detectada, no entanto, essa atividade pode ser explicada pelo vazamento na expressão (“leaky expression”), ou seja, expressão sem adição do indutor IPTG. É proposto na literatura que o vazamento de expressão é uma característica dos sistemas de expressão controlados pelo óperon lac, sendo relacionado a uma possível resposta ao esgotamento de nutrientes no meio de cultura (GROSSMAN *et al.*, 1998). A expressão de *rCvLPMO-SUMO* foi observada por eletroforese pela presença de uma banda proeminente

correspondendo à massa molecular monoisotópica teórica de 54,9 kDa nos extratos totais induzidos solúveis (ETS) e insolúveis (ETI) (Figura 10), sendo possível observar que a maior parte da proteína recombinante foi encontrada na fração insolúvel na forma de corpos de inclusão.

Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), evidenciando o perfil de proteínas em diferentes extratos.

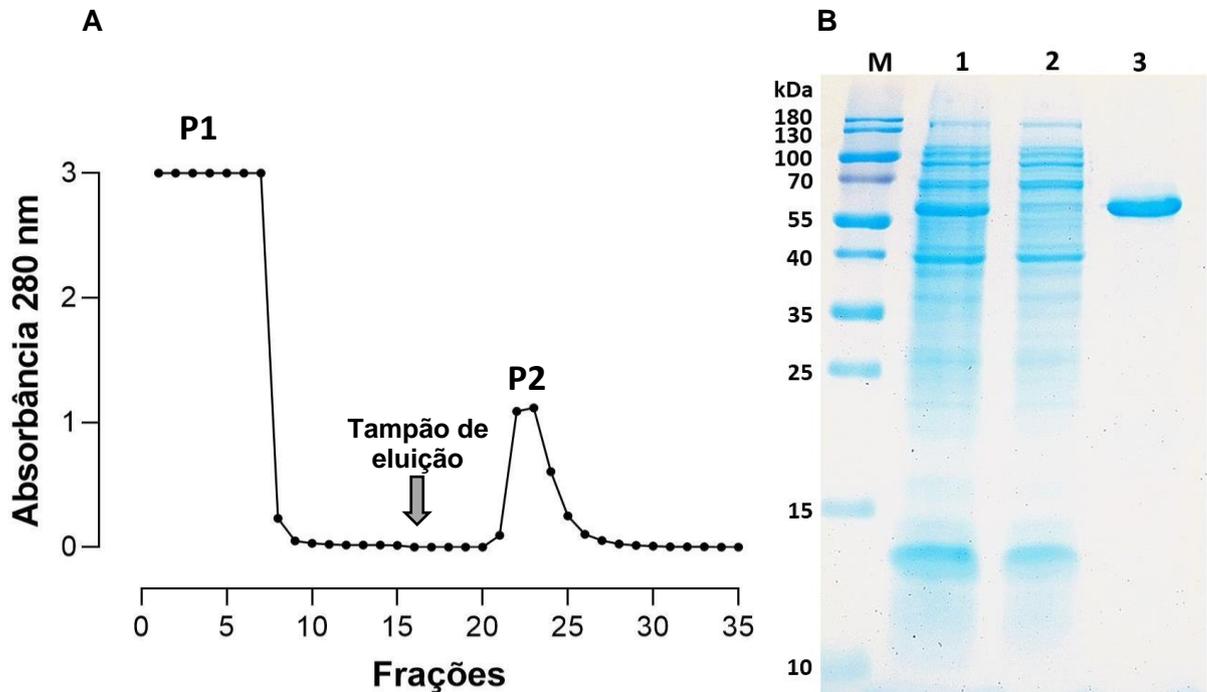


Fonte: elaborada pelo autor. (M) o marcador de peso molecular, (1) ETS não induzido, (2) ETS induzido, (3) ETI não induzido e (4) ETI induzido. Os quadros vermelhos indicam a banda referente a proteína recombinante.

#### 7.4 Purificação de rCvLPMO-SUMO

Considerando que o plasmídeo pET-SUMO adiciona à proteína expressa uma sequência (6x His) correspondente a uma cauda “tag” de histidina, que possui alta afinidade de ligação a íons metálicos como cobre, cobalto e níquel. Proteínas expressas com a 6xHis tag podem ser purificadas por meio de cromatografia de afinidade a íon metálico imobilizado (IMAC). Em geral, o níquel II ( $\text{Ni}^{2+}$ ) é o íon metálico mais utilizado por possuir alta capacidade de ligação com a tag 6xHis (YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012). No entanto, neste caso uma matriz contendo cobalto imobilizado apresentou maior grau de pureza, quando comparada com as resinas contendo níquel imobilizado. A aplicação de 30 mL de um extrato total solúvel numa matriz de afinidade a cobalto imobilizado resultou em dois picos, P1 e P2 correspondendo às proteínas não adsorvidas e adsorvidas à matriz, respectivamente (Figura 11).

Figura 11: (A) perfil cromatográfico da Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado (IMAC); (B) eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).



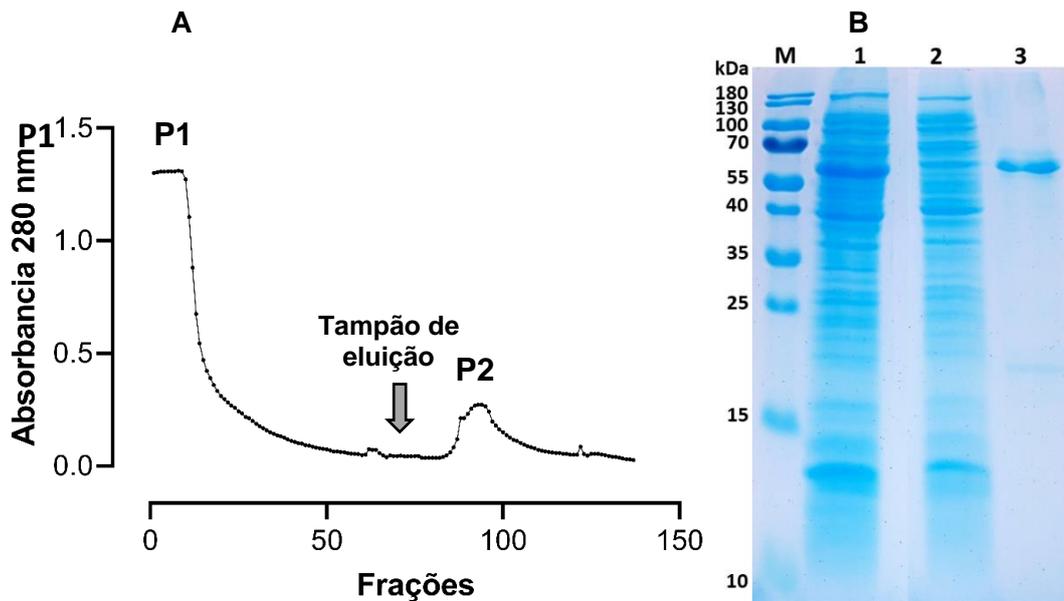
Fonte: elaborado pelo autor. (M) marcador de peso molecular; (1) extrato total solúvel de proteínas aplicados na matriz cromatográfica; (2) pico P1 correspondente à fração de proteínas não adsorvidas à matriz e (3) pico P2 correspondente à fração de proteínas adsorvidas.

A análise por SDS-PAGE das frações obtidas, demonstrou a presença de uma banda proeminente de massa molecular aparente de 56 kDa presente no ETS aplicado, a qual não foi observada no pico 1, correspondente à fração de proteínas não adsorvidas, eluidas com tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 50 mM contendo NaCl 300 mM e imidazol 10 mM em pH 7,4), e presente na forma de uma banda única na fração de proteínas adsorvidas eluidas com tampão de eluição (fosfato de sódio 50 mM contendo NaCl 300 mM e imidazol 150 mM em pH 7,4) correspondente ao pico 2. Dessa forma rCvLPMO-SUMO foi purificada com sucesso.

Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina foi realizada a fim de confirmar a funcionalidade do domínio de ligação à quitina ChiA1\_BD predito pelo CDD (Conserved Domain Database). O pico não retido (PI), eluído com o tampão de equilíbrio (acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo NaCl 1M), foi recuperado em alíquotas de 10 mL a um fluxo constante de 1 mL/min. Já o pico retido (PII), eluído com ácido acético 0,1 M, foi recuperado em alíquotas de 1,5 mL a um fluxo constante de 1 mL/min. A presença de proteínas nas frações obtidas foi

monitorada ao longo de todo processo cromatográfico, por leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm, como representado na Figura 12-A.

Figura 12: (A) perfil cromatográfico de Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina; (B) eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)



Fonte: elaborado pelo autor. (M) marcador de peso molecular, (1) o extrato total solúvel de proteínas aplicados na matriz cromatográfica; (2) o pico P1 correspondente à fração de proteínas não adsorvidas na matriz e (3) o pico P2 correspondente a fração de proteínas adsorvidas.

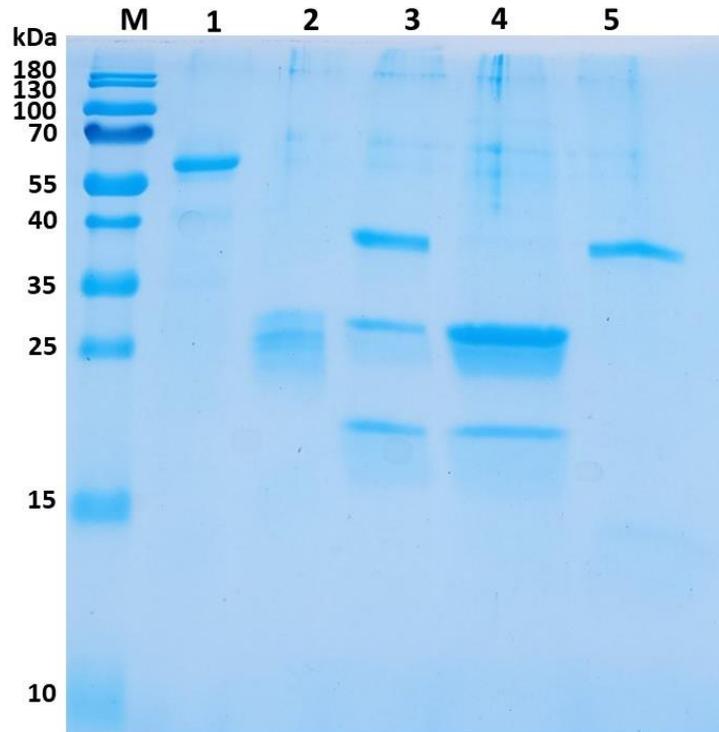
### 7.5 Dosagem de proteínas e rendimento

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). O rendimento proteico observado para a rCvLPMO-SUMO quando purificada por Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado foi de 9,3%, o que corresponde a 6,3 mg de proteína obtida a partir de um extrato total de proteínas solúveis contendo 67,5 mgP produzida em 1000 mL de cultura. Quando purificada por Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina o rendimento observado foi de 6,2% correspondendo a um total de 4,2 mgP por litro de cultura.

## 7.6 Digestão de rCvLPMO-SUMO com protease TEV

O plasmídeo pET-SUMO utilizado como vetor de expressão da ORF CV2592, que produz uma proteína denominada neste trabalho como rCvLPMO, adiciona à região C-terminal da proteína recombinante a proteína de fusão SUMO (**S**mall **U**biquitin-like **M**odifier) cuja função neste caso é aumentar a estabilidade proteica. As proteínas recombinantes expressas em *E. coli* podem não se dobrar adequadamente, formando agregados e precipitando como corpos de inclusão (BURGESS, 2009). Essa insolubilidade pode ser devido à presença de códons lidos de forma ineficiente por *E. coli*, diferenças entre os ribossomos eucarióticos e procarióticos, ou ausência de chaperonas moleculares apropriadas para o dobramento adequado de proteínas. Portanto, para purificar essas proteínas pode ser necessário fundir a proteína de interesse com um marcador de solubilidade, como SUMO ou MBP (**M**altose **B**inding **P**rotein) para aumentar a solubilidade da proteína. A proteína SUMO pode ser posteriormente clivada da proteína de interesse usando uma protease específica, como a Ulp1 peptidase. Neste caso, um sítio para protease TEV foi adicionado a sequência codificadora de rCvLPMO-SUMO para que a proteína SUMO pudesse ser clivada ao final do processo de purificação, e assim foi feito com sucesso, conforme metodologia descrita anteriormente no item 6.8. O resultado da reação de digestão é mostrado na figura 13.

Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) do resultado da digestão de rCvLPMO-SUMO com a protease TEV.

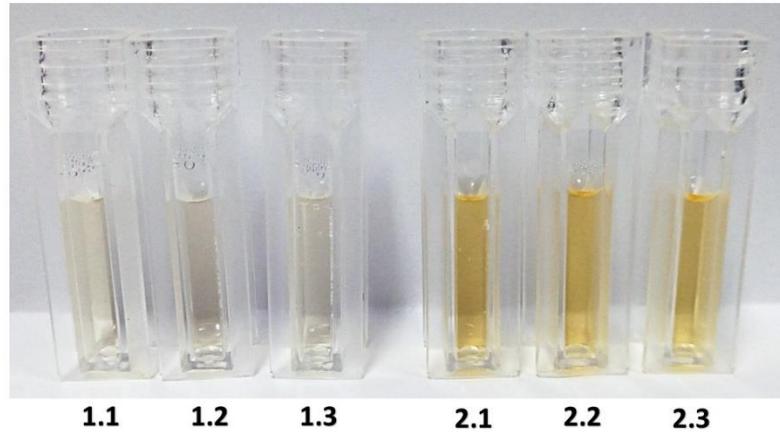


Fonte: elaborada pelo autor. (M) o marcador de peso molecular; (1) rCvLPMO-SUMO purificada; (2) protease TEV purificada; (3) reação de digestão de rCvLPMO-SUMO com protease TEV, as três bandas correspondem de cima para baixo a rCvLPMO, protease TEV, e proteína SUMO; (4) protease TEV+SUMO separadas de CvLPMO por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC); e (5) rCvLPMO purificada sem a proteína SUMO

### 7.7 Atividade “*peroxidase-like*” de LPMO

A atividade “*peroxidase-like*” de LPMO foi detectada por meio de ensaio utilizando o substrato 2,6 dimetoxifenol (2,6 DMP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) conforme metodologia descrita por (BRESLMAYR *et al.*, 2018). Neste ensaio o substrato sofre ação oxidativa da LPMO produzindo um intermediário 1-hidrocoerulignona que sofre uma segunda reação de oxidação e produz a coerulignona como produto final. A coerulignona é um produto cromogênico que pode ser detectado por espectrofotometria, com pico de absorvância em comprimento de onda de 469 nm e apresenta um coeficiente de extinção molar de 53.200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Assim, monitora-se a atividade da enzima medindo-se a formação de coerulignona neste ensaio aplicando a lei de Lambert-beer.

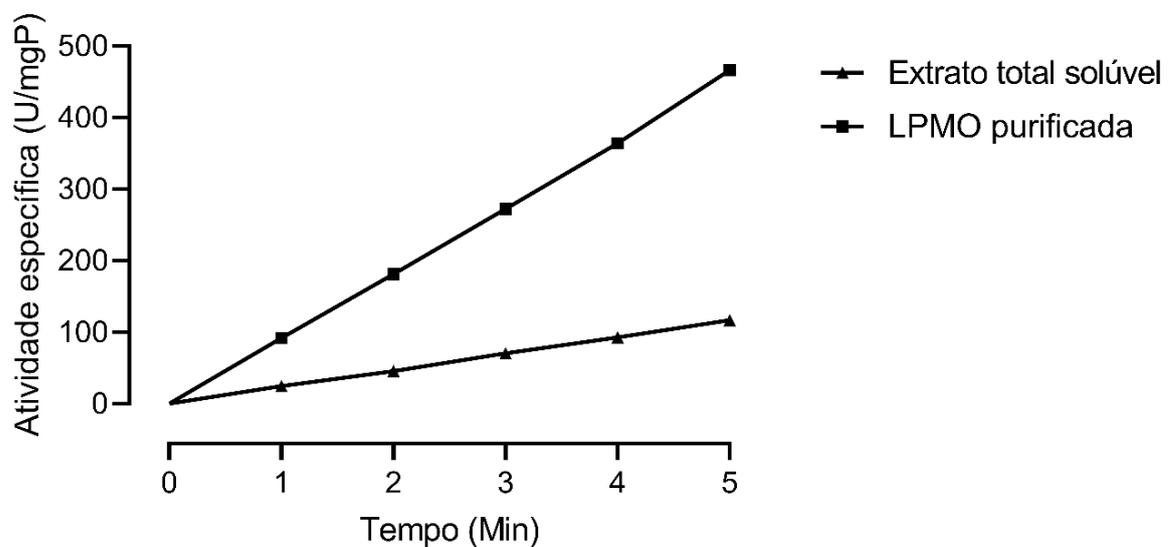
Figura14: Ensaio de atividade “*peroxidase-like*” de LPMO com rCvLPMO-SUMO purificada.



Fonte: elaborada pelo autor. Em 1.1, 1.2 e 1.3 triplicatas da reação desenvolvida na presença de rCvLPMO-SUMO inativada por aquecimento a 99 °C por 10 min (controle); em 2.1, 2.2 e 2.3 triplicatas da reação contendo rCvLPMO-SUMO nativa e funcional.

Uma unidade de atividade de LPMO foi definida como a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de coerulignona ( $\epsilon_{469}=53.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por minuto sob condições de reação. A proteína rCvLPMO-SUMO purificada apresentou uma média de atividade específica de 467,5 U/mgP, enquanto o extrato total solúvel de proteínas apresentou uma média de atividade específica de 117,3 U/mgP em pH 7,0 e temperatura de 30 °C (figura 15).

Figura15: Gráfico de atividade “*peroxidase-like*” de LPMO de rCvLPMO-SUMO.



Fonte: elaborado pelo autor

## 7.8 Análise por Espectrometria de Massas de rCvLPMO-SUMO

Para confirmar a identidade da LPMO recombinante, rCvLPMO-SUMO, a banda única da fração P2 (figura 9 B) referente à proteína recombinante foi excisada do gel de poliacrilamida e analisada por espectrometria de massas. Os peptídeos identificados (tabela 1) (quatorze no total) cobriram 45,3% da sequência da LPMO recombinante, e foram 100% idênticos à sequência de aminoácidos já conhecida (Figura 16).

**Tabela 2-** Peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry*) da sequência de aminoácidos de rCV2592, referente a banda de 56 kDa (P2) da figura 12-B

Peptídeo	Massa (Da)		Sequência <sup>1</sup>	Cobertura da sequência (%)
	Experimental	Calculada		
1	<b>4028.784</b>	3942.32	<sup>56</sup> VGGTQAMYDWNGINQNPPG D <sup>94</sup> NHQAVVPDGMLCAAGQSK	10,36
2	<b>2379.1133</b>	2380.56	<sup>151</sup> WSDLELFGTYNGNPPLDASQR <sup>172</sup>	5,44
3	<b>2119.0586</b>	2120.35	<sup>268</sup> VDLSATTGQAANWPYELGVK <sup>288</sup>	5,18
4	<b>1738.8638</b>	1739.91	<sup>360</sup> EGVAYAVGQVVS <sup>376</sup> YQNR	4,14
5	<b>1637.7797</b>	1638.76	<sup>343</sup> KGDDGVTPPPAGDAWR <sup>359</sup>	4,14
6	<b>1509.6847</b>	1510.58	<sup>344</sup> GDDGVTPPPAGDAWR <sup>359</sup>	3,88
7	<b>1493.7474</b>	1494.62	<sup>232</sup> EVGSVTAHENLPNK <sup>246</sup>	3,62
8	<b>1071.5865</b>	1072.27	<sup>190</sup> HIIYNVWK <sup>198</sup>	2,07
9	<b>930.4883</b>	931.02	<sup>289</sup> VNASSQIGR <sup>298</sup>	2,33
10	<b>898.5236</b>	899.06	<sup>309</sup> TVTINPVR <sup>317</sup>	2,07
11	<b>815.429</b>	815.93	<sup>324</sup> VWLNER <sup>330</sup>	1,55
12	<b>778.4225</b>	778.90	<sup>336</sup> YQIDIK <sup>342</sup>	1,55
13	<b>702.4276</b>	702.85	<sup>299</sup> IGVISSKQ <sup>307</sup>	2,07
14	<b>676.3657</b>	676.77	<sup>97</sup> GFNLAR <sup>102</sup>	1,55

<sup>1</sup>O número antes e depois de cada sequência indica a posição dos respectivos resíduos (relativo à Met<sup>1</sup>) na sequência de aminoácidos correspondente no NCBI

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 16: Peptídeos trípticos identificados por espectrometria de massas na sequência de rCvLPMO-SUMO

MKLA FMPAGIGIALAGLSGASWAHGTMEVPVNRVYSCYQEGAESP KTPACQEAKR<sup>5</sup>  
<sup>6</sup>VGGTQAMYDWNGINQNPPGDNHQAVVPDGMLCAAGQSK<sup>94</sup>FKGFNLARTDWPAT  
 NIVPNASGNFEFIYKAPAPHATKYFRFYVTKNGWNPSQPLK<sup>151</sup>WSDLELFGTYNGN  
 PPLDASQR<sup>172</sup>YHMTMKLPTGKTGR<sup>190</sup>HIIYNVWK<sup>198</sup>RSDSEEFYSCSDVNFNGG  
 PQPEPPISNPWKEVGSVTAHENLPNKSSVTLRIFDGSGRDVESHK<sup>268</sup>VDLSATTG  
 QANWPYELGVK<sup>288/289</sup>VNASSQIGR<sup>298/299</sup>IGVISSKQR<sup>308/309</sup>TVTINPVR<sup>317</sup>SATANR<sup>3</sup>  
<sup>24</sup>VWLNER<sup>330</sup>YSGYR<sup>336</sup>YQIDIK<sup>342/343</sup>KGDDGVTPPPAGDAWR<sup>359/360</sup>EGVAYAVGQV  
 VSYQNR<sup>376</sup>R YRCLQAHTAWVGAGWTPSTTPALWTPV

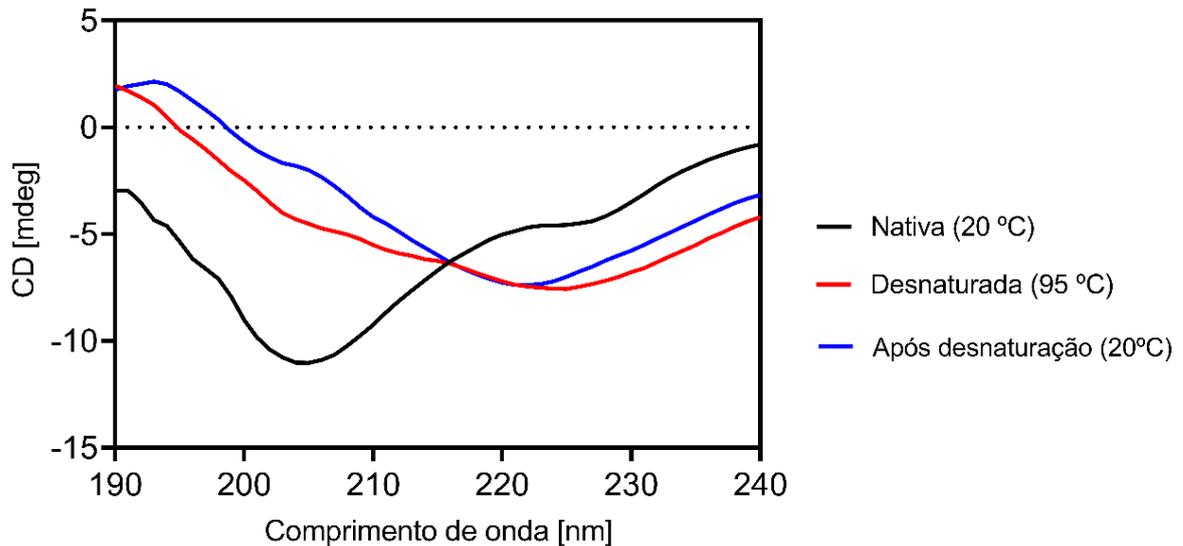
<sup>1</sup>O número antes e depois de cada sequência indica a posição dos respectivos resíduos (relativo à Met<sup>1</sup>) na sequência de aminoácidos correspondente no NCBI

Fonte: elaborado pelo autor

## 7.9 Análises de Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) baseia-se na absorção diferenciada da luz circular polarizada à esquerda e à direita por cromóforos que ou possuem quiralidade intrínseca ou são colocados em ambientes quirais. Proteínas possuem uma série de cromóforos que podem dar origem a sinais de CD característicos, com pequenas alterações exclusivas de cada proteína em estudo. Na região do ultravioleta distante (240-180 nm), que corresponde à absorção da ligação peptídica, o espectro de CD pode ser analisado para predizer o perfil de estruturas secundárias, como o conteúdo de hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$ , de determinada proteína (KELLY; PRICE, 2005). A forma da curva do espectro, bem como os comprimentos de onda máximo e mínimo de emissão, fornecem informações estruturais da proteína. Assim, por exemplo, os picos presentes na faixa de comprimento de onda de 200-250 (UV-distante) são geralmente característicos de um espectro em forma de “W”, com picos em torno de 222 e 208 nm, sendo indicativo da presença de estruturas em hélice  $\alpha$ . Já um espectro em forma de “V”, com pico em torno de 217-220 nm, indica a presença de estruturas em folha  $\beta$ . Varreduras no intervalo de comprimento de onda de 250 a 300 nm podem fornecer informações sobre a estrutura terciária (RANJBAR; GILL, 2009).

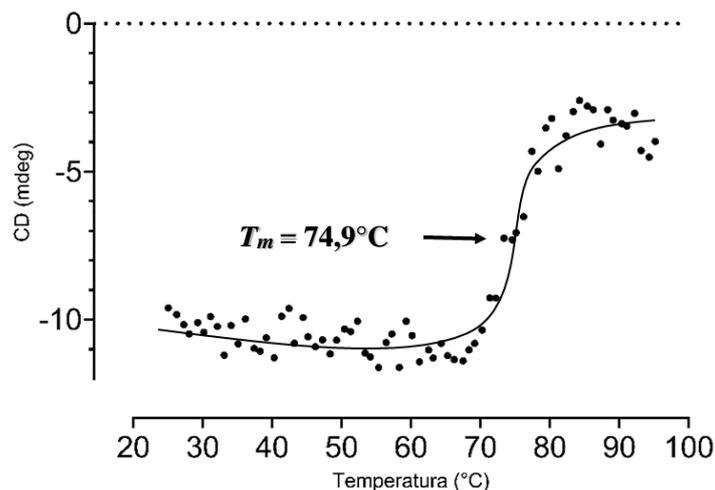
Figura 17: Análise do perfil de estruturas secundárias de rCvLPMO por espectroscopia de dicroísmo circular



Fonte: elaborado pelo autor

Além de fornecer dados sobre estrutura secundária, a espectroscopia de dicroísmo circular é bastante utilizada para acompanhar a estabilidade de uma proteína quando submetida a diferentes temperaturas, pois os espectros da proteína enovelada e em sua conformação desnaturada são bem diferentes. Na Figura 18 pode-se observar a transição para a desnaturação da rCvLPMO, onde as amostras foram incubadas por 5 min, a diferentes temperaturas entre 20 e 95 °C, com intervalos de 5 °C. A desnaturação da rCvLPMO expressa em *E. coli* foi observada em temperaturas a partir de 74,9 °C, quando o espectro tende a zero.

Figura 18: curva de desnaturação térmica de rCvLPMO na faixa de 20 a 95 °C

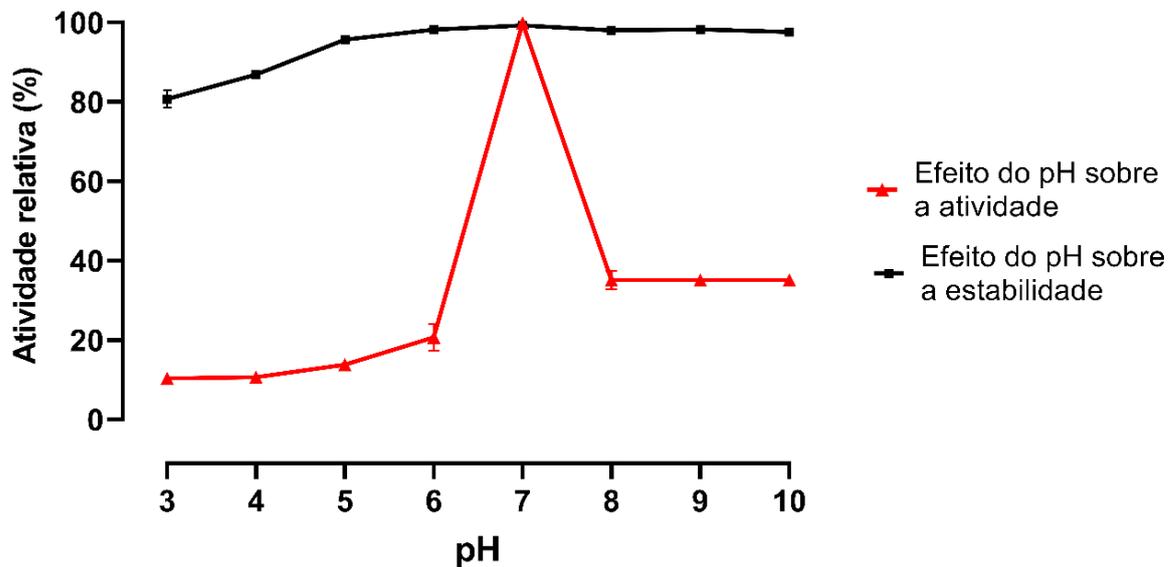


Fonte: elaborado pelo autor

### 7.10 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de rCvLPMO

A proteína recombinante foi incubada em diferentes condições de pH a fim de se investigar seus efeitos sobre atividade e estabilidade enzimáticas. rCvLPMO-SUMO apresentou atividade em uma ampla faixa de pH (pH 3 a 10), com atividade ótima registrada em pH 7,0 seguindo metodologia descrita por (BRESLMAYR *et al.*, 2018). Os percentuais de atividade relativa foram calculados considerando a atividade em pH 7,0 como 100% de atividade de rCvLPMO-SUMO. Após incubação por 24 h em tampões na faixa de pH 3,0 a 10,0, a LPMO manteve-se ativa, demonstrando excelente estabilidade frente à variação de pH.

Figura 19 - Efeito da variação de pH sobre a estabilidade e atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO



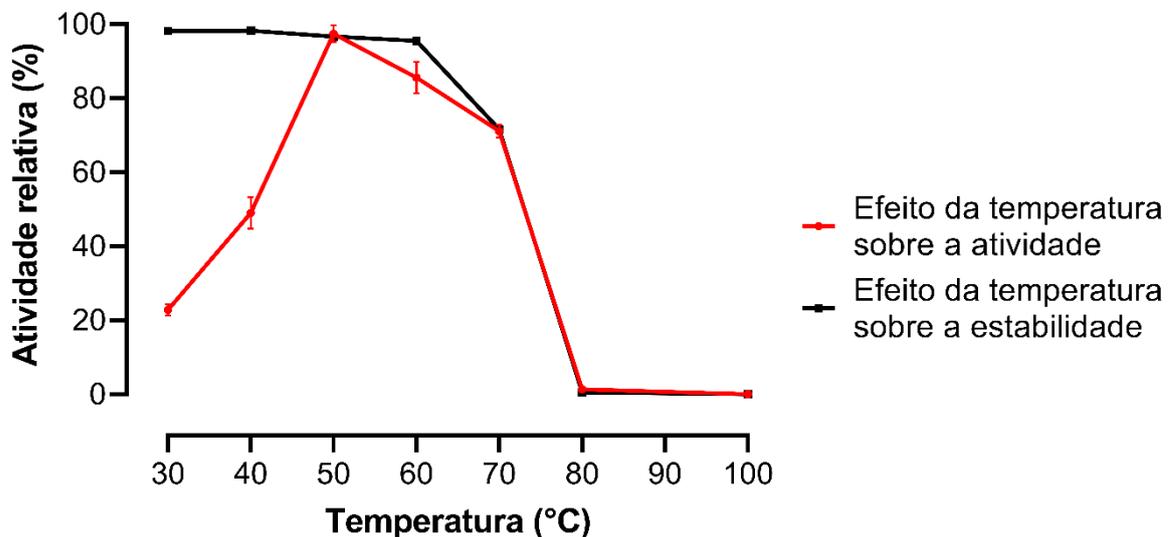
Fonte: elaborado pelo autor

A atividade LPMO ótima em pH 7,0, ocorre em diversas LPMOs, como demonstrado por (BHATIA; YADAV, 2021) para uma LPMO de *Aspergillus orizae* e (HEGNAR *et al.*, 2019) em uma LPMO do fungo *Gloeophyllum trabeum*.

### 7.11 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de rCvLPMO-SUMO

As temperaturas ótimas para atividade enzimática e a estabilidade da proteína recombinante também foram investigadas. A rCvLPMO-SUMO apresentou atividade enzimática ótima a 50 °C. Após incubação por 1 h na faixa de temperatura de 30 a 80 °C, a rCvLPMO-SUMO manteve sua atividade enzimática acima de 95 % até 60 °C, sendo inativada gradativamente, com perda de 30% da atividade a 70 °C, mais de 75% a 80 °C e 100% a 100 °C (Figura 20).

Figura 20 - Efeito da variação de temperatura sobre a estabilidade e atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO



Fonte: elaborado pelo autor

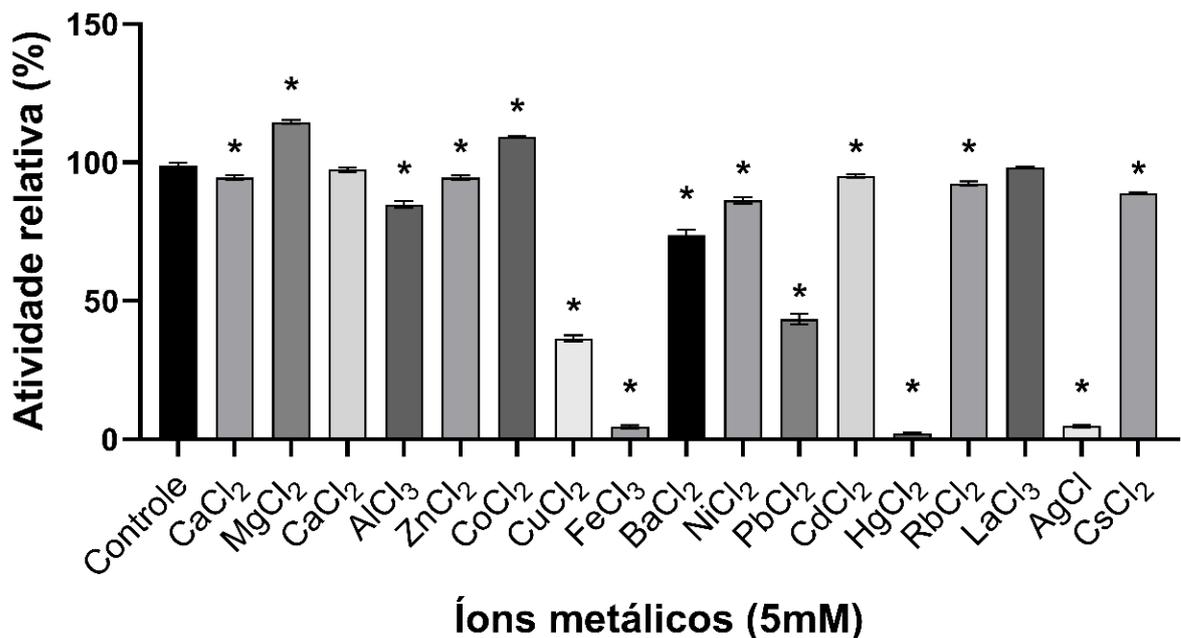
Os dados de temperatura ótima e termoestabilidade registrados nestas análises, corroboram com os dados obtidos nas análises de espectroscopia de dicroísmo circular, nos quais a LPMO recombinante teve seu perfil de estruturas secundárias avaliado para diferentes temperaturas a fim de se determinar a  $T_m$  (Temperatura de *melting*), e, portanto, o limite de temperatura em que a enzima teoricamente é capaz de apresentar alguma atividade. Muitas LPMOs tem sido relatadas na literatura com temperatura ótima de atividade entre 40 e 60 °C, como demonstrado por (EIJNSINK *et al.*, 2019) e (GRIECO *et al.*, 2020) para a LPMO do fungo *Myceliophthora thermophila*. Em termos de termoestabilidade rCvLPMO-SUMO demonstrou ser termoestável em faixa de temperaturas próxima à relatada por (LO LEGGIO *et al.*, 2018) para uma LPMO de *Aspergillus fumigatus* e maior termoestabilidade quando comparada à LPMO do fungo *Talaromyces cellulolyticus* estudada por (ZHANG *et al.*, 2019). Além disso há

descrito na literatura algumas dessas enzimas com hipertermoestabilidade, estáveis em temperaturas maiores que 100 °C, como a LPMO de *Aspergillus oryzae* estudada por (BHATIA; YADAV, 2021), que apresenta estabilidade numa faixa de temperatura de 40 a 140°C e atividade ótima a 100 °C e a LPMO recuperada de um metagenoma por (TUVENG *et al.*, 2020) que apresenta temperatura de *melting* de 83 °C, e é cataliticamente ativa a temperaturas de pelo menos 80 °C.

### 7.12 Efeitos dos metais e aditivos químicos sobre a atividade de rCvLPMO

Os ensaios de atividade “*peroxidase-like*” de LPMO na presença de íons metálicos, demonstraram que alguns íons reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade enzimática de rCvLPMO, sendo esta diminuição em torno de 60% da atividade da enzima para os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  e uma diminuição em torno de 95% da atividade para os íons  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ . A enzima apresentou a máxima modulação positiva de atividade com aumento de 16,93% na presença do íon  $\text{Mg}^{2+}$ , seguido do íon  $\text{Co}^{2+}$  com 9,22%. Um perfil similar a rCvLPMO-SUMO foi descrito por (AGRAWAL *et al.*, 2010) para a LPMO (PMO9D\_SCYTH) do fungo termofílico *Scytalidium thermophilum*

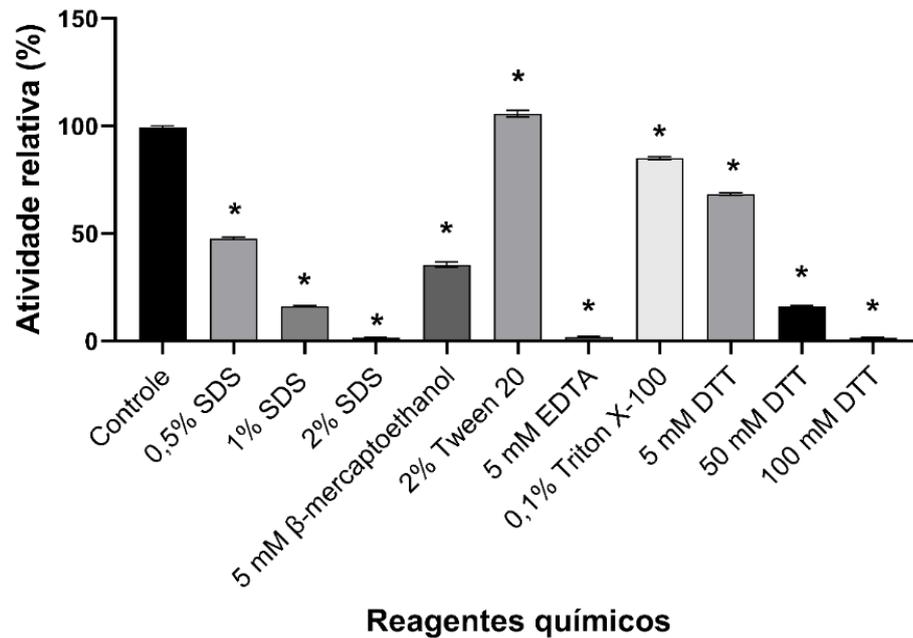
Figura 21- Efeito de íons metálicos na atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO



Fonte: elaborado pelo autor

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de as LPMOs serem metaloenzimas conhecidas por conter cobre ( $\text{Cu}^{2+/1+}$ ) em seu sítio ativo e utilizarem um sistema rebote de oxigênio de cobre-oxil (KIM *et al.*, 2014) para oxidar a quitina cristalina. Além disso, as LPMOs demonstraram ser capazes de ligar  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  em seu sítio ativo, o que leva a uma alteração na dinâmica de interação com o substrato, conforme determinado por Ressonância Magnética Nuclear (AACHMANN *et al.*, 2012). A influência do íon  $\text{Hg}^{2+}$  na conformação e atividade de uma  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase de *Panopus vannamei* Boone foi investigada por (LIN *et al.*, 2005). Os dados indicam que um íon  $\text{Hg}^{2+}$  se liga a cada molécula da enzima levando à perda da atividade e que a inibição total e irreversível da enzima se dá pela interação do íon bivalente  $\text{Hg}^{2+}$  com o grupo sulfidril de resíduos de cisteína presentes no sítio ativo da enzima. Em um estudo com uma glicosil hidrolase da família 18, (RAMAKRISHNA *et al.*, 2018) propõem que, íons de metais pesados como  $\text{Hg}^{2+}$ , são agentes perturbadores da estrutura terciária de proteínas por reagirem com grupos sulfidril presentes nas cadeias laterais de resíduos de cisteína, causando perda de atividade. Considerando que a LPMO nativa apresenta duas pontes dissulfeto preditas, é possível que a perda quase total de atividade de rCvLPMO-SUMO na presença de 5 mM dos íons metálicos  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$  se dê pela perturbação dos resíduos de cisteína que formam as pontes de dissulfeto presentes na estrutura tridimensional da proteína. Quanto aos agentes químicos testados, é possível observar na figura 20, que concentrações crescentes do surfactante aniônico SDS (0,5, 1 e 2%) causaram reduções significativas ( $p < 0,05$ ) na atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO, sendo a enzima completamente inibida na maior concentração testada. Na presença do agente quelante EDTA (5 mM) a atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO foi completamente inibida. A atividade enzimática foi reduzida em 31,55 e 83,71 % na presença do agente redutor DTT nas concentrações de 5 e 50 mM, respectivamente, e, completamente inibida na concentração de 100 mM.

Figura 22- Efeito de aditivos químicos sobre a atividade enzimática de rCvLPMO-SUMO



Fonte: elaborado pelo autor

O SDS é um detergente aniônico que pode se ligar aos resíduos de aminoácidos das proteínas e gerar mudanças na sua conformação, conseqüentemente, levando-as à desnaturação e perda de atividade. Diversos estudos demonstram que o SDS pode se ligar em baixas concentrações ao estado nativo de proteínas como a albumina sérica bovina (KRACH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002), β-lactoglobulina (HANSTED *et al.*, 2011), e lisozima (YONATH *et al.*, 1977). Portanto, a completa inibição de rCvLPMO-SUMO na presença de SDS (2%) e diminuição de atividade nas concentrações de 0,5 e 1%, podem ser explicadas pela desnaturação da enzima frente ao agente surfactante. O EDTA é um agente quelante que se complexa a diversos íons metálicos. Considerando que as LPMOs são metaloenzimas dependentes de cobre, a inibição de rCvLPMO na presença de 5 mM de EDTA pode ser explicada pela perda do íon  $\text{Cu}^{2+}$  complexado na cinta de histidina conservada em todas as LPMOs e que apresenta papel central no mecanismo de catálise enzimática deste grupo de enzimas (WANG *et al.*, 2021). Em um estudo com uma LPMO de *Aspergillus fumigatus* (BERNARDI *et al.*, 2020) demonstrou o efeito inibitório do EDTA sobre a enzima, corroborando o papel do cobre no mecanismo de catálise enzimática e o efeito inibitório de agentes quelantes como o EDTA sobre atividade das LPMOs. DTT e β-mercaptoetanol são agentes redutores capazes de reduzir as ligações dissulfeto nas proteínas, dessa forma a inibição de atividade causada por esses agentes sobre rCvLPMO-SUMO pode estar relacionada ao

rompimento de pontes dissulfeto importantes para a estabilidade do domínio catalítico LPMO<sub>10</sub> e, conseqüentemente, para suas conformações enzimaticamente ativas.

### 7.13 Atividades biológicas

#### 7.13.1 Efeito de rCvLPMO-SUMO sobre o crescimento de *Candida*

As frações cromatográficas contendo rCvLPMO-SUMO purificada, foram testadas quanto à capacidade de inibir a multiplicação celular em células de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* de diferentes estirpes, conforme demonstrado na tabela 2. Os testes por microdiluição em caldo demonstraram que rCvLPMO-SUMO tem atividade inibitória e letal sobre pelo menos duas estirpes de cada uma das espécies de *Candida* testadas. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e letais (CLM) foram determinadas para todas as espécies e estirpes para qual rCvLPMO-SUMO apresentou efeito inibitório e letal.

**Tabela 3-** Resultado dos testes de inibição em diferentes espécies e cepas de *Candida* com determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima

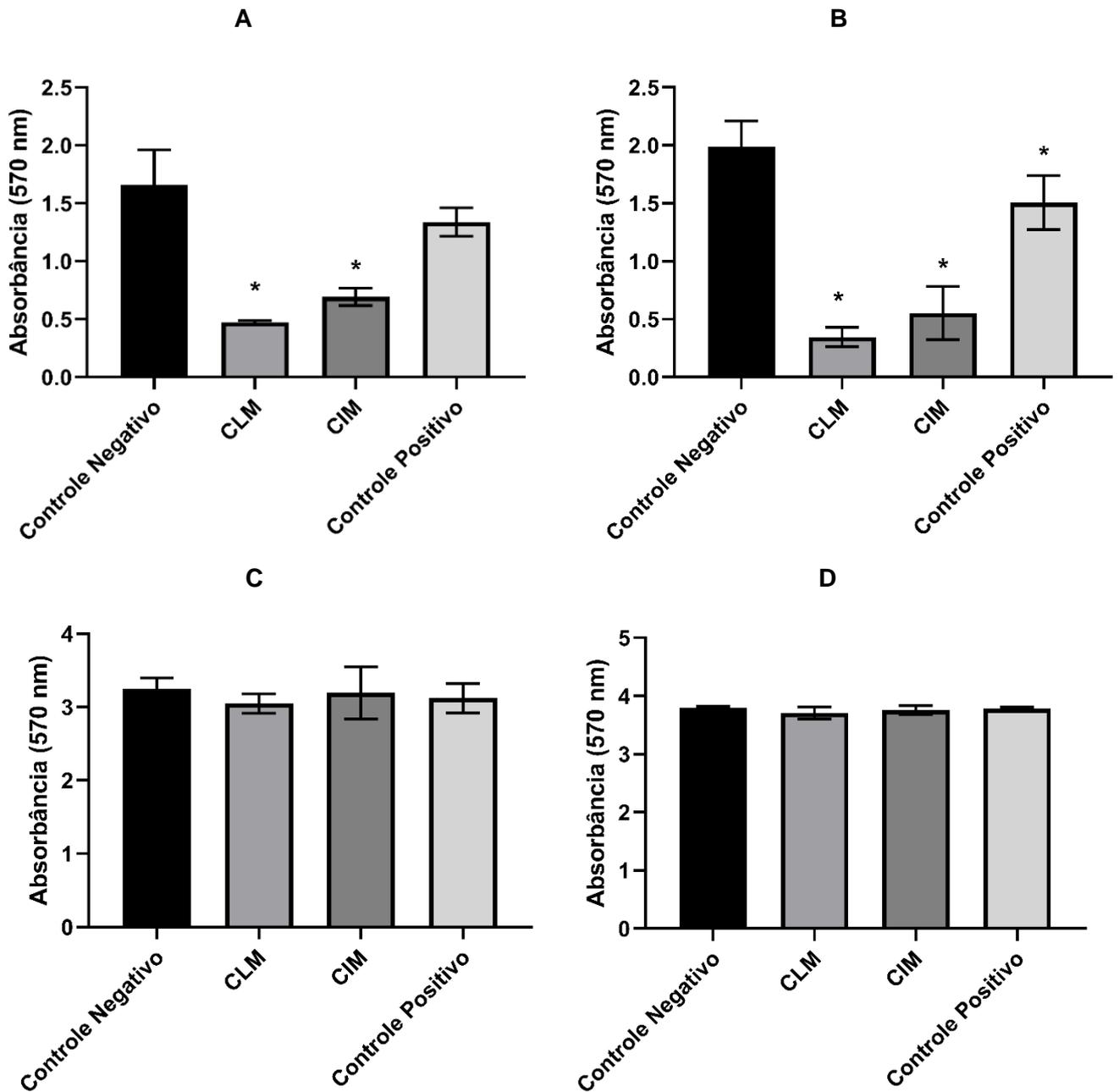
Espécie- cepa	Atividade	Concentração Inibitória Mínima	Concentração Letal Mínima
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	-	ND	ND
<i>C. albicans</i> ATCC 64129	+	32 µg/mL	32 µg/mL
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	-	ND	ND
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	-	ND	ND
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	+	32 µg/mL	64 µg/mL
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	+	125 µg/mL	250 µg/mL
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	+	64 µg/mL	125 µg/mL
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13083	+	125 µg/mL	250 µg/mL
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	+	32 µg/mL	32 µg/mL

Fonte: elaborado pelo autor. ND: não determinado

### 7.13.2 Efeito de rCvLPMO-SUMO sobre a formação e degradação de biofilmes de *Candida*

Os biofilmes são estruturas formadas por um aglomerado de células microbianas com capacidade de se aderirem à uma superfície e se desenvolverem sobre esta. A estrutura de um biofilme é absorvida em uma matriz complexa composta por polissacarídeos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos que, juntos, conferem resistência à estrutura e protegem o microrganismo da ação de agentes antimicrobianos (KHATOON *et al.*, 2018). Dessa forma, buscou-se avaliar a capacidade de rCvLPMO-SUMO em inibir ou degradar biofilmes de *Candida* spp. As análises de inibição de formação de biofilme (figura 23) demonstraram a capacidade de rCvLPMO-SUMO em inibir a tanto o crescimento quanto a formação de biofilme em *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. A formação de biofilme nas células não tratadas foi considerada como 100% da capacidade de formação de biofilme em comparação com as células tratadas em ambas as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Para *C. albicans* a CIM (32 µg/mL) foi capaz de inibir 58,29% da formação de biofilme enquanto a CLM (64 µg/mL) inibiu 71,49% da formação de biofilme, em comparação com o controle negativo. Em *C. parapsilosis* foi possível observar uma maior eficiência na inibição da formação de biofilme onde a CLM foi capaz de inibir 82,62%, enquanto a CIM apresentou 72,3% de inibição, quando comparada com o controle negativo. As análises de degradação de biofilme por rCvLPMO-SUMO não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (biofilme não tratado) e os grupos tratamento (biofilmes tratados com rCvLPMO-SUMO na CIM e CLM), ficando assim demonstrado que rCvLPMO-SUMO é eficiente na inibição de formação de biofilme, mas não na erradicação de biofilmes já formados.

Figura 23 - Efeito de rCvLPMO-SUMO sobre a formação (A) e degradação de biofilme (C) em *C. albicans* ATCC 10231 e sobre a formação (B) e degradação de biofilme (D) em *C. parapsilosis* ATCC 22019

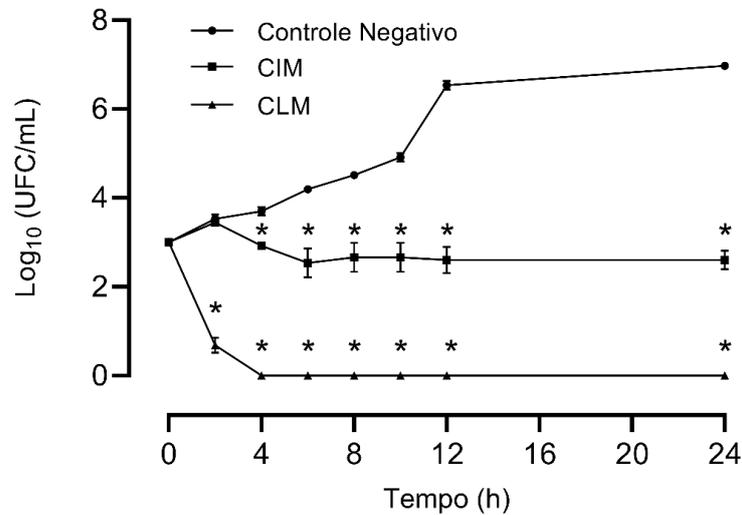


Fonte: elaborado pelo autor

### 7.13.3 Efeito do tempo de exposição de rCvLPMO-SUMO sobre a viabilidade celular em *Candida*

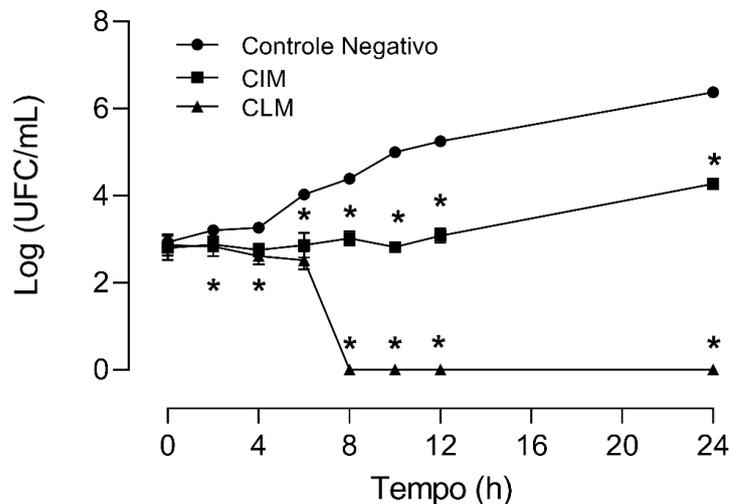
A exposição à CLM (64 µg/mL para *C. albicans* e 128 µg/mL para *C. parapsilosis*) de rCvLPMO-SUMO inviabilizou o crescimento das cepas *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 após 4h e 8 h, respectivamente. Quando expostas à CIM (32 µg/mL para *C. albicans* e 64 µg/mL para *C. parapsilosis*) da rCvLPMO-SUMO, as duas cepas tiveram seu crescimento inibido por todo o período do ensaio, 24h (Figura 24 e Figura 25).

Figura 24 - Efeito do tempo de exposição a rCvLPMO-SUMO na viabilidade *C. albicans* ATCC 10231



Os valores representam a média ± EPM. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se o pós-teste de Dunnett com  $p < 0,05$ . UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro. Fonte: elaborado pelo autor

Figura 25: Efeito do tempo de exposição a rCvLPMO-SUMO na viabilidade de *C. parapsilosis* ATCC 22019



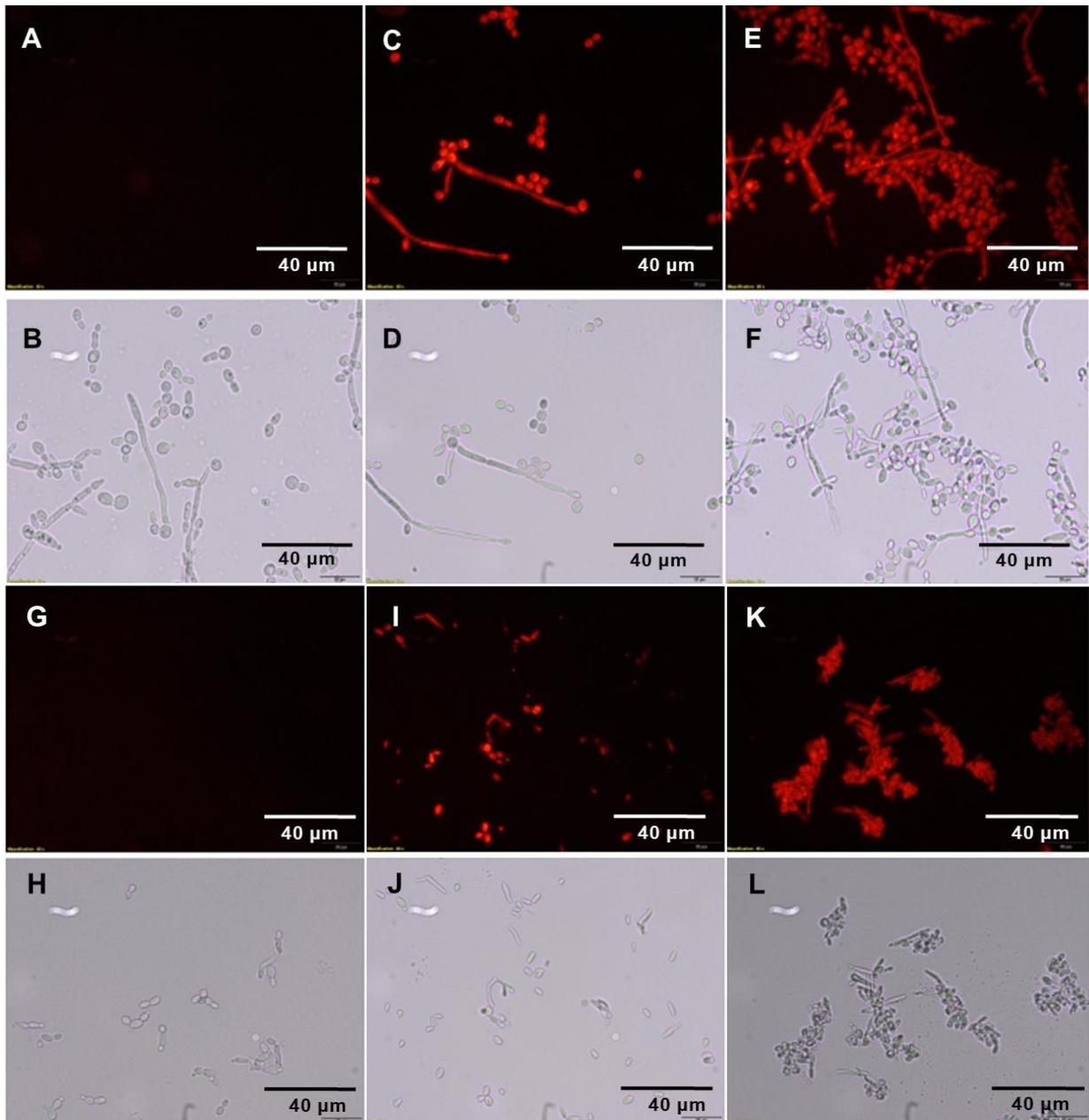
Os valores representam a média ± EPM. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, utilizando-se o pós-teste de Dunnett com  $p < 0,05$ . UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro. Fonte: elaborado pelo autor

#### 7.13.4 *Investigação do mecanismo de ação de rCvLPMO-SUMO na inibição do crescimento de Candida*

##### 7.13.4.1 *Análise de integridade da membrana celular*

A avaliação da integridade da membrana celular é o método mais comumente utilizado para estudar o efeito de várias moléculas em estudos de toxicidade e microbiologia industrial. A viabilidade é definida como um percentual de células vivas em uma determinada população (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014b). A avaliação da integridade de membrana, e, portanto, da viabilidade celular em *C. albicans* e *C. parapsilosis* foi realizada utilizando a metodologia do iodeto de propídio conforme descrito por (ARAÚJO *et al.*, 2019). O iodeto de propídio é um corante fluorescente, que ao interagir com o DNA das células e sob excitação de luz UV, emite fluorescência na cor vermelha. As células danificadas, ou seja, aquelas que apresentam membrana celular não íntegra, se apresentam fluorescentes quando expostas à luz no comprimento de onda de excitação de 490 nm (ZHANG *et al.*, 2018). Os resultados desta análise são mostrados na figura 26 e indicam que a exposição de ambas as células (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) à rCvLPMO-SUMO alterou a permeabilidade da membrana, permitindo a captação de iodeto de propídio e sua interação com o DNA celular (Figura 26- C e I). Este resultado nos permite inferir que rCvLPMO-SUMO exerce efeito sobre a parede celular, uma vez que a quitina é um dos polissacarídeos estruturais da parede celular de *Candida*. Sugere-se então que o poder oxidativo de rCvLPMO-SUMO atua então oxidando a quitina e fragilizando a parede celular, de forma que a célula se rompa por não suportar a força osmótica na ausência da estrutura rígida da parede celular, um mecanismo semelhante ao dos antifúngicos da classe das equinocandinas que inibem a enzima  $\beta$ -1,3-D-glucano sintase, impedindo assim a síntese de glucano, que está presente na parede celular dos fungos, resultando em uma parede celular anormal que é fraca e incapaz de resistir ao estresse osmótico (CHEN; SORRELL, 2007; KUSE *et al.*, 2007)

Figura 26- Ensaio de avaliação da integridade da membrana celular em *Candida albicans* ATCC 10231 (A; B; C; D; E e F) e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (G; H; I; J; K e L) utilizando fluoróforo iodeto de propídio e visualizado em microscópio de fluorescência

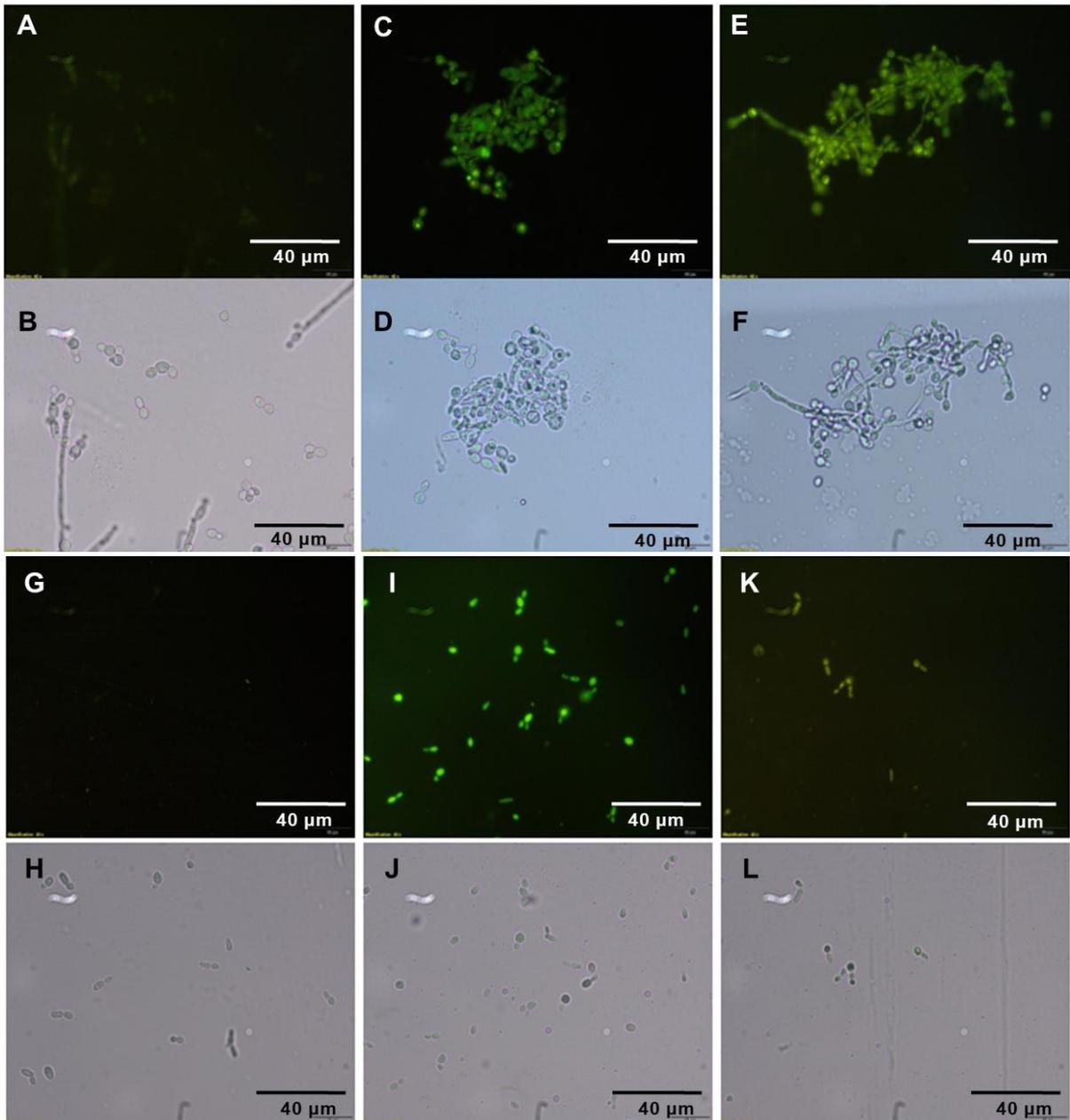


Fonte: elaborado pelo autor. Imagens de *C. albicans* em A e B células não tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente. Em C e D observa-se células tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente e em E e F observa-se células tratadas com etanol a 50% visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente. Imagens de *C. parapsilosis* em G e H células não tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente. Em I e J observa-se células tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente e em K e L observa-se células tratadas com etanol a 50% visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente.

#### 7.13.4.2 Estresse oxidativo por produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio é uma condição que indica estresse oxidativo nas células e é uma das respostas bioquímicas de hospedeiros infectados por *Candida albicans* (WELLINGTON; DOLAN; KRYSAN, 2009), dessa forma examinamos a capacidade de rCvLPMO-SUMO induzir a produção de espécies reativas de oxigênio como mecanismo inibitório em *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio foi utilizado o método baseado no corante fluorescente DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate). A lógica é que a oxidação de DCFH-DA em 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) tem sido amplamente utilizada para detecção de ROS totais, incluindo radicais hidroxila (OH) e dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>). Mecanicamente, DCFH-DA é absorvido por células onde a esterase celular cliva os grupos acetil, resultando em DCFH. A oxidação de DCFH por ROS converte a molécula em DCF, que emite fluorescência verde em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm (KIM; XUE, 2020). Os resultados desta análise são mostrados na figura 27 e indicam a produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à exposição de ambas as células (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) à rCvLPMO-SUMO. A produção de espécies reativas de oxigênio não foi observada nas células do controle negativo (Figura 27- A e G), indicando que a produção de espécies reativas de oxigênio nas células tratadas (figura 27- C e I) se deva à exposição a rCvLPMO-SUMO e não quaisquer outros possíveis interferentes no ensaio. Sugere-se então que o acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio induzido pela exposição a rCvLPMO-SUMO, causa dano oxidativo progressivo e, finalmente, morte celular. Diversas moléculas apresentam atividade inibitória sobre células de levedura pela indução de produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente o estresse oxidativo, como descrito por (CHOI; LEE, 2015) para o licopeno, um pigmento carotenoide vermelho encontrado em frutas e vegetais.

Figura 27: Ensaio de avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em *Candida albicans* ATCC 10231 (A; B; C; D; E e F) e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (G; H; I; J; K e L) utilizando fluoróforo DCFH-DA (Diacetato 2,7 diclorofluoracéina) e visualizado em microscópio de fluorescência.

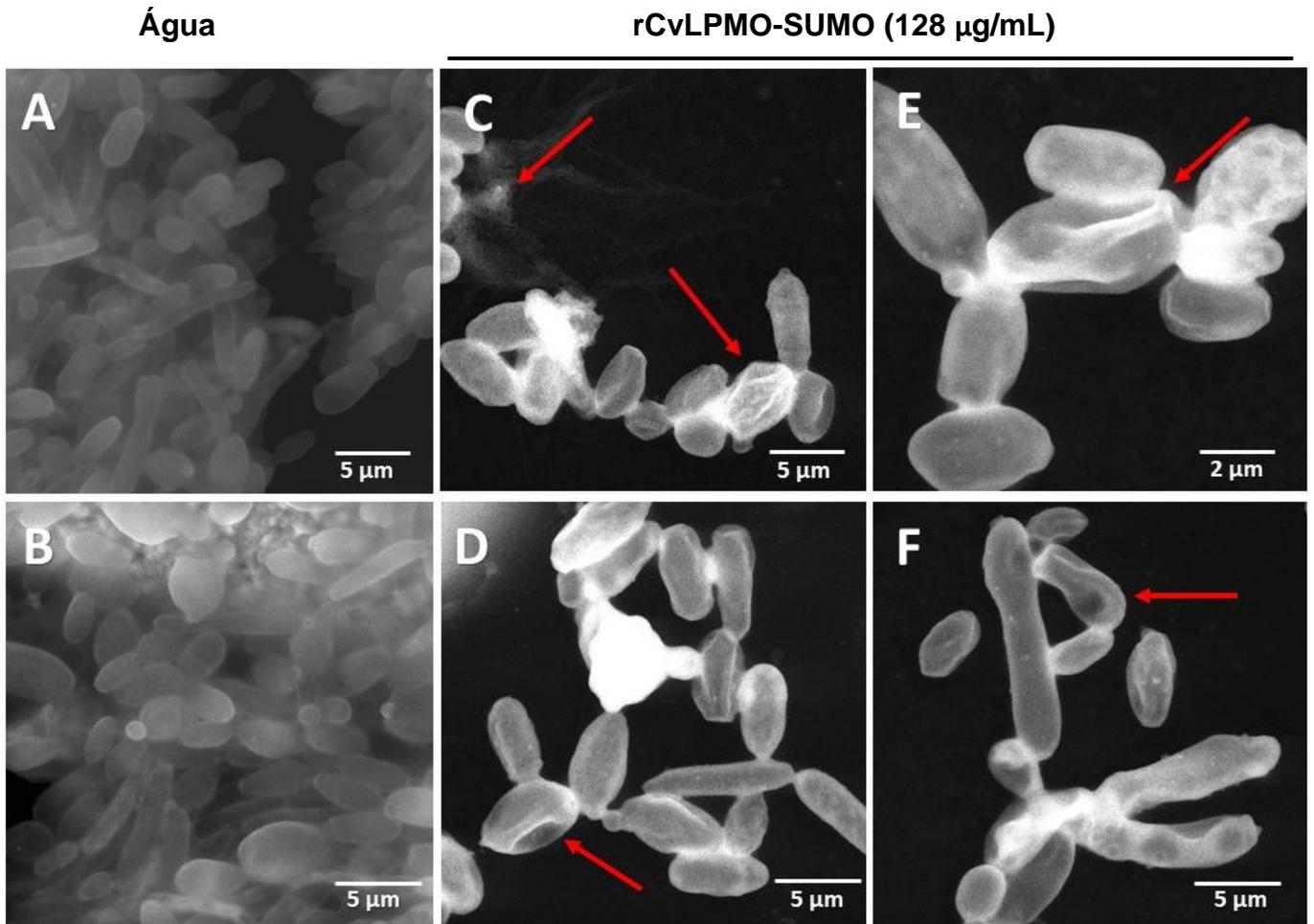


Fonte: elaborado pelo autor. Imagens de *C. albicans* em A e B células não tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente. Em C e D observa-se células tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente e em E e F observa-se células tratadas com 100 mM de  $H_2O_2$  visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente. Imagens de *C. parapsilosis* em G e H células não tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente. Em I e J observam-se células tratadas com rCvLPMO-SUMO visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente e em K e L observa-se células tratadas com 100 mM de  $H_2O_2$  visualizadas sob fluorescência e campo claro respectivamente.

### 7.13.5 *Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Candida sp tratada com rCvLPMO-SUMO*

Análises por microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas, a fim de que possíveis alterações morfológicas nas células de *Candida parapsilosis* tratadas por *rCvLPMO-SUMO* fossem observadas. As imagens de MET de *C. parapsilosis* (ATCC 22019) retratam importantes alterações morfológicas na presença de *rCvLPMO-SUMO* (Fig. 28- C,D,E e F). As células não tratadas (Fig. 28 – A e B) apresentam sua forma oval lisa e natural, e uma grande agregação celular, característica de células submersas em matriz polissacarídica de biofilmes (PAULITSCH *et al.*, 2009). A adição de *rCvLPMO-SUMO* na concentração de 128 µg/mL exerceu um efeito sobre a morfologia de *C. parapsilosis*, sendo possível ser observada retração da superfície celular sugestiva de extravasamento celular por danos na estrutura da parede (figura.28-C), além da presença de pseudo-hifas. Em um estudo sobre a atividade anti-*Candida* de um inibidor de tripsina purificado a partir das sementes de *Cassia leiandra Benth* (ARAÚJO *et al.*, 2019) descreveram mecanismos semelhantes ao que foi observado neste estudo, uma superprodução de espécies reativas de oxigênio e permeabilização da membrana plasmática nas células tratadas com o inibidor de tripsina. Além disso, as análises de MEV das células tratadas realizadas no estudo citado, demonstraram alterações na estrutura celular e extravasamento de citoplasma, assim como foi observado em nossas análises de MET.

Figura 28 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 exposta a rCvLPMO-SUMO (C; D; E e F) na concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$ , e o controle negativo (água) (A e B)



Fonte: elaborado pelo autor

## 8 CONCLUSÕES

Este trabalho fornece evidências contundentes da funcionalidade da LPMO recombinante de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 rCvLPMO-SUMO codificada pela ORF CV2592 com relação à atividade “*peroxidase-like*”. Esta LPMO também apresentou atividade antifúngica *in vitro* sobre cepas fúngicas de importância médica do gênero *Candida*, por meio da indução da formação de espécies reativas de oxigênio e a permeabilização da membrana plasmática. Além disso, a enzima recombinante apresentou excelentes resultados de estabilidade térmica e variação de pH, o que é desejável para uma possível aplicação em ambiente com condições não controladas. Dessa forma, a proteína recombinante, rCvLPMO-SUMO, apresenta grande potencial biotecnológico para compor novos antifúngicos de interesse médico ou agrônômico, no entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados, acerca de sua atividade antifúngica e toxicidade, *in vitro* como cultura de células e *in vivo* em modelos animais, afim de atestar sua eficácia e segurança para uma possível aplicação clínica no tratamento de infecções por *Candida* spp.

## 9 PERMISSÕES LEGAIS

Todas as atividades envolvendo OGMs (organismos geneticamente modificados) foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular (LabGeM), localizado no Departamento de Biologia, situado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). O presente trabalho encontra-se cadastrado junto ao SISGEN sob número A582302 com permissão de acesso ao patrimônio genético de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 e outras espécies. A UFC possui o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). O CQB número 102/99 (processo 01200.004129/98-53) consta no Ítem XVII do Comunicado Número 77/CTNBio, publicado no Diário Oficial da União Número 52-E em 18/03/1999 (Seção 3, página 60-61). O Laboratório de Genética Molecular (R002-1999) é uma das unidades autorizadas a desenvolver atividades envolvendo OGMs e seus derivados. É possível confirmar todas as unidades autorizadas da UFC em <http://www.cibio.ufc.br/index.php/pt-br/unidades-operativas#>.

## REFERÊNCIAS

- AACHMANN, F. L. *et al.* NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s,l]. v. 109, n. 46, p. 18779–18784, 13 nov. 2012.
- AGOSTONI, M.; HANGASKY, J. A.; MARLETTA, M. A. Physiological and Molecular Understanding of Bacterial Polysaccharide Monooxygenases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s,l]. v. 81, n. 3, set. 2017.
- AGRAWAL, Dhruv *et al.* Discovery and expression of thermostable LPMOs from thermophilic fungi for producing efficient lignocellulolytic enzyme cocktails. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s,l]. v. 191, n. 2, p. 463-481, 2020.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, [s,l]. v. 40, n. 3–4, p. 997–1026, 1 mar. 2005.
- ANWAR KHAN, P.; MALIK, A.; SUBHAN KHAN, H. Profile of candidiasis in HIV infected patients. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 204, 2012.
- ARANDA, A. *et al.* resultando em uma parede celular anormal que é fraca e incapaz de resistir ao estresse osmótico **Toxicology in Vitro**, [s,l]. v. 27, n. 2, p. 954–963, 1 mar. 2013.
- ARAÚJO, N. M. S. *et al.* CITI, a Kunitz trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* Benth. seeds, exerts a candidicidal effect on *Candida albicans* by inducing oxidative stress and necrosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s,l]. v. 1861, n. 11, p. 183032, 1 nov. 2019.
- AVENAS, P. Etymology of main polysaccharide names. **The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE): Research Initiatives and Results**, [s,l]. p. 13–21, 1 jan. 2013.
- BANANI, H. *et al.* Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. **International Journal of Food Microbiology**, [s,l]. v. 199, p. 54–61, 16 abr. 2015.
- TILLE, Patricia. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology-E-Book**. [s,l]. Elsevier Health Sciences, 2015.
- BARROSO, J. F.; ELHOLM, M.; FLATMARK, T. Tight binding of deoxyribonucleotide triphosphates to human thymidine kinase 2 expressed in *Escherichia coli*. Purification and partial characterization of its dimeric and tetrameric forms. **Biochemistry**, [s,l]. v. 42, n. 51, p. 15158–15169, 30 dez. 2003.
- BEESON, W. T. *et al.* Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034439>, [s,l]. v. 84, p. 923–946, 2 jun. 2015.
- BERNARDI, A. V. *et al.* LPMO AfAA9\_B and Cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail. **International**

**Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 276, [s,l]. v. 22, n. 1, p. 276, 29 dez. 2020.

BHATIA, S.; YADAV, S. K. Novel catalytic potential of a hyperthermostable mono-copper oxidase (LPMO-AOAA17) for the oxidation of lignin monomers and depolymerisation of lignin dimer in aqueous media. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s,l].v. 186, p. 563–573, 1 set. 2021.

BLUMENTHAL, H. J.; ROSEMAN, S. Quantitative estimation of chitin in fungi'. **Journal of bacteriology**, [s,l]. v. 74, n. 2, p. 222, 1957.

BOISBAUDRAN, L. D. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comp. Rend. Acad. Sci**, [s,l]. v. 94, p. 562-563, 1882.

BOOK, A. J. *et al.* Evolution of substrate specificity in bacterial AA10 lytic polysaccharide monoxygenases. **Biotechnology for Biofuels**, [s,l]. v. 7, n. 1, p. 1–14, 6 ago. 2014.

BRACONNOT, H. Sur la nature des champignons. **Ann Chim Phys**, [s,l]. v. 79, p. 265–304, 1811.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s,l]. v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRESLMAYR, E. *et al.* A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monoxygenase Biotechnology for Biofuels. **Biotechnol Biofuels**, [s,l]. v. 11, p. 79, 2018.

BROWN, G. D.; NETEA, M. G. Immunology of fungal infections. **Immunology of Fungal Infections**, [s,l]. p. 1–492, 2007.

BROWN, K. L.; STEIN, A.; MORRELL, D. S. *Ecthyma gangrenosum* and septic shock syndrome secondary to *Chromobacterium violaceum*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 5, p. S224–S228, 1 maio 2006.

BURGESS, R. R. Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. **Methods in Enzymology**, [s,l]. v. 463, n. C, p. 259–282, 1 jan. 2009.

CALDAS, L. R. Um pigmento nas águas negras. **Cienc. Hoje**, [s,l]. v. 11, p. 55-57, 1990.

CHATTOPADHYAY, A. *et al.* *Chromobacterium violaceum* infection: A rare but frequently fatal disease. **Journal of Pediatric Surgery**, [s,l]. v. 37, n. 1, p. 108–110, 1 jan. 2002.

CHAVES, Guilherme Maranhão; SILVA, Walicyranison Plinio da. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s,l]. v. 107, p. 998-1005, 2012.

CHEN, S. C. A.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **The Medical journal of Australia**, [s,l]. v. 187, n. 7, p. 404–409, 1 out. 2007.

CHERNIN, L. S. *et al.* Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, [s,l]. v. 180, n. 17, p. 4435–4441, 1998.

- CHHETRI, G.; KALITA, P.; TRIPATHI, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. **MethodsX**, [s,l]. v. 2, p. 385–391, 2015.
- CHOI, H.; LEE, D. G. Lycopene induces apoptosis in *Candida albicans* through reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. **Biochimie**, [s,l]. v. 115, p. 108–115, 1 ago. 2015.
- CLARK, G. L.; SMITH, A. F. X-ray diffraction studies of chitin, chitosan, and derivatives 1. **The Journal of Physical Chemistry**, [s,l]. v. 40, n. 7, p. 863–879, 1956.
- COHEN, S. N. *et al.* Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s,l]. v. 70, n. 11, p. 3240–3244, 1 nov. 1973.
- CRONAN, J. E. *Escherichia coli* as an Experimental Organism. **eLS**, [s,l]. 15 jul. 2014.
- CROUCH, L. I. *et al.* The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monoxygenases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 14, p. 7439–7449, 1 abr. 2016.
- DE OLIVEIRA FRANCO, L. *et al.* Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, [s,l]. v. 35, n. 3, p. 243–247, 2004.
- DE VASCONCELOS, A. T. R. *et al.* The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11660, 9 set. 2003.
- DIMOPOULOU, M. *et al.* Embryotoxic and pharmacologic potency ranking of six azoles in the rat whole embryo culture by morphological and transcriptomic analysis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s,l]. v. 322, p. 15–26, 1 maio 2017.
- DRULA, E. *et al.* The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. **Nucleic Acids Research**, [s,l]. v. 50, n. D1, p. D571–D577, 7 jan. 2022.
- DURÁN, N. *et al.* Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 1994 10:6, [s,l]. v. 10, n. 6, p. 686–690, nov. 1994.
- DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. <https://doi.org/10.1080/20014091096747>, [s,l]. v. 27, n. 3, p. 201–222, 2008.
- DYBALLA, N.; METZGER, S. Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, [s,l]. n. 30, 2009.
- EIJSINK, Vincent GH *et al.* On the functional characterization of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). **Biotechnology for biofuels**, [s,l]. v. 12, n. 1, p. 1-16, 2019.

- EL GHAOUTH, A. *et al.* Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. **Mycological Research**, [s,l]. v. 96, n. 9, p. 769–779, 1 set. 1992.
- FANTINATTI-GARBOGGINI, Fabiana *et al.* Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genet Mol Res**, [s,l]. v. 3, n. 1, p. 134–147, 2004.
- FORSBERG, Z. *et al.* Comparative study of two chitin-active and two cellulose-active AA10-type lytic polysaccharide monooxygenases. **Biochemistry**, [s,l]. v. 53, n. 10, p. 1647–1656, 18 mar. 2014.
- FUCHS, R. L.; MCPHERSON, S. A.; DRAHOS, D. J. Cloning of a *Serratia marcescens* Gene Encoding Chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, [s,l]. v. 51, n. 3, p. 504–509, 1986.
- GIL-ALONSO, S. *et al.* Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time–kill curves. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s,l]. v. 82, n. 1, p. 57–61, 1 maio 2015.
- GIL-ALONSO, S. *et al.* Postantifungal effect of caspofungin against the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* clades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s,l]. v. 86, n. 2, p. 172–177, 1 out. 2016.
- GOODAY, Graham W. The ecology of chitin degradation. In: **Advances in microbial ecology**. Springer, Boston, MA, 1990. p. 387–430.
- GOW, N. A. R. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology** 2011 10:2, [s,l]. v. 10, n. 2, p. 112–122, 12 dez. 2011.
- GRIECO, M. A. B. *et al.* Evaluation of the Enzymatic Arsenal Secreted by *Myceliophthora thermophila* During Growth on Sugarcane Bagasse With a Focus on LPMOs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s,l]. v. 8, p. 1028, 25 ago. 2020.
- GROSSMAN, T. H. *et al.* Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, [s,l]. v. 209, n. 1–2, p. 95–103, 16 mar. 1998.
- GUARIM, S. Ocorrência e distribuição de *Chromobacterium violaceum* (Schroeter) Bergonzini 1881, na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, [s,l]. v. 9, n. 3, p. 501–506, 1979.
- GUDMUNDSSON, M. *et al.* Structural and electronic snapshots during the transition from a Cu(II) to Cu(I) metal center of a lytic polysaccharide monooxygenase by x-ray photoreduction. **Journal of Biological Chemistry**, [s,l]. v. 289, n. 27, p. 18782–18792, 4 jul. 2014.
- HAKIM, L. *et al.* Synthesis of novel chitosan resin derivatized with serine diacetic acid moiety and its application to on-line collection/concentration of trace elements and their determination using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s,l]. v. 588, n. 1, p. 73–81, 4 abr. 2007.
- HAMRE, A. G. *et al.* Activation of enzymatic chitin degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase. **Carbohydrate Research**, [s,l]. v. 407, p. 166–169, 30 abr. 2015.

- HARRIS, P. V. *et al.* Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, [s,l]. v. 49, n. 15, p. 3305–3316, 20 abr. 2010.
- HEGNAR, O. A. *et al.* pH-Dependent Relationship between Catalytic Activity and Hydrogen Peroxide Production Shown via Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s,l]. v. 85, n. 5, 3 mar. 2019.
- HEMSWORTH, G. R. *et al.* Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. **Nature Chemical Biology** 2013 10:2, [s,l]. v. 10, n. 2, p. 122–126, 22 dez. 2013.
- HERRING, P. J. Marine ecology and natural products. **Pure and Applied Chemistry**, [s,l]. v. 51, n. 9, p. 1901–1911, 1 jan. 1979.
- HORN, S. J. *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, [s,l]. v. 5, n. 1, p. 1–13, 2 jul. 2012.
- HOSOBAMA, M. *et al.* Synthesis of novel chitosan resin possessing histidine moiety and its application to the determination of trace silver by ICP-AES coupled with triplet automated-pretreatment system. **Analytica Chimica Acta**, [s,l]. v. 639, n. 1–2, p. 51–56, 20 abr. 2009.
- HU, X. *et al.* Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, [s,l]. v. 70, n. 4, p. 451–458, 1 nov. 2007.
- HUNGRIA, M. *et al.* Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon. **Letters in Applied Microbiology**, [s,l]. v. 41, n. 1, p. 17–23, 1 jul. 2005.
- HUNT, D. E. *et al.* Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s,l]. v. 74, n. 1, p. 44–51, jan. 2008.
- JAIANA, M. *et al.* Metodologia de microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da ação antibacteriana de substâncias extraídas de plantas. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2022.
- JE, J. Y.; KIM, S. K. Antioxidant activity of novel chitin derivative. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s,l]. v. 16, n. 7, p. 1884–1887, 1 abr. 2006.
- JEAN STRUELENS, M. *et al.* a rapid growth-independent antibiotic resistance Detection Test by sYBr green/Propidium iodide Viability assay. [s,l]. v. 5, p. 3, 2018.
- JEUNIAUX, Charles; CORNELIUS, C. Distribution and activity of chitinolytic enzymes in the digestive tract of birds and mammals. In: **First international conference on Chitin/Chitosan**. Cambridge, 1997.
- JIANLONG, W. *et al.* Bioadsorption of lead(II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, [s,l]. v. 87, n. 3, p. 273–277, 18 maio 2001.
- KANOKWIROON, K. *et al.* Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. **Mycoses**, [s,l]. v. 51, n. 4, p. 301–307, 1 jul. 2008.

- KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s,l]. v. 106, p. 803–822, 1 jan. 2018.
- KELLY, S.; PRICE, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein & Peptide Science**, [s,l]. v. 1, n. 4, p. 349–384, 25 mar. 2005.
- KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s,l]. v. 1473, n. 1, p. 108–122, 17 dez. 1999.
- KHATOON, Z. *et al.* Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. **Heliyon**, [s,l]. v. 4, n. 12, p. e01067, 1 dez. 2018.
- KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin Research Revisited. **Marine Drugs** 2010, Vol. 8, Pages 1988–2012, [s,l]. v. 8, n. 7, p. 1988–2012, 28 jun. 2010.
- KIM, H.; XUE, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. **Journal of visualized experiments : JoVE**, [s,l]. v. 2020, n. 160, p. 1–5, 6 jun. 2020.
- KIM, J. S.; JE, Y. H. A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2010 87:5, [s,l]. v. 87, n. 5, p. 1639–1648, 6 maio 2010.
- KIM, S. *et al.* Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monoxygenases use a copper-oxy, oxygen-rebound mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s,l]. v. 111, n. 1, p. 149–154, 7 jan. 2014.
- KOCH, C. *et al.* Cardiac effects of echinocandins after central venous administration in adult rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s,l]. v. 59, n. 3, p. 1612–1619, 1 mar. 2015.
- KOTHARI, V.; SHARMA, S.; PADIA, D. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s,l]. v. 10, n. 8, p. 744–752, 1 ago. 2017.
- KUSANO, K. *et al.* Protein synthesis inhibitors and ethanol selectively enhance heterologous expression of P450s and related proteins in *Escherichia coli*. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s,l]. v. 367, n. 1, p. 129–136, 1 jul. 1999.
- KUSE, E. R. *et al.* Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. **Lancet (London, England)**, [s,l]. v. 369, n. 9572, p. 1519–1527, 5 maio 2007.
- KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS yeast research**, [s,l]. v. 14, n. 7, p. 1068–1079, 1 nov. 2014b.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 1970 227:5259, [s,l]. v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

- LEON, L. L. *et al.* Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s,l]. v. 48, n. 3, p. 449–450, 1 set. 2001.
- LEVASSEUR, A. *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, [s,l]. v. 6, n. 1, p. 1–14, 21 mar. 2013.
- LI, B. *et al.* Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. **Carbohydrate Polymers**, [s,l]. v. 72, n. 2, p. 287–292, 5 maio 2008.
- LI, J. F. *et al.* Production of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2009 **84:2**, [s,l]. v. 84, n. 2, p. 383–388, 7 jul. 2009.
- LICHSTEIN, H. C.; VAN DE SAND, V. F. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **The Journal of Infectious Diseases**, [s,l]. v. 76, n. 1, p. 47–51, 1945.
- LIN, J.-C. *et al.* Effects of mercuric ion on the conformation and activity of Penaeus Vannamei-N-acetyl-d-glucosaminidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s,l]. v. 36, p. 327–330, 2005.
- LEGGIO, Leila Lo *et al.* Structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* and an engineered thermostable variant. **Carbohydrate research**, [s,l]. v. 469, p. 55-59, 2018.
- LOBO, M. D. P. *et al.* Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, [s,l]. v. 13, n. 1, p. 1–15, 1 jun. 2013.
- LOMBARD, V. *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, [s,l]. v. 42, n. D1, p. D490–D495, 1 jan. 2014.
- MARÓDI, L.; JOHNSTON, R. B. Invasive *Candida* species disease in infants and children: occurrence, risk factors, management, and innate host defense mechanisms. **Current opinion in pediatrics**, [s,l]. v. 19, n. 6, p. 693–697, dez. 2007.
- MARR, K. A. *et al.* Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **The Journal of infectious diseases**, [s,l]. v. 181, n. 1, p. 309–316, 2000.
- MAUBON, D. *et al.* Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive care medicine**, [s,l]. v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 1 set. 2014a.
- MAUBON, D. *et al.* Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive care medicine**, [s,l]. v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 1 set. 2014b.
- MAURYA, I. K. *et al.* Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1732–1740, 1 ago. 2011.

- MAURYA, V. *et al.* Oropharyngeal candidiasis and *Candida* colonization in HIV positive patients in northern India. **Journal of infection in developing countries**, [s,l]. v. 7, n. 8, p. 608–613, 2013.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119, 2 fev. 2013.
- MCCLEAN, K. H. *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, [s,l]. v. 143, n. 12, p. 3703–3711, 1 dez. 1997.
- MEHMOOD, M. A. *et al.* Molecular characterization of the modular chitin binding protein Cbp50 from *Bacillus thuringiensis* serovar konkukian. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s,l]. v. 100, n. 3, p. 445–453, 7 out. 2011.
- MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in microbiology**, [s,l]. v. 3, n. AUG, 2012.
- MINAMI, S. *et al.* Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway. **Carbohydrate Polymers**, [s,l]. v. 36, n. 2–3, p. 151–155, 1 jul. 1998.
- MORROW, J. F. *et al.* Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 5, p. 1743–1747, 1 maio 1974.
- MOURA. **Caracterização in silico e docking molecular de uma N-acetil-β-D-glicosaminidase de Chromobacterium violaceum: estudos preliminares para o design de um bioprocesso**. Fortaleza, Ceará: [s.n.].
- MUZZARELLI, R. A. A. *et al.* Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, [s,l]. v. 87, n. 2, p. 995–1012, 15 jan. 2012.
- MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitin and chitosan hydrogels. **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**, p. 849–888, 1 jan. 2009.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000 403:6772, [s,l]. v. 403, n. 6772, p. 853–858, 24 fev. 2000.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s,l]. v. 67, n. 3, p. 400–428, set. 2003.
- NGO, D. N. *et al.* Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. **Journal of Functional Foods**, [s,l]. v. 1, n. 2, p. 188–198, 1 abr. 2009.
- NIEMIROWICZ, K. *et al.* Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s,l]. v. 12, n. 8, p. 2395–2404, 1 nov. 2016.

ODIER, A. Memoire sur la composition chimique des parties cornees des Insectes. **Mem. Soc. Hist. Paris**, [s,l]. v. 1, p. 29–42, 1823.

OKADA, M. *et al.* *Chromobacterium haemolyticum*-induced bacteremia in a healthy young man. **BMC Infectious Diseases**, [s,l]. v. 13, n. 1, p. 1–4, 3 set. 2013.

OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* A Chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Frontiers in Microbiology**, [s,l]. v. 8, n. JUN, p. 980, 6 jun. 2017.

OSHITA, K. *et al.* Synthesis of chitosan resin possessing a phenylarsonic acid moiety for collection/concentration of uranium and its determination by ICP-AES. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [s,l]. v. 390, n. 7, p. 1927–1932, abr. 2008.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s,l]. v. 62, n. 4, p. e1–e50, 4 nov. 2016.

PATEL, H.; VASHI, R. T. Use of Naturally Prepared Coagulants for the Treatment of Wastewater from Dyeing Mills. **Characterization and Treatment of Textile Wastewater**, [s,l]. p. 147–158, 2015.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, [s,l]. v. 26, n. 7, p. 473–483, 1 abr. 2000.

PAULITSCH, A. H. *et al.* In-vivo *Candida* biofilms in scanning electron microscopy. **Medical Mycology**, [s,l]. v. 47, n. 7, p. 690–696, 1 nov. 2009.

PEISELT DA SILVA, K. M.; PAIS DA SILVA, M. I. Copper sorption from diesel oil on chitin and chitosan polymers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s,l]. v. 237, n. 1–3, p. 15–21, 20 abr. 2004.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert review of anti-infective therapy**, [s,l]. v. 7, n. 4, p. 453–460, maio 2009.

PFALLER, M. A. *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of clinical microbiology**, [s,l]. v. 45, n. 6, p. 1735–1745, 1 jun. 2007.

PFALLER, M. A. *et al.* Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, [s,l]. v. 68, n. 3, p. 278–283, nov. 2010.

PFALLER, M. A. *et al.* Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. **Journal of clinical microbiology**, [s,l]. v. 51, n. 8, p. 2571–2581, ago. 2013.

- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical reviews in microbiology**, [s,l]. v. 36, n. 1, p. 1–53, fev. 2010.
- PLANTINGA, T. S. *et al.* Human genetic susceptibility to *Candida* infections. **Medical mycology**, [s,l]. v. 50, n. 8, p. 785, nov. 2012.
- POTTS, J. R.; CAMPBELL, I. D. Structure and function of fibronectin modules. **Matrix Biology**, [s,l]. v. 15, n. 5, p. 313–320, 1 nov. 1996.
- PURUSHOTHAM, P. *et al.* Chitin Binding Proteins Act Synergistically with Chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. **PLOS ONE**, [s,l]. v. 7, n. 5, p. e36714, 9 maio 2012.
- RAMAKRISHNA, B. *et al.* Carboxy-terminal glycosyl hydrolase 18 domain of a carbohydrate active protein of *Chitinophaga pinensis* is a non-processive exochitinase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s,l]. v. 115, p. 1225–1232, 1 ago. 2018.
- RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chemical Biology & Drug Design**, [s,l]. v. 74, n. 2, p. 101–120, 1 ago. 2009.
- RATON, B.; NEW, L.; WASHINGTON, Y. Handbook of Microbiological Media. **Handbook of Microbiological Media**, [s,l]. 27 maio 2004.
- RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, [s,l]. v. 46, n. 1, p. 1–27, 1 nov. 2000.
- ROMEIRO, R. S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. **UFV Viçosa: Viçosa, Brazil**, 2007.
- RUDALL, K. M. The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. **Advances in Insect Physiology**, [s,l]. v. 1, n. C, p. 257–313, 1 jan. 1963.
- SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. *et al.* Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. **Archives of Oral Biology**, [s,l]. v. 58, n. 10, p. 1318–1326, 1 out. 2013.
- SANDFORD, R.; MULROY, S.; FOGGENSTEINER, L. The polycystins: a novel class of membrane-associated proteins involved in renal cystic disease. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS** 1999 56:7, [s,l]. v. 56, n. 7, p. 567–579, 1999.
- SANGLARD, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in Medicine**, [s,l]. v. 3, n. MAR, p. 11, 2016.
- SAN-LANG, W. *et al.* Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s,l]. v. 31, n. 3, p. 321–328, 2 ago. 2002.
- SANTOS, G. C. DE O. *et al.* *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**, [s,l]. v. 9, n. JUL, 3 jul. 2018.
- SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of bacteriology**, [s,l]. v. 189, n. 23, p. 8746–8749, dez. 2007.

- SHAFIEE, F.; RABBANI, M.; JAHANIAN-NAJAFABADI, A. Optimization of the Expression of DT386-BR2 Fusion Protein in *Escherichia coli* using Response Surface Methodology. **Advanced Biomedical Research**, [s,l]. v. 6, n. 1, p. 22, 2017.
- SHIGEMATSU, N. *et al.* FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968 II. Structure determination. **The Journal of Antibiotics**, [s,l]. v. 47, n. 3, p. 311–314, 25 mar. 1994.
- SHUTINOSKI, B.; SCHMIDT, M. A.; HEUSIPP, G. Transcriptional regulation of the Yts1 type II secretion system of *Yersinia enterocolitica* and identification of secretion substrates. **Molecular Microbiology**, [s,l].v. 75, n. 3, p. 676–691, 1 fev. 2010.
- SILVA MELO SILVYA STUCHI MARIA, P. DA *et al.* Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in v79 cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal**, [s,l]. v. 36, p. 539–543, 2000.
- SINGHVI, P. *et al.* Solubilization and refolding of variety of inclusion body proteins using a novel formulation. **International journal of biological macromolecules**, [s,l]. v. 193, n. Pt B, p. 2352–2364, 15 dez. 2021.
- SNEATH, P. *et al.* Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **The Lancet**, [s,l]. v. 262, n. 6780, p. 414–425, 1953.
- SOUZA, A. O. DE. Atividade da violaceina in vitro sobre o *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s,l]. p. 59–62, 1999.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, [s,l]. v. 2013, 2013a.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, [s,l]. v. 2013, 2013b.
- STAUDER, M. *et al.* Role of GbpA protein, an important virulence-related colonization factor, for *Vibrio cholerae*'s survival in the aquatic environment. **Environmental Microbiology Reports**, [s,l]. v. 4, n. 4, p. 439–445, 1 ago. 2012.
- STOTT, M. B. *et al.* **Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria**. [s,l]. John Wiley & Sons, Ltd, 2015.
- STREICHSBIER, F. Utilization of chitin as sole carbon and nitrogen source by *Chromobacterium violaceum*. **FEMS Microbiology Letters**, [s,l]. v. 19, p. 129–132, 1983.
- STRUSZCZYK, M. H. 12. Global Requirements for Medical Applications of Chitin and its Derivatives. **Polish Chitin Society, Monograph XI; Polish Chitin Society: Łódź, Poland**, [s,l]. p. 95–102, 2006.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, [s,l]. v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.
- SUZUKI, K. *et al.* Chitin Binding Protein (CBP21) in the Culture Supernatant of *Serratia marcescens* 2170. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s,l]. v. 62, n. 1, p. 128–135, 1998.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s,l]. v. 72, n. 2, p. 211–222, 22 set. 2006.

THARANATHAN, Rudrapatnam N.; KITTUR, Farooqahmed S. Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. [s,l].2003.

THOMAS, J. G.; BANEYX, F. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-shock proteins. **The Journal of biological chemistry**, [s,l]. v. 271, n. 19, p. 11141–11147, 1996.

TRICK, W. E. *et al.* Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s,l]. v. 35, n. 5, p. 627–630, 1 set. 2002.

TSAI, G. J.; SU, W. H. Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, [s,l]. v. 62, n. 3, p. 239–243, 1 mar. 1999.

TUVENG, T. R. *et al.* A thermostable bacterial lytic polysaccharide monooxygenase with high operational stability in a wide temperature range. **Biotechnology for Biofuels**, [s,l]. v. 13, n. 1, 1 dez. 2020.

UMADEVI, S. *et al.* *Chromobacterium violaceum*: A potential nosocomial pathogen. **American Journal of Infection Control**, [s,l]. v. 41, n. 4, p. 386, 1 abr. 2013.

VAAJE-KOLSTAD, G. *et al.* The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. **J Biol Chem**, [s,l]. v. 280, n. 31, p. 28492–28497, 5 ago. 2005.

VAAJE-KOLSTAD, G. *et al.* An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, [s,l] v. 330, n. 6001, p. 219–222, 8 out. 2010.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, [s,l]. 2012.

VU, V. V. *et al.* A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s,l]. v. 111, n. 38, p. 13822–13827, 23 set. 2014.

WAGNER, G. P. *et al.* Chitin in the epidermal cuticle of a vertebrate (*Paralipophrys trigloides*, Blenniidae, Teleostei). **Experientia** 1993 49:4, [s,l]. v. 49, n. 4, p. 317–319, abr. 1993.

WALTON, P. H.; DAVIES, G. J. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s,l]. v. 31, p. 195–207, 1 abr. 2016.

WAUGH, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. **Protein Expression and Purification**, [s,l]. v. 80, n. 2, p. 283, dez. 2011.

WELLINGTON, M.; DOLAN, K.; KRYSAN, D. J. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. **Infection and Immunity**, [s,l]. v. 77, n. 1, p. 405–413, jan. 2009.

WINGARD, J. R. *et al.* Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **The New England journal of medicine**, [s,l]. v. 325, n. 18, p. 1274–1277, 31 out. 1991.

WONG, E. *et al.* The *Vibrio cholerae* Colonization Factor GbpA Possesses a Modular Structure that Governs Binding to Different Host Surfaces. **PLOS Pathogens**, [s,l]. v. 8, n. 1, p. e1002373, jan. 2012.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s,l]. v. 11, n. 13, p. 1699–1701, 9 jul. 2001.

YANG, C. H.; LI, Y. H. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s,l]. v. 74, n. 10, p. 435–441, 1 out. 2011.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, [s,l]. v. 2, n. 3, p. 204–226, 1 jun. 2015.

ZHANG, N. *et al.* Cell permeability and nuclear DNA staining by propidium iodide in basidiomycetous yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, [s,l]. v. 102, n. 9, p. 4183–4191, 1 maio 2018.

ZHANG, R. *et al.* Identification of a thermostable fungal lytic polysaccharide monoxygenase and evaluation of its effect on lignocellulosic degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s,l]. v. 103, p. 5739–5750, 2019.

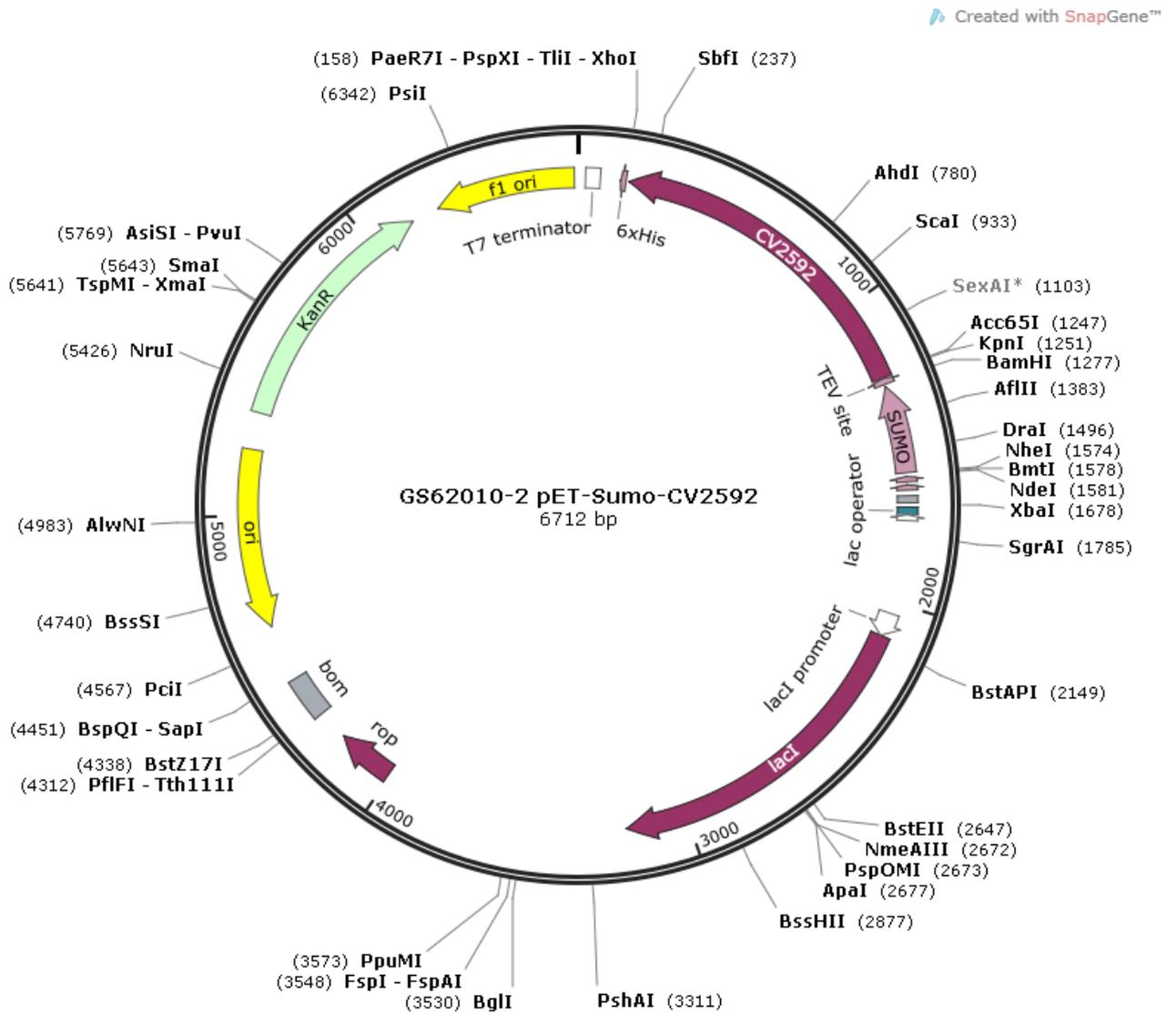
**APÊNDICE A - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CORRESPONDENTE À  
PROTEÍNA RECOMBINANTE rCv2592-SUMO**

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSE  
 IFFKIKKTTPLRRLMEAFQKQKEMDSLRFYLDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEA  
 HREQIGGSENLYFQGHGTMEVPVNRVYSCYQEGAESPKTPACQEAKRVGGTQAMYD  
 WNGINQNPPGDNHQAVVPDGMLCAAGQSKFKGFNLARTDWPATNIVPNASGNFEFIY  
 KAPAPHATKYFRFYVTKNGWNPSQPLKWSDELEFGTYNGNPPLDASQRYHMTMKLPT  
 GKTGRHIIYNVWKRSDSEEFYSCSDVNFNGGPPQPEPPPISNPWKEVGSVTAHENL  
 PNKSSVTLRIFDGSGRDVESHKVDLSATTGQAANWPYELGVKVNASSQIGRIGVISS  
 KQRTVTINPVRSATANRVWLNERYSGYRYQIDIKKGDDGVTPPPAGDAWREGVAYAV  
 GQVVSYQNRRYRCLQAHTAWVGAGWTPSTTPALWTPVLE\*

Fonte: elaborado pelo autor

As cores ilustram as diferentes porções da proteína rCv2592-SUMO. Em amarelo, a calda de histidina; em azul, a sequência correspondente a ORF CV2592, sem o peptídeo sinal; em cinza, o sítio de clivagem da protease TEV; e em roxo, a proteína SUMO.

APÊNDICE B – MAPA DO PLASMÍDEO SINTÉTICO pET-SUMO-CV2592



Fonte: elaborado pelo autor