



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ÁDRIA HELEN PESSOA FARIAS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA, SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA
OSMOTINA ANTIFÚNGICA DE *CALOTROPIS PROCERA***

FORTALEZA
2023

ÁDRIA HELEN PESSOA FARIAS

EXPRESSÃO HETERÓLOGA, SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA
OSMOTINA ANTIFÚNGICA DE *CALOTROPIS PROCERA*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

FORTALEZA
2023

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)

F238e Farias, Ádria Helen Pessoa.
Expressão heteróloga, solubilização e purificação de uma osmotina antifúngica de *calotropis procera* / Ádria Helen Pessoa Farias. – 2023.
59 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

1. Proteína recombinante. 2. Corpos de inclusão. 3. CTAB. I. Título.

CDD 661

ÁDRIA HELEN PESSOA FARIAS

EXPRESSÃO HETERÓLOGA, SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA
OSMOTINA ANTIFÚNGICA DE *CALOTROPIS PROCERA*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 08/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a Dra. Marina Duarte Pinto Lobo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Ecilene e Hélio.

Ao meu avô Edilson (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, por ter me recebido no seu laboratório e pela excelente orientação, sempre com otimismo e palavras de incentivo. Foi uma honra ser orientada por alguém que admiro como professor, pesquisador e como pessoa.

Ao Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas e à Prof^ª. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo por aceitarem compor a banca examinadora e pela disponibilidade em avaliar o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) pelos momentos de aprendizado e de descontração. Agradeço especialmente ao Edvar pela paciência e ensinamentos durante minha jornada no laboratório.

A todos os professores, funcionários e colaboradores da Universidade Federal do Ceará que de alguma forma contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Aos meus companheiros de curso, sobretudo minhas amigas Luana, Victória e Edna por me proporcionarem os meus melhores momentos na graduação e por todo o apoio, sobretudo nessa reta final.

Ao meu melhor amigo e namorado, Caio, por todo o carinho, paciência e apoio em toda minha trajetória na graduação.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, Ecilene e Hélio, pelo suporte incondicional. Vocês são a parte mais importante da minha vida e eu não poderia ter chegado até aqui sem vocês.

A Deus por ter me dado a oportunidade de viver mais uma existência. Por ter me guiado na resolução desse trabalho, por ter me dado toda a força necessária para superar os obstáculos e especialmente por ter permitido compartilhar a vida com as pessoas tão maravilhosas que foram citadas.

RESUMO

Em etapa anterior a este trabalho, uma osmotina foi purificada a partir do látex de *Calotropis procera*, denominada CpOsm. Essa proteína exibiu forte atividade contra fungos fitopatogênicos, apresentando grande potencial biotecnológico no desenvolvimento de antifúngicos. No entanto, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante para a produção e recuperação de rCpOsm ainda é um desafio. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo otimizado de expressão e purificação dessa osmotina. Para isso, CpOsm foi expressa em células de *E. coli* BL21(DE3) fusionada à tag de solubilidade tiorredoxina (Trx). Os corpos de inclusão contendo Trx-CpOsm foram eficientemente solubilizados a partir da utilização do reagente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) na concentração de 1% (m/v). A proteína solubilizada foi purificada em matriz cromatográfica com níquel imobilizado. Foi utilizado um gradiente stepwise da concentração de imidazol e a proteína recombinante foi eluída no tampão contendo imidazol 250 mM. O protocolo de expressão, solubilização e purificação empregado levou a recuperação de Trx-CpOsm com rendimento de 17,8 mg/L de cultura. A fração proteica purificada foi concentrada em Vivaspin™ 20 10 kDa MWCO (GE Healthcare) e utilizada para ensaios antifúngicos contra estirpes do gênero *Candida*. Testes de difusão em ágar conduzidos com *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida tropicalis* ATCC 750 confirmaram a atividade antifúngica da proteína, estabelecendo a formação de halos de inibição com diâmetros variando de 21 mm a 35 mm. A atividade antimicrobiana do agente solubilizante da proteína também foi investigada. A partir do teste de microdiluição em caldo, a atividade inibitória sobre as células promovidas por Trx-CpOsm e CTAB foram comparadas. Os resultados apontam que Trx-CpOsm e CTAB apresentam importante atividade antimicótica, sendo notável a ação inibitória persistente da proteína mesmo em concentrações mais baixas, ao passo que CTAB perde sua eficácia em concentrações iguais ou menores que 1,95 µg/mL. A persistência residual de CTAB após a solubilização dos corpos de inclusão e a recuperação da proteína bioativa representa um possível reforço para a atividade antifúngica já demonstrada pela proteína. Tais resultados abrem perspectivas promissoras para o desenvolvimento de formulações antimicóticas mais eficazes, destacando o potencial biotecnológico da osmotina de *Calotropis procera*.

Palavras-chave: proteína recombinante; corpos de inclusão; CTAB; *Candida*.

ABSTRACT

In the preliminary stage of this work, an osmotin was purified from the latex of *Calotropis procera*, called CpOsm. This protein exhibits strong activity against phytopathogenic fungi, presenting great biotechnological potential in the development of antifungals. However, the application of recombinant DNA technology for the production and recovery of rCpOsm is still a challenge. Thus, the present work aimed to establish an optimized protocol for the expression and purification of this osmotin. For this, CpOsm was expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells fused to the thioredoxin (Trx) fusion tag. The inclusion bodies, containing Trx-CpOsm, were efficiently solubilized using 1% (w/v) cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The solubilized protein was purified on a chromatographic matrix with immobilized nickel. A stepwise gradient of imidazole concentration was applied, and the recombinant protein was eluted with a buffer containing 250 mM imidazole. The expression, solubilization and purification protocol used led to the recovery of Trx-CpOsm with a yield of 17.8 mg/L of culture. The purified protein fraction was concentrated using Vivaspin™ 20 with a 10 kDa MWCO (GE Healthcare) and employed in antifungal assays against *Candida* strains. Agar diffusion tests with *Candida Krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 13803 and *Candida tropicalis* ATCC 750 revealed the antifungal activity of the protein, establishing the formation of growth inhibition halos with diameters ranging from 21 mm to 35 mm. The antimicrobial activity of the protein solubilizing agent was also investigated. From the broth dilution test, cell growth inhibition activity promoted by Trx-CpOsm and CTAB were compared. The results indicate that Trx-CpOsm and CTAB have important antimycotic activity, with the persistent inhibitory action of the protein being notable even at lower concentrations, while CTAB loses its effectiveness at concentrations equal to or lower than 1.95 µg/mL. The residual persistence of CTAB after solubilization of inclusion bodies and recovery of the bioactive protein represents a possible reinforcement of the antifungal activity already demonstrated by the protein. These results open promising perspectives for the development of more effective antimycotic formulations, highlighting the biotechnological potential of this osmotin from *Calotropis procera*.

Keywords: recombinant protein; inclusion bodies; CTAB; *Candida*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Potencial biotecnológico de osmotinas vegetais | 17 |
| Figura 2 – Mecanismo de ação de osmotinas contra fungos | 19 |
| Figura 3 – Processo esquemático da recuperação de proteína ativa a partir de corpos de inclusão..... | 20 |
| Figura 4 – Morfologia de <i>Calotropis procera</i> | 22 |
| Figura 5 – Estrutura tridimensional da osmotina de <i>Calotropis procera</i> (CpOsm) | 23 |
| Figura 6 – Corpos de inclusão de rCpOsm expressa em <i>E.coli</i> | 23 |
| Figura 7 – Perfil eletroforético da indução de células de BL21(DE3) transformadas com os plasmídeos pET-32a-CpOsm | 33 |
| Figura 8 – Perfil eletroforético de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm após lise celular e solubilização dos corpos de inclusão a partir do pellet..... | 34 |
| Figura 9 – Ilustração esquemática da metodologia aplicada para solubilização de Trx-CpOsm expressa em <i>E.coli</i> | 35 |
| Figura 10 – Perfil eletroforético de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm após lise celular e solubilização dos corpos de inclusão a partir do lisado total | 36 |
| Figura 11 – Perfil eletroforético de células BL21(DE3) transformadas com os plasmídeos pET-32a(+)-CpOsm após lise celular e solubilização dos corpos de inclusão a partir do lisado total após diferentes períodos de indução..... | 37 |
| Figura 12 – Detergente catiônico CTAB..... | 38 |
| Figura 13 – Perfil cromatográfico de Trx-CpOsm em matriz de Sepharose com níquel imobilizado..... | 41 |
| Figura 14 – Perfil eletroforético da solução proteica concentrada a partir do processo de ultrafiltração em Vivaspin™ 20 10 kDa MWCO..... | 42 |
| Figura 15 – Teste de difusão em ágar das estirpes de <i>Candida</i> spp..... | 45 |
| Figura 16 – Gráficos das leituras de absorvância a 620 nm de estirpes de <i>Candida</i> spp. incubadas com a proteína Trx-CpOsm..... | 47 |
| Figura 17 – Gráficos das leituras de absorvância a 620 nm de estirpes de <i>Candida</i> spp. incubadas com CTAB | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Distribuição de isolados de <i>Candida</i> de amostras clínicas do Sul do Brasil | 24 |
| Tabela 2 – Análise comparativa de vários métodos de solubilização de corpos de inclusão | 32 |
| Tabela 3 – Diâmetros médios dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar das estirpes de <i>Candida</i> spp..... | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| CI | Corpos de inclusão |
| CpOsm | Osmotina de <i>Calotropis procera</i> |
| CTAB | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| GdnHCl | Cloreto de guanidina |
| IMAC | Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados |
| IPTG | Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo |
| LB | Luria-Bertani |
| MWCO | Massa molecular de corte |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| Trx-CpOsm | Osmotina de <i>Calotropis procera</i> fusionada à tioredoxina |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Defesa Vegetal | 14 |
| 1.2 | Osmotinas | 15 |
| 1.2.1 | Características gerais | 15 |
| 1.2.2 | Potencial biotecnológico | 16 |
| 1.2.3 | Aplicação antifúngica | 17 |
| 1.2.4 | Expressão heteróloga de osmotinas | 19 |
| 1.3 | <i>Calotropis procera</i> | 21 |
| 1.4 | Infecção por <i>Candida</i> spp. | 23 |
| 2 | OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 | Objetivo geral | 26 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 26 |
| 3 | METODOLOGIA | 27 |
| 3.1 | Expressão da proteína recombinante | 27 |
| 3.2 | Lise celular | 27 |
| 3.3 | Solubilização dos corpos de inclusão | 28 |
| 3.3.1 | Solubilização a partir do pellet | 28 |
| 3.3.2 | Solubilização a partir do lisado total | 28 |
| 3.4 | Eletroforese SDS-PAGE | 28 |
| 3.5 | Cromatografia IMAC com níquel imobilizado | 29 |
| 3.6 | Quantificação da proteína e concentração da amostra por ultrafiltração | 29 |
| 3.7 | Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> | 30 |
| 3.7.1 | Teste de difusão em ágar | 30 |
| 3.7.2 | Teste de microdiluição em caldo | 31 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 4.1 | Expressão da proteína recombinante | 32 |
| 4.2 | Solubilização dos corpos de inclusão | 34 |
| 4.3 | Cromatografia IMAC com níquel imobilizado | 40 |
| 4.4 | Dosagem da proteína e concentração por ultracentrifugação | 42 |
| 4.5 | Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> | 43 |
| 5 | CONCLUSÃO | 51 |
| | REFERENCIAS | 52 |

| | |
|---|-----------|
| ANEXO A – SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA Trx-CpOsm | 59 |
| ANEXO B – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE Trx-CpOsm | |
| OBTIDOS A PARTIR DA FERRAMENTA ProtParam | 60 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Defesa vegetal

As plantas estão expostas a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos. Para mitigarem os danos ao seu crescimento e desenvolvimento, esses organismos desenvolveram mecanismos de defesa contra adversidades diversas, incluindo defesas constitutivas e induzidas. As defesas constitutivas incluem barreiras pré-formadas, como parede celular, cutículas epidérmicas cerosas e casca, que são capazes de conferir além da proteção contra invasão, força e rigidez à planta. As defesas induzíveis, por sua vez, abrangem produtos químicos tóxicos produzidos pela planta quando em contato com o patógeno (FREEMAN; BEATTIE, 2008). No caso de contato com fitopatógenos, a defesa induzida inclui resposta hipersensitiva (HR), resistência sistêmica adquirida (SAR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) e compostos sinalizadores, como por exemplo, ácido salicílico e peróxido de hidrogênio (FERNANDES *et al.*, 2009).

Proteínas relacionadas à patogênese abrangem uma série de proteínas com importante papel na defesa vegetal. Podem ser agrupadas em 17 famílias, classificadas com base na sua massa molecular, localização e atividade biológica (ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021). A grande maioria das proteínas PR compartilha características bioquímicas de baixo peso molecular, solubilidade em ácido e resistência a proteases. São encontradas em quase todos os órgãos da planta incluindo caules, raízes, flores e, sobretudo, folhas. São expressas constitutivamente nos diferentes órgãos e tecidos vegetais, porém a indução de sua síntese acontece em resposta a condições ambientais adversas ou invasão por agente patogênico (FINKINA *et al.*, 2017; JAIN; KHURANA, 2018).

Dentre as famílias de PR-proteínas, as proteínas da família 5 representam grande importância para a defesa da planta, sendo expressas principalmente em resposta a infecções por patógenos e em situações de estresse não biótico. São reconhecidas como proteínas semelhantes à taumatina, por apresentarem homologia da sequência de aminoácidos com a taumatina isolada do fruto de *Thaumatococcus danielli* (VAN DER WEL; LOEVE, 1972). A família PR-5 inclui membros com massa molecular no intervalo de 18 a 25 kDa e caráter básico ou ácido de acordo com seus pontos isoelétricos. Os membros dessa família, tais como osmotinas, zeamatinas e taumatinas, são reconhecidas principalmente por suas propriedades antifúngicas, antibacterianas e antivirais, representando fundamental importância na defesa vegetal contra patógenos (EL-KEREAMY *et al.*, 2011; HAKIM *et al.*, 2018; ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021).

1.2 Osmotinas

1.2.1 Características gerais

Osmotinas são proteínas vegetais classificadas na família 5 de proteínas relacionadas à patogênese (família PR-5) e têm seu nível de expressão aumentado pela planta como reação a diferentes tipos de estresse. A primeira osmotina foi descrita por Singh e colaboradores (1987) em células de *Nicotiana tabacum* adaptadas às condições de salinidade. Posteriormente, foram relatadas em outras espécies de plantas, tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas, apresentando diferentes funções (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

O gene da osmotina é expresso de forma basal na planta e está envolvido no metabolismo básico da célula, já em condições de estresse biótico e abiótico, a sua produção é notavelmente aumentada (WAN *et al.*, 2017). Sua atividade envolve a regulação da resposta da planta por meio de sinalização celular, funcionando como um regulador transcricional de genes codificadores de enzimas relacionadas ao estresse ou como molécula sinalizadora por meio de receptores intracelulares (BASHIR *et al.*, 2020). Essas proteínas estão envolvidas na resistência em situações de frio, salinidade, deficiência de água e frente a patógenos diversos. Sua natureza modular confirma seu caráter multifuncional, em que seus três domínios funcionais podem cumprir sua própria função independentemente ou de maneira combinada com seus vizinhos (ABDIN; KIRAN; ALAM, 2011).

Sua estrutura apresenta arquitetura similar à zeamatina e taumatina, compostas por três domínios. O domínio I é composto por 11 fitas β que formam o núcleo da proteína, enquanto os vários *loops* do domínio II, dispostos a partir do domínio I, são estabilizados por quatro ligações dissulfeto. O domínio III é formado por um pequeno *loop* com duas ligações dissulfeto. Uma fenda ácida pronunciada é formada pelos domínios I e II, e está envolvida na sua atividade contra patógenos (MIN *et al.*, 2004). A presença de pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína conservados em sua estrutura contribuem para características importantes das osmotinas, como a alta resistência à proteólise e à desnaturação por extremos de temperatura e pH (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

A indução de sua expressão ocorre por NaCl, ácido abscísico, etileno, dessecação, frio, seca, ácido salicílico, ferimentos, estresse bacteriano, viral e fúngico (ANIL KUMAR *et al.*, 2015). Osmotinas se concentram em inclusões densas nos vacúolos, enquanto uma pequena quantidade de proteína pode ser encontrada no citoplasma, sem localização preferencial (SINGH *et al.*, 1987). Sua presença é relatada em diferentes partes

da planta, incluindo folhas, tricomas, flores, endosperma, tegumento de semente, embriões somáticos, casca de fruta, epiderme do caule e da raiz (HAKIM *et al.*, 2018). Em espécies laticíferas, a presença de osmotina foi confirmada no látex (DE FREITAS *et al.*, 2011a; SUBROTO *et al.*, 2001).

1.2.2 Potencial biotecnológico

Osmotinas vegetais tem grande potencial de aplicação biotecnológica, sobretudo nas áreas da agricultura e saúde humana (Figura 1). Por serem proteínas associadas à defesa contra estresses bióticos e abióticos, as osmotinas tem papel importante na introdução de cultivares tolerantes a adversidades ambientais e resistentes a patógenos. A expressão de dessas proteínas de forma transgênica já foi explorada para culturas de grande importância econômica, dentre elas batata (LIU *et al.*, 1994), morango (HUSAINI; ABDIN, 2008), algodão (PARKHI *et al.*, 2009), tomate (GOEL *et al.*, 2010) e soja (SUBRAMANYAM *et al.*, 2012).

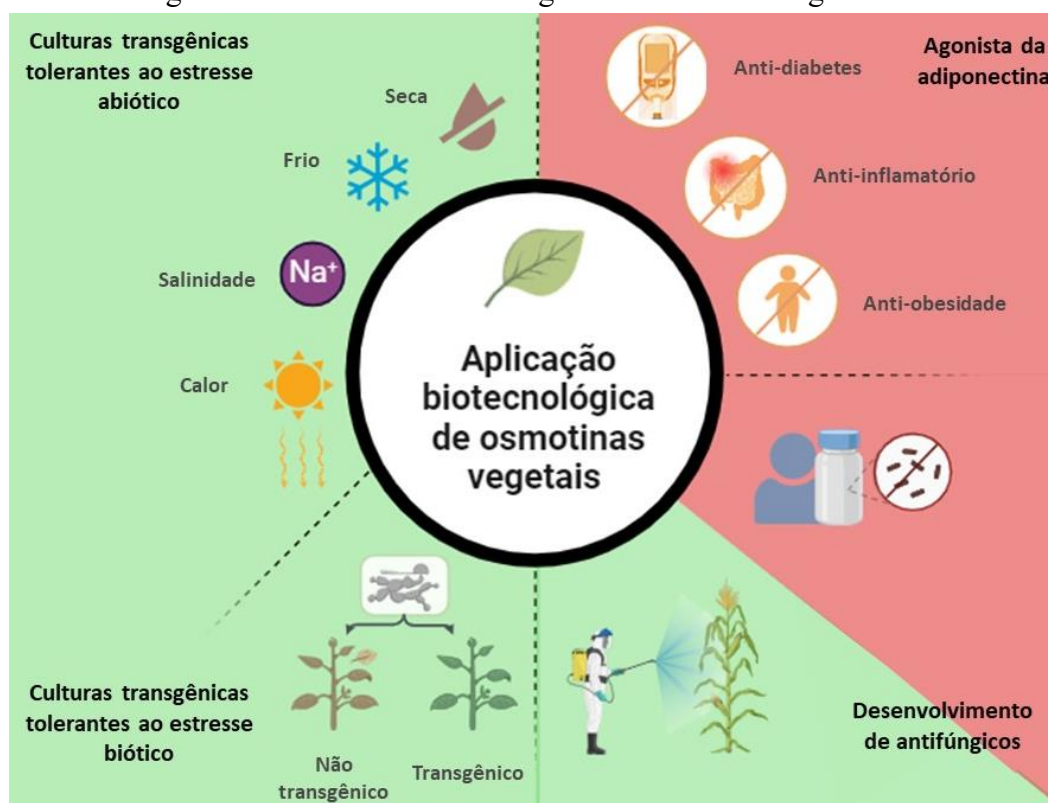
A obtenção de plantas transgênicas que expressam o gene da osmotina tem levado ao estabelecimento de culturas com maior resistência contra condições ambientais adversas, estabelecendo importante papel no contexto da Biotecnologia Verde, visto que contribui para a manutenção do rendimento e produtividade de culturas frente à problemas globais, como falta de água, solo infértil e variações de temperatura. Além de proporcionar maior tolerância a estresses ambientais, a presença de osmotina em plantas transgênicas teve como consequência um maior nível de resistência antifúngica contra diferentes espécies patogênicas (BASHIR *et al.*, 2020; PRIYA *et al.*, 2019).

O gene da osmotina de tabaco (*Nicotiana tabacum*) tem sido o mais explorado no estabelecimento de cultivares transgênicas. A expressão dessa osmotina em espécies vegetais transgênicas foi capaz de proporcionar maior tolerância a fatores ambientais adversos, como seca, salinidade, e frio (GOEL *et al.*, 2010; MANDAL *et al.*, 2018; PATADE *et al.*, 2018). Quanto à proteção contra infecções fúngicas, osmotina de tabaco expressa em cultivares transgênicas foi capaz de conferir resistência contra *Aspergillus niger*, *Piriformospora*, *Microsphaera difusa*, *Septoria glycines*, *Phakospora pachyrhizi*, entre outros patógenos (CHEN, 2012; HUSAINI; ABDIN, 2008; SUBRAMANYAM *et al.*, 2012).

Na saúde humana, osmotinas apresentam importante potencial de aplicação biotecnológica por compartilharem similaridade estrutural com a adiponectina, molécula produzida por adipócitos, que possui capacidade de reduzir o armazenamento do excesso de lipídios no fígado, além de fornecer proteção contra inflamação e fibrose (FANTUZZI,

2013). Ainda que não apresente sequência primária homóloga à adiponectina humana, a osmotina é capaz de interagir com o receptor de membrana e ativar mecanismos moleculares semelhantes aos ativados pela ligação da adiponectina ao seu receptor. Por isso, é apontada como potencial agente terapêutico antidiabético e anti-obesidade, ou ainda, molécula modelo para o desenho de agonistas do receptor de adiponectina (AHMAD *et al.*, 2019; MIELE; COSTANTINI; COLONNA, 2011).

Figura 1 – Potencial biotecnológico de osmotinas vegetais.



Potenciais aplicações de osmotinas vegetais na agricultura (Biotecnologia Verde) e na saúde humana (Biotecnologia Vermelha) estão representadas com fundos verde e vermelho, respectivamente. Fonte: Autora. Criado com Biorender.com.

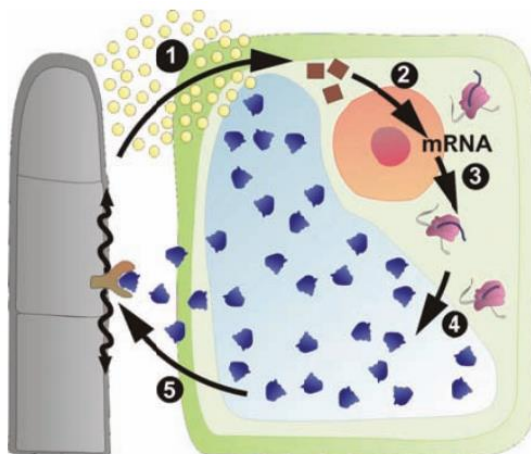
1.2.3 Aplicação antifúngica

Considerando a sua atividade contra fungos, osmotinas podem ser exploradas como uma opção promissora no desenvolvimento de antifúngicos para combater espécies de preocupação nas áreas de agricultura e saúde humana. Ensaio *in vitro* comprovam a atividade dessas proteínas sobre diversos fungos, promovendo inibição do crescimento de hifas e germinação de esporos, além de induzir lise de esporos e redução de sua viabilidade (VIKTOROVA *et al.*, 2012).

O mecanismo preciso pelo qual as osmotinas atuam em fungos ainda não está totalmente compreendido. No entanto, sabe-se que o principal alvo das osmotinas nos fungos é a membrana plasmática, na qual são capazes de aumentar a permeabilidade e causar perturbação em seu gradiente de pH, acarretando, eventualmente, a ruptura dessa membrana. O efeito da osmotina sobre a membrana plasmática do fungo parece envolver, primeiramente, a interação dessa proteína com componentes da parede celular do patógeno, o que pode definir a sensibilidade do fungo à ação da osmotina (Figura 2). Essa interação, por sua vez, é capaz de ativar a via de transdução de sinal MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), cuja estimulação resulta em alterações na parede celular que facilitam o acesso da osmotina à membrana plasmática, aumentando sua citotoxicidade. A permeabilização da membrana fúngica resulta das interações entre a membrana plasmática de fungos sensíveis e supostos domínios formadores de poros nas osmotinas (ABAD *et al.*, 1996; YUN *et al.*, 1998).

Sob a perspectiva da capacidade antifúngica de osmotinas, é sabido que no contexto atual de crescente surgimento de resistência fúngica a agentes antimicóticos disponíveis, tem-se intensificado a busca de novas substâncias ativas contra patógenos, sobretudo de origem natural. As plantas são fontes de diversas moléculas com atividade antifúngica, que podem ser usadas diretamente ou consideradas como precursoras para o desenvolvimento de moléculas mais potentes, sendo as osmotinas um exemplo de potencial antifúngico (ARIF *et al.*, 2009; SANTO, 2010). Nessa perspectiva, Falcao e colaboradores (2016) demonstraram que a osmotina do cacau e seus peptídeos derivados são bons candidatos para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas visando o controle de fungos fitopatogênicos, potencial que pode ser explorado para outras osmotinas com atividade antifúngica já descrita.

Figura 2 – Mecanismo de ação de osmotinas contra fungos.



(1) A célula fúngica libera toxinas, que rompem a membrana da planta e induzem a formação de mensageiros secundários e moléculas sinalizadoras, como ácido abscísico, citocininas e outros. (2) A molécula sinal induz a transcrição do gene da osmotina. (3) O mRNA é traduzido na sequência da proteína. (4) A proteína osmotina é transferida para o vacúolo (5) A osmotina é armazenada em vacúolo até que a membrana do vacúolo seja provavelmente rompida e a osmotina é liberada para o ambiente. Osmotina se liga ao receptor do fungo e causa ruptura da membrana fúngica e apoptose. Fonte: VIKTOROVA *et al.*, 2012.

1.2.4 Expressão heteróloga de osmotinas

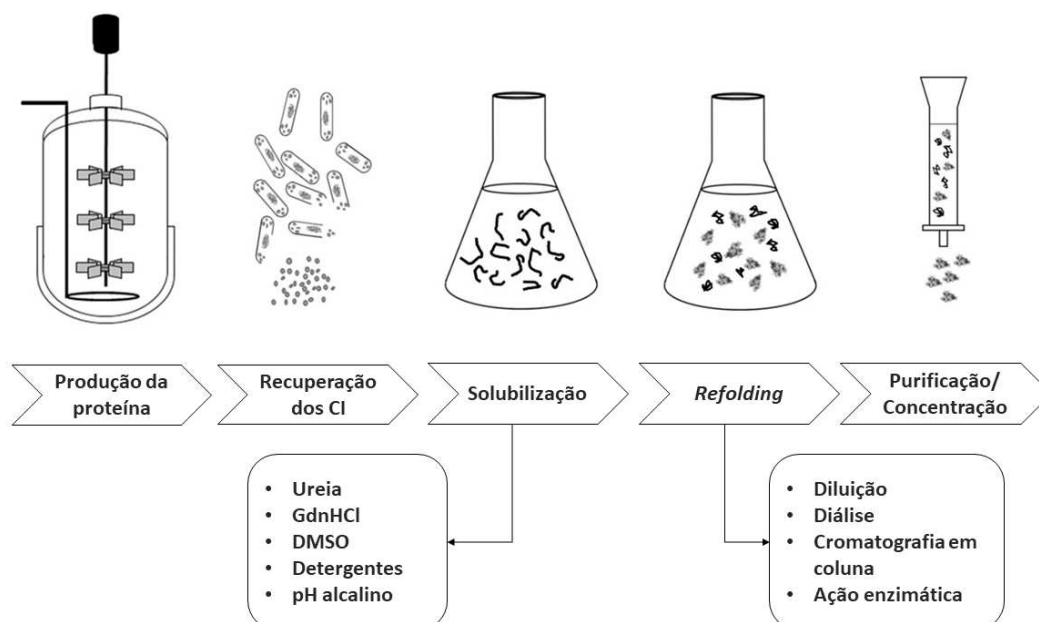
Apesar das inúmeras aplicações e do evidente potencial biotecnológico das osmotinas, a produção eficiente dessas proteínas apresenta desafios consideráveis. A tecnologia do DNA recombinante tem sido utilizada para proporcionar a obtenção de quantidades satisfatórias de macromoléculas úteis, com o intuito de explorar propriedades e potencialidades dessas substâncias. No entanto, aplicação da tecnologia do DNA recombinante para produção e recuperação de osmotinas apresenta limitações significativas. Essa restrição se deve, principalmente, à dificuldade de estabelecimento de um sistema heterólogo eficiente para a expressão dessa proteína.

Ainda que existam muitos hospedeiros utilizados para a produção de proteína recombinante, *Escherichia coli* tem sido o sistema mais popular, dada a disponibilidade de ferramentas e métodos de manipulação genética bem estabelecidos, sendo o sistema modelo mais seguro e economicamente viável na produção de moléculas recombinantes. Entretanto, ao apresentar capacidade limitada de formação de pontes dissulfeto, em sistemas de expressão procarióticos, as osmotinas não conseguem atingir sua conformação nativa e tendem a se acumular de forma insolúvel em corpos de inclusão (CIs) (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; VIKTOROVA *et al.*, 2012).

Os corpos de inclusão produzidos em *Escherichia coli* são compostos por moléculas de proteínas desnaturadas densamente compactadas na forma de partículas (SINGH; PANDA, 2005). A partir dos corpos de inclusão, podem ser recuperadas pequenas quantidades de proteína biologicamente ativa (Figura 3), ainda que frequentemente esse processo seja baseado em etapas de solubilização e redobramento caros e demorados (GLICK; PASTERNAK; PATTEN, 2009). A ressolubilização das proteínas em corpos de inclusão envolve tratamentos agressivos com detergentes, solventes orgânicos ou agentes caotrópicos, e nos protocolos de solubilização esses reagentes podem ser usados de forma isolada ou em diferentes combinações (BHATWA *et al.*, 2021). Por sua vez, a etapa de *refolding*, ou seja, o dobramento da proteína da forma desnaturada para a forma ativa, geralmente ocorre pela remoção gradual do agente solubilizante, passo fundamental na recuperação eficiente das proteínas (YAMAGUCHI; MIYAZAKI, 2014).

Para as osmotinas, a solubilização de corpos de inclusão tem sido alcançada geralmente pela aplicação de altas concentrações do agente desnaturante ureia (JAMI *et al.*, 2007; TZOU *et al.*, 2011; VIKTOROVA *et al.*, 2017). Entretanto, os processos de *refolding* são ainda dificultados por serem proteínas que apresentam baixa solubilidade em água (VIKTOROVA *et al.*, 2012). Portanto, garantir a recuperação de osmotinas em sua conformação nativa quando expressa de forma heteróloga representa um desafio que deve ser superado, a fim de explorar o potencial de aplicação biotecnológica dessas proteínas.

Figura 3 – Processo esquemático da recuperação de proteína ativa a partir de corpos de inclusão.



Fonte: Adaptado de (HUMER; SPADIUT, 2018)

1.3 *Calotropis procera*

Calotropis procera, conhecida popularmente no Brasil como algodão-de-seda ou flor de seda, é uma espécie vegetal perene, arbustiva, pertencente à família Apocynaceae (Figura 4). É considerada uma espécie invasora em vários estados brasileiros, sobretudo no nordeste do país, conforme dados do Instituto Hórus (2021). Essa planta produz uma quantidade significativa de látex, cujo conteúdo apresenta moléculas importantes para a defesa vegetal, com expressiva atividade proteolítica e capacidade antioxidante, confirmando o envolvimento desse fluido na resistência a fitopatógenos (CD *et al.*, 2007).

A partir do látex de *C. procera*, uma osmotina foi purificada, apresentando duas isoformas de mesma sequência N-terminal e com massas moleculares de 22.340 Da e 22.536 Da e valores de ponto isoelétrico (pI) de 8, 9 e 9,1, respectivamente (DE FREITAS *et al.*, 2011a). Essa osmotina apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium solani* (CI50= 67,0 µg/mL), *Neurospora* sp. (CI50= 57,5 µg/mL) e *Colletotrichum gloeosporioides* (CI50= 57,5 µg/mL). De forma semelhante à outras osmotinas com atividade sobre fungos já relatadas, o mecanismo de ação de CpOsm envolve a permeabilização da membrana celular fúngica, consequência da interação eletrostática entre a proteína de caráter básico e os grupos negativamente carregados dos fosfolípidos da superfície da membrana (DE FREITAS *et al.*, 2011b).

Sua estrutura tridimensional conta com três domínios, estabilizados por oito pontes dissulfeto, conservadas entre membros da família PR-5, sendo duas delas responsáveis por conectar os domínios I e II e I e III de CpOsm (Figura 5) (RAMOS *et al.*, 2015). As pontes dissulfeto presentes em sua estrutura, além de conferirem estabilidade conformacional à CpOsm, garantindo que esteja ativa em diferentes temperaturas e pH, são essenciais para a manutenção de sua atividade sobre fungos (DE FREITAS *et al.*, 2011b). Considerando a importante atividade antifúngica de CpOsm, esta proteína apresenta grande potencial de aplicação biotecnológica, seja no desenvolvimento de antifúngicos ou, ainda, no estabelecimento de plantas transgênicas resistentes a patógenos.

No entanto, a exploração do potencial de CpOsm tem sido até certo ponto limitado por ainda não ter sido possível alcançar a produção e recuperação da proteína em sua forma nativa com alto rendimento. No que tange à aplicação da tecnologia do DNA recombinante para produção de CpOsm, Oliveira (2014) demonstrou que a expressão heteróloga da proteína em sistema eucarionte *Pichia pastoris* leva a produção de quantidades limitadas de rCpOsm, o que pode ser resultado de sua atividade antifúngica contra o próprio

sistema de expressão. Por outro lado, a utilização de plataforma procariótica de expressão leva a produção de quantidades relevantes de proteína, no entanto, pelo sistema não ser capaz de realizar modificações pós-traducionais necessárias para a conformação nativa da proteína, ela se acumula no espaço citoplasmático como corpos de inclusão (Figura 6). Embora seja possível a investigação do potencial dessa proteína usando corpos de inclusão (TAVARES *et al.*, 2022), é fundamental produzi-la em sua forma nativa para uma investigação completa de suas funções biológicas associadas. Isso ocorre porque moléculas de proteína parcialmente dobradas e mal dobradas, que se agregam para formar corpos de inclusão, podem perder sua atividade, comprometendo a análise precisa de suas funções em alguns casos (BHATWA *et al.*, 2021)

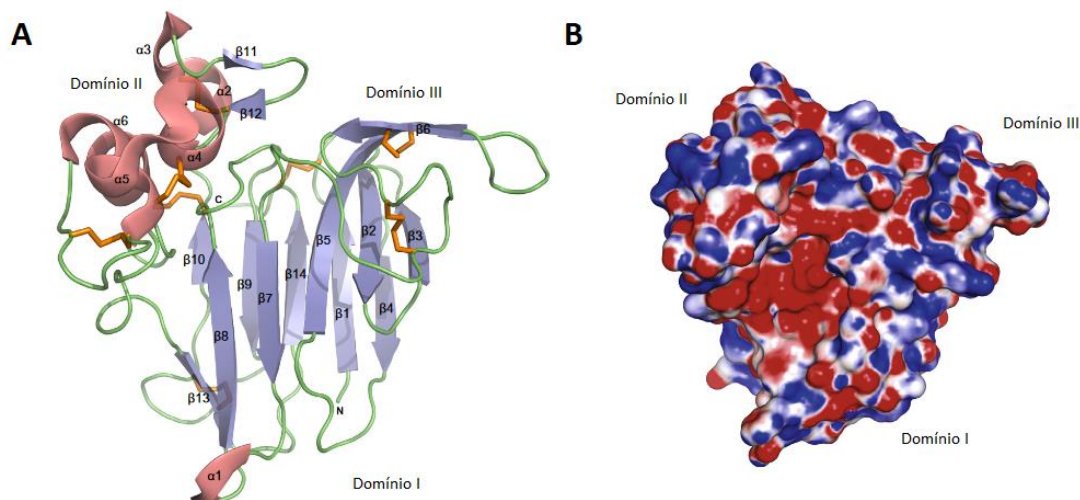
Para recuperação da proteína em sua forma nativa, a solubilização dos corpos de inclusão tornou-se uma alternativa viável, e que apesar de terem sido alcançados resultados promissores a partir da solubilização com agente surfactante, a purificação da proteína solubilizada e a possível interferência do agente solubilizante foram entraves encontrados na investigação do potencial biotecnológico de CpOsm (NASCIMENTO, 2016). Logo, o protocolo de solubilização e purificação da proteína requer otimizações para permitir a recuperação eficiente de rCpOsm em sua forma nativa, e superar os desafios associados à sua produção heteróloga.

Figura 4 – Morfologia de *Calotropis procera*



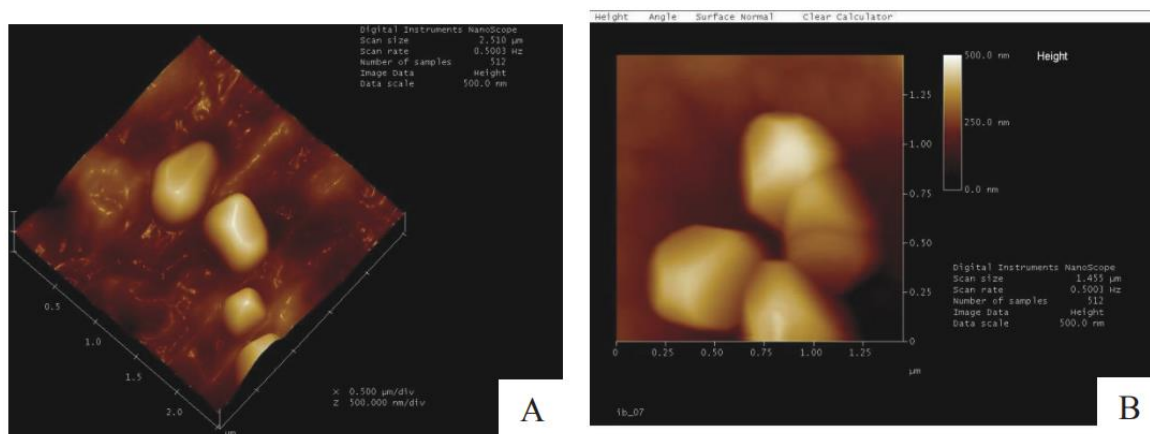
(A) Visão superior da planta com flores; (B) Látex escorrendo do caule ferido. Fonte: Adaptado de KAUR *et al.*, 2021

Figura 5 – Estrutura tridimensional da osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm)



(A) Diagrama da estrutura tridimensional de CpOsm composta por três domínios (I, II e III), seis alfa-hélices (rosa), 14 folhas-beta (azul) e oito pontes dissulfeto (laranja). (B) Superfície molecular de CpOsm com mapeamento dos potenciais eletrostáticos. Potenciais negativos e positivos estão representados nas cores vermelha e azul, respectivamente. Fonte: Adaptado de (RAMOS *et al.*, 2015)

Figura 6 – Corpos de inclusão de rCpOsm expressa em *E.coli*



Imagens obtidas por meio de Microscopia de Força Atômica. (A) AFM tridimensional dos corpos de inclusão obtidos de bactérias transformadas (*E.coli*) expressando a proteína recombinante (CpOsm). (B) Imagem 2D de 1,25 x 1,25 μm . Fonte: NASCIMENTO, 2016

1.4 Infecção por *Candida* spp.

Inúmeras espécies de fungos são consideradas parte da flora normal humana encontrada em diferentes locais anatômicos, incluindo pele, pulmão, trato geniturinário, oral e gastrointestinal, onde desempenham um papel importante na saúde. Entretanto, quando o sistema imunológico está prejudicado, as espécies fúngicas comensais podem se transformar

em patógenos invasivos, translocando-se sistematicamente para desenvolver infecções fúngicas invasivas (IFIs), que afetam múltiplos órgãos e sistemas orgânicos (ARASTEHFAR *et al.*, 2020). As infecções fúngicas invasivas são um problema emergente em todo o mundo, sendo organismos do gênero *Candida* responsáveis pela maioria dos casos relatados de infecções (ENOCH *et al.*, 2017).

Pertencente ao filo Ascomycota, o gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies, entre as quais apenas 30 espécies foram identificadas como causadoras de doenças em humanos. Como patógeno oportunista, *Candida* spp. pode causar dois tipos principais de infecções: infecções superficiais (candidíase cutânea e de mucosa) e infecções sistêmicas invasivas (AHMED *et al.*, 2022). Dentre as espécies de *Candida* consideradas patogênicas, cinco delas - *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* - são responsáveis por 92% dos casos de candidemia, com 62% dos casos atribuídos a estirpe de *C. albicans* (GUINEA, 2014). A Tabela 1 mostra as principais espécies de *Candida*, isoladas em um estudo conduzido no sul de Brasil.

O tratamento eficaz de infecções fúngicas invasivas depende de três classes de antifúngicos sistêmicos: azóis (fluconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol), equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) e polienos (anfotericina B (AmB) e suas formas lipídicas — complexo de lipídios de AmB e lipossomal-AmB (PAIVA; PEREIRA, 2023). No entanto, a crescente incidência de *Candida* resistente a esses medicamentos traz um novo desafio ao tratamento da infecção fúngica, o que sustenta novas abordagens para o controle desses fungos (DANESHNIA *et al.*, 2023; FENG *et al.*, 2023).

Sob a perspectiva da necessidade de antifúngicos inovadores e potentes à medida que os fungos desenvolvem resistência aos antifúngicos atualmente utilizados na medicina, as plantas oferecem uma fonte enorme de compostos, sobretudo proteínas e peptídeos de caráter antifúngico, com potencial utilidade no tratamento de infecções (DE LUCCA; CLEVELAND; WEDGE, 2005).

Tabela 1 – Distribuição de isolados de *Candida* de amostras clínicas do Sul do Brasil

| Estirpe de <i>Candida</i> | Total N/% |
|---------------------------|-----------|
| <i>C. albicans</i> | 56 (59.6) |
| <i>C. dubliniensis</i> | 02 (2.1) |
| <i>C. glabrata</i> | 08 (8.5) |
| <i>C. guilliermondii</i> | 02 (2.1) |

| | |
|------------------------|-----------|
| <i>C. kefir</i> | 01 (1.1) |
| <i>C. krusei</i> | 03 (3.1) |
| <i>C. lipolitica</i> | 01 (1.1) |
| <i>C. lusitanea</i> | 01 (1.1) |
| <i>C. parapsilosis</i> | 14 (14.9) |
| <i>C. tropicalis</i> | 06 (6.3) |
| Total N/% | 94 (100) |

Fonte: (BOTELHO *et al.*, 2022)

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer um protocolo otimizado de expressão e purificação de uma osmotina recombinante de *Calotropis procera* (rCpOsm) a partir de indução de células de *Escherichia coli* transformadas com plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm e comprovar sua atividade biológica.

2.2 Específicos

- Induzir a expressão de rCpOsm em sistema heterólogo *E. coli*;
- Promover a solubilização dos corpos de inclusão com alto rendimento;
- Purificar a proteína a partir da fração solúvel;
- Avaliar a atividade antifúngica da proteína;

3 METODOLOGIA

3.1 Expressão da proteína recombinante

Células de *Escherichia coli* da estirpe BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm, que contém a sequência codificadora da proteína osmotina de *Calotropis procera*, foram obtidas do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. O produto gênico consiste na sequência correspondente à CpOsm fusionada a uma *tag* de solubilidade do tipo tiorredoxina e uma cauda de histidina (Anexo A).

A partir de cultura estoque em glicerol, células de *E. coli* BL21(DE3) já transformadas com o plasmídeo recombinante foram estriadas em meio LB ágar, contendo o antibiótico carbenicilina na concentração final de 150 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. Com o auxílio de uma ponteira estéril, uma colônia isolada foi transferida para meio LB caldo suplementado com mesmo antibiótico na concentração final já estabelecida. As células foram incubadas a 37 °C e 180 rpm por 16 h. Em seguida, uma alíquota correspondente a 5% do volume final do inóculo foi adicionada ao meio LB caldo de maior volume suplementado com carbenicilina (150 µg/mL). A cultura foi incubada a 37 °C e 180 rpm até uma D.O.₆₀₀ de 0,6-0,8. Nesse momento, o indutor de expressão IPTG foi adicionado para uma concentração final de 0,3 mM, e a cultura foi incubada a 30 °C e 150 rpm. Após um período de indução de 2 horas, a cultura foi centrifugada a 8.000 × g por 15 min a 4 °C, e o pellet de células foi recuperado para posterior lise celular.

3.2 Lise celular

O pellet de células foi ressuspensionado em 1/10 de volume de cultura em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM). Em seguida, adicionou-se 1/10 do volume final de solução de Triton X-100 1% (v/v) e lisozima para concentração final de 100 µg/mL. A suspensão foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionadas 50 U de DNase I (VWR AMRESCO Chemicals), além de MgCl₂ e CaCl₂ para concentrações finais de 8 mM e 10 mM, respectivamente. Após incubação a 37 °C por 1 hora, a solução foi centrifugada a 8.000 × g por 30 min a 4 °C. As frações solúveis e insolúveis foram separadas para posterior análise por eletroforese SDS-PAGE.

3.3 Solubilização dos corpos de inclusão

3.3.1 Solubilização a partir do pellet

Os corpos de inclusão foram solubilizados com o agente surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em uma concentração de 1% (m/v). O protocolo seguido foi adaptado a partir da metodologia descrita por Nascimento (2016). O pellet resultante do processo de lise celular foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, contendo CTAB 1% (m/v). A solução foi então incubada a 50 °C por 2 horas. Com o intuito de acompanhar a solubilização dos corpos de inclusão ao longo do período de 2 horas, alíquotas foram retiradas da suspensão incubada a cada 30 minutos. Ao final de 2 h, a porção solúvel resultante do processo de solubilização foi centrifugada a 8.000 × g por 30 min a 4 °C. As frações solúvel e insolúvel foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE para avaliar qualitativamente a presença da proteína na fração solúvel ou insolúvel.

3.3.2 Solubilização a partir do lisado total

Após lise celular, foi adicionado ao lisado total a solução de solubilização Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 5mM e CTAB 10% para uma concentração final de CTAB 1%. O material foi incubado por 30 min a 50°C. Por fim, as soluções foram centrifugadas a 8.000 × g por 30 min a 25 °C. As frações solúveis e insolúveis foram separadas para posterior análise por eletroforese SDS-PAGE.

3.4 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis entre placas de vidro. O gel de separação continha 15% de poliacrilamida, 1% SDS e foi preparado em tampão Tris-HCl 1,0 M pH 8,8, enquanto o gel de empacotamento continha 5% de poliacrilamida, 1% de SDS, preparado em tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8. Com o intuito de acompanhar a eficiência da solubilização dos corpos de inclusão, as amostras insolúveis provenientes do processo de solubilização foram ressuspensionadas em tampão de amostra 1 × [TrisHCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)]. As amostras solúveis, por sua vez, foram adicionadas ao tampão de amostra 4 ×. Ambas foram submetidas a aquecimento a 100 °C por 10 min. Volumes de 5 µL e 24 µL das frações

insolúveis e solúveis, respectivamente, foram aplicados em cada poço. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical Dual Gel Caster (Hoefer, São Francisco, Califórnia, EUA) sob voltagem constante de 120 V, usando tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M e SDS 0,1 % (m/v). As bandas de proteínas foram coradas com *Blue Silver Dye*, preparado de acordo com o protocolo estabelecido por Metzger & Dyballa (2009), e descoradas com água destilada. Para calcular a massa molecular aparente da proteína expressa, o marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado. Foram conduzidas eletroforeses adicionais, de acordo com as especificações já mencionadas, para acompanhar o processo de purificação de rCpOsm, utilizando, por sua vez, o marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific).

3.5 Cromatografia IMAC com níquel imobilizado

A fração de rCpOsm solubilizada com CTAB 1% (m/v) foi submetida à diálise contra tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 500 mM, imidazol 5mM e CTAB 1% (m/v) e aplicada na matriz Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), previamente equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min e frações de 3 mL foram coletadas. A cromatografia foi acompanhada a partir das medidas da absorbância das frações a 280 nm no espectrofotômetro *Genesys 10 UV Scanning*. As proteínas não retidas na matriz foram eluídas com tampão de equilíbrio. Em seguida, foram aplicados sequencialmente tampões de mesma composição do tampão de equilíbrio, porém contendo imidazol nas concentrações de 40 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM. Os picos obtidos foram analisados por eletroforese SDS-PAGE.

3.6 Quantificação da proteína e concentração da amostra por ultrafiltração

A determinação da concentração de proteína foi realizada a partir da aplicação da Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon c l$), na qual A é a absorbância a 280 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar da proteína, c é a concentração da proteína e l é o caminho óptico. O coeficiente de extinção molar de Trx-CpOsm foi calculado a partir da ferramenta ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005) (Anexo B), ao passo que o caminho óptico foi considerado igual a 1 cm. A absorbância foi obtida através da leitura no espectrofotômetro Genesys 10 UV Scanning a 280 nm.

Após quantificação da proteína, a solução proteica foi submetida ao processo de ultrafiltração utilizando coluna de centrifugação e ultrafiltração Vivaspin™ 20 10 kDa MWCO (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) com o intuito de concentrar a proteína. A solução foi submetida aos ciclos de centrifugação nas condições de $8.000 \times g$ por 17 min a 20 °C. O volume de solução foi reduzido até obtenção de amostra com concentração de proteína de aproximadamente 1 mg/mL, calculada com base na Lei de Lambert-Beer.

3.7 Avaliação de atividade antifúngica *in vitro*

3.7.1 Teste de difusão em ágar

Para avaliação da atividade antifúngica de Trx-CpOsm, foram utilizadas as estirpes *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida tropicalis* ATCC 750, totalizando seis cepas. O ensaio para determinação da atividade antifúngica foi realizado pelo método da difusão em meio sólido, conforme documento M44-A2 (CLSI, 2009). A partir de cultura estoque mantida em caldo inclinado, as células de cada estirpe foram inoculadas em 3 mL de meio Sabouraud 1× e incubadas a 35 °C por 24 horas. Em seguida, a partir das culturas crescidas, foram realizadas diluições para obtenção de inóculo final contendo 10^6 UFC/mL para utilização nos ensaios. As placas contendo ágar Sabouraud (60 mL) foram inoculadas com a suspensão da levedura, utilizando swab estéril, usado para distribuir uniformemente as células sobre a superfície do meio. As placas foram mantidas em repouso por aproximadamente 5 minutos em temperatura ambiente, para melhor absorção do inóculo no meio de cultura. Em seguida, foram colocados sobre a superfície do meio discos de papel filtro estéreis, com diâmetro de aproximadamente 10 mm, e 50 µL da solução de Trx-CpOsm ($1,196 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi inserida sobre o disco. Após um período de 30 minutos para secagem do papel filtro, um volume de mais 50 µL da proteína recombinante foi colocado sobre o papel, totalizando 100 µL utilizados no ensaio. Esse processo foi repetido para discos contendo fluconazol (100mg/mL) e água Milli-Q estéril como controle positivo e negativo, respectivamente. Para verificar a atividade antifúngica do agente solubilizante da proteína, discos contendo no total 100µL no diluente da proteína (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 500 mM e CTAB 0,2% (m/v)) também foram utilizados nos ensaios. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Os resultados

foram avaliados a partir da mensuração dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento fúngico em milímetros (mm). O ensaio foi realizado em duplicata, sendo considerada a média aritmética dos valores obtidos.

3.7.2 Teste de microdiluição em caldo

Os ensaios de atividade antifúngica também foram realizados com base na técnica de microdiluição em placa de 96 poços conforme descrito pelo documento M27-A3 (CLSI, 2008). A partir de cultura estoque mantida em caldo inclinado, as células foram inoculadas em 3 mL de meio Sabouraud 1× e incubadas a 35 °C por 24 horas. Em seguida, a partir das culturas crescidas, foram realizadas diluições para obtenção de inóculo final contendo 10⁶ UFC/mL para utilização nos ensaios. Inicialmente, ao primeiro poço de cada linha da placa, foram adicionados 200 µL de solução com Trx-CpOsm de concentração 1 mg/mL em Tris-HCl 50mM, NaCl 0,5M e CTAB 0,2% (m/v). Em seguida, 100 µL de água Milli-Q estéril foi distribuído em todos os poços, exceto no primeiro. A diluição seriada foi realizada então a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL do primeiro poço contendo unicamente a proteína para o seguinte contendo água Milli-Q, e assim sucessivamente, estabelecendo concentração decrescente de proteína de 1 a 0,00048 mg/mL. Por fim, foram aplicados 100 µL das suspensões celulares preparadas de cada estirpe de *Candida* spp. Como controle, as células de cada estirpe testada foram inoculadas em poços contendo apenas água Milli-Q estéril. Para avaliar o efeito do agente solubilizante da proteína sobre as células, foram adicionados 200 µL de solução de CTAB 0,2% (m/v) em Tris-HCl 50mM, NaCl 0,5M, e em seguida foi feita a diluição seriada nos demais poços contendo apenas água Milli-Q estéril conforme preparados para a proteína recombinante. Aos poços contendo CTAB foram adicionados 100 µL de suspensão celular de cada cepa, e avaliados com relação à inibição do crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata. As microplacas foram incubadas a 35 °C e submetidas à inspeção visual de crescimento microbiano e à leitura de absorbância a 620 nm, em leitor de Elisa (BioTek) após o período de 24 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão da proteína recombinante

No presente trabalho, foram utilizadas células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm, que carrega além sequência de DNA codificadora de CpOsm, a *tag* de solubilidade tiorredoxina. A utilização de uma *tag* de solubilidade apresenta uma tentativa de evitar a formação de corpos de inclusão e obter a expressão de proteína solúvel em *E. coli*. Por definição, *tags* de solubilidade são proteínas co-expressas e fusionadas à proteína alvo que podem proporcionar uma melhor solubilidade geral do produto gênico. Embora o mecanismo não seja bem compreendido, acredita-se que a fusão a um parceiro estável ajude a estabilizar e promover o dobramento adequado da proteína insolúvel (BHATWA *et al.*, 2021). Várias etiquetas de fusão já foram desenvolvidas para ajudar na solubilização de proteínas, dentre as mais conhecidas estão GST, SUMO, TrxA e NusA (YADAV *et al.*, 2016).

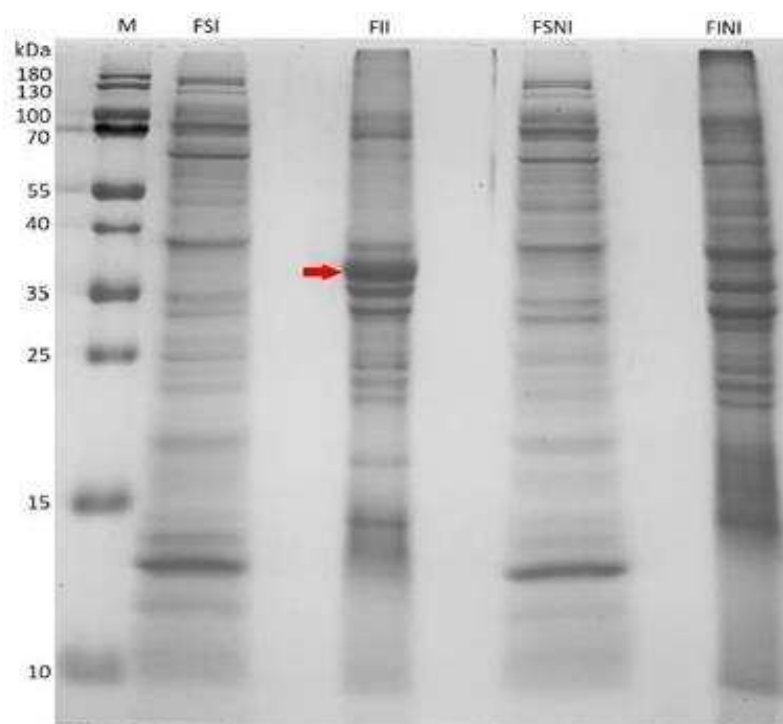
Na estratégia experimental aqui empregada, a *tag* de solubilidade tiorredoxina (*trx*) foi utilizada como parceiro de fusão, na tentativa de aprimorar a solubilidade da osmotina de *C. procera* expressa em *E. coli*. A expressão da proteína recombinante foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (Figura 7). A intensidade notável da banda de Trx-CpOsm, identificada com uma massa molecular aparente de aproximadamente 37 kDa, é um indicativo claro do alto nível de expressão alcançado. Este resultado é diretamente influenciado pelo sistema de expressão escolhido, no qual o gene que codifica a RNA polimerase T7 é integrado ao cromossomo da bactéria, sob o controle do promotor lac L8-UV5. Este sistema demonstrou ser altamente eficiente ao promover níveis significativos de transcrição e tradução (ROSANO; CECCARELLI, 2014), o que foi confirmado pelo alto nível de expressão da osmotina recombinante de *Calotropis procera* pela cepa. Entretanto, apesar do uso da *tag* de solubilidade, a proteína foi integralmente expressa de forma insolúvel em corpos de inclusão (Figura 7). Ainda que vários relatos na literatura atestem que o uso de *tags* de fusão facilitam a expressão da proteína na fração solúvel e auxiliam no seu enovelamento adequado, cada proteína é diferente e não há garantias que as mesmas condições de expressão funcionem da mesma forma para todas as proteínas (KAUR *et al.*, 2018).

A co-expressão de proteínas PR-5 com *tags* de solubilidade atesta a variabilidade de eficácia dessa abordagem, uma vez que tantos resultados positivos como negativos são relatados na literatura (HIGUCHI *et al.*, 2016; JAMI *et al.*, 2007), demonstrando que o

sucesso dessa abordagem para evitar a formação de corpos de inclusão pode variar de uma proteína para outra e requer uma otimização empírica (BHATWA *et al.*, 2021).

Com o intuito de recuperar a proteína em sua conformação nativa, os corpos de inclusão obtidos a partir de expressão em *E. coli* BL21(DE3) transformadas com plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm, foram submetidos a tentativas de solubilização a partir do uso de agente surfactante.

Figura 7 – Perfil eletroforético da indução de células de BL21(DE3) transformadas com os plasmídeos pET-32a-CpOsm.

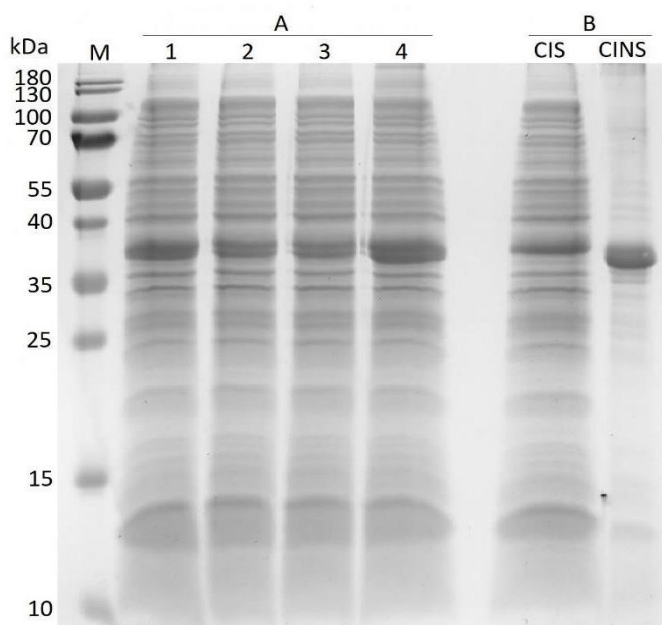


Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). (A) BL21(DE3) transformada com plasmídeo pET-32a-CpOsm, expressando osmotina fundida à tiorredoxina (Trx-CpOsm) com uma massa molecular aparente de ~37,226 kDa (seta vermelha). M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); FSI: Fração Solúvel Induzida; FII: Fração Insolúvel induzida; FSNI: Fração Solúvel Não Induzida; FINI: Fração Insolúvel Não Induzida.

4.2 Solubilização dos corpos de inclusão

Para a recuperação de proteína bioativa a partir de corpos de inclusão, o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi escolhido como agente solubilizante. Em uma abordagem inicial, a fração insolúvel resultante do processo de lise celular foi ressuspensa em tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mM pH 8 NaCl 500 mM, imidazol 5mM) contendo CTAB 1% (m/v) e incubada a 50 °C por 2 horas. A análise do gel de eletroforese revelou que o uso de CTAB na concentração de 1% (m/v) foi eficaz na solubilização da proteína, como evidenciado pela visualização da banda correspondente à proteína recombinante na fração solúvel (Figura 8). O acompanhamento da solubilização ao longo do período de 2 horas revelou que nos 30 minutos iniciais de incubação a 50 °C os corpos de inclusão atingiram a solubilização máxima possível nas condições testadas. Embora a solubilização de Trx-CpOsm a partir da reação com o surfactante tenha ocorrido, ela foi apenas parcial, sendo possível observar que uma fração substancial da proteína permaneceu insolúvel, apontando a necessidade de ajustes na metodologia empregada.

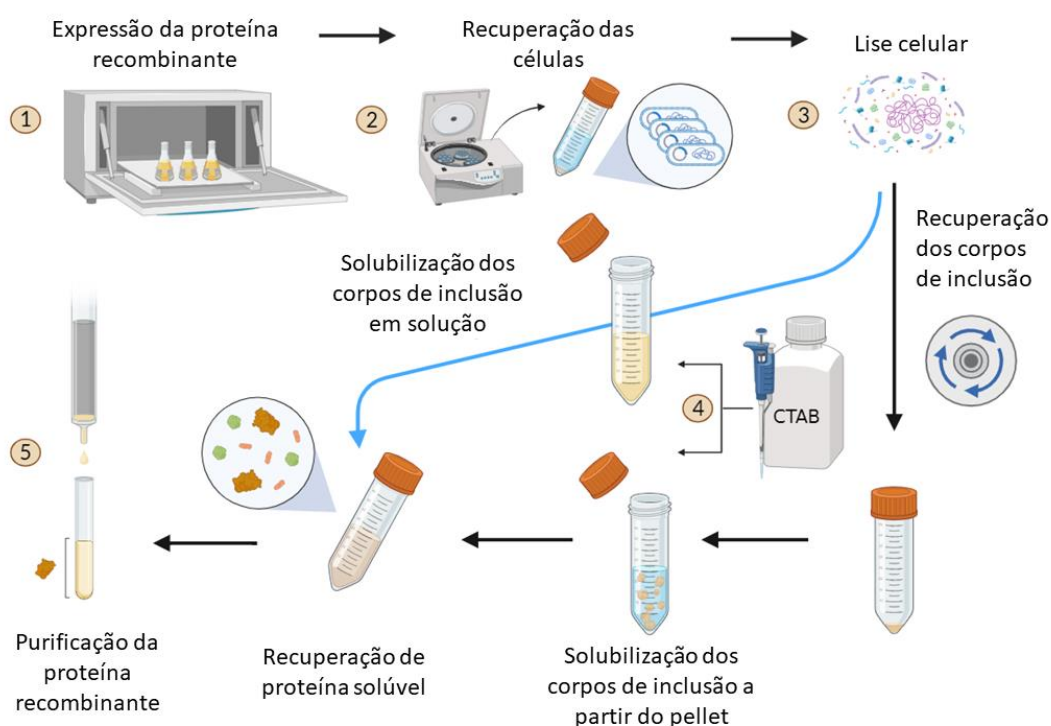
Figura 8 – Perfil eletroforético de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm após lise celular e solubilização dos corpos de inclusão a partir do pellet



Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes. A) Fração solúvel da suspensão de solubilização incubada a 50 °C após (1) 30 minutos (2) 60 minutos (3) 90 minutos (4) 120 minutos. B) Resultado da tentativa de solubilização dos corpos de inclusão; CIS: Corpos de Inclusão Solubilizados; CINS: Corpos de Inclusão Não Solubilizados. M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Com o intuito de aumentar o rendimento de proteínas solúveis, o protocolo de solubilização dos corpos de inclusão sofreu modificações (Figura 9). Na metodologia anteriormente aplicada, a solução resultante da lise celular era submetida a centrifugação e o pellet contendo os corpos de inclusão era recuperado para posterior solubilização. Em uma abordagem alternativa, a solução de solubilização foi adicionada ao final da etapa de lise celular e, em seguida, incubada na temperatura de 50 °C. O tempo de incubação também foi ajustado, já que, com base nos resultados anteriormente alcançados, o período de 30 minutos é suficiente para promover a solubilização da proteína.

Figura 9 – Ilustração esquemática da metodologia aplicada para solubilização de Trx-CpOsm expressa em *E.coli*

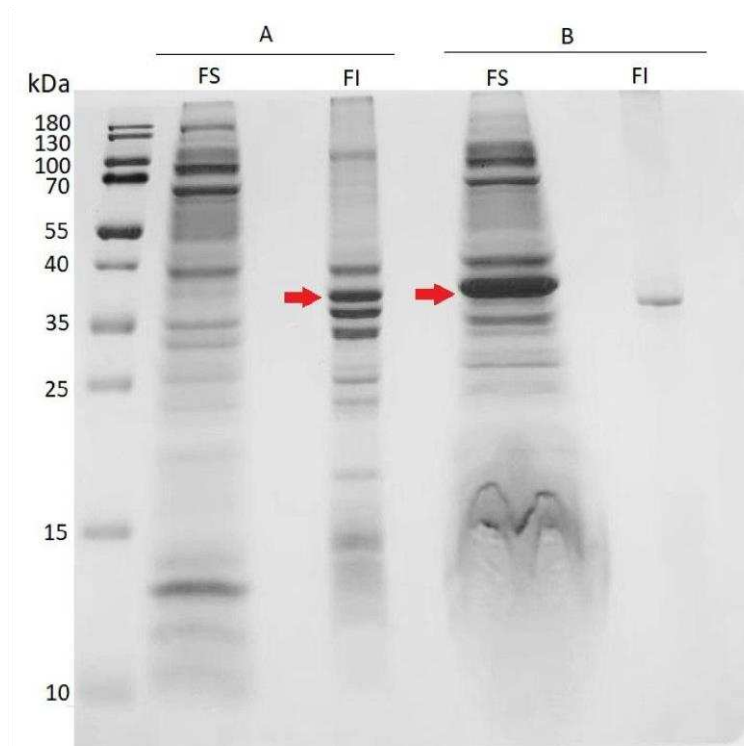


O processo envolve quatro passos principais: (1) Expressão da proteína recombinante, (2) Recuperação das células induzidas, (3) Lise das células, (4) Solubilização dos corpos de inclusão, (5) Purificação da proteína solubilizada. A seta azul indica a modificação na metodologia de solubilização dos corpos de inclusão de Trx-CpOsm. Fonte: Autora. Criado com BioRender.com.

A partir da análise do gel de eletroforese e comparação da intensidade de bandas, é possível constatar que a alteração no protocolo resultou em um aumento significativo de rendimento no processo, com praticamente toda a quantidade de proteína localizada na fração solúvel (Figura 10). A lise celular na ausência do reagente comprova a necessidade de adição de um agente de solubilização para alcançar a recuperação de proteína em sua

forma nativa e, no experimento em questão, o detergente catiônico CTAB mostrou-se ideal para promover a solubilização de Trx-CpOsm nas condições testadas.

Figura 10 – Perfil eletroforético de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-32a(+)-CpOsm após lise celular e solubilização dos corpos de inclusão a partir do lisado total

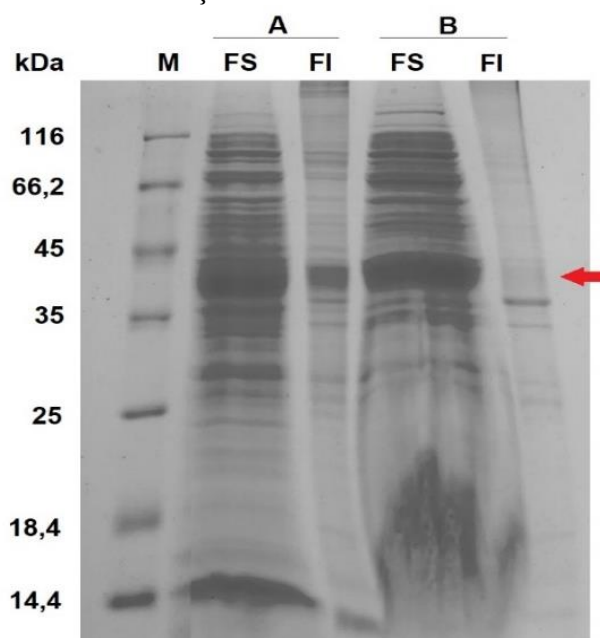


Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A seta vermelha indica rCpOsm. (A) Lise celular na ausência de CTAB. (B) Lise celular na presença de CTAB. M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); FS: Fração Solúvel FI: Fração Insolúvel.

Na abordagem inicialmente testada, a ressuspensão dos corpos de inclusão a partir do pellet em tampão de solubilização era desafiadora, com parte do agregado permanecendo inacessível para a renaturação adequada. A provável causa para essa dificuldade é a presença de detritos celulares, ácido nucleico e algumas proteínas de membrana que podem interagir com os corpos de inclusão, devido à maior densidade e carga do agregado proteico (SINGHVI *et al.*, 2020). Convencionalmente, a separação dos contaminantes dos corpos de inclusão inclui várias etapas de lavagem do pellet com baixas concentrações de detergentes ou agentes caotrópicos, o que pode levar a perda de parte da proteína de interesse (PETERNEL, 2013; SINGH *et al.*, 2015). A solubilização dos corpos de inclusão quando ainda em solução de lise foi uma alternativa viável para evitar perdas de proteína com a lavagem do pellet e aumentar consideravelmente o rendimento do processo.

Com a implementação da nova metodologia, a duração da indução tornou-se um fator importante a ser considerado já que apresentou maior eficiência quando aplicada às células cujo período de indução foi de 2 horas, em contraste com o período de 18 h de indução (Figura 11). De fato, a duração da indução é um parâmetro que deve ser otimizado durante o desenvolvimento de um protocolo de expressão de proteína recombinante. Isso porque ao passar do tempo, a limitação de nutrientes torna o ambiente tóxico e a produção da proteína de interesse já não se torna tão desejável porque há aumento da produção de outros compostos pelo microrganismo, como metabólitos secundários (HUNTER; BIBBY; BAUTISTA, 2016; NASCIMENTO, 2016). No trabalho em questão, o efeito negativo do aumento do tempo de indução sobre a recuperação de proteína solúvel a partir dos corpos de inclusão pode decorrer justamente do acúmulo de outros produtos gerados pelo sistema de expressão, que podem interagir com o agregado proteico e, assim, diminuir a eficiência da solubilização do CTAB sobre os corpos de inclusão.

Figura 11 – Perfil eletroforético de células BL21(DE3) transformadas com os plasmídeos pET-32a(+)-CpOsm após lise celular e solubilização dos corpos de inclusão a partir do lisado total após diferentes períodos de indução

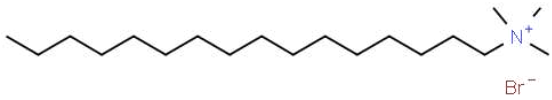


Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A seta vermelha indica a altura correspondente de rCpOsm no gel. (A) Lise celular na presença de CTAB com células induzidas por 18h (B) Lise celular na presença de CTAB com células induzidas por 2h M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); FS: Fração Solúvel FI: Fração Insolúvel.

A eficácia do CTAB em promover o *refolding* de proteínas expressas em corpos de inclusão já foi comprovada para diferentes proteínas (PURI *et al.*, 1992; SINGH; GUPTA, 2008; WANG *et al.*, 2005). Esse efeito também foi constatado para a osmotina recombinante

em questão, já que permitiu a recuperação de proteína solúvel com alto rendimento, validando o uso desse surfactante no experimento. Além de ter sido eficiente no objetivo aqui traçado, a utilização do CTAB apresenta vantagem sobre outros métodos de solubilização de corpos de inclusão (Tabela 2). Isso porque a utilização de detergentes, como o CTAB, promove a solubilização da proteína sem desnaturação. O proposto modo de ação de surfactantes catiônicos nesse processo abrange uma série de interações. Primeiramente, são estabelecidas interações hidrofóbicas entre a estrutura dos corpos de inclusão e a cadeia lateral acila do detergente, seguida pela repulsão entre os grupos carregados positivamente do surfactante e a estrutura da proteína. Esse complexo de interações formado é capaz de superar as forças associativas do corpo de inclusão e produzir a solubilização da proteína (PURI *et al.*, 1992). Sendo assim, a utilização do CTAB dispensa a necessidade de uma etapa de *refolding*, tornando o processo mais simples. Além disso, por promover a solubilização por um mecanismo diferente, a utilização do CTAB na solubilização de corpos de inclusão permite superar problemas comuns nesse processo, como modificações nas cadeias laterais de aminoácidos e agregação (SINGHVI *et al.*, 2020).

Figura 12 – Detergente catiônico CTAB

| Fórmula molecular | Massa (Da) | Estrutura química |
|-------------------------------------|------------|--|
| C ₁₉ H ₄₂ BrN | 364.448 |  |

Fonte: ChemSpider, 2023

Tabela 2 – Análise comparativa de vários métodos de solubilização de corpos de inclusão

| Natureza do método | Método | Vantagens | Desvantagens |
|--------------------|----------|---|--|
| Desnaturação forte | 8M ureia | - Potencial para solubilizar uma ampla gama de CIs bacterianos - Baixo custo de reagente | - Baixa recuperação de proteína bioativa - Modificação de cadeias laterais de aminoácidos |

| | | | |
|-------------------|--|---|---|
| | 6M GdnHCl | | <ul style="list-style-type: none"> - Causa agregação - Baixa recuperação de proteína bioativa |
| Desnaturação leve | Prensa francesa | - Alto rendimento | - Técnica de alto custo |
| | pH alcalino | <ul style="list-style-type: none"> - Potencial para solubilizar uma ampla gama de CIs bacterianos - Boa recuperação de proteína bioativa Baixo custo de reagente | - Modificação nas cadeias laterais de aminoácidos |
| | Baseado em calor | <ul style="list-style-type: none"> - Custo-benefício - Metodologia rápida | - Agregação induzida pelo aquecimento das proteínas |
| | Baseado em ácido | - Custo-benefício | <ul style="list-style-type: none"> - Modificações químicas irreversíveis - Clivagem ácida |
| Sem desnaturação | Baixa concentração de solvente orgânico, DMSO, CTAB e demais detergentes | <ul style="list-style-type: none"> - Dispensa etapa de <i>refolding</i> - Reagentes de baixo custo | <ul style="list-style-type: none"> - Interferência com processos cromatográficos |

Fonte: Adaptado de (SINGHVI *et al.*, 2020)

4.3 Cromatografia IMAC com níquel imobilizado

A cromatografia é uma operação crítica na obtenção de proteínas recombinantes bioativas, uma vez que além de promover a purificação da molécula alvo, pode auxiliar no redobramento da proteína em sua forma nativa quando são expressas em corpos de inclusão (RAJENDRAN; PUSHPAVANAM; JAYARAMAN, 2022). Como estratégia para purificação de rCpOsm, foi utilizada a matriz Ni Sepharose 6 Fast Flow, que permite a purificação eficaz de proteínas expressas com cauda de histidina, como é o caso da proteína recombinante em questão. A cromatografia foi conduzida utilizando o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, contendo imidazol em concentrações variáveis.

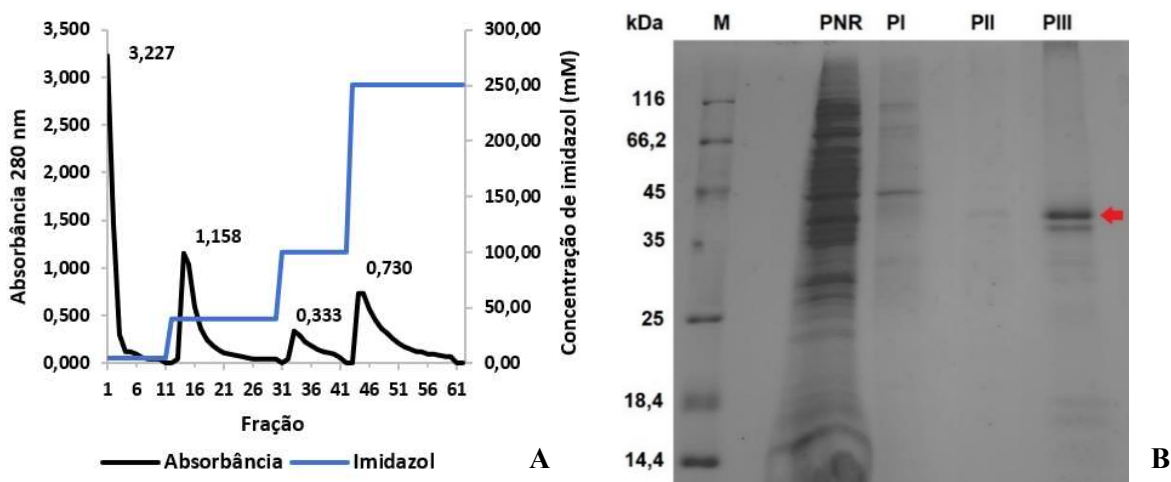
Três picos (PI, PII e PIII) foram obtidos, sendo o primeiro pico eluído com o tampão contendo imidazol na concentração de 40 mM, o segundo com imidazol 100 mM e o terceiro com imidazol 250 mM. Apenas os picos PI e PIII apresentaram valores de absorvância relevantes (Figura 13 A). As frações 1 a 9 (PI), 14 a 23 (PII), 33 a 40 (PIII) e 44 a 58 (PIII) foram reunidas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. A análise por eletroforese mostra que a maior parte de rCpOsm foi encontrada nas frações correspondentes ao pico III, eluído com tampão contendo imidazol na concentração de 250 mM, e apenas uma pequena parcela da proteína foi eluída com tampão contendo imidazol 100 mM (Figura 13 B). Apesar da predominância de rCpOsm nas frações correspondentes ao PII, é possível observar a presença de bandas, ainda que fracas, correspondentes a moléculas que não são de interesse.

Os resultados obtidos apontam a eficiência do protocolo empregado, sendo capaz de promover a separação praticamente completa de rCpOsm solubilizada com CTAB 1% em um único pico cromatográfico. No entanto, a presença de bandas correspondentes a proteínas não desejadas aponta necessidade de ajustes nos parâmetros empregados no processo cromatográfico. Em outra abordagem, a utilização de métodos baseados em membrana semipermeável com valor de peso molecular de corte (MWCO, de *molecular weight cutoff*) apropriado para exclusão de moléculas não alvo, como diálise e ultracentrifugação em Vivaspin™, podem contribuir para obtenção de proteína na pureza adequada para posteriores ensaios de atividade biológica.

Recomenda-se, para a purificação de proteínas solubilizadas a partir de corpos de inclusão, que o agente solubilizante seja adicionado aos tampões utilizados durante o procedimento cromatográfico, com o objetivo de evitar a agregação da proteína e assegurar que ela permaneça solúvel durante o processo (GE Healthcare, 2010). No experimento aqui

descrito, a purificação ocorreu sem adição de CTAB durante o processo cromatográfico. Por essa razão e para evitar a precipitação da proteína após o processo cromatográfico, o pico no qual ocorreu a diluição da proteína foi dialisado contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM e CTAB 0,2% (m/v).

Figura 13 – Perfil cromatográfico de Trx-CpOsm em matriz de Sepharose com níquel imobilizado.



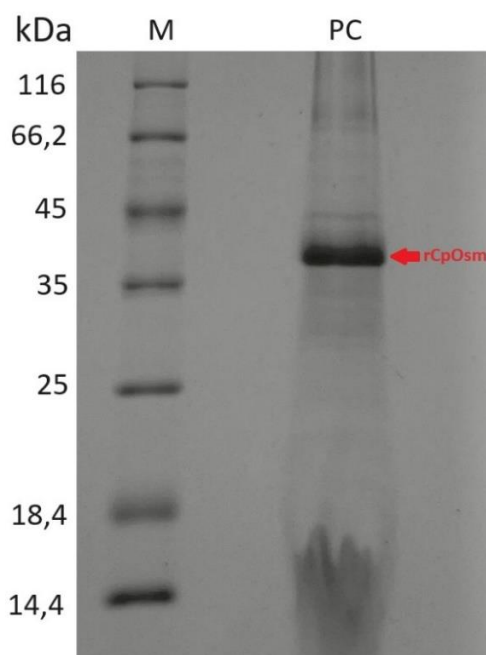
(A) Gráfico construído a partir das leituras de absorbância. Durante a cromatografia três picos (PI, PII e PII) foram obtidos, um foi eluído com o tampão contendo imidazol 40 mM (Abs 1,158), outro com imidazol 100 mM (Abs 0,333) e o terceiro com imidazol 250 mM (Abs 0,730) (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes das frações obtidas a partir da cromatografia. A seta vermelha indica rCpOsm. PRN: Pico não retido; PI: Pico retido I; PII: Pico retido II; PIII: Pico retido III; M: marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific). Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Dosagem da proteína e concentração por ultracentrifugação

A dosagem de rCpOsm pela aplicação da Lei de Lambert-Beer constatou a recuperação de 17,8 mg de proteína solúvel por litro de cultura a partir do protocolo empregado. O rendimento desse processo é aproximadamente doze vezes maior do que o obtido a partir da expressão heteróloga em *Pichia pastoris* e de CpOsm nativa purificada do látex de *Calotropis procera* (OLIVEIRA, 2014).

O volume final de solução após diálise contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM e CTAB 0,2% (m/v) foi submetido ao processo de ultrafiltração com o intuito de concentrar a proteína e retirar impurezas. Para isso, foi utilizada a coluna de centrifugação e ultrafiltração Vivaspín™ 20 10 kDa MWCO (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia). Foi obtida uma solução contendo rCpOsm na concentração de 1,196 mg/mL. A análise do perfil eletroforético da solução concentrada permite atestar a presença apenas da banda correspondente à proteína recombinante (Figura 14). Sendo assim, após submissão ao processo de ultrafiltração, a solução proteica atingiu a pureza e concentração adequada para posterior aplicação em ensaios de atividade antifúngica.

Figura 14 – Perfil eletroforético da solução proteica concentrada a partir do processo de ultrafiltração em Vivaspín™ 20 10 kDa MWCO.



Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes. A seta vermelha indica rCpOsm. PC: Proteína Concentrada; M: marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific).

4.5 Avaliação de atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica da osmotina de *Calotropis procera* está diretamente relacionada com a manutenção de sua estrutura tridimensional. De Freitas e colaboradores (2011) demonstraram que a redução das ligações dissulfeto presentes na estrutura de CpOsm leva a perda da atividade biológica contra *Fusarium solani*, *Neurospora* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*. Para verificar se a proteína recombinante solubilizada e purificada no presente trabalho está na sua conformação nativa e conseqüentemente biologicamente ativa, foram conduzidos ensaios de atividade antifúngica contra seis estirpes de *Candida*: *Candida Krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida tropicalis* ATCC 750.

A avaliação da atividade antifúngica da proteína recombinante Trx-CpOsm pelo método de difusão em ágar revelou a ação inibitória da proteína sobre todas as estirpes testadas (Figura 15). Os valores dos halos de inibição estão representados na Tabela 3. O diâmetro dos halos de inibição variou de 21 mm a 35 mm. A cepa mais sensível à presença da proteína foi *C. parapsilosis* ATCC 90018, enquanto a menos sensível foi *C. tropicalis* ATCC 13803.

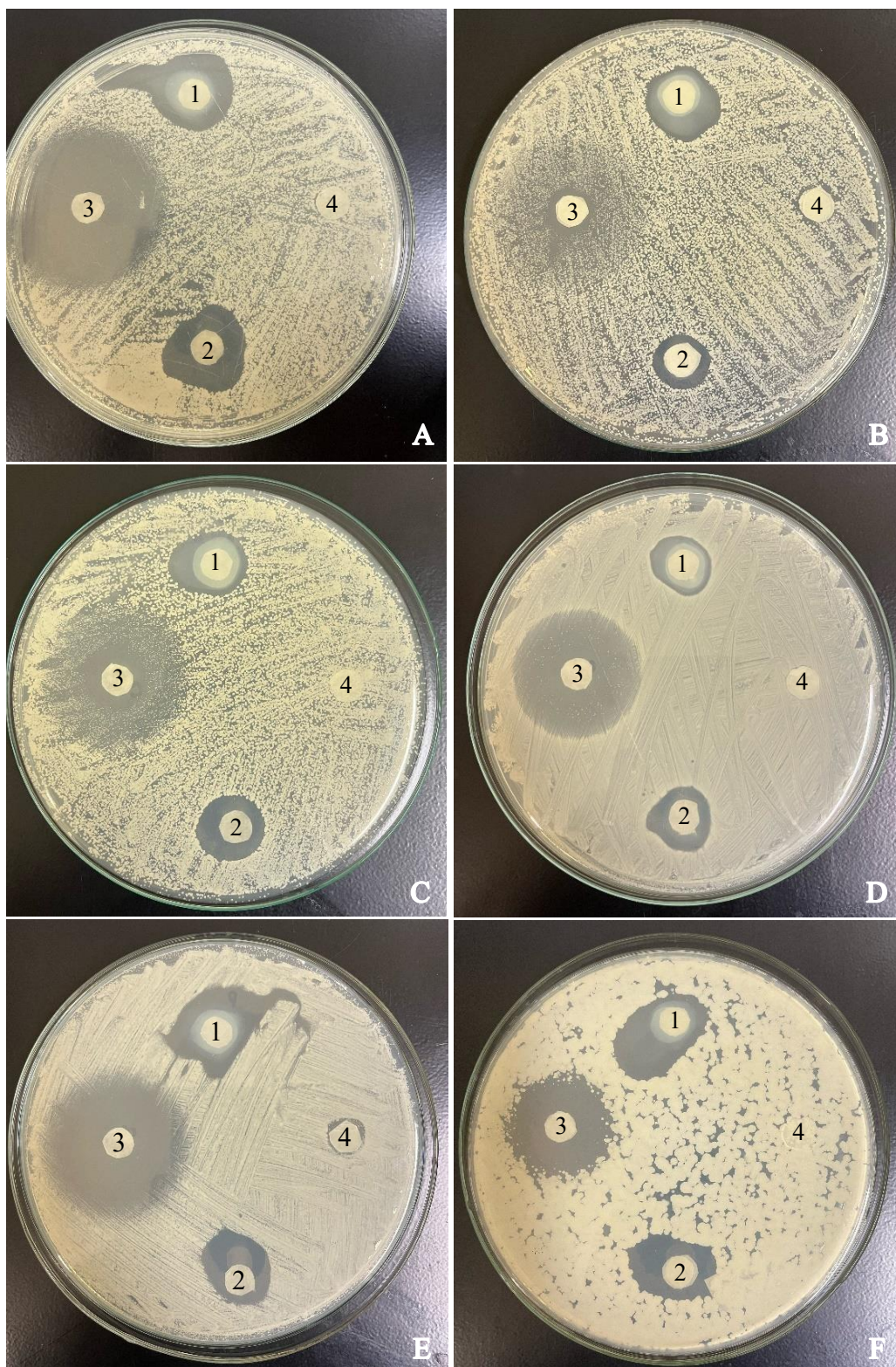
Partindo do conhecimento que surfactantes catiônicos são amplamente utilizados como agentes antimicrobianos em diversos setores, como em hospitais, indústria alimentícia e cosméticos (BUFFET-BATAILLON *et al.*, 2012), o potencial de inibição da solução diluente da proteína contendo o agente solubilizante CTAB 0,2 % (m/v) também foi avaliado. O teste de difusão em ágar confirmou a ação fungicida do detergente, revelando a formação de halos com diâmetros variando de 18,5 mm a 27 mm.

Tabela 3 – Diâmetros médios (mm) dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar das estirpes de *Candida* spp.

| Amostra testada Estirpe | Amostra testada | | | |
|--------------------------------------|-----------------|------|------------|--------------|
| | Trx- CpOsm | CTAB | Fluconazol | Água Milli-Q |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 25,5 | 18,5 | 1,0 | 0,0 |
| <i>C. Krusei</i> ATCC 6258 | 33,0 | 25,5 | 34,0 | 0,0 |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 | 21,0 | 21,0 | 25,0 | 0,0 |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 | 26,0 | 22,0 | 2,0 | 0,0 |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018 | 35,0 | 27,0 | 35,0 | 0,0 |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | 28,5 | 25,5 | 34,0 | 0,0 |

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15 – Teste de difusão em ágar das estirpes de *Candida* spp.



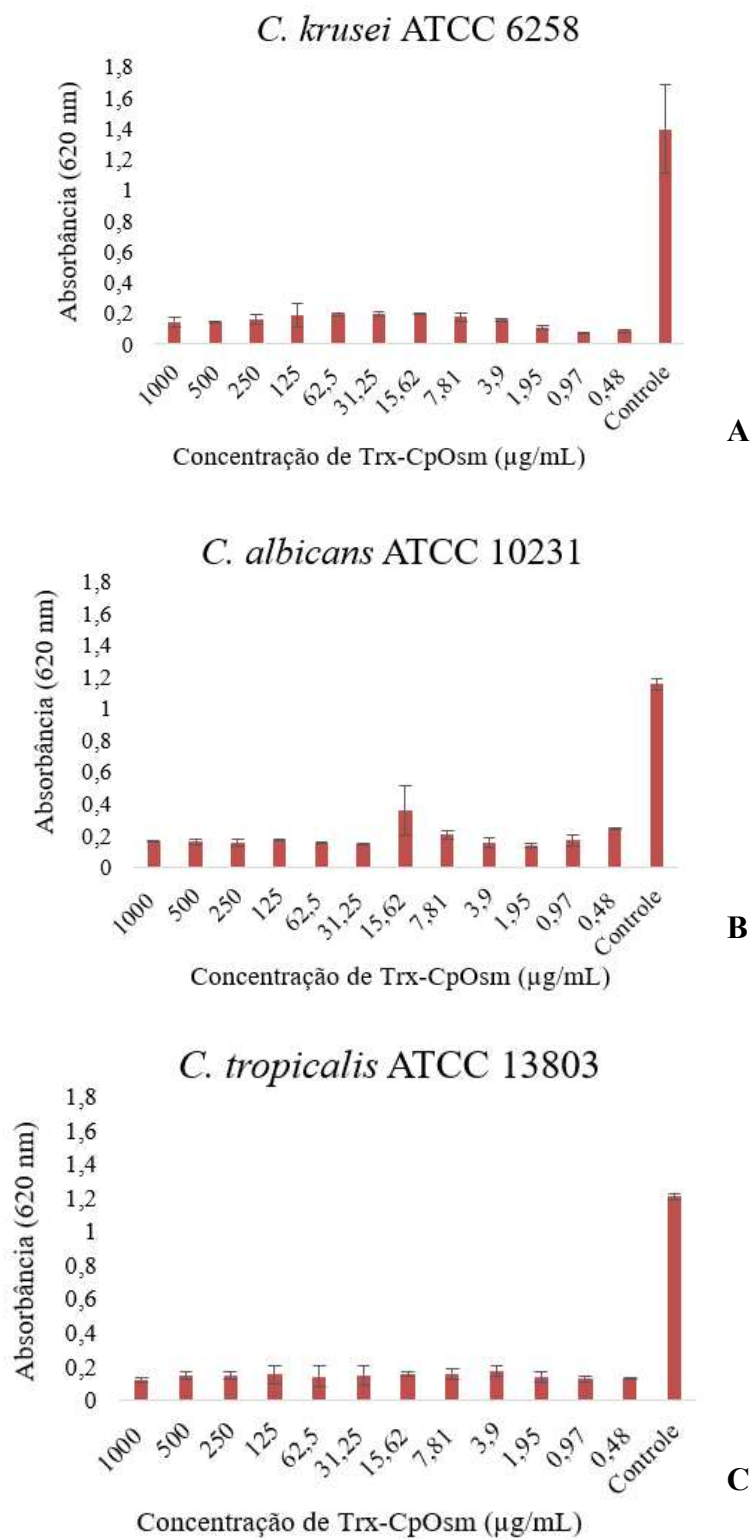
(A) *C. tropicalis* ATCC 13803 (B) *C. albicans* ATCC 10231 (C) *C. tropicalis* ATCC 750 (D) *C. parapsilosis* 22019 (E) *C. parapsilosis* ATCC 90018 (F) *C. krusei* ATCC 6258. 1:Trx-CpOsm (1,196 mg/mL) em Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM e CTAB 0,2% (m/v); 2: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM e CTAB 0,2% (m/v); 3: Fluconazol (100 mg/mL); 4: Água Milli-Q estéril.

Fonte: Autora.

Para verificar a suscetibilidade das estirpes de *Candida* spp. frente às variações de concentração da proteína e de CTAB, foi conduzido o teste de microdiluição em caldo para as cepas *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 13803. Esse ensaio permitiu comparar o efeito de diferentes concentrações da proteína solubilizada e de seu agente solubilizante separadamente e analisar sua influência sobre o crescimento celular. As concentrações de Trx-CpOsm avaliadas variaram de 1000 µg/mL a 0,48 µg/mL. A diluição de CTAB foi conduzida a partir da concentração determinada desse reagente no diluente da proteína que é de 0,2%. Logo, as concentrações de CTAB variaram de 2000 µg/mL a 0,97 µg/mL. Além da análise visual das placas, a inibição do crescimento microbiano foi confirmada a partir dos valores de absorbância a 620 nm.

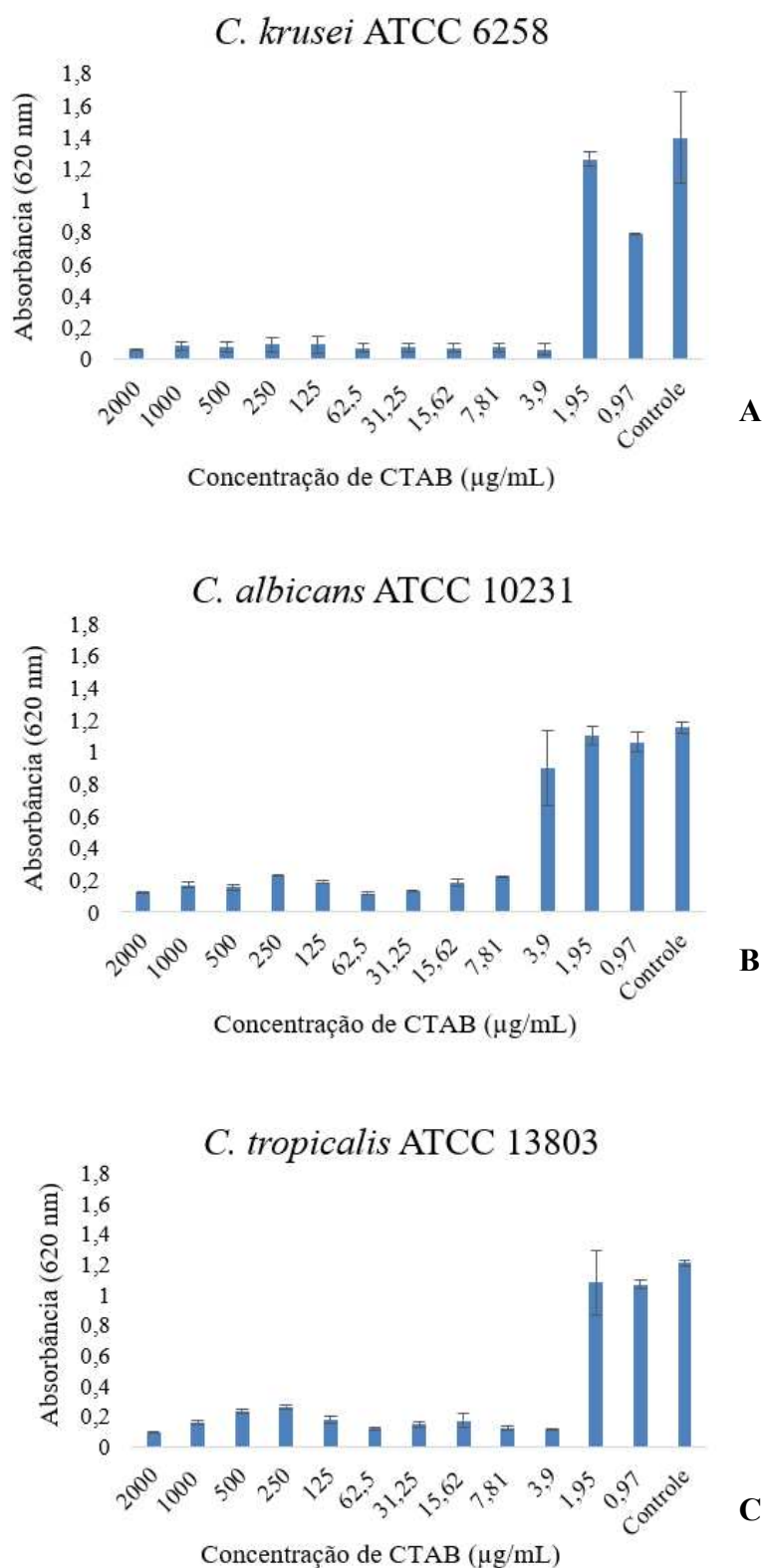
O resultado do teste de microdiluição em caldo para as estirpes incubadas com Trx-CpOsm confirmou a ação fungicida da osmotina, que foi capaz de inibir o crescimento das células em todas as concentrações testadas nos ensaios (Figura 16). Os valores de absorbância das culturas incubadas com o agente solubilizante da proteína, CTAB, também indicam inibição do crescimento celular das estirpes testadas (Figura 17).

Figura 16. Gráficos das leituras de absorvância a 620 nm de estirpes de *Candida* spp. incubadas com a proteína Trx-CpOsm.



(A) Gráfico correspondente à *Candida krusei* ATCC 6258; (B) Gráfico correspondente à *Candida albicans* ATCC 10231; (C) Gráfico correspondente à *Candida tropicalis* ATCC 13803. Fonte: Autora.

Figura 17. Gráficos das leituras de absorvância a 620 nm de estirpes de *Candida* spp. incubadas com CTAB.



(A) Gráfico correspondente à *Candida krusei* ATCC 6258; (B) Gráfico correspondente à *Candida albicans* ATCC 10231; (C) Gráfico correspondente à *Candida tropicalis* ATCC 13803.

Fonte: Autora.

Ao comparar o efeito da proteína recombinante e do CTAB sobre o crescimento celular, é possível visualizar que o efeito inibitório da proteína sobre o fungo permanece mesmo em concentrações mais baixas. Por outro lado, em concentrações de CTAB iguais ou menores que 1,95 µg/mL, o efeito sobre as estirpes diminui drasticamente. Logo, como a proteína recombinante utilizada nos ensaios estava diluída em tampão Tris-HCl 50mM, NaCl 0,5M e CTAB 0,2%, é possível inferir que em concentrações mais baixas o efeito inibitório sobre o crescimento celular se deu unicamente ao efeito da osmotina. Por outro lado, em concentrações mais altas, o agente solubilizante provavelmente exerce efeito antimicrobiano, assim como a proteína.

Ainda que ambos apresentem atividade antifúngica, o modo de ação de osmotinas e do CTAB sobre os microrganismos são distintos. Surfactantes catiônicos, como o CTAB, são capazes de promover a desintegração da membrana do patógeno graças à interação eletrostática e hidrofóbica entre sua estrutura e os componentes da membrana, apresentando atividade contra bactérias, fungos e vírus (FALK, 2019; ZHOU; WANG, 2020). Diferentemente, a atividade antifúngica de osmotinas em leveduras está associada à morte celular programada e produção de espécies reativas de oxigênio. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína NP24 do tomate, homóloga da osmotina, leva à perda de viabilidade celular pela interação com o receptor PHO36 e consequente indução de morte celular programada dependente da caspase (HIGUCHI *et al.*, 2016). Em *Candida albicans*, por sua vez, um peptídeo derivado de proteínas semelhantes a osmotina e taumatina foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose (LOPES, 2018). De forma similar, a osmotina de *Calotropis procera* aqui testada pode estar atuando sobre as estirpes de *Candida* spp. a partir da ativação de processos de morte celular programada e geração de espécies reativas de oxigênio.

Diante da distinção nos modos de ação, uma formulação contendo CpOsm e CTAB apresenta considerável potencial de aplicação como antifúngico no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. Esse enfoque é particularmente significativo devido às limitações nas classes principais de agentes antifúngicos tradicionais, que têm alvos celulares bem definidos: os polienos, que se ligam ao ergosterol da membrana celular fúngica, conduzindo à lise celular; azóis que inibem a biossíntese do ergosterol; e equinocandinas que inibem a biossíntese de β-1,3-glucano da parede celular de fungos (PAIVA; PEREIRA, 2023). Como consequência da ampla utilização desses agentes antifúngicos, a resistência de espécies patogênicas de *Candida* spp. aos medicamentos está aumentando, o que demonstra a necessidade de busca de agentes antifúngicos eficazes com

alvos diferentes no patógeno dos já explorados nos antifúngicos atuais (LI *et al.*, 2018). Nesse contexto, abordagens como combinações de medicamentos têm sido exploradas com o intuito de contornar o problema de desenvolvimento de resistência (VITALE, 2021). Dessa forma, a combinação estratégica de Osmotina e CTAB, com seus distintos mecanismos de ação, oferece uma abordagem promissora, atingindo as células fúngicas de *Candida* spp. de maneiras complementares, potencialmente superando desafios relacionados à resistência aos agentes antifúngicos convencionais.

Sendo assim, no processo metodológico aqui conduzido, o CTAB além de solubilizar a proteína, poderia contribuir para a atividade antifúngica e potencializar o efeito antimicrobiano da solução contendo a osmotina de *Calotropis procera*. Em consonância com a investigação aqui conduzida, MARTINS DA SILVA FILHO *et al.*, 2023 demonstrou que o CTAB residual resultante do processo de síntese de materiais mesoporosos, garante ao material sintetizado ação antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus* e *Candida*, com a toxicidade reduzida para células humanas, o que abre a possibilidade para o uso de nanomateriais baseados em CTAB. Portanto, a presença de CTAB residual após solubilização dos corpos de inclusão e recuperação de proteína bioativa poderia complementar a atividade antifúngica já apresentada pela proteína e dificultar o desenvolvimento de resistência pelo patógeno.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a osmotina de *Calotropis procera*, fusionada à uma tag de solubilidade do tipo tiorredoxina, foi expressa heterologicamente em *Escherichia coli*. A proteína Trx-CpOsm foi expressa integralmente em corpos de inclusão. A recuperação de proteína recombinante solúvel a partir da solubilização dos corpos de inclusão mediante tratamento com o agente surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi eficiente, permitindo alcançar um rendimento de proteína purificada de 17,8 mg/L de cultura. Ensaio de atividade antifúngica com estirpes do gênero *Candida* spp. comprovaram que a proteína recombinante está biologicamente ativa. O agente solubilizante da proteína também apresentou atividade antimicrobiana. Por atuarem por mecanismos de ações diferentes, Trx-CpOsm contendo CTAB residual representa uma formulação promissora para aplicação como antifúngico no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L. R. *et al.* Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, v. 118, n. 1, p. 11–23, 21 jul. 1996.
- ABDIN, M. Z.; KIRAN, U.; ALAM, A. Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. **Bioinformation**, v. 5, n. 8, p. 336–340, 22 jan. 2011.
- AHMAD, A. *et al.* Adiponectin homolog novel osmotin protects obesity/diabetes-induced NAFLD by upregulating AdipoRs/PPAR α signaling in ob/ob and db/db transgenic mouse models. **Metabolism**, v. 90, p. 31–43, 1 jan. 2019.
- AHMED, N. *et al.* COVID-19-Associated Candidiasis: Possible Patho-Mechanism, Predisposing Factors, and Prevention Strategies. **Current Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 127, 14 mar. 2022.
- ANIL KUMAR, S. *et al.* Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 163, 16 mar. 2015.
- ARASTEHFAR, A. *et al.* Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 877, dez. 2020.
- ARIF, T. *et al.* Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621–638, 1 jul. 2009.
- BASHIR, M. A. *et al.* Osmotin: A Cationic Protein Leads to Improve Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 8, p. 992, 4 ago. 2020.
- BHATWA, A. *et al.* Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 630551, 2021.
- BOTELHO, T. K. R. *et al.* Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from clinical samples in southern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. e20727, 19 dez. 2022.
- BUFFET-BATAILLON, S. *et al.* Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 5, p. 381–389, 1 maio 2012.
- CD, F. *et al.* Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant physiology and biochemistry : PPB**, v. 45, n. 10–11, nov. 2007.
- CHEN, D. **Aspergillus niger Control on Strawberries by Recombinant Tobacco Osmotin for Extending Shelf-life**. Thesis (Degree of Master of Science) - Department of Nutrition and Food Science, Auburn University, Auburn, Alabama, May 6, 2012.
- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2009). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline-2nd Edition, CLSI Document M44-A2, New York. CLSI, Wayne, PA.

- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2008). Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard – Third Edition, CLSI Document M27-A3, New York. CLSI, Wayne, PA.
- DANESHNIA, F. *et al.* Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 6, p. e470–e480, 1 jun. 2023.
- DE FREITAS, C. D. T. *et al.* Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant physiology and biochemistry: PPB**, v. 49, n. 7, p. 738–743, jul. 2011a.
- DE FREITAS, C. D. T. *et al.* Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 10, p. 2501–2507, 1 out. 2011b.
- DE LUCCA, A. J.; CLEVELAND, T. E.; WEDGE, D. E. Plant-derived antifungal proteins and peptides. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 1001–1014, dez. 2005.
- DYBALLA, N.; METZGER, S. Fast and sensitive colloidal coomassie G250 staining for proteins in polyacrylamide gels. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 30, p. e1431, 2009.
- EL-KEREAMY, A. *et al.* *Prunus domestica* Pathogenesis-Related Protein-5 Activates the Defense Response Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17973, 23 mar. 2011.
- ENOCH, D. A. *et al.* The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. Em: LION, T. (Ed.). **Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2017. p. 17–65.
- FALCAO, L. L. *et al.* Antimicrobial properties of two novel peptides derived from *Theobroma cacao* osmotin. **Peptides**, v. 79, p. 75–82, 1 maio 2016.
- FALK, N. A. Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 22, n. 5, p. 1119–1127, set. 2019.
- FANTUZZI, G. Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 1–10, out. 2013.
- FENG, Y. *et al.* Understanding Fluconazole Tolerance in *Candida albicans*: Implications for Effective Treatment of Candidiasis and Combating Invasive Fungal Infections. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2 nov. 2023.
- FERNANDES, C. DE F. *et al.* Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondônia. Documentos**, 133, 2009.
- FINKINA, E. I. *et al.* Plant Pathogenesis-Related Proteins PR-10 and PR-14 as Components of Innate Immunity System and Ubiquitous Allergens. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 17, p. 1772–1787, 2017.

FREEMAN, B.; BEATTIE, G. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. **The Plant Health Instructor**, 1 jan. 2008.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Em: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GE Healthcare. **Instructions 28-4020-89 AD**. Affinity media. Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, 2010. Disponível em: <http://prep-hplc.com/Uploads/ueditor/file/20190731/5d41050fbc33d.pdf>. Acesso em: 29 ago 2023.

GLICK, B.; PASTERNAK, J. Manipulation of gene expression in prokaryotes. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. 4th ed. p. 121-62. Washington, DC, 2010.

GOEL, D. *et al.* Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Protoplasma**, v. 245, n. 1–4, p. 133–141, set. 2010.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5–10, 1 jun. 2014.

HAKIM *et al.* Osmotin: A plant defense tool against biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 149–159, 1 fev. 2018.

HIGUCHI, N. *et al.* NP24 induces apoptosis dependent on caspase-like activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 619–624, 1 jun. 2016.

HUMER, D.; SPADIUT, O. Wanted: more monitoring and control during inclusion body processing. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 158, 19 out. 2018.

HUNTER, T.; BIBBY, E.; BAUTISTA, D. Application Note 6 Protein Sample Preparation. **Norgen Biotek Corporation**, St. Catharines, Ontario, Canada, 2016.

HUSAINI, A. M.; ABDIN, M. Z. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. **Plant Science**, v. 174, n. 4, p. 446–455, abr. 2008.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. **Base de Dados Nacional de Espécies Exóticas Invasoras**. Florianópolis, SC, 2021. Disponível em: <http://bd.institutohorus.org.br>. Acesso em: 03 set. 2023

JAIN, D.; KHURANA, J. P. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Em: SINGH, A.; SINGH, I. K. (Eds.). **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**. Singapore: Springer, 2018. p. 265–281.

JAMI, S. K. *et al.* Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 238–252, 7 mar. 2007.

KAUR, A. *et al.* An Overview of the Characteristics and Potential of *Calotropis procera* From Botanical, Ecological, and Economic Perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 690806, 17 jun. 2021.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, jan. 2018.

LAEMMLI, Ulrich Karl. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970

LI, Y. *et al.* Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018.

LIU, D. *et al.* Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 5, p. 1888–1892, 1 mar. 1994.

LIU, J.-J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 5, p. 419–436, 1 maio 2010.

LOPES, F. E. S. **Estudo de osmotinas e taumatinas vegetais para a prospecção de peptídeos antimicrobianos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MANDAL, A. B. *et al.* Osmotin: A PR Gene Imparts Tolerance to Excess Salt in *indica* Rice. **Advances in Life Sciences**, v. 8, n. 2, p. 39–50, 2018.

MARTINS DA SILVA FILHO, P. *et al.* Antibacterial and antifungal action of CTAB-containing silica nanoparticles against human pathogens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 641, p. 123074, 25 jun. 2023.

MIELE, M.; COSTANTINI, S.; COLONNA, G. Structural and Functional Similarities between Osmotin from *Nicotiana Tabacum* Seeds and Human Adiponectin. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16690, 2 fev. 2011.

MIN, K. *et al.* Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 170–173, 2004.

NASCIMENTO, C. T. M. DO. **Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão**. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

OLIVEIRA, R. S. B. DE. **Expressão heteróloga, caracterização cristalográfica e análise funcional de uma osmotina antifúngica de *Calotropis procera***. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

PAIVA, J.-A.; PEREIRA, J. M. Treatment of invasive candidiasis in the era of *Candida* resistance. **Current Opinion in Critical Care**, v. 29, n. 5, p. 457, out. 2023.

PARKHI, V. *et al.* Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 4, p. 625–639, 1 maio 2009.

PATADE, V. Y. *et al.* Containment evaluation, cold tolerance and toxicity analysis in Osmotin transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Pusa Ruby). **3 Biotech**, v. 8, n. 10, p. 410, out. 2018.

PETERNEL, Š. Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 250–254, 25 jan. 2013.

PRIYA, M. *et al.* Drought and heat stress-related proteins: an update about their functional relevance in imparting stress tolerance in agricultural crops. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 6, p. 1607–1638, 1 jun. 2019.

PURI, N. K. *et al.* Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. **Biochemical Journal**, v. 285, n. Pt 3, p. 871–879, 1 ago. 1992.

RAJENDRAN, V.; PUSHPAVANAM, S.; JAYARAMAN, G. Continuous refolding of L-asparaginase inclusion bodies using periodic counter-current chromatography. **Journal of Chromatography. A**, v. 1662, p. 462746, 11 jan. 2022.

RAMOS, M. V. *et al.* Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 119, p. 5–18, nov. 2015.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SANTO, R. D. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 7, p. 1084–1098, 24 jun. 2010.

SINGH, A. *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 41, 25 mar. 2015.

SINGH, N. K. *et al.* Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. **Plant Physiology**, v. 85, n. 2, p. 529–536, out. 1987.

SINGH, P. K.; GUPTA, M. N. Simultaneous refolding and purification of a recombinant lipase with an intein tag by affinity precipitation with chitosan. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1784, n. 11, p. 1825–1829, nov. 2008.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 1 abr. 2005.

SINGHVI, P. *et al.* Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 474–486, 1 maio 2020.

SUBRAMANYAM, K. *et al.* Overexpression of tobacco osmotin (Tbosm) in soybean conferred resistance to salinity stress and fungal infections. **Planta**, v. 236, n. 6, p. 1909–1925, dez. 2012.

SUBROTO, T. *et al.* Enzymic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (lutoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis* §1 Dedicated to the memories of Dr R. Soedigdo, Professor of Biochemistry, Institut Teknologi Bandung, Indonesia and of Dr A.M. Hahn, Professor of Biochemistry, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1047–1055, 1 dez. 2001.

TAVARES, L. S. *et al.* Recombinant osmotin inclusion bodies from *Calotropis procera* produced in *E. coli* BL21(DE3) prevent acute inflammation in a mouse model of listeriosis. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 102, p. 154186, 20 jul. 2022.

TZOU, Y.-M. *et al.* Expression of truncated tobacco osmotin in *Escherichia coli*: purification and antifungal activity. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 539–543, 1 mar. 2011.

VAN DER WEL, H.; LOEVE, K. Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. **European Journal of Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 221–225, 1972.

VIKTOROVA, J. *et al.* Osmotin, a pathogenesis-related protein. **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 7, p. 672–681, nov. 2012.

VIKTOROVA, J. *et al.* New findings in potential applications of tobacco osmotin. **Protein Expression and Purification**, v. 129, p. 84–93, 1 jan. 2017.

VITALE, R. G. Role of Antifungal Combinations in Difficult to Treat *Candida* Infections. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 731, 6 set. 2021.

WAN, Q. *et al.* Salinity Tolerance Mechanism of Osmotin and Osmotin-like Proteins: A Promising Candidate for Enhancing Plant Salt Tolerance. **Current Genomics**, v. 18, n. 6, p. 553–556, dez. 2017.

WANG, J. *et al.* How CTAB assists the refolding of native and recombinant lysozyme. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, n. 3, p. 269–277, 1 jul. 2005.

YADAV, D. K. *et al.* An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 612, p. 57–77, 15 dez. 2016.

YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 235–251, 20 fev. 2014.

YUN, D.-J. *et al.* Osmotin, a Plant Antifungal Protein, Subverts Signal Transduction to Enhance Fungal Cell Susceptibility. **Molecular Cell**, v. 1, n. 6, p. 807–817, 1 maio 1998.

ZHOU, C.; WANG, Y. Structure–activity relationship of cationic surfactants as antimicrobial agents. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Surfactants. v. 45, p. 28–43, 1 fev. 2020.

ZRIBI, I.; GHORBEL, M.; BRINI, F. Pathogenesis Related Proteins (PRs): From Cellular Mechanisms to Plant Defense. **Current Protein & Peptide Science**, v. 22, n. 5, p. 396–412, 2021.

ANEXO A – SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA Trx-CpOsm

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKL
NIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH
HHHSSGLVPRGSGMKETAATAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSENYFQGATFTI
RNNCPYTIWAAAVPGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTNCNFDGAGRGRQCQTD
CNGVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKCRAIR
CTADINGQCPNELRAPGGCNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFKERCWDAYSYPK
DDPTSTFTCPSGTNYRVIFCPPGLEHHHHH

**ANEXO B – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE Trx-CpOsm OBTIDOS A PARTIR
DA FERRAMENTA ProtParam**

Number of amino acids: 385

Molecular weight: 41881.89

Theoretical pI: 5.99

Amino acid composition:

| | | |
|---------|----|-------|
| Ala (A) | 31 | 8.1% |
| Arg (R) | 16 | 4.2% |
| Asn (N) | 22 | 5.7% |
| Asp (D) | 29 | 7.5% |
| Cys (C) | 18 | 4.7% |
| Gln (Q) | 11 | 2.9% |
| Glu (E) | 14 | 3.6% |
| Gly (G) | 41 | 10.6% |
| His (H) | 15 | 3.9% |
| Ile (I) | 18 | 4.7% |
| Leu (L) | 24 | 6.2% |
| Lys (K) | 19 | 4.9% |
| Met (M) | 7 | 1.8% |
| Phe (F) | 18 | 4.7% |
| Pro (P) | 24 | 6.2% |
| Ser (S) | 21 | 5.5% |
| Thr (T) | 26 | 6.8% |
| Trp (W) | 6 | 1.6% |
| Tyr (Y) | 11 | 2.9% |
| Val (V) | 14 | 3.6% |
| Pyl (O) | 0 | 0.0% |
| Sec (U) | 0 | 0.0% |

(B) 0 0.0%

(Z) 0 0.0%

(X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 43

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 35

Atomic composition:

| | | |
|----------|---|------|
| Carbon | C | 1829 |
| Hydrogen | H | 2785 |
| Nitrogen | N | 521 |
| Oxygen | O | 563 |
| Sulfur | S | 25 |

Formula: C₁₈₂₉H₂₇₈₅N₅₂₁O₅₆₃S₂₅

Total number of atoms: 5723

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 50515

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.206, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 49390

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.179, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 21.55
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 61.14

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.452