



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**JÉSSICA LOREN MARQUES FERREIRA**

**EXPRESSÃO DE UMA OSMOTINA DE *Calotropis procera* (Ait) R. Br (CpOsm) EM  
*Escherichia coli* COMO PROTEÍNA DE FUSÃO COM TIORREDOXINA (Trx-  
CpOsm): PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA  
PROTEÍNA RECOMBINANTE Trx-CpOsm**

**FORTALEZA**

**2018**

JÉSSICA LOREN MARQUES FERREIRA

EXPRESSÃO DE UMA OSMOTINA DE *Calotropis procera* (Ait) R. Br (CpOsm) EM  
*Escherichia coli* COMO PROTEÍNA DE FUSÃO COM TIORREDOXINA (Trx-CpOsm):  
PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE Trx-CpOsm

Monografia apresentada ao Curso de  
Biotecnologia do Departamento de Bioquímica  
e Biologia Molecular da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito parcial para obtenção  
do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa  
Grangeiro.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F441e Ferreira, Jéssica Loren Marques.

Expressão de uma osmotina de *Calotropis procera* (Ait) R. Br (CpOsm) em *Escherichia coli* como proteína de fusão com tiorredoxina (Trx-CpOsm) : Purificação e avaliação da atividade antifúngica da proteína recombinante Trx-CpOsm / Jéssica Loren Marques Ferreira. – 2018.  
61 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

1. Plasmídeos sintéticos. 2. Tags de fusão. 3. Corpos de inclusão. 4. Lasiodiplodia. 5. Candida. I. Título.  
CDD 661

---

JÉSSICA LOREN MARQUES FERREIRA

EXPRESSÃO DE UMA OSMOTINA DE *Calotropis procera* (Ait) R. Br (CpOsm) EM  
*Escherichia coli* COMO PROTEÍNA DE FUSÃO COM TIORREDOXINA (Trx-CpOsm):  
PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE Trx-CpOsm

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

Aprovada em: 20/06/2018.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Msc. Simone Torres de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Msc. Suelen Carneiro de Medeiros  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família, meu amor e meus colegas,  
pelo suporte incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela excelente orientação, pela disponibilidade em esclarecer dúvidas e por todos os ensinamentos como professor e como orientador.

Aos membros participantes da Banca Examinadora, pelo tempo concedido e pelas sugestões e colaborações.

À Dra. Nadia Accioly e Msc. Valéria Dodou, do Laboratório de Microbiologia Aplicada (Departamento de Farmácia), e à Dra. Christiana Bruce, do Laboratório de Patologia Pós Colheita (Embrapa Agroindústria Tropical), pela parceria realizada neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, principalmente Simone, Suelen e Edvar pelos ensinamentos, suporte, críticas e sugestões.

Aos colegas da graduação, em especial Pâmella, Gabi, Jonathan, Cristiano, Mathias e Ruthyelle, por me acompanharem e me darem suporte em quase todos os momentos.

Ao secretário do Curso de Biotecnologia, Gilmar Ferreira da Costa, pela total disponibilidade em ajudar e tirar dúvidas.

Aos professores do Curso de Biotecnologia, por todo aprendizado proporcionado.

À minha família, por não medirem esforços para que eu tivesse uma boa educação e por sempre estarem ao meu lado e torcerem pelo meu sucesso. Serei pra sempre grata à minha avó (Zulmira), minha mãe (Adriana), minha tia/madrinha (Luciana) e meu pai (José).

Ao meu amor e companheiro, Fábio Charles, por sempre me incentivar e apoiar em todos os momentos.

## RESUMO

Em trabalhos anteriores, uma proteína do tipo osmotina isolada do látex de *Calotropis procera* (CpOsm) foi purificada e caracterizada e apresentou atividade antifúngica. Neste trabalho células de *Escherichia coli* das estirpes ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) e SHuffle, utilizadas para expressão heteróloga, e da estirpe DH5 $\alpha$ , utilizada para clonagem, foram transformadas, através de choque térmico, com quatro plasmídeos sintéticos (GenOne). Cada plasmídeo possuía a sequência de uma *tag* de fusão (Trx, SUMO, GST e Nus), na tentativa de expressar a osmotina de forma solúvel. As células transformadas de DH5 $\alpha$  foram cultivadas e passaram por uma extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial extraído foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I e a digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (0,8%). As células de expressão ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) e SHuffle foram cultivadas e a expressão da osmotina recombinante foi induzida através da adição de IPTG. Em seguida, foi realizada um lise celular e as frações solúvel e insolúvel foram analisadas por SDS-PAGE. Foi possível constatar que nenhuma das células havia produzido osmotina recombinante de forma solúvel e que a estirpe BL21 (DE3), transformada com o plasmídeo sintético pET 32a, obteve uma maior produção de proteína (Trx-CpOsm). Assim, esta estirpe foi selecionada para posterior tentativa de solubilização com CTAB. Os corpos de inclusão foram solubilizados com CTAB em três concentrações (1,0%, 2,5% e 5%), além do controle sem CTAB. O melhor resultado foi obtido com CTAB na concentração de 1%. Com a fração solubilizada com CTAB 1% foi realizada uma cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. Um gradiente *stepwise* da concentração de imidazol foi utilizado e a proteína recombinante foi eluída no tampão contendo imidazol 100mM. A fração proteica purificada foi concentrada em Vivaspin 3,000 MWCO (GE Healthcare) para uma concentração de 1,39 mg/mL e utilizada para ensaios antifúngicos contra *Lasiodiplodia* sp.. O ensaio de difusão em ágar foi realizado com quatro tratamentos: fungicida Carbendazim (2mL/L), água deionizada, Trx-CpOsm e o tampão em que a proteína estava diluída (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; CTAB 0,1%; Glicerol 15%). O halo de inibição formado pela proteína foi observado a partir de 48h de ensaio e permaneceu até 168h, constatando a atividade da proteína. A Trx-CpOsm foi utilizada em ensaios contra *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida parapsilosis* ATCC 90018. Através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram definidas como sendo 62,50 ng/mL para as estirpes *C. parapsilosis* ATCC 90018 e *C. albicans* ATCC 10231 e

31,20 ng/mL para a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803. Através de plaqueamento em ágar Plate-Count (Merck) as Concentrações Letais Mínimas (CLM) foram determinadas como sendo 62,50 ng/mL, 31,20 ng/mL e 125 ng/mL para as cepas *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* ATCC 90018, respectivamente.

**Palavras-chave:** Plasmídeos sintéticos. Tags de fusão. Corpos de inclusão. CTAB. Lasiodiplodia. Candida



## ABSTRACT

In previous works, an osmotin-like protein isolated from *Calotropis procera* latex (CpOsm) was purified and characterized and exhibited antifungal activity. In this work, *Escherichia coli* cells ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) and Shuffle strains, used for heterologous expression, and the DH5 $\alpha$  strain used for cloning were transformed by thermal shock with four synthetic plasmids (GenOne). Each plasmid had the sequence of a fusion tag (Trx, SUMO, GST and Nus), in an attempt to express the osmotin in a soluble form. The transformed DH5 $\alpha$  cells were cultured and undergo a plasmidial DNA extraction. The extracted plasmid DNA was digested with restriction enzymes *Bam*HI and *Xho*I and the digestion was confirmed by agarose gel electrophoresis (0.8%). ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) and SHuffle expression cells were cultured and recombinant osmotin expression was performed by the addition of IPTG. Then, cell lysis was performed and the soluble and insoluble fractions were analyzed by SDS-PAGE. It was found that none of the cells had produced soluble recombinant osmotin and that the BL21 (DE3) strain, transformed with the synthetic plasmid pET 32a, obtained a higher production of protein (Trx-CpOsm). Thus, this strain was selected for further attempt to solubilize with CTAB. Inclusion bodies were solubilized with CTAB at three concentrations (1.0%, 2.5% and 5%), in addition to the control without CTAB. The best result was obtained with CTAB at 1% concentration. With the fraction solubilized with 1% CTAB an immobilized nickel affinity chromatography was performed. A stepwise gradient of the imidazole concentration was used and the recombinant protein was eluted in the buffer containing 100 mM imidazole. The purified protein fraction was concentrated in Vivaspin 3,000 MWCO (GE Healthcare) to a concentration of 1,39 mg/mL and used for antifungal tests against *Lasiodiplodia* sp. The agar diffusion assay was performed with four treatments: fungicide Carbendazim (2mL/L), deionized water, Trx-CpOsm and the buffer in which the protein was diluted (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% CTAB, 15% Glycerol). The inhibition halo formed by the protein was observed from 48h of assay and remained up to 168h, noting the activity of the protein. Trx-CpOsm was used in assays against *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 13803 and *Candida parapsilosis* ATCC 90018. By the microdilution technique in 96-well plates the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) were defined as being 62,50 ng / mL for strains *C. parapsilosis* ATCC 90018 and *C. albicans* ATCC 10231 and 31,20 ng / mL for *C. tropicalis* ATCC 13803 strain. Through Plate-Count agar (Merck) plating the Minimum Lethal

Concentrations (MLC) were determined to be 62,50 ng/mL, 31,20 ng/mL and 125 ng/mL for the strains *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803 and *C. parapsilosis* ATCC 90018, respectively.

**Keywords:** Synthetic plasmids. Fusion tags. Inclusion bodies. CTAB. Lasiodiplodia. Candida

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura tridimensional da osmotina de <i>Calotropis procera</i> (CpOsm).	17
Figura 2 – Ensaio de virulência do fungo <i>Lasiodiplodia</i> sp. isolado de banana.	20
Figura 3 – Esquema das construções após a transformação de estirpes de <i>E. coli</i> com os plasmídeos sintéticos.	25
Figura 4 – Perfil eletroforético dos produtos da digestão de DNA plasmidial.	34
Figura 5 – Perfil eletroforético da indução de células de Arctic Express (DE3) transformadas com os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm.	36
Figura 6 – Perfil eletroforético da indução de células de BL21 (DE3) transformadas com os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm.	37
Figura 7 – Perfil eletroforético da indução de células de SHuffle transformadas com os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm.	38
Figura 8 – Resultado do percentual de solubilidade das proteínas de fusão calculado através da ferramenta <i>Recombinant Protein Solubility Prediction</i> .	39
Figura 9 – Perfil eletroforético de Trx-CpOsm solubilizada com CTAB 1%, 2,5% e 5%.	40
Figura 10 – Perfil da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.	41
Figura 11 – Perfil eletroforético de cada fração obtida na cromatografia na eluição com imidazol (100 mM).	42
Figura 12 – Fungo <i>Lasiodiplodia</i> sp. isolado de banana após 7 dias de crescimento em meio BDA.	43

- Figura 13 – Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. isolado de banana durante 7 dias de 44  
ensaio.
- Figura 14 – Gráficos das leituras de absorbância a 620 nm em leitor de Elisa de Trx- 45  
CpOsm incubada com *Candida* spp.
- Figura 15 – Determinação da Concentração Letal Mínima de *C. parapsilosis* ATCC 46  
90018
- Figura 16 – Gráficos das leituras de absorbância a 620 nm em leitor de Elisa do 47  
diluyente da proteína incubado com *Candida* spp.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resumo de informações das <i>tags</i> de fusão.	25
Tabela 2 –	Lista de antibióticos e concentrações utilizados em cada estirpe de <i>E. coli</i> transformada com os plasmídeos sintéticos pET 32a – CpOsm, pET 41a – CpOsm, pET 43.1a – CpOsm, pET SUMO – CpOsm.	26
Tabela 3 –	Absorbâncias e concentrações de DNA plasmidial	33
Tabela 4 –	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) de Trx-CpOsm para estirpes de <i>Candida</i> spp..	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CI	Corpos de Inclusão
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CINS	Corpos de Inclusão Não Solubilizados
CIS	Corpos de Inclusão Solubilizados
CLM	Concentração Letal Mínima
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CpOsm	Osmotina de <i>Calotropis procera</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GST	Glutathione-S-transferase
HCl	Ácido clorídrico
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Luria Bertani
LMW	Low Molecular Weight
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de Magnésio Hexahidratado
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NaCl	Cloreto de sódio
NusA	N-utilization substance A
PR-5	Pathogenesis related - family 5
PRs	Pathogenesis related
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SUMO	Small Ubiquitin Modifier
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TrxA	Thioredoxin A

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
1.1	Osmotina	16
1.2	Corpos de inclusão	18
1.3	<i>Tags</i> de fusão	18
1.4	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	19
1.5	<i>Candida</i> spp.	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
<b>3</b>	<b>MATERIAIS</b>	22
3.1	Células para clonagem e expressão	22
3.2	Plasmídeos	22
3.3	Enzimas	22
3.4	Reagentes e outros materiais	22
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b>	24
4.1	Preparação e transformação de <i>Escherichia coli</i> competente utilizando cloreto de cálcio	24
4.2	Extração de DNA plasmidial	27
4.3	Digestão de DNA plasmidial	27
4.4	Eletroforese em gel de agarose	28
4.5	Indução da expressão da osmotina recombinante em <i>Escherichia coli</i>	28
4.6	Lise celular	29
4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes	29
4.8	Solubilização dos corpos de inclusão	28
4.9	Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado	30
4.10	Dosagem de proteínas	30
4.11	Ensaio de atividade antifúngica contra <i>Lasiodiplodia</i> sp.	30
4.12	Ensaio de atividade antifúngica contra <i>Candida</i> spp.	31



<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
5.1	Extração e digestão de DNA plasmidial	33
5.2	Indução da expressão da osmotina recombinante em <i>Escherichia coli</i>	34
5.3	Solubilização dos corpos de inclusão	40
5.4	Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado	41
5.5	Ensaio de atividade antifúngica contra <i>Lasiodiplodia</i> sp.	43
5.6	Ensaio de atividade antifúngica contra <i>Candida</i> spp.	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO A - MAPAS PLASMIDIAIS</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXO B – SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO TRX-CpOsm, GST-CpOsm, NUS-CpOsm E SUMO-CpOm</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO C – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE TRX-CpOsm</b>	<b>59</b>
	<b>OBTIDOS ATRAVÉS DA FERRAMENTA ProtParam</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Osmotina

Proteínas do tipo osmotina estão relacionadas ao controle de respostas de plantas à estresses bióticos e abióticos, agindo como reguladores transcricionais para genes que codificam de enzimas-chave, ou são usadas como moléculas de sinalização, agindo via receptores intracelulares. Estas proteínas têm função essencial na proteção de estruturas nativas de proteínas e no reparo de proteínas desnaturadas (ULLAH *et al.*, 2017).

A primeira osmotina estudada foi descrita como sendo uma proteína produzida e acumulada em células de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var Wisconsin-38) sob condições de estresse osmótico (SINGH *et al.*, 1987). Em plantas laticíferas, há poucas evidências de proteínas do tipo osmotinas, dentre as que possuem esta proteína estão *Hevea brasiliensis* e *Calotropis procera*. A osmotina extraída do látex de *Calotropis procera*, denominada CpOsm, foi encontrada como duas isoformas com a mesma sequência N-terminal de 40 resíduos, massas moleculares de 22,340 e 22,536 Da e, através de eletroforese bidimensional, foi descoberto que as duas isoformas possuem pI de 8.9 e 9.1, respectivamente (DE FREITAS *et al.*, 2011a).

A osmotina pertence à família 5 da superfamília de proteínas relacionadas à patogênese (PR-5). As proteínas PRs são classificadas em 17 famílias conforme sua composição de aminoácidos, estrutura primária, relação sorológica e atividades enzimáticas e biológicas. As proteínas PR-5 também são chamadas de *thaumatin-like proteins* (TLPs) devido à semelhança das suas estruturas à da taumatina (ULLAH *et al.*, 2017).

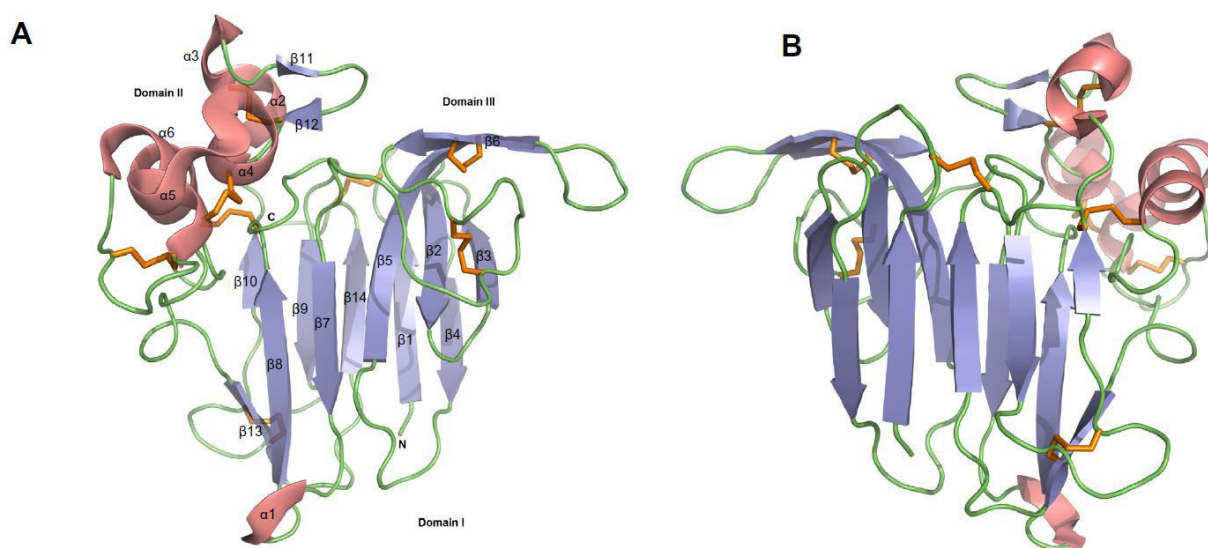
Através de dicroísmo circular, foi possível estimar a quantidade de conformações da estrutura secundária da CpOsm, sendo ela composta de 20% de alfa-hélice, 33% de folha-beta, 19% de volta-beta e 28% de estruturas desordenadas. Além disso, foi possível constatar que a CpOsm é estável em uma ampla faixa de pH (3,0 - 9,0) e em temperaturas de até 75 °C (DE FREITAS *et al.*, 2011b). Em um estudo posterior, a estrutura tridimensional da CpOsm foi resolvida (Figura 1), mostrando que esta proteína possui 3 domínios, 6 alfa-hélices, 14 folhas-beta e 8 pontes dissulfeto (RAMOS *et al.*, 2015).

Em testes antifúngicos, a CpOsm apresentou atividade contra *Fusarium solani*, *Neurospora* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides* (DE FREITAS *et al.*, 2011a). Por meio de ensaios com vesículas unilamelares gigantes produzidas a partir de POPG (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo(1-rac-glicerol)), contendo o corante calceína em seu interior, foi

possível descobrir que a CpOsm altera a permeabilidade da membrana. Posteriormente, testes com iodeto de propídio e *Fusarium solani* incubado com CpOsm foram capazes de comprovar a permeabilidade causada pela proteína na membrana do fungo (DE FREITAS *et al.*, 2011b). Também foi reforçada a hipótese do mecanismo de ação antifúngico da proteína, sendo proposto que a osmotina de *C. procera* se liga à superfície celular e induz a permeabilidade da membrana, causando extravasamento de conteúdo citoplasmático (RAMOS *et al.*, 2015).

Dito isto, a CpOsm se caracteriza como uma proteína de grande potencial biotecnológico, podendo ser utilizada para o desenvolvimento de antifúngicos e plantas transgênicas resistentes a patógenos (RAMOS *et al.*, 2015). Entretanto, trabalhos anteriores (OLIVEIRA, 2014; NASCIMENTO, 2016) obtiveram a osmotina recombinante expressa em corpos de inclusão, o que se caracteriza como um obstáculo para a obtenção da proteína purificada.

**Figura 1 – Estrutura tridimensional da osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm).**



(A) Visão frontal da estrutura proteica; (B) Visão posterior, com rotação de 180°. A estrutura possui três domínios, seis alfa-hélices (rosa), 14 folhas-beta (azul) e oito pontes dissulfeto (laranja). Fonte: Adaptado de RAMOS *et al.*, 2015.

## 1.2 Corpos de inclusão

*Escherichia coli* é o sistema de expressão mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes devido ao seu genoma bem caracterizado, baixo custo, simplicidade, facilidade para manipulação genética e produção em larga escala. Apesar destas vantagens, este sistema possui limitações como ausência de modificações pós-traducionais e formação de corpos de inclusão (KAUR; KUMAR; KAUR, 2017; YADAV *et al.*, 2016).

Corpos de inclusão (CI) são agregados densos de proteínas, geralmente produzidos quando há um alto nível de expressão proteica (GEORGIU; VALAX, 1999). Proteínas produzidas e acumuladas dentro de corpos de inclusão não são biologicamente ativas, assim, elas devem ser solubilizadas a partir desses agregados ou deve-se prevenir a formação dos mesmos. Várias são as estratégias para evitar a formação de corpos de inclusão. Dentre elas estão a otimização do indutor, otimização da temperatura de indução, expressão da proteína com *tags* de fusão e co-expressão de chaperonas. Quando nenhuma destas estratégias é bem sucedida, faz-se necessária a solubilização da proteína a partir dos CI. Geralmente, esta solubilização é feita com o uso de agentes caotrópicos, como ureia e cloridrato de guanidina, e de detergentes, como SDS e CTAB (KAUR; KUMAR; KAUR, 2017). O CTAB é, geralmente, menos desnaturante do que outros detergentes iônicos, como o SDS, permitindo que algumas proteínas retenham atividade enzimática após a solubilização. Além disso, o CTAB necessita de pouco solubilização em comparação com SDS, mercaptoetanol e ureia (FREEDMAN; NUTMAN; OTTESEN, 1988).

A formação de corpos de inclusão, em algumas situações, pode apresentar vantagens como a facilidade de isolamento destes agregados, resistência ao ataque de proteases, alto nível de expressão proteica e quando há a expressão de proteínas tóxicas à célula (CLARK, 2001; KAUR; KUMAR; KAUR, 2017).

## 1.3 Tags de fusão

*Tags* de fusão são proteínas que se ligam à proteína alvo e auxiliam no seu dobramento de maneira correta, aumentando sua solubilidade. Várias são as *tags* para aumento de solubilidade, dentre elas estão a GST (*Glutathione-S-transferase*), SUMO (*Small Ubiquitin Modifier*), TrxA (*Thioredoxin A*) e NusA (*N-utilization substance A*) (YADAV *et al.*, 2016). A GST é uma proteína de aproximadamente 26 kDa proveniente de *Schistosoma japonicum*. Ela pode ser utilizada como uma *tag* de afinidade ou de solubilidade e estabiliza a

proteína recombinante protegendo-a da ação de proteases intracelulares. A proteína SUMO tem cerca de 11 kDa e é encontrada em leveduras e vertebrados. Sua fusão com a proteína alvo ocorre na porção N-terminal e aumenta a estabilidade e solubilidade através do correto enovelamento da proteína e da proteção contra proteólise. A TrxA é uma proteína óxido-redutora de aproximadamente 12 kDa e é proveniente de *E. coli*. A proteína NusA, proveniente de *E. coli*, tem cerca de 55 kDa e promove o aumento da solubilidade através da diminuição da tradução e, assim, permite mais tempo para o enovelamento da proteína (KAUR; KUMAR; KAUR, 2017; YADAV *et al.*, 2016).

#### **1.4 *Lasiodiplodia* sp.**

Na agricultura várias culturas são afetadas por fungos fitopatogênicos. Dentre eles, um de grande disseminação é o *Lasiodiplodia theobromae*. Este fungo se encontra presente em mais de 500 espécies de plantas de regiões tropicais e subtropicais. Ele pode ser disseminado pelo vento, insetos e instrumentos de poda e é capaz de infectar frutos. (BATISTA *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta capacidade de infectar frutos coloca este fungo dentre os mais eficientes patógenos disseminados por meio de sementes e causadores de doenças pós-colheita (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; FREIRE *et al.*, 2004).

Culturas economicamente importantes, como o cajueiro, a gravioleira, a aceroleira, o maracujazeiro e a cirigueleira já foram relatadas como hospedeiras deste patógeno (FREIRE *et al.*, 2004). Dentre os sintomas apresentados pelas plantas infectadas estão a seca de ramos, cancro em ramos, caules e raízes, lesões em estacas, folhas, frutos e sementes, além de incitar a morte de mudas e enxertos (BATISTA *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; FREIRE *et al.*, 2004).

Com o trabalho de grupos de pesquisa, novos isolados do gênero *Lasiodiplodia* estão em constante descoberta (BURGESS *et al.*, 2006). Recentemente, um fungo do gênero *Lasiodiplodia* foi isolado de banana (Cultivar Williams) na Fazenda Bela Flor (Ceará) pelo Laboratório de Patologia Pós-Colheita (Embrapa Agroindústria Tropical), e demonstrou grande agressividade na infecção do fruto (Figura 2).

Devido à sua grande capacidade de infecção e do controle de doenças na agricultura ser feito em grande maioria por agrotóxicos, faz-se necessária uma forma alternativa de controle deste fungo fitopatogênico (MORANDI *et al.*, 2009).

**Figura 2 – Ensaio de virulência do fungo *Lasiodiplodia* sp. isolado de banana.**



Fonte: Christiana De Fatima Bruce Da Silva

### **1.5 *Candida* spp.**

Leveduras do gênero *Candida* são parte da microbiota normal do corpo, entretanto elas são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas em hospitais, que vão desde infecções superficiais até infecções sistêmicas. Dentre as espécies causadoras de doenças em humanos estão *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

*Candida albicans* é a espécie mais descrita em casos de infecções hospitalares. Ela possui uma alta capacidade de adesão, o que é um fator importante para sua infecção, disseminação e persistência em tecidos do organismo (SARDI *et al.*, 2010; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *Candida tropicalis* é tão virulenta quanto *C. albicans*, e estudos mostram que sua incidência vem aumentando consideravelmente com o passar dos anos (KOTHAVADE *et al.*, 2010). *Candida parapsilosis* possui uma menor virulência quando comparada a *C. albicans* e *C. tropicalis* (WEEMS JR, 1992), entretanto sua incidência também vem aumentando desde 1990.

Relatos indicam o rápido desenvolvimento de resistência de espécies de *Candida* a antifúngicos como o fluconazol (KRCMERY; BARNES, 2002; KOTHAVADE *et al.*, 2010). Devido ao uso indiscriminado de medicamentos contra infecções, a resistência de microrganismos aumentou, levando pesquisadores a buscar substâncias com atividade antimicrobiana de várias fontes, incluindo plantas (BANSOD; RAI, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir osmotina recombinante de *Calotropis procera* em diferentes estirpes de *Escherichia coli* transformadas com plasmídeos sintéticos e comprovar sua atividade biológica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Transformar células de *Escherichia coli* das estirpes ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) e SHuffle, utilizadas para expressão heteróloga, e da estirpe DH5 $\alpha$ , utilizada para clonagem, com plasmídeos sintéticos;
- Expressar a proteína recombinante nas estirpes ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) e SHuffle de *E. coli*;
- Avaliar qual estirpe obtém melhor resultado na expressão da proteína recombinante;
- Solubilizar a proteína recombinante por tratamento de corpos de inclusão com CTAB;
- Purificar a proteína a partir da fração solubilizada por CTAB;
- Realizar testes antifúngicos contra *Lasiodiplodia* sp. e *Candida* spp. com a proteína purificada.

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Células para clonagem e expressão

As células de *E. coli* das estirpes ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) e SHuffle foram utilizadas para expressão heteróloga, enquanto a estirpe DH5 $\alpha$  foi utilizada para clonagem. Todas as células foram obtidas da Agilent Technologies.

#### 3.2 Plasmídeos

Os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm foram produzidos pela empresa GenOne (Anexo A). As amostras liofilizadas foram ressuspensas em tampão TE pH8,0 estéril para uma concentração final de 20 ng/ $\mu$ L.

#### 3.3 Enzimas

As enzimas *Bam*HI (15 U/ $\mu$ L), *Xho*I (10 U/ $\mu$ L), DNaseI ((10 U/ $\mu$ L) e Lisozima foram obtidas, respectivamente, da Invitrogen, Fermentas, Roche e USB Corporation.

#### 3.4 Reagentes e outros materiais

Os meios de cultura Caldo LB e Ágar LB, o antibiótico Carbenicilina e o IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida) foram obtidos da Invitrogen.

Cloreto de potássio (KCl), azul de bromofenol, EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), imidazol e CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) foram obtidos da USB Corporation.

Cloreto de Magnésio Hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), Cloreto de Sódio (NaCl), Ácido Clorídrico (HCl), Glicerol, Isopropanol, Triton X-100, Agarose e Persulfato de Amônio foram obtidos da Vetec.

Gentamicina, SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder foram obtidos da Thermo Fischer Scientific.



Marcador LMW (Low Molecular Weight) e Vivaspin 3,000 MWCO foram obtidos da GE Healthcare.

Etanol, 2- $\beta$ -mercaptoetanol, Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), Kit NucleoBond® Xtra Midi e o antifúngico Carbomax 500 SC (Carbendazim) foram obtidos, respectivamente, da Dinâmica, Merck, Sigma, Macherey-Nagel e Sinon Corporation.

## 4 MÉTODOS

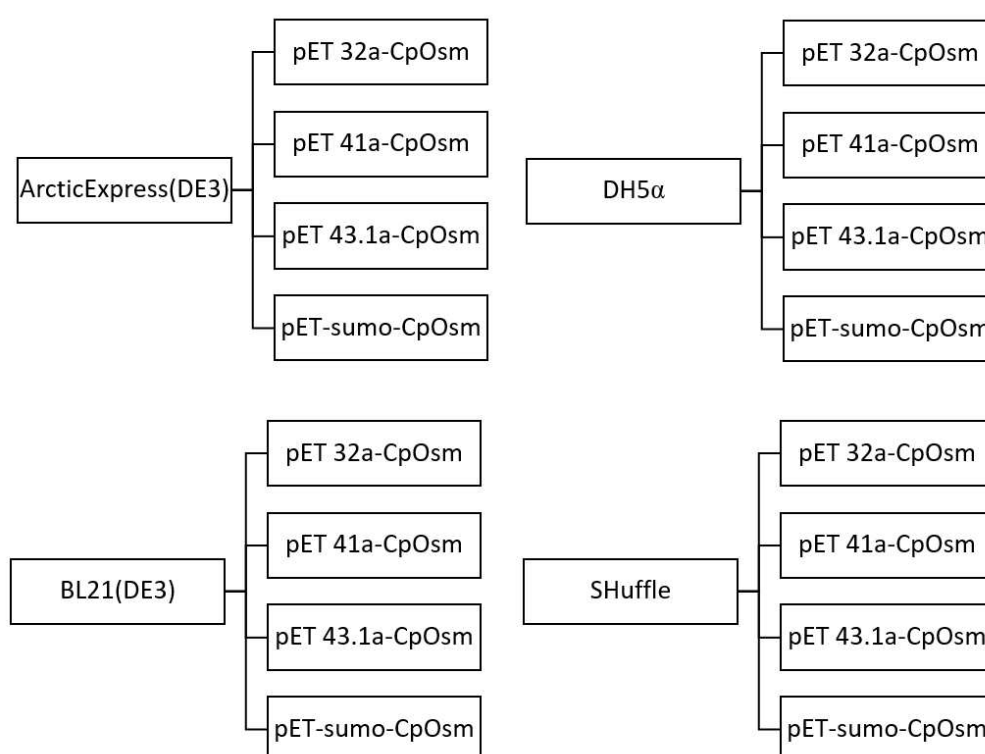
### 4.1 Preparação e transformação de *Escherichia coli* competente utilizando cloreto de cálcio

A preparação e a transformação de células de *E. coli* competentes foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). Células de *Escherichia coli* das estirpes ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) e SHuffle, utilizadas para expressão heteróloga, e da estirpe DH5 $\alpha$ , utilizada para clonagem, foram plaqueadas em meio LB ágar e incubadas por 16-20 h a 37 °C. A placa da estirpe ArcticExpress(DE3) continha o antibiótico gentamicina em uma concentração de 20  $\mu$ g/mL. Uma colônia isolada de cada estirpe foi inoculada em 5 mL de caldo LB e a cultura foi incubada *overnight* a 37 °C sob agitação orbital constante de 180 rpm. Foi transferido 0,5 mL de cada cultura para 50 mL de meio LB. As culturas foram incubadas a 37 °C, 180 rpm até atingirem uma D.O.<sub>600</sub> de 0,2 a 0,3. Após atingirem a D.O.<sub>600</sub> desejada, as culturas foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 min a 4°C. As células foram ressuspensas em 10 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 50mM e incubadas no gelo por 30 min. As suspensões foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 min a 4°C e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Foram adicionados 200  $\mu$ L de cada suspensão de células a microtubos de 2 mL estéreis. A cada microtubo foram adicionados 2,5  $\mu$ L (50 ng) das soluções de plasmídeos sintéticos (Tabela 1). Os microtubos foram incubados no gelo por 30 min e, em seguida, em banho-maria a 42 °C por exatamente 3 min. Os microtubos foram incubados no gelo por 2 min e a cada um deles foram adicionados 800  $\mu$ L de meio SOC e incubados a 37 °C por 1 h e 30 min. Em seguida, foram plaqueados 50  $\mu$ L de cada transformação em LB ágar com os antibióticos apropriados (Tabela 2) e incubados a 37 °C por, no mínimo, 12 h. As construções resultantes das transformações ficaram como ilustrado na Figura 3.

**Tabela 1 – Resumo de informações das *tags* de fusão.**

Plasmídeo	Tag de fusão	Proteína de fusão	Massa molecular da proteína de fusão	pI da proteína de fusão
pET 41a – CpOsm	GST	GST-CpOsm	57 kDa	6,49
pET SUMO – CpOsm	SUMO	SUMO-CpOsm	37 kDa	6,31
pET 32a – CpOsm	Trx	Trx-CpOsm	42 kDa	5,99
pET 43.1a – CpOsm	Nus	Nus-CpOsm	85 kDa	4,90

Fonte: GenOne.

**Figura 3 – Esquema das construções após a transformação de estirpes de *E. coli* com os plasmídeos sintéticos.**

Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 2 – Lista de antibióticos e concentrações utilizados em cada estirpe de *E. coli* transformada com os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm.**

Construções	Antibióticos
ArcticExpress (DE3) – pET 32a – CpOsm	Gentamicina (20 µg/mL) e Carbenicilina (100 µg/mL)
ArcticExpress (DE3) – pET 41a – CpOsm	Gentamicina (20 µg/mL) e Kanamicina (50 µg/mL)
ArcticExpress (DE3) – pET 43.1a – CpOsm	Gentamicina (20 µg/mL) e Carbenicilina (100 µg/mL)
ArcticExpress (DE3) – pET SUMO – CpOsm	Gentamicina (20 µg/mL) e Kanamicina (50 µg/mL)
BL21 (DE3) – pET 32a – CpOsm	Carbenicilina (100 µg/mL)
BL21 (DE3) – pET 41a – CpOsm	Kanamicina (50 µg/mL)
BL21 (DE3) – pET 43.1a – CpOsm	Carbenicilina (100 µg/mL)
BL21 (DE3) – pET SUMO – CpOsm	Kanamicina (50 µg/mL)
DH5α – pET 32a – CpOsm	Carbenicilina (100 µg/mL)
DH5α – pET 41a – CpOsm	Kanamicina (50 µg/mL)
DH5α – pET 43.1a – CpOsm	Carbenicilina (100 µg/mL)
DH5α – pET SUMO – CpOsm	Kanamicina (50 µg/mL)
SHuffle – pET 32a – CpOsm	Carbenicilina (100 µg/mL)
SHuffle – pET 41a – CpOsm	Kanamicina (50 µg/mL)
SHuffle – pET 43.1a – CpOsm	Carbenicilina (100 µg/mL)
SHuffle – pET SUMO – CpOsm	Kanamicina (50 µg/mL)

Fonte: Elaborada pela autora.

## 4.2 Extração de DNA plasmidial

Para estocagem dos plasmídeos e posterior confirmação das construções, a extração de DNA plasmidial foi realizada com o Kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel). Uma colônia isolada de DH5 $\alpha$  de cada transformação com os plasmídeos sintéticos foi inoculada em 5 mL de LB com os antibióticos apropriados (Tabela 2). As culturas foram incubadas a 37 °C, sob agitação de 180 rpm, por 8 h. Em seguida, 100  $\mu$ L de cada cultura foram transferidos para 100 mL de LB com os antibióticos apropriados (Tabela 2) e incubados por 16 h a 180 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000 x *g* por 15 min a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas com 8 mL de tampão RES com RNase A. Foram acrescentados 8 mL de tampão LYS, a solução foi invertida gentilmente 5 vezes e incubada em temperatura ambiente por 4 min. A coluna NucleoBond® Xtra foi equilibrada com 12 mL de tampão EQU. Foram acrescentados 8 mL de tampão NEU ao lisado e o tubo foi invertido gentilmente até a solução azul se tornar transparente. A solução foi centrifugada a 6.000 x *g* por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para a coluna NucleoBond® Xtra. Em seguida, a coluna foi lavada com 5 mL do tampão EQU e 8 mL do tampão WASH. O DNA foi eluído com 5 mL do tampão ELU e foram adicionados 3,5 mL de isopropanol ao eluído. A solução foi centrifugada a 12.000 x *g* por 30 min a 4°C. Foram adicionados 2 mL de etanol 70% ao *pellet* e foi centrifugado a 12.000 x *g* por 5 min a 4°C. Após 15 min em temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuspensado em 1 mL de tampão TE pH 8,0 estéril. A concentração de DNA plasmidial foi estimada com base nas leituras das absorbâncias a 260 nm, utilizando o espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia), as leituras foram realizadas em quatro absorbâncias (230, 260, 280 e 320 nm) e a concentração foi determinada através da multiplicação da absorbância a 260 nm por 50 e pela diluição utilizada. O resultado foi expresso em ng/ $\mu$ L.

## 4.3 Digestão de DNA plasmidial

Para confirmação das construções, a reação de digestão foi composta por 2  $\mu$ L de Tampão R 10X (Fermentas), 60 U da enzima *Bam*HI (Invitrogen), 20 U da enzima *Xho*I (Fermentas), 10  $\mu$ L de DNA plasmidial e 2  $\mu$ L de água deionizada estéril. O controle foi composto por 200 ng de DNA plasmidial e 10  $\mu$ L de água deionizada estéril. As soluções foram incubadas a 37 °C por 3 h e, em seguida, a 80 °C por 20 min em Termociclador

(Amplitherm Thermal Cyclers). A digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### **4.4 Eletroforese em gel de agarose**

O gel de agarose foi preparado de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). O gel de agarose 0,8% (m/v) foi preparado com tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) acrescentado de 0,5 µL de brometo de etídio (0,5µg/mL). As amostras da digestão (20 µL) foram misturadas a 5 µL de Loading Dye Green 5x (Promega) e aplicadas no gel de agarose. O marcador utilizado foi o 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 100 V, em cuba horizontal, com o gel de agarose submerso em tampão TAE. As bandas foram visualizadas através da exposição à luz UV em um transiluminador (Vilber Lourmat) e a imagem foi capturada através do fotodocumentador (Vilber Lourmat) acoplado ao equipamento.

#### **4.5 Indução da expressão da osmotina recombinante em *Escherichia coli***

A indução da expressão da osmotina recombinante foi realizada de acordo com as condições descritas por De Sousa e colaboradores (2017). As células de *E. coli* das estirpes ArcticExpress(DE3), BL21(DE3) e SHuffle foram plaqueadas em LB ágar com os antibióticos apropriados (Tabela 2) e incubadas a 37 °C por 16 a 20 h. Uma colônia isolada foi inoculada em meio LB com os antibióticos apropriados e incubado a 37 °C, sob uma agitação orbital de 180 rpm por 3 h. Em seguida, uma alíquota correspondente a 10% do volume final do inóculo foi transferida para o meio LB com os antibióticos apropriados (Tabela 2). As culturas foram incubadas a 37 °C, 180 rpm até uma D.O.<sub>600</sub> de 0,4-0,6. Foi adicionado IPTG para uma concentração final de 0,3 mM e as culturas foram incubadas a 20 °C, 130 rpm por 16 h. O controle foi feito conforme descrito acima, porém sem a adição de IPTG (Controle não induzido). No caso das células de ArcticExpress (DE3), antes de adicionar IPTG a células foram aclimatadas por 20 min a 12 °C, 130 rpm e as condições de indução foram 12 °C, 130 rpm por 20 h. As células foram coletadas por centrifugação a 8.000 x g por 15 min a 4°C para posterior lise celular.

#### 4.6 Lise celular

A lise celular foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira (1999). As células foram ressuspensas em 1/10 do volume de cultura em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM). Em seguida, foi adicionado 1/10 do volume de Triton X-100 1% e lisozima para uma concentração final de 100 µg/mL. A suspensão foi incubada por 30 min a 37 °C. Foi adicionado 50 U de Dnase I (Roche), MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> para concentrações finais de 8 mM e 10 mM, respectivamente. As suspensões foram incubadas por 1 h, a 37 °C e centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4°C para separação das frações solúvel e insolúvel.

#### 4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), adaptado para géis montados entre placas de vidro. O gel de empacotamento continha 3,5% de acrilamida, 1% de SDS e foi preparado em tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, enquanto o gel de resolução continha 15% de acrilamida, 1% de SDS e foi preparado em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. As amostras foram diluídas em tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v); 2-β-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)] quatro vezes concentrado e aquecidas a 100 °C por 10 min. Em todos os géis foram aplicados 25 µL de amostra em cada poço. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical Dual Gel Caster (Hoefer, São Francisco, USA) sob voltagem constante de 120 V, usando tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3; glicina 0,192 M; SDS 0,1 % (m/v). As bandas de proteínas foram coradas com *Blue Silver Dye*, preparado de acordo com o protocolo estabelecido por Candiano e colaboradores (2004), e descoradas com água destilada. O marcador de peso molecular utilizado nas corridas eletroforéticas foi o *Low Molecular Weight* (GE Healthcare).

#### 4.8 Solubilização dos corpos de inclusão

A solubilização dos corpos de inclusão com CTAB foi adaptada do protocolo descrito por Nascimento (2016). O *pellet* obtido a partir da lise celular de BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET 32a-CpOsm, que expressa a proteína de fusão Trx-

CpOsm, foi ressuspendido com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; Imidazol 5 mM e CTAB nas concentrações 1%, 2,5% e 5% (p/v) na proporção de 0,1 g/mL. Em seguida, as suspensões foram incubadas a 55°C por 2 h e centrifugadas a 8.000 x g por 30 min a 4 °C. As frações solúvel (Corpos de Inclusão Solubilizados-CIS) e insolúvel (Corpos de Inclusão Não Solubilizados-CINS) foram analisadas por SDS-PAGE.

#### 4.9 Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado

A CpOsm recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. A fração proteica solubilizada com CTAB 1% foi aplicada na matriz (*Ni Sepharose 6 Fast Flow*, *GE Healthcare*, EUA) previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; Imidazol 5 mM; CTAB 1%. A fração de proteínas não retidas foi eluída com este tampão e, em seguida, foram aplicados à coluna tampões com a mesma composição do tampão de equilíbrio, porém com um gradiente crescente de concentração de Imidazol de 40 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM, respectivamente. Os picos obtidos foram dialisados contra o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; CTAB 0,1%; Glicerol 15% e, em seguida, analisados por SDS-PAGE. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min e frações de 2 mL foram coletadas, sendo toda a cromatografia monitorada pela medida da absorbância das frações a 280 nm em espectrofotômetro *Genesys 10 UV Scanning*.

#### 4.10 Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi feita através da fórmula da Lei de Lambert-Beer ( $A = \epsilon c l$ ), onde A é a absorbância a 280 nm,  $\epsilon$  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 da proteína de fusão Trx-CpOsm foi obtido através da ferramenta ProtParam (Anexo C), a absorbância foi obtida através da leitura em espectrofotômetro *Genesys 10 UV Scanning* a 280 nm e o caminho óptico é igual a 1 cm. A partir desses valores foi possível calcular a concentração da proteína.

#### 4.11 Ensaio de atividade antifúngica contra *Lasiodiplodia* sp.

O ensaio de atividade antifúngica foi adaptado do protocolo descrito por Lopes Neto (2014). O fungo *Lasiodiplodia* sp. isolado de banana foi repicado em placa de Petri



contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e mantido em sala de incubação com temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 10 h de claro de 14 h de escuro, durante 7 dias. Em uma placa de Petri com BDA, foram feitos quatro poços de 8 mm onde foram aplicados 2 µL do fungicida Carbendazim (2mL/L), 100 µL de água deionizada estéril, 139 µg de Trx-CpOsm e 100 µL do tampão em que a proteína estava diluída (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; CTAB 0,1%; Glicerol 15%). Todas as amostras aplicadas foram esterilizadas por filtração com filtros com poro de 0,22 µm (Millipore). Um disco de 8 mm da cultura fúngica foi disposto no meio da placa e as placas foram mantidas em sala de incubação com temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 10 h de claro de 14 h de escuro. O experimento foi acompanhado durante 7 dias a cada 24 h.

#### **4.12 Ensaio de atividade antifúngica contra *Candida* spp.**

Para este ensaio de atividade antifúngica foram utilizadas as estirpes *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida parapsilosis* ATCC 90018.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da técnica de microdiluição em placa de 96 poços, conforme descrito pela diretriz M7-A6 Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico - Sexta Edição (CLSI, 2008). Culturas microbianas puras foram repicadas em caldo Sabouraud (Merck) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento. As culturas tiveram sua densidade celular ajustada, em solução salina 0,85% estéril, à turbidez da escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL), e foram diluídas 100 vezes em caldo Sabouraud ( $1,5 \times 10^4$  UFC/mL). Inicialmente, em cada poço da placa, foram distribuídos 100 µL de caldo Sabouraud. Em seguida, na primeira coluna, foram aplicados 100 µL da proteína Trx-CpOsm com uma concentração inicial de 1 µg/mL. A diluição seriada foi realizada a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL do primeiro poço para o seguinte, e assim sucessivamente (1 a 0,00048 µg/mL). O mesmo tratamento descrito acima foi realizado com o tampão em que a proteína estava diluída (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; CTAB 0,1%; Glicerol 15%), com CTAB em uma concentração inicial de  $3,9 \cdot 10^{-3}$  mM. Posteriormente, foram adicionados 5 µL da suspensão microbiana em cada poço da placa. Como controle foram utilizados poços que continham apenas o caldo Sabouraud e o inóculo. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e submetidas à inspeção visual de crescimento microbiano e à leitura de absorbância a 620 nm, em leitor de Elisa (BioTek).

A CIM foi considerada a menor concentração de Trx-CpOsm capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, comprovada pela ausência de turvação visível. O experimento foi realizado em triplicata.

A Concentração Letal Mínima (CLM) foi determinada conforme descrito por Castro (2010). Após a determinação da CIM, 5  $\mu$ L das concentrações inibitórias e as duas concentrações sucessivamente mais concentradas foram depositadas na superfície do ágar Plate-Count (Merck). As placas foram incubadas a 35°C por 24h. A CLM foi considerada a menor concentração que impediu o crescimento microbiano na superfície do ágar. O experimento foi realizado em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração e digestão de DNA plasmidial

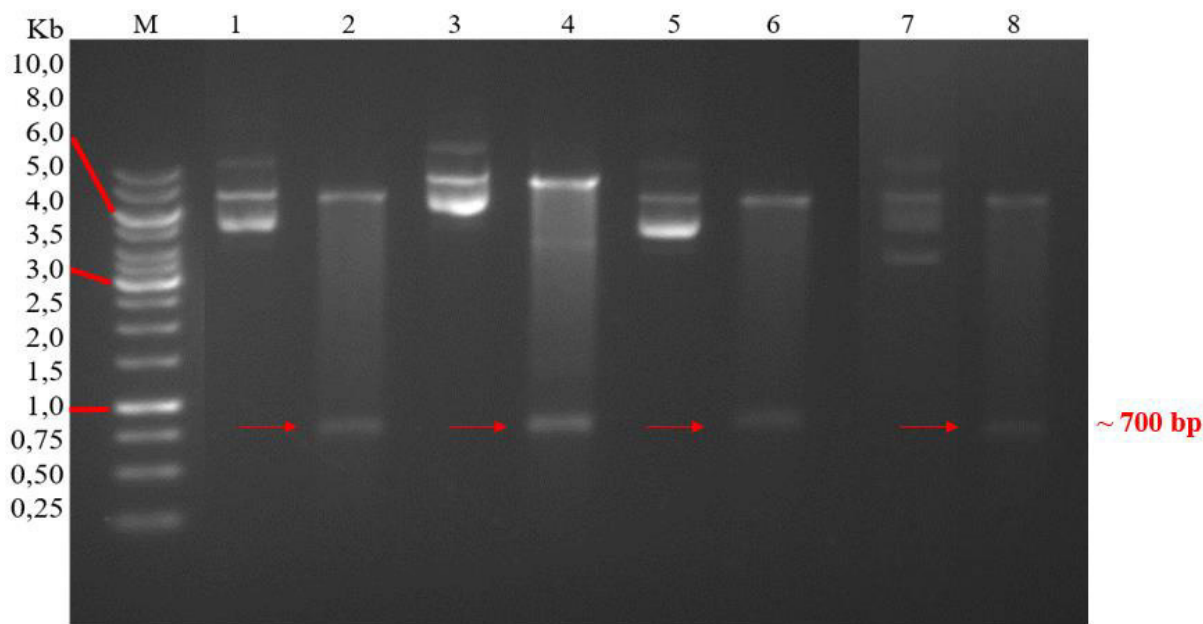
Para a confirmação das construções, a extração de DNA plasmidial foi realizada a partir de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com os plasmídeos sintéticos. A concentração de DNA plasmidial foi calculada a partir da medida da absorbância a 260 nm, (Tabela 3). Em seguida, o DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *Bam*HI 15 U/  $\mu$ L (Invitrogen) e *Xho*I 10 U/  $\mu$ L (Fermentas) e aplicado em gel de agarose 0,8%. Uma banda de aproximadamente 700 bp comprova a digestão do plasmídeo (Figura 4).

**Tabela 3 – Absorbâncias e concentrações de DNA plasmidial**

Plasmídeo	Abs 230 nm	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Abs 320 nm	Concentração (ng/ $\mu$ L)
<b>pET 32a -CpOsm</b>	0.027	0.071	0.038	0.000	35,5
<b>pET 41a-CpOsm</b>	0.038	0.105	0.053	-0.016	52,5
<b>pET 43.1a-CpOsm</b>	0.059	0.147	0.086	0.002	73,5
<b>pET SUMO-CpOsm</b>	0.032	0.078	0.038	-0.012	39,0

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 4 – Perfil eletroforético dos produtos da digestão de DNA plasmidial.**



Eletroforese em gel de agarose (0,8%). Nos poços 1, 3, 5 e 7 plasmídeos íntegros e nos poços 2, 4, 6 e 8 plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI 15 U/  $\mu$ L (Invitrogen) e *Xho*I 10 U/  $\mu$ L (Fermentas). Poço 1: pET 41a-CpOsm íntegro. Poço 2: pET 41a-CpOsm digerido. Poço 3: pET 43.1a-CpOsm íntegro. Poço 4: pET 43.1a-CpOsm digerido. Poço 5: pET SUMO-CpOsm íntegro. Poço 6: pET SUMO-CpOsm digerido. Poço 7: pET 32a-CpOsm íntegro. Poço 8: pET 32a-CpOsm digerido. M: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.2 Indução da expressão da osmotina recombinante em *Escherichia coli*

Após a transformação, a osmotina recombinante foi expressa em três diferentes estirpes de *E. coli* através de indução com IPTG. Como controle foi utilizado um meio de cultura sem adição do indutor. Em seguida, foi realizada uma lise celular e as frações proteicas solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS-PAGE. Através da análise dos géis obtidos, é possível perceber que a proteína foi produzida em corpos de inclusão em todas as estirpes utilizadas (Figuras 4 a 6). Apesar de aparecer nos géis de Arctic Express (DE3) uma banda com massa molecular de 57 kDa na fração solúvel, esta mesma banda é visível em todos os poços de todos os géis desta célula e corresponde à chaperonina Cpn60, que é produzida constitutivamente em células de Arctic Express (DE3) (AGILENT, 2010).

De acordo com Kaur, Kumar, Kaur (2017) o fato de o citoplasma ser um ambiente redutor impede a formação de ligações dissulfeto. A osmotina de *Calotropis procera* possui

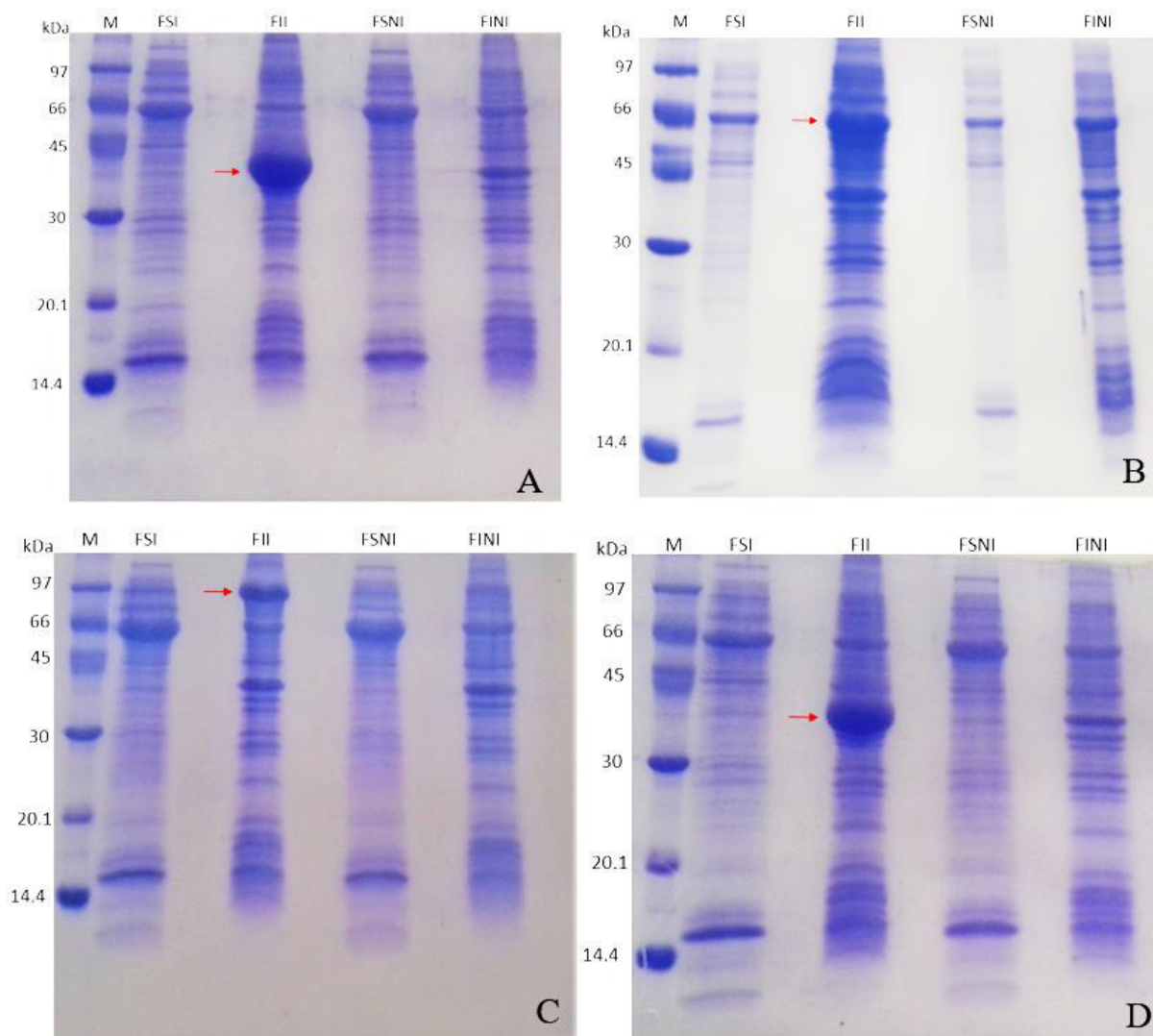
oito pontes dissulfeto (RAMOS et al., 2015), podendo ser este o motivo da sua expressão em corpos de inclusão.

Através do uso da ferramenta online *Recombinant Protein Solubility Prediction* foi possível calcular a probabilidade de solubilidade das proteínas de fusão. De acordo com a ferramenta, todas as quatro proteínas apresentaram 0% de chance de serem expressas de forma solúvel em *E. coli* (Figura 8).

Apesar de vários relatos na literatura de aumento da solubilidade de proteínas através de *tags* de fusão, cada proteína é diferente e nem sempre o que é relatado para um proteína funcionará da mesma forma em outras (KAUR; KUMAR; KAUR, 2017). Além disso, o mecanismo de ação das *tags* de fusão não está completamente elucidado, assim uma maior compreensão sobre elas levaria um uso mais correto e direcionado das mesmas (COSTA et al., 2014).

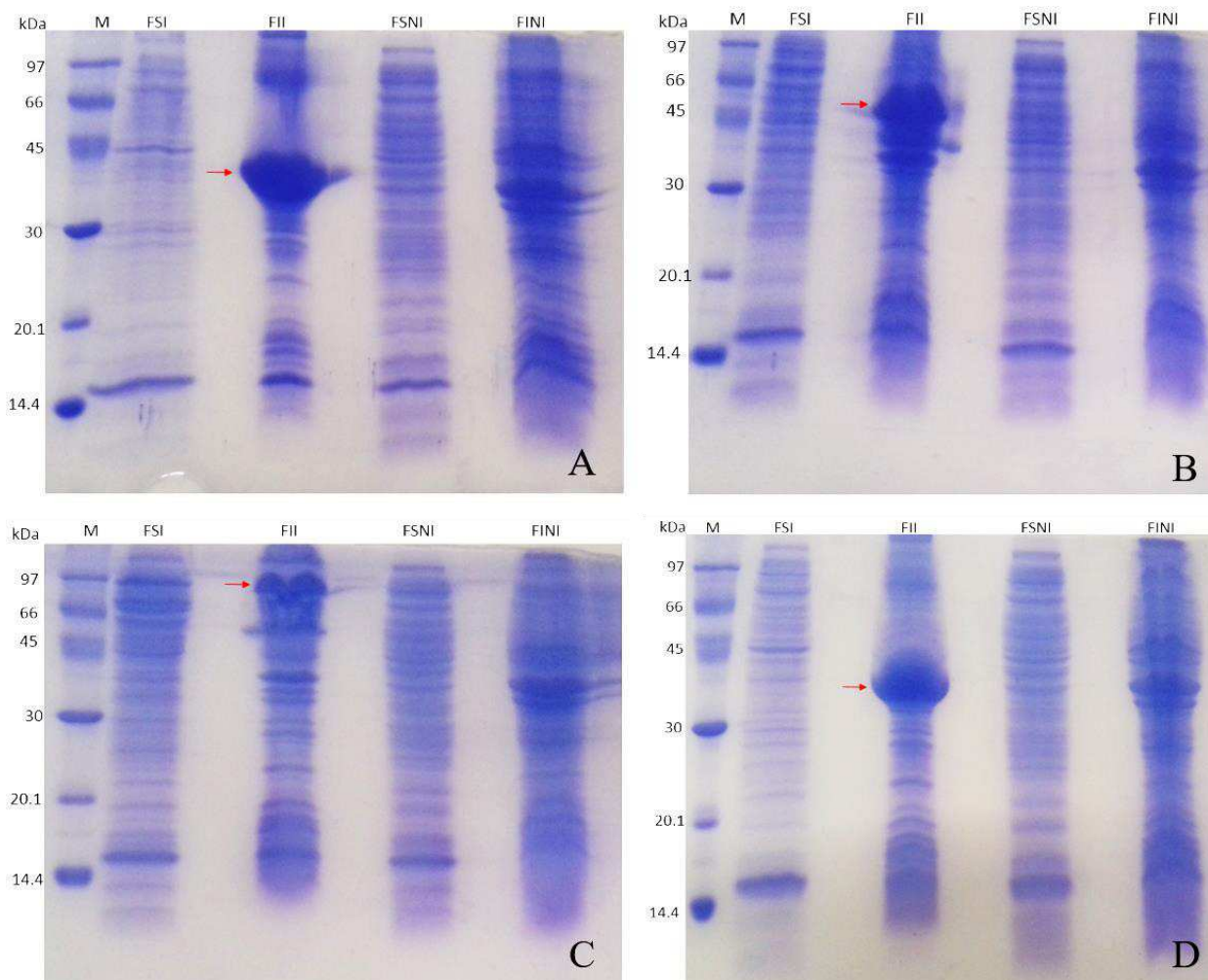
Como nenhuma das estirpes obteve sucesso na produção de osmotina na fração solúvel, a célula BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET 32a-CpOsm, que expressa a proteína de fusão Trx-CpOsm, foi escolhida para prosseguir na tentativa de solubilização dos corpos de inclusão através de tratamento com CTAB, devido à sua maior produção de proteína em comparação com as outras células.

**Figura 5 - Perfil eletroforético da indução de células de Arctic Express (DE3) transformadas com os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm.**



Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). (A) Arctic Express (DE3) transformada com plasmídeo pET 32a-CpOsm, expressando osmotina fundida à tiorredoxina (Trx-CpOsm) com uma massa molecular de 42 kDa (seta vermelha). (B) Arctic Express (DE3) transformada com plasmídeo pET 41a-CpOsm, expressando osmotina fundida à glutathione S-transferase (GST-CpOsm) com uma massa molecular de 57 kDa (seta vermelha). (C) Arctic Express (DE3) transformada com plasmídeo pET 43.1a-CpOsm, expressando osmotina fundida à proteína Nus (Nus-CpOsm) com uma massa molecular de 85 kDa (seta vermelha). (D) Arctic Express (DE3) transformada com plasmídeo pET SUMO-CpOsm, expressando osmotina fundida à proteína SUMO (SUMO-CpOsm) com uma massa molecular de 37 kDa (seta vermelha). M: marcador LMW (*Low Molecular Weight-GE Healthcare*); FSI: Fração Solúvel Induzida; FII: Fração Insolúvel induzida; FSNI: Fração Solúvel Não Induzida; FINI: Fração Insolúvel Não Induzida. Fonte: Elaborada pela autora.

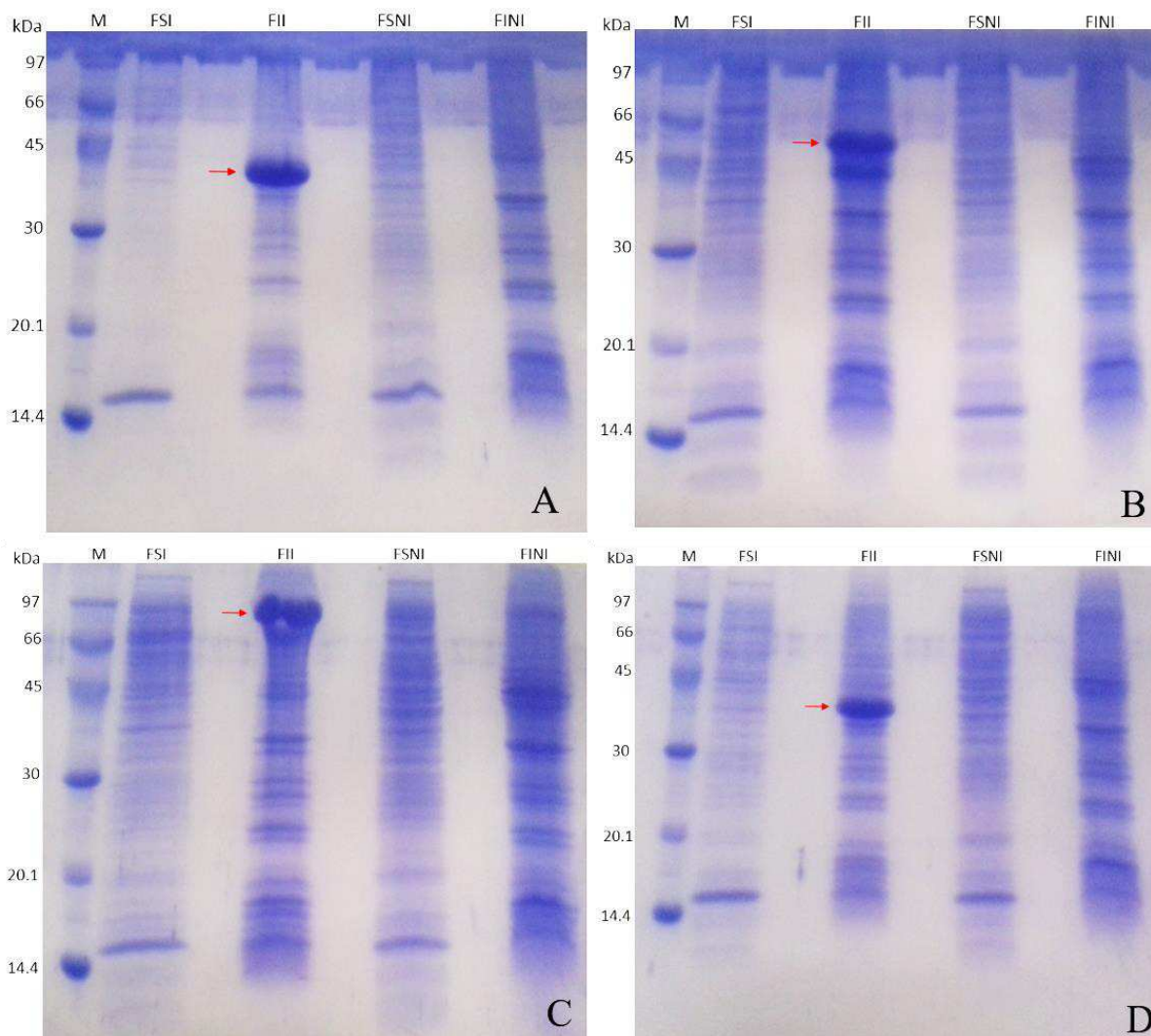
**Figura 6 - Perfil eletroforético da indução de células de BL21 (DE3) transformadas com os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm.**



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 de 42 kDa (seta vermelha). (B) BL21 (DE3) transformada com plasmídeo pET 41a-CpOsm, expressando osmotina fundida à glutatona S-transferase (GST-CpOsm) com uma massa molecular de 57 kDa (seta vermelha). (C) BL21 (DE3) transformada com plasmídeo pET 43.1a-CpOsm, expressando osmotina fundida à proteína Nus (Nus-CpOsm) com uma massa molecular de 85 kDa (seta vermelha). (D) BL21 (DE3) transformada com plasmídeo pET SUMO-CpOsm, expressando osmotina fundida à proteína SUMO (SUMO-CpOsm) com uma massa molecular de 37 kDa (seta vermelha). M: marcador LMW (*Low Molecular Weight-GE Healthcare*); FSI: Fração Solúvel Induzida; FII: Fração Insolúvel induzida; FSNI: Fração Solúvel Não Induzida; FINI: Fração Insolúvel Não Induzida. Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 7 - Perfil eletroforético da indução de células de SHuffle transformadas com os plasmídeos sintéticos pET32a-CpOsm, pET41a-CpOsm, pET43.1a-CpOsm e pET SUMO-CpOsm.**



Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). (A) SHuffle transformada com plasmídeo pET 32a-CpOsm, expressando osmotina fundida à tiorredoxina (Trx-CpOsm) com uma massa molecular de 42 kDa (seta vermelha). (B) SHuffle transformada com plasmídeo pET 41a-CpOsm, expressando osmotina fundida à glutatona S-transferase (GST-CpOsm) com uma massa molecular de 57 kDa (seta vermelha). (C) SHuffle transformada com plasmídeo pET 43.1a-CpOsm, expressando osmotina fundida à proteína Nus (Nus-CpOsm) com uma massa molecular de 85 kDa (seta vermelha). (D) SHuffle transformada com plasmídeo pET SUMO-CpOsm, expressando osmotina fundida à proteína SUMO (SUMO-CpOsm) com uma massa molecular de 37 kDa (seta vermelha). M: marcador LMW (*Low Molecular Weight*-GE Healthcare); FSI: Fração Solúvel Induzida; FII: Fração Insolúvel induzida; FSNI: Fração Solúvel Não Induzida; FINI: Fração Insolúvel Não Induzida. Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 8 – Resultado do percentual de solubilidade das proteínas de fusão calculado através da ferramenta *Recombinant Protein Solubility Prediction*.**

<p>The input sequence has a <b>0.0 percent</b> chance of solubility when overexpressed in <i>E. Coli</i>.</p> <p>The amino acid composition of the input sequence is:</p> <p>78 Alanine (A) 49 Arginine (R) 58 Aspartate (D) 37 Asparagine (N) 19 Cysteine (C) 27 Glutamine (Q) 65 Glutamate (E) 61 Glycine (G) 17 Histidine (H) 42 Isoleucine (I) 53 Leucine (L) 34 Lysine (K) 12 Methionine (M) 28 Phenylalanine (F) 36 Proline (P) 34 Serine (S) 46 Threonine (T) 8 Tryptophan (W) 15 Tyrosine (Y) 54 Valine (V)</p> <p>Click <a href="#">here</a> to return to the home page.</p> <p style="text-align: center;"><b>A</b></p>	<p>The input sequence has a <b>0.0 percent</b> chance of solubility when overexpressed in <i>E. Coli</i>.</p> <p>The amino acid composition of the input sequence is:</p> <p>31 Alanine (A) 16 Arginine (R) 29 Aspartate (D) 22 Asparagine (N) 18 Cysteine (C) 11 Glutamine (Q) 14 Glutamate (E) 41 Glycine (G) 15 Histidine (H) 18 Isoleucine (I) 24 Leucine (L) 19 Lysine (K) 7 Methionine (M) 18 Phenylalanine (F) 24 Proline (P) 21 Serine (S) 26 Threonine (T) 6 Tryptophan (W) 11 Tyrosine (Y) 14 Valine (V)</p> <p>Click <a href="#">here</a> to return to the home page.</p> <p style="text-align: center;"><b>B</b></p>
<p>The input sequence has a <b>0.0 percent</b> chance of solubility when overexpressed in <i>E. Coli</i>.</p> <p>The amino acid composition of the input sequence is:</p> <p>29 Alanine (A) 25 Arginine (R) 35 Aspartate (D) 22 Asparagine (N) 20 Cysteine (C) 13 Glutamine (Q) 25 Glutamate (E) 51 Glycine (G) 21 Histidine (H) 22 Isoleucine (I) 38 Leucine (L) 30 Lysine (K) 13 Methionine (M) 23 Phenylalanine (F) 33 Proline (P) 29 Serine (S) 28 Threonine (T) 8 Tryptophan (W) 24 Tyrosine (Y) 18 Valine (V)</p> <p>Click <a href="#">here</a> to return to the home page.</p> <p style="text-align: center;"><b>C</b></p>	<p>The input sequence has a <b>0.0 percent</b> chance of solubility when overexpressed in <i>E. Coli</i>.</p> <p>The amino acid composition of the input sequence is:</p> <p>20 Alanine (A) 20 Arginine (R) 20 Aspartate (D) 21 Asparagine (N) 16 Cysteine (C) 12 Glutamine (Q) 18 Glutamate (E) 32 Glycine (G) 9 Histidine (H) 16 Isoleucine (I) 15 Leucine (L) 15 Lysine (K) 7 Methionine (M) 17 Phenylalanine (F) 23 Proline (P) 24 Serine (S) 22 Threonine (T) 4 Tryptophan (W) 10 Tyrosine (Y) 13 Valine (V)</p> <p>Click <a href="#">here</a> to return to the home page.</p> <p style="text-align: center;"><b>D</b></p>

(A) Nus-CpOsm; (B) Trx-CpOsm; (C) GST-CpOsm; (D) SUMO-CpOsm. Fonte: *Recombinant Protein Solubility Prediction*

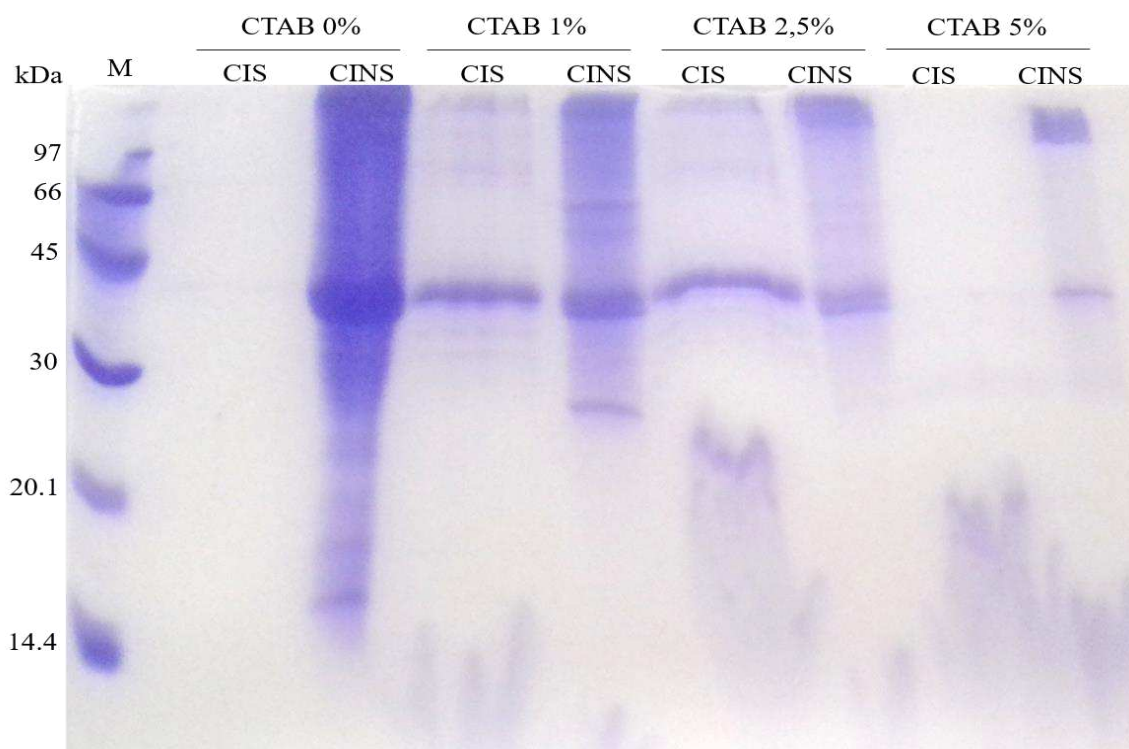
### 5.3 Solubilização dos corpos de inclusão

A solubilização dos corpos de inclusão foi feita através de tratamento com CTAB nas concentrações de 1%, 2,5% e 5% (p/v) a 55 °C. Em seguida, as frações solúvel e insolúvel foram analisadas através de SDS-PAGE. Através da análise do gel (Figura 9) é possível constatar que as concentrações de 1% e 2,5% de CTAB obtiveram resultados semelhantes.

De acordo com Wang e colaboradores (2005), com uma determinada concentração de CTAB a proteína lisozima atinge o ápice do seu renovelamento, e após esse ápice, quanto maior a concentração CTAB, menor a porcentagem de renovelamento. Além disso, segundo Tandon e Horowitz (1987) a atividade da enzima rodanase é afetada pela concentração de CTAB. A atividade enzimática determinada colorimetricamente a 460 nm, foi de 0,01, 1,25 e 0 para as concentrações de 0,1, 1,0 e 10 mg/mL de CTAB, respectivamente.

Desta forma, fração proteica solubilizada com CTAB 1% foi utilizada para prosseguir com a etapa de purificação da proteína Trx-CpOsm.

**Figura 9 – Perfil eletroforético de Trx-CpOsm solubilizada com CTAB 1%, 2,5% e 5%.**



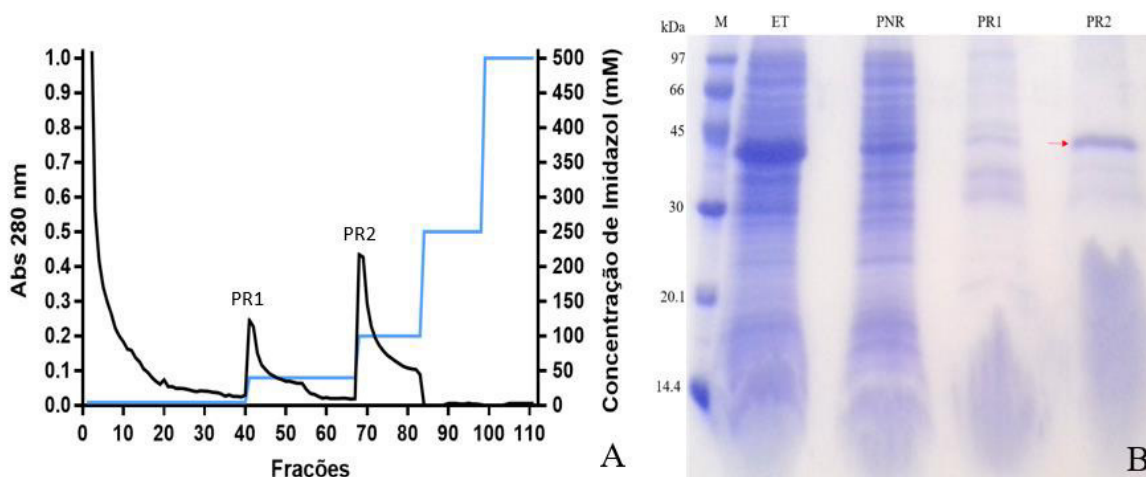
Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes. M: Marcador LMW (*Low Molecular Weight*-GE Healthcare); CIS: Corpos de Inclusão Solubilizados; CINS: Corpos de Inclusão Não Solubilizados.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.4 Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado

A fração proteica solubilizada com CTAB 1% foi submetida a uma cromatografia de afinidade em níquel imobilizado. O primeiro pico foi eluído com o tampão contendo imidazol na concentração de 40 mM e o segundo com 100 mM. Os picos obtidos foram dialisados e uma alíquota de cada pico foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida. Através da análise do gel, é possível constatar que a osmotina recombinante (Trx-CpOsm) de massa molecular de 42 kDa foi eluída com o tampão contendo imidazol na concentração de 100 mM (Figura10).

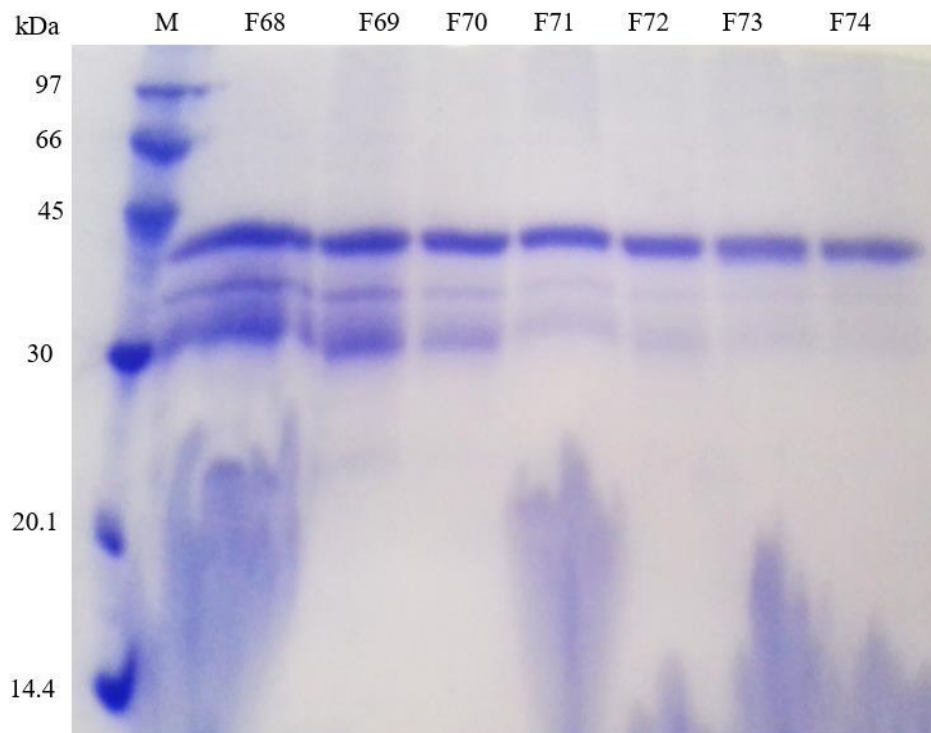
**Figura 10 – Perfil da cromatografia de afinidade em níquel imobilizado.**



(A) Durante a cromatografia dois picos foram obtidos, um foi eluído com o tampão com imidazol 40 mM e outro com imidazol 100 mM. A proteína recombinante foi eluída no pico retido 2. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes. Durante a cromatografia dois picos foram obtidos, um foi eluído com o tampão com imidazol 40 mM (PR1) e outro com imidazol 100 mM (PR2). A proteína recombinante foi eluída no pico retido 2 (seta vermelha). M: Marcador LMW (*Low Molecular Weight*-GE Healthcare); ET: Extrato Total; PNR: Pico Não Retido; PR1:Pico retido 1; PR2: Pico Retido 2.Fonte: Elaborada pela autora.

Antes de juntar as frações que obtiveram maior absorbância ao serem eluídas com o tampão de 100 mM de imidazol, uma alíquota de cada fração (frações 68 a 74) foi misturada ao tampão de amostra e submetida a uma SDS-PAGE. O gel mostra a purificação contínua da Trx-CpOsm em cada fração obtida na cromatografia (Figura 11).

**Figura 11 – Perfil eletroforético de cada fração obtida na cromatografia na eluição com imidazol (100 mM).**

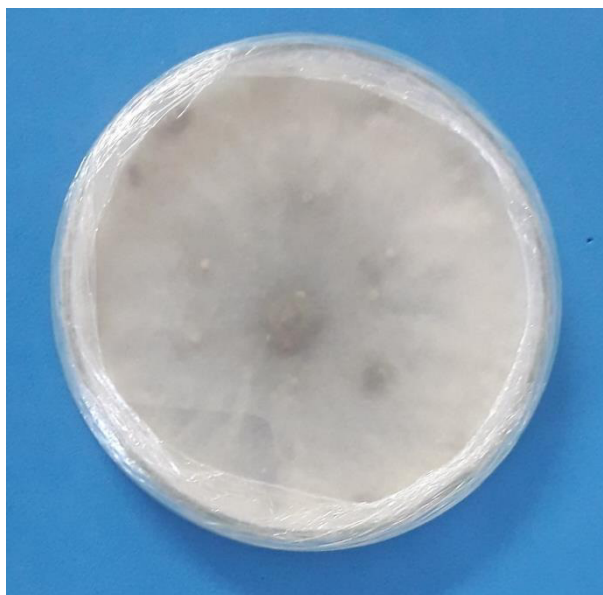


Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em condições desnaturantes. M: Marcador LMW (*Low Molecular Weight*-GE Healthcare); F: Fração. Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.5 Ensaio de atividade antifúngica contra *Lasiodiplodia* sp.

Após o crescimento do fungo *Lasiodiplodia* sp. por 7 dias (Figura 12), o ensaio foi realizado e acompanhado durante 7 dias a cada 24h.

**Figura 12 – Fungo *Lasiodiplodia* sp. isolado de banana após 7 dias de crescimento em meio BDA.**



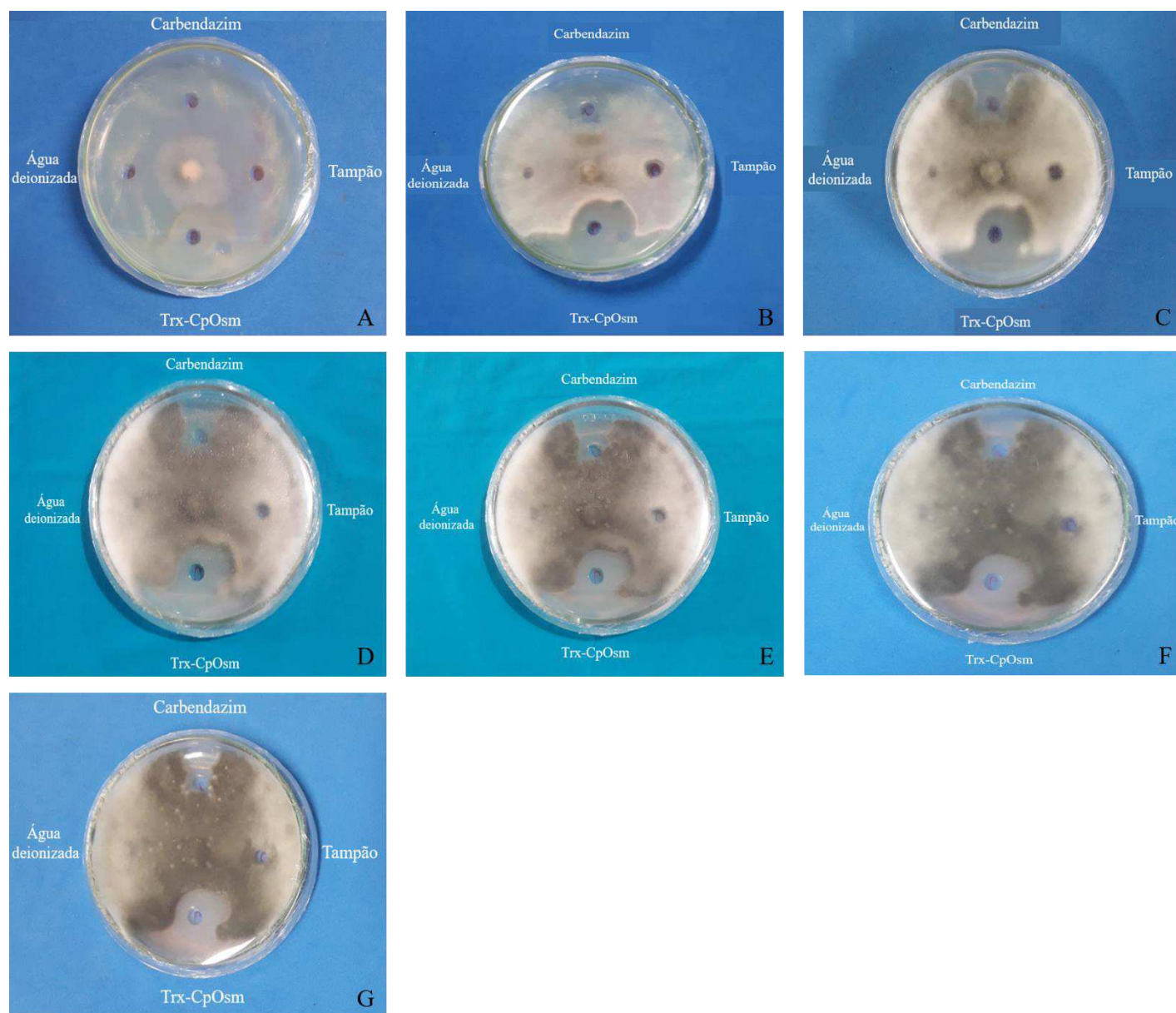
Fonte: Elaborada pela autora.

Após 24 h do início do ensaio não é possível observar o halo de inibição aparente em nenhum dos quatro poços. Com 48 h de ensaio, o halo de inibição de crescimento é visível ao redor do poço onde a proteína foi aplicada e do antifúngico Carbendazim. Os halos persistem até 168 h após o início do ensaio (Figura 13).

Estes resultados demonstram a atividade antifúngica da proteína, sendo o primeiro relato da atividade de osmotina de *Calotropis procera* contra *Lasiodiplodia* sp, e sua alta estabilidade por manter o halo de inibição durante 7 dias. A atividade antifúngica da osmotina de *Calotropis procera* contra fungos fitopatogênicos já foi documentada por De Freitas (2011a), assim como sua estabilidade a variações de pH e altas temperaturas (DE FREITAS *et al.*, 2011b). Apesar de sua forma de ação não ser totalmente compreendida, propõe-se que ela cause uma desestabilidade na membrana o que leva ao extravasamento do material citoplasmático (RAMOS *et al.*, 2015).



**Figura 13 – Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. isolado de banana durante 7 dias de ensaio.**

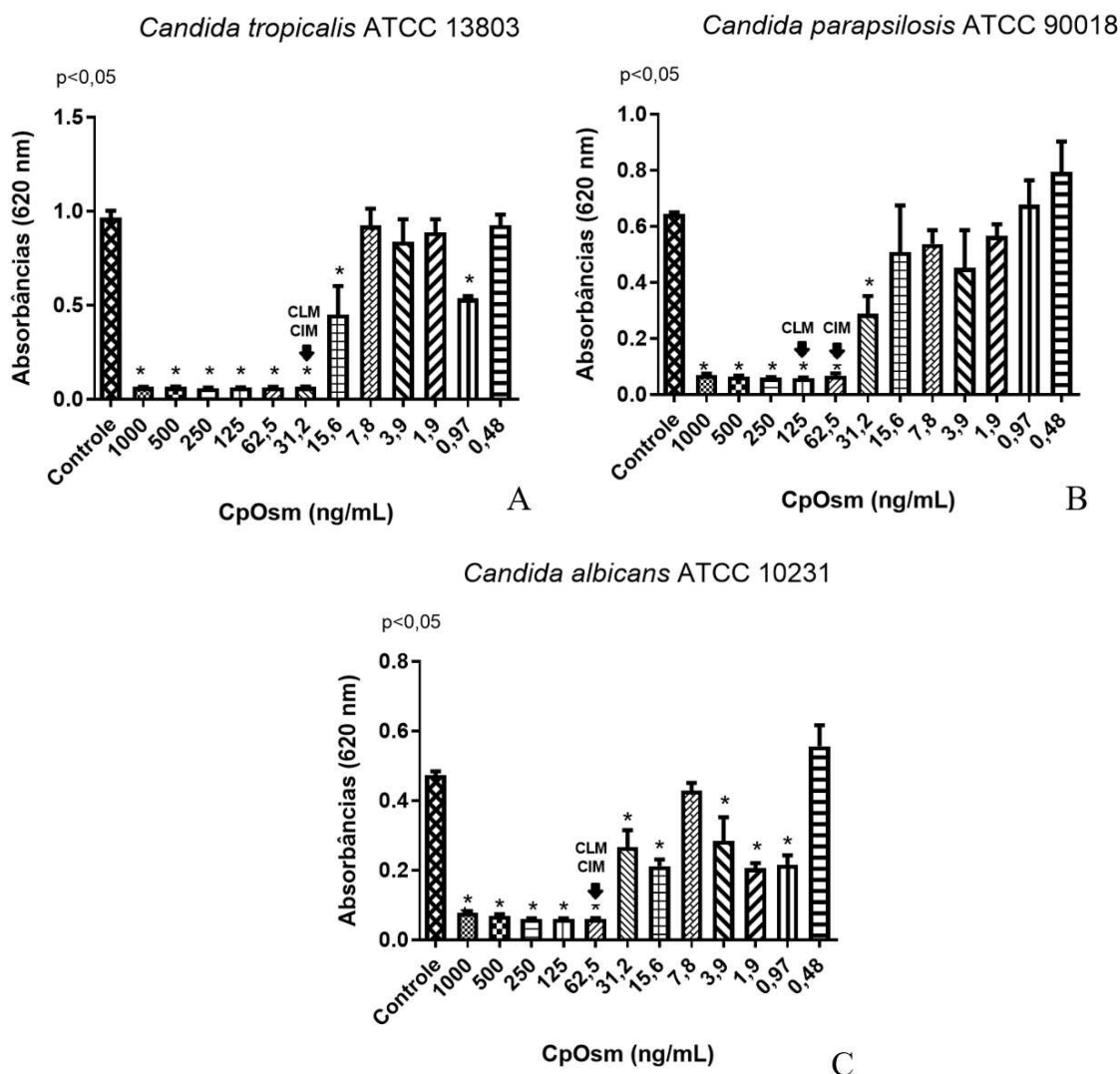


(A) Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. após 24h do início do ensaio; (B) Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. após 48h do início do ensaio; (C) Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. após 72h do início do ensaio; (D) Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. após 96h do início do ensaio; (E) Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. após 120h do início do ensaio; (F) Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. após 144h do início do ensaio; (G) Crescimento de *Lasiodiplodia* sp. após 198h do início do ensaio. Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.6 Ensaio de atividade antifúngica contra *Candida* spp.

A concentração inibitória mínima de Trx-CpOsm foi de 62,50 ng/mL para as estirpes *C. parapsilosis* ATCC 90018 e *C. albicans* ATCC 10231. Já para a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803 a CIM foi de 31,20 ng/mL (Figura 14 e Tabela 4).

**Figura 14 – Gráficos das leituras de absorbância a 620 nm em leitor de Elisa de Trx-CpOsm incubada com *Candida* spp.**

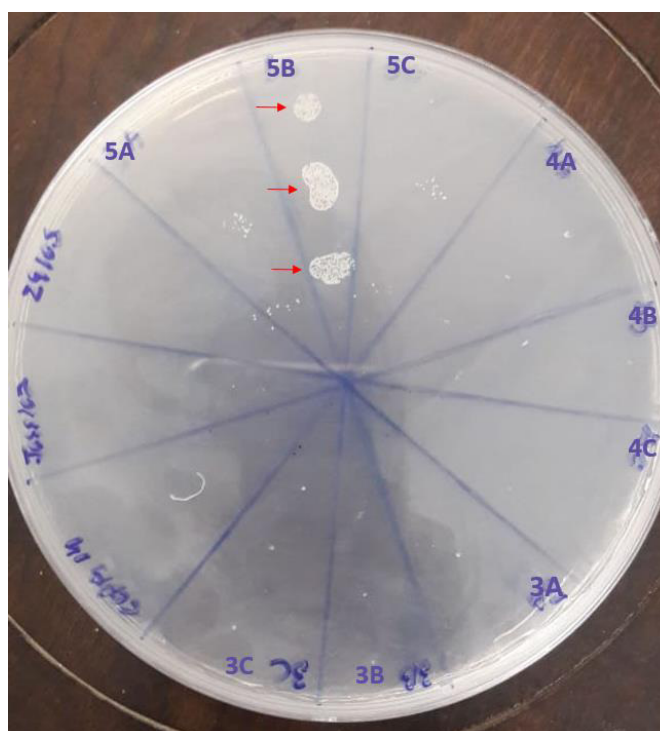


(A) Gráfico correspondente à *Candida tropicalis* ATCC 13803 onde os valores da CIM e da CLM foram de 31,20 ng/mL; (B) Gráfico correspondente à *Candida parapsilosis* ATCC 90018 onde os valores da CIM e da CLM foram de 62,50 ng/mL e 125 ng/mL; (C) Gráfico correspondente à *Candida albicans* ATCC 10231 onde os valores da CIM e da CLM foram de 62,50 ng/mL. Fonte: Valéria Dodou.

A Concentração letal mínima para as cepas *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 13803 foi igual à CIM, 62,50 ng/mL e 31,20 ng/mL, respectivamente (Figura 14 e Tabela 4).

Ao ser plaqueada em ágar Plate-count a proteína com a CIM determinada para a estirpe *C. parapsilosis* ATCC 90018 (62,50 ng/mL) permitiu o crescimento microbiano, indicando que a CLM foi 125 ng/mL (Figuras 14 e 15 e Tabela 4).

**Figura 15 – Determinação da Concentração Letal Mínima de *C. parapsilosis* ATCC 90018**



Concentração de Trx-CpOsm em 3A, 3B E 3C: 250 ng/mL; Concentração de Trx-CpOsm em 4A, 4B E 4C: 125 ng/mL; Concentração de Trx-CpOsm em 5A, 5B E 5C: 62,50 ng/mL. Seta vermelha: crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 90018 na concentração de 62,50 ng/mL. Fonte: Valéria Dodou.

**Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) de Trx-CpOsm para estirpes de *Candida* spp..**

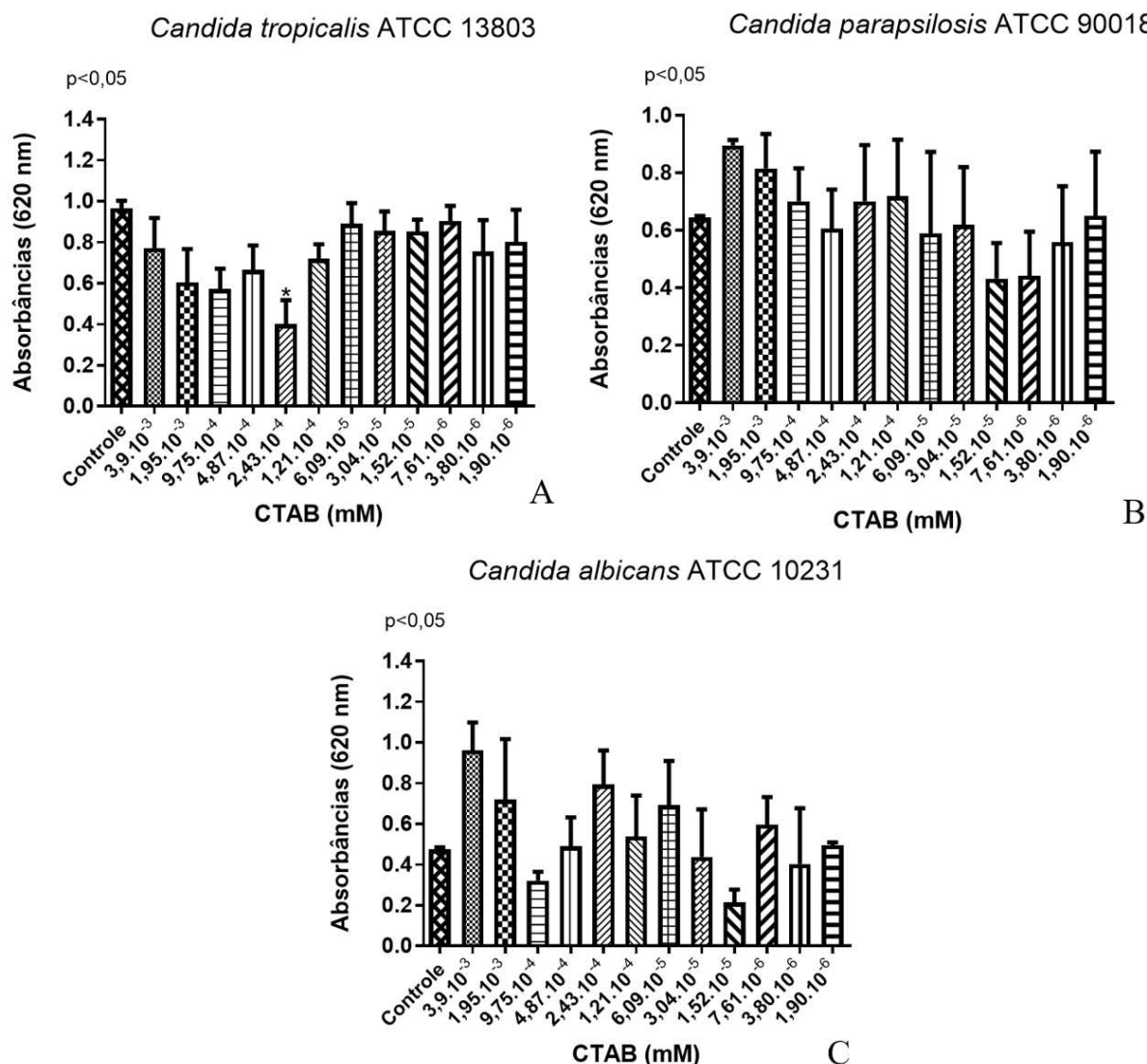
Cepa	CIM (ng/mL)	CLM (ng/mL)
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	31,20	31,20
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	62,50	125,00
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	62,50	62,50

Fonte: Elaborada pela autora.



O tampão diluente da proteína, contendo CTAB, não apresentou atividade inibitória para nenhuma das cepas do ensaio (Figura 16).

**Figura 16 – Gráficos das leituras de absorbância a 620 nm em leitor de Elisa do diluente da proteína incubado com *Candida* spp.**



(A) Gráfico correspondente à *Candida tropicalis* ATCC 13803; (B) Gráfico correspondente à *Candida parapsilosis* ATCC; (C) Gráfico correspondente à *Candida albicans* ATCC 10231. Fonte: Elaborada pela autora.

Este é o primeiro relato de osmotina de *Calotropis procera* a exibir atividade contra espécies de *Candida*. Já é descrito na literatura que a osmotina de tabaco exibe atividade contra *C. albicans*. Tzou e colaboradores (2011) relatam a produção em *Escherichia coli* de uma osmotina de tabaco em corpos de inclusão e solubilizada com ureia. Esta proteína

apresentou atividade contra *Candida albicans*, sendo necessária uma concentração de 57 µg/mL para inibir 10% do crescimento da cultura (CIM<sub>10</sub>). Vigers e colaboradores (1992) também relatam a eficiência de uma osmotina isolada de folhas de tabaco na inibição do crescimento de *Candida albicans*. Esta proteína inibiu completamente o crescimento de *C. albicans* em uma concentração de 3,3 µg/mL. Comparando-se as Concentrações Inibitórias e Letais Mínimas obtidas em níveis de nanogramas com a proteína Trx-CpOsm às relatadas na literatura, é possível inferir que os resultados foram muito promissores.

Vieira e Carmona-Ribeiro (2006) relatam que o CTAB atua como agente antifúngico contra *C. albicans* em uma concentração de 0.3 mM. Desta forma, como o tampão em que a proteína estava diluído continha CTAB, ele foi utilizado como controle nos testes antifúngicos. Na concentração em que o CTAB foi usado nestes testes ( $3,9 \cdot 10^{-3}$  mM) ele não exibiu atividade antifúngica, evidenciando que a atividade era decorrente somente da proteína.

## 6 CONCLUSÃO

A osmotina recombinante de *Calotropis procera* foi expressa na forma de corpos de inclusão em nas estirpes ArcticExpress (DE3), BL21 (DE3) e SHuffle. Entretanto, foi possível solubilizá-la com o uso de CTAB e, em seguida purificá-la. A proteína purificada demonstrou atividade contra o fungo *Lasioidiplodia* sp., que é um fitopatógeno e contra as espécies *Candida albicas*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, que são leveduras de importância médica.

## REFERÊNCIAS

- AGILENT. Arctic Express Competent Cells and Arctic Express (DE3) Competent Cells. **Manual Agilent Technologies**, 2010.
- BANSOD, Sunita; RAI, Mahendra. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World J Med Sci**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.
- BATISTA, D. da C. et al. Manejo integrado de *Lasioidiplodia theobromae* em videira no Submédio do Vale do São Francisco. **Embrapa Semiárido-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2010.
- BURGESS, Treena I. et al. Three new *Lasioidiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.
- CANDIANO, Giovanni et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.
- CASTRO, Ricardo Dias de et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. 2010.
- CLARK, Eliana De Bernardez. Protein refolding for industrial processes. **Current opinion in biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 202-207, 2001.
- CLSI, CaLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi; Approved Standard—Second Edition—Document M38-A2. 2008.
- COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003.
- COSTA, Sofia et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 63, 2014.
- DE FREITAS, Cleverson Diniz Teixeira et al. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 738-743, 2011a.
- DE FREITAS, Cleverson Diniz Teixeira 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, 2011b.

DE OLIVEIRA, Maria Zélia Alencar et al. Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para agricultura baiana. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.

DE SOUSA, Felipe Domingos et al. Frutapin, a lectin from *Artocarpus incisa* (breadfruit): cloning, expression and molecular insights. **Bioscience reports**, v. 37, n. 4, p. BSR20170969, 2017.

FREEDMAN, D. O.; NUTMAN, T. B.; OTTESEN, E. A. Enhanced solubilization of immunoreactive proteins from *Brugia malayi* adult parasites using cetyltrimethylammonium bromide. **Experimental parasitology**, v. 65, n. 2, p. 244-250, 1988.

FREIRE, FFCO et al. Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.

GEORGIU, George; VALAX, Pascal. [3] Isolating inclusion bodies from bacteria. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1999. p. 48-58.

KAUR, Jashandeep; KUMAR, Arbind; KAUR, Jagdeep. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International journal of biological macromolecules**, 2017.

KOTHAVADE, Rajendra J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873-880, 2010.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243-260, 2002.

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

LOPES NETO, Antônio Viana. Atividade fungistática de uma quitinase recombinante do feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.)] contra *Lasiodiplodia theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.), agente causal da resinose do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

MORANDI, Marcelo Augusto Boechat et al. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

NASCIMENTO, Camila Tauane Monteiro do. Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão. 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2016.

NOGUEIRA, Nadia Accioly Pinto. Purificação e Caracterização biológica da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli*. 1999. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

OLIVEIRA, Raquel Sombra Basílio. Expressão heteróloga, caracterização cristalográfica e análise funcional de uma osmotina antifúngica de *Calotropis procera*. 2014. 127p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

RAMOS, Marcio 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, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning, vol. 1-3. **Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York**, 2001.

SARDI, Janaina CO et al. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. **Journal of oral science**, v. 52, n. 2, p. 177-185, 2010.

SINGH, Narendra 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, 1987.

TANDON, Shohba; HOROWITZ, Paul M. Detergent-assisted refolding of guanidinium chloride-denatured rhodanese. The effects of the concentration and type of detergent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 10, p. 4486-4491, 1987.

TZOU, Ywh-Min et al. Expression of truncated tobacco osmotin in *Escherichia coli*: purification and antifungal activity. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 3, p. 539-543, 2011.

ULLAH, Abid et al. Osmotin: A plant defense tool against biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2017.

VIEIRA, Débora B.; CARMONA-RIBEIRO, Ana M. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 760-767, 2006.

VIGERS, Alison J. et al. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Science**, v. 83, n. 2, p. 155-161, 1992.

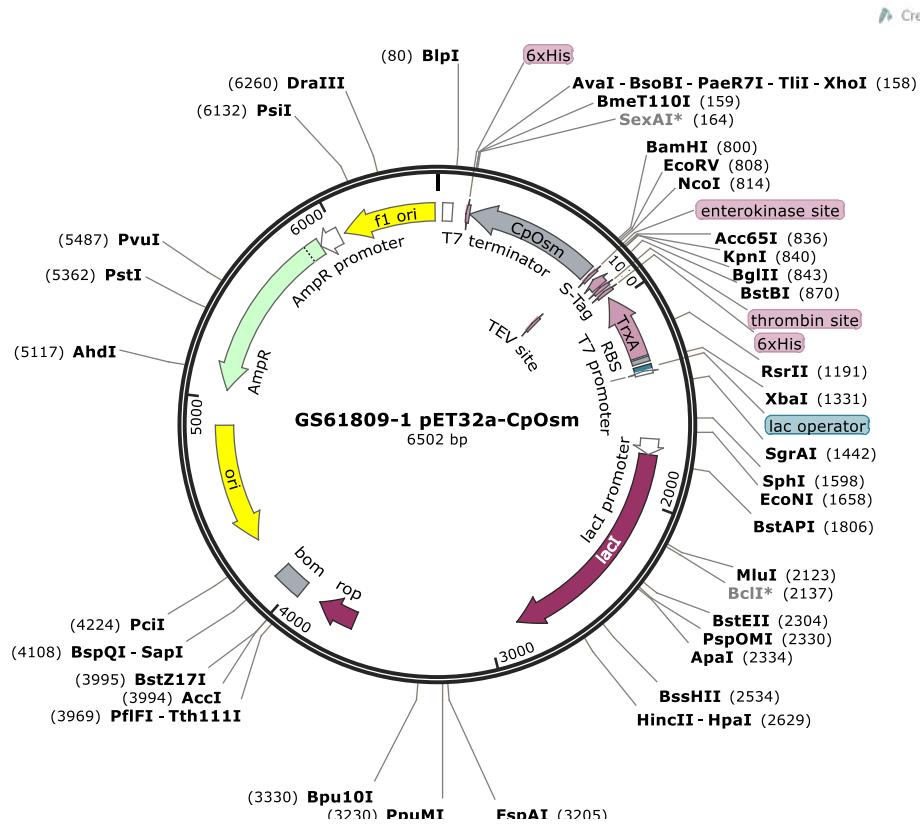
WANG, Jun et al. How CTAB assists the refolding of native and recombinant lysozyme. **Biochemical engineering journal**, v. 24, n. 3, p. 269-277, 2005.

WEEMS JR, J. John. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. **Clinical infectious diseases**, v. 14, n. 3, p. 756-766, 1992.

YADAV, Dinesh 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, 2016.

## ANEXO A - MAPAS PLASMIDIAIS

### a) Mapa do plasmídeo pET 32a-CpOsm

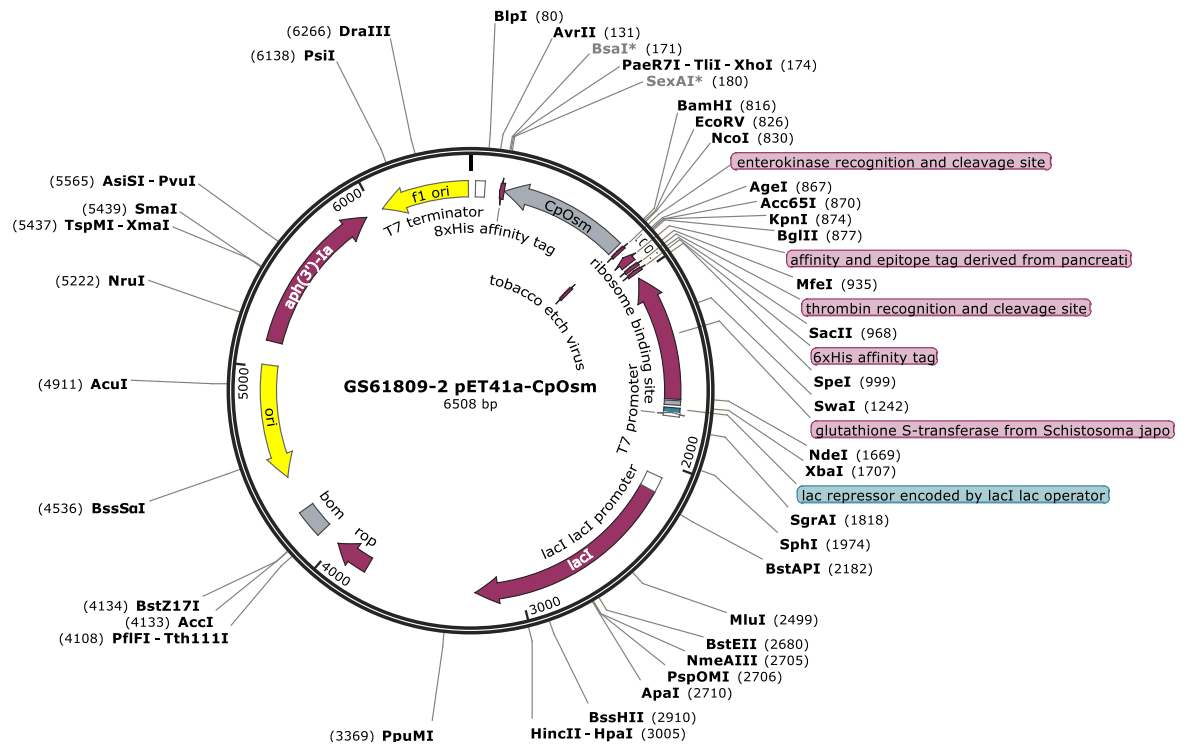


Fonte: GenOne



## b) Mapa do plasmídeo pET 41a-CpOsm

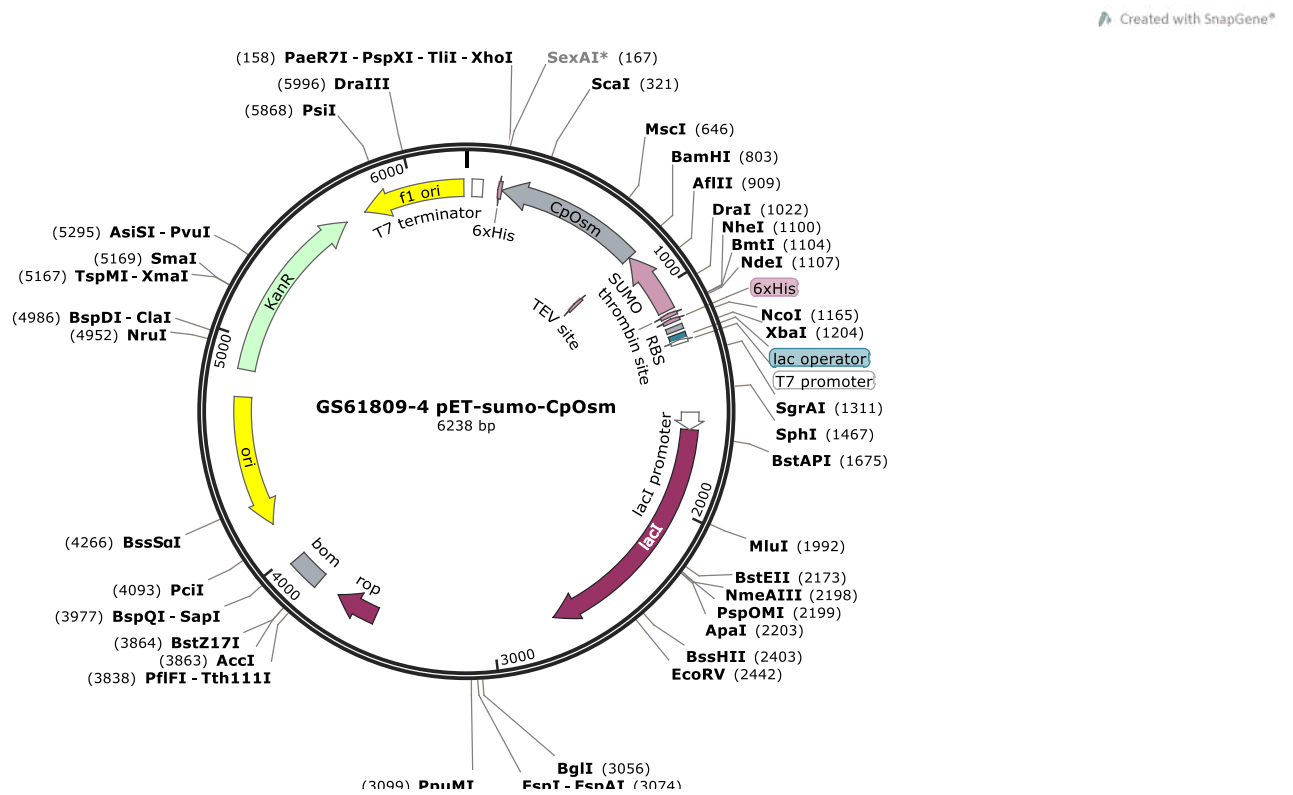
Created with SnapGene®



Fonte: GenOne



### d) Mapa do plasmídeo pET SUMO-CpOsm



Fonte: GenOne

## ANEXO B – SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO TRX-CpOsm, GST-CpOsm, NUS-CpOsm E SUMO-CpOsm

### a) Sequência da proteína de fusão TRX-CpOsm

MSDKIIHLTDDSFDTDLVKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLN  
IDQNPGETAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH  
HHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSENLYFQGATFTIRNN  
CPYTIWAAAVPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTNCNFDGAGRGRQCQTGDCNGV  
LECKGYGQPPNTLAEYALNQFQNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKCRAIRCTADI  
NGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFKERCWDAISYPKDDPTST  
FTCPSGTNYRVIFCPPGLEHHHHHH

### b) Sequência da proteína de fusão GST-CpOsm

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEHLIERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYID  
GDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKV  
DFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK  
KRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDGSTSGSGHHHHHHSAGLVPR  
GSTAIGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTGGGSGDDDDKSPMGYRGSSENLYFQGATFTIRNN  
CPYTIWAAAVPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTNCNFDGAGRGRQCQTGDCNGV  
LECKGYGQPPNTLAEYALNQFQNLDFFDISLVDGFNVPMEFSPVSGSGDKCRAIRCTADI  
NGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFKERCWDAISYPKDDPTST  
FTCPSGTNYRVIFCPPGLEHHHHHHHH

### c) Sequência da proteína de fusão NUS-CpOsm

MNKEILAVVEAVSNEKALPREKIFEALASALATATKKKYEQEIDVRVQIDRKSGDFDFTFR  
RWLVVDEVDTQPTKEITLEAARYEDESINLGDYVEDQIESVTFDRITTQTAKQVIVQKVRE  
AERAMVVDQFREHEGEIITGVVKKVNRDNISLDLGNNAEAVILREDMLPRENFRPGDRVR  
GVLYSVRPEARQAQLFVTRSKPEMLIELFRIEVP EIGEEVIEIKAAARDPGSRKIAVKT  
NDKRIDPVGACVGMRGARVQAVSTELGGERIDIVLWDDNPAQFVINAMAPADVASIVVDE  
DKHTMDIAVEAGNLAQAIGRNGQNVRLASQLSGWELNVMVTVDLQAKHQAEAHAAIDTFT  
KYLDIDEDFATVLVEEGFSTLEELAYVPMKELLEIEGLDEPTVEALRERAKNALATIAQA  
QEESLGDNKPADDLLNLEGVDRDLAFKLAARGVCTLEDLAEQGIDDLADIEGLTDEKAGA  
LIMAARNICWFGDEATSGSGHHHHHHSAGKETAAAKFERQHMDSPPTGLVPRGSAGSGT  
IDDDDKSPGARGSENLYFQGATFTIRNNCPYTIWAAAVPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTA  
GARIWPRTNCNFDGAGRGRQCQTGDCNGVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFQNLDFFDISLV  
DGFNVPMEFSPVSGSGDKCRAIRCTADINGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGS  
CGPTTYSRFFKERCWDAISYPKDDPTSTFTCPSGTNYRVIFCPPGLEHHHHHH

### d) Sequência da proteína de fusão SUMO-CpOsm

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFF  
KIKKTTPLRLMEAFKRQKGEMDSLRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIEAHREQIG  
GSENLYFQGATFTIRNNCPYTIWAAAVPGGGRRRLNSGQTWTINVAPGTAGARIWPRTNCN  
FDGAGRGRQCQTGDCNGVLECKGYGQPPNTLAEYALNQFQNLDFFDISLVDGFNVPMEFSP  
VSGSGDKCRAIRCTADINGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTDKYCCNSGSCGPTTYSRFFK  
ERCWDAISYPKDDPTSTFTCPSGTNYRVIFCPPG

Fonte: GenOne

## ANEXO C – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE TRX-CpOsm OBTIDOS ATRAVÉS DA FERRAMENTA ProtParam

ProtParam

User-provided sequence:

```

          10          20          30          40          50          60
SDKIIHLTDD SFDTDVLKAD GAILVDFWAE WCGPCKMIAP ILDEIADEYQ GKLTVAKLNI

          70          80          90         100         110         120
DQNPGTAPKY GIRGIPTLLL FKNGEVAATK VGALSKGQLK EFLDANLAGS GSGHMHMHHHH

          130         140         150         160         170         180
HSSGLVPRGS GMKETAAAKF ERQHMDSPDL GTDDDDKAMA DIGSENLYFQ GATFTIRNNC

          190         200         210         220         230         240
PYTIWAAAVP GGGRRRLNSGQ TWTINVAPGT AGARIWPRTN CNFDGAGRGR CQTGDCNGVL

          250         260         270         280         290         300
ECKGYGQPPN TLAEYALNQF QNLDDFFDISL VDGFNVPMEF SPVSGSGDKC RAIRCTADIN

          310         320         330         340         350         360
GQCPNELRAP GGCNNPCTVF KTDKYCCNSG SCGPTTYSRF FKERCWDAYS YPKDDPTSTF

          370         380
TCPSGTNYRV IFCPPGLEHH HHHH
--

```

Number of amino acids: 384

Molecular weight: 41750.69

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	7.6%
Cys (C)	18	4.7%
Gln (Q)	11	2.9%
Glu (E)	14	3.6%
Gly (G)	41	10.7%
His (H)	15	3.9%
Ile (I)	18	4.7%
Leu (L)	24	6.2%
Lys (K)	19	4.9%
Met (M)	6	1.6%
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	1824
Hydrogen	H	2776
Nitrogen	N	520
Oxygen	O	562
Sulfur	S	24

Formula: C1824H2776N520O562S24

Total number of atoms: 5706

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient      50515

Abs 0.1% (=1 g/l)    1.210, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient      49390

Abs 0.1% (=1 g/l)    1.183, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is S (Ser).

The estimated half-life is: 1.9 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 20.44

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 61.30

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.458

**Fonte: ProtParam**