

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA

THAÍS BARBONI ALVES

PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS SECRETADAS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DO GÊNERO *Aspergillus*

ARARAQUARA
2017

THAÍS BARBONI ALVES

PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS SECRETADAS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DO GÊNERO *Aspergillus*

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

A474p Alves, Thaís Barboni
 Prospecção de proteínas bioativas secretadas por fungos
 filamentosos do gênero *Aspergillus* / Thaís Barboni Alves. –
 Araraquara : [s.n.], 2017
 172 f. : il.

 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

 1. *Aspergillus*. 2. Enzimas. 3. Fungos filamentosos.
 4. Proteínas. 5. Cromatografia de troca iônica. I. Título.

THAÍS BARBONI ALVES

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 14 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



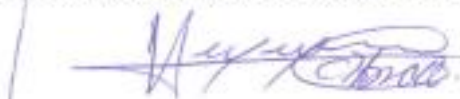
Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Orientador)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP



Profª Drª Ariela Veloso de Paula
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª Rosimeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Hamilton Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto - SP



Profª Drª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Thaís Barboni Alves

Nome em citações bibliográficas: Alves, T. B.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Instituto de Química, IQ, Unesp, Araraquara

Avenida Professor Francisco Degni, nº 55 – Jardim Quitandinha, Araraquara, SP,
14800-900

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- **2013. Doutorado em Biotecnologia (em adamento)**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Prospecção de peptídeos/proteínas bioativas secretados por fungos
filamentosos do gênero *Aspergillus*

Orientador: Luis Henrique de Souza Guimarães

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia
Aplicada / Especialidade: Microbiologia Industrial e de Fermentação.

- **2011-2013. Mestrado em Biotecnologia**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Clonagem de Oxidoesqualeno Ciclases de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex
Reissek.

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.

Coorientadora: Tatiana Maria de Souza Moreira.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

- **2008-2010. Graduação em Biotecnologia**

Graduação em Superior de Tecnologia em Biotecnologia.

Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Brasil.

Título: Detecção e caracterização molecular de hemoplasmas em cães na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo.

Orientador: Mozart Marins.

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2016. Entrepreneursip. (Carga horária: 3h) SINPOSPq, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, USP, Brasil.

2016. Bioinformatics. (Carga horária: 3h) SINPOSPq, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, USP, Brasil.

2012. Metabolomics applied to biotechnological products. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Ilhéus, Brasil.

2010. Utilização de *B. thuringiensis* no controle de pragas. (Carga horária: 10h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal, Brasil.

2010. VI Curso de Inverno de Genética. (Carga horária 40h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal, Brasil.

2010. I Curso de Biossegurança: Condutas e Riscos. (Carga horária: 16h). Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Brasil.

2010. Curso de Limpeza e Manutenção de Micropipetas tipo Eppendorf. (Carga horária: 3h). Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Brasil.

2009. Curso de Inverno de Bioinformática. (Carga horária: 33h). Universidade de São Paulo.

2008. Vacinas de DNA e suas aplicações. (Carga horária: 3h). Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2013 – Atual. Doutoranda em Biotecnologia no Instituto de Química, UNESP. Desenvolvendo projeto de pesquisa sobre a prospecção de proteínas bioativas secretadas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*.

08/2015 – 12/2015. Estágio docência na disciplina de Biotecnologia do curso Farmácia-Bioquímica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara.

08/2015 – 12/2015. Estágio docência na disciplina de Biologia Molecular do curso Farmácia-Bioquímica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara.

2011 – 2013. Mestranda em Biotecnologia no Instituto de Química, UNESP. Desenvolvendo projeto de pesquisa sobre a clonagem de oxidoesqualeno ciclases de *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek

2009 – 2010. Iniciação científica na Unidade de Biotecnologia da UNAERP. Desenvolvendo projeto de pesquisa sobre detecção e caracterização molecular de hemoplasmas em cães na cidade de Ribeirão Preto.

2008 – 2009. Iniciação científica na Unidade de Biotecnologia da UNAERP. Desenvolvendo projeto sobre a produção de ácido jasmônico e jasmonatos pelo fungo filamentoso *Botryosphaeria rhodina*.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. SOUZA-MOREIRA, T. M.; **ALVES, T. B.**; PINHEIRO, K. A.; FELIPPE, L. G.; DE LIMA, G. M. A.; WATANABE, T. F.; BARBOSA, C. C.; SANTOS, V. A. F. F. M.; LOPES, N. P.; VALENTINI, S. R.; GUIDO, R. V. C.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. Friedelin Synthase from *Maytenus ilicifolia*: Leucine 482 Plays an Essential Role in the Production of the Most Rearranged Pentacyclic Triterpene. Scientific Reports, v. 6, p. 36858, 2016.
2. **ALVES, T. B.** ; FAGGION, S. A. ; SANTOS, E. V. ; ROBERTO, PATRICIA GARNICA ; FRANÇA, SUZELEI C. ; FACHIN, A. L. ; MARINS, M. Real-time PCR-based study of hemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. Archivos de Medicina Veterinaria (Impressa), v. 46, p. 333-336, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

1. **ALVES, T.B.**; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Production and characterization of chitinase from *Aspergillus niveus*. 46^a Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, 2017. (Trabalho)
2. **ALVES, T.B.**; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Ribotoxins secreted by filamentous fungi *Aspergillus niveus*: biological activity on tumor cells. 46^a Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, 2017. (Trabalho)
3. **ALVES, T. B.**; PARENTE, M. L. F.; SATO, V. S.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of chitinase by *Aspergillus niveus*. In: International Symposium of Graduate and Research, SINPOSPq, 2016, Ribeirão Preto.
4. FERNANDES, M. L. P.; SATO, V. S.; **ALVES, T. B.**; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of β -Fructofuranosidase by fungus *Aspergillus niveus* under Solid-State Fermentation, purification and biochemical characterization. In: 1^o Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2015, Ribeirão Preto.
5. SOUZA-MOREIRA, T.M.; FELIPPE, L.G. ; **ALVES, T.B.** ; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Functional characterization of friedelin synthase

from *Maytenus ilicifolia* in *Saccharomyces cerevisiae*. In: EMBO/EMBL Symposium: Enabling Technologies for Eukaryotic Synthetic Biology, 2015, Heidelberg.

6. SOUZA-MOREIRA, T. M.; **ALVES, T. B.**; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Strategy for cloning of oxidosqualene cyclases from *Maytenus ilicifolia*. In: FEBS Congress, 2012, Sevilha. FEBS Journal, 2012. v. 279. p. 83.
7. SOUZA-MOREIRA, T. M.; **ALVES, T. B.**; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Synthetic biology for the production of terpenoid. In: 3º BCNP Brazilian Conference on Natural Products, 2012, Ouro Preto.
8. **ALVES, T. B.**; SOUZA-MOREIRA, T. M.; VALENTINI, S. R.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. Cloning of oxidosqualene cyclases from *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2012, Ilhéus.
9. SOUZA-MOREIRA, T. M.; MAVEDO, V.A.F.F.; **ALVES, T. B.**; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Susceptibility os *Saccharomyces cerevisiae* to terpenoids from *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2012, Ilhéus.
10. **ALVES, T. B.**; SOUZA-MOREIRA, T. M.; VALENTINI, S. R.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. Strategy for cloning of oxidosqualene cyclases from *Maytenus ilicifolia*. In: Search for new drug targets using molecular and cell biology approaches, 2012, Araraquara.
11. **ALVES, T. B.**; FAGGION, S. A.; FACHIN, A.L.; FRANÇA, S.C; MARINS, M. Detecção de *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* em cães da cidade de Ribeirão Preto com a técnica de PCR em Tempo Real. In: VI Curso de Inverno de Genética, 2010, Jaboticabal.
12. SANTOS, E.V.; **ALVES, T. B.**; CARDOZO, G.P.; FAGGION, S. A.; FRANÇA, S. C.; MARINS, M. A Taqman Real-time PCR assay for detection of *Ehrlichia*

canis and *Babesia canis* in naturally infected dogs. In: Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza.

13. **ALVES, T. B.**; FAGGION, S. A.; FACHIN, A.L.; FRANÇA, S. C.; MARINS, M. Application of real time PCR technique for routine detection of canine hemoplasmas. In: Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza.
14. **ALVES, T. B.**; FAGGION, S. A.; FRANÇA, S. C.; MARINS, M. Identificação de *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* em cães na cidade de Ribeirão Preto. In: 11º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Unaerp, 2010, Ribeirão Preto.
15. JACOBINO, K.L.; **ALVES, T. B.**; FRANÇA, S. C.; FACHIN, A.L.; MARINS, M. Detecção e caracterização molecular de hemoplasmas em gatos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. In: 11º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Unaerp, 2010, Ribeirão Preto.
16. FAGGION, S. A.; **ALVES, T. B.** Monitoramento da Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães no período de junho a setembro de 2009 na cidade de Ribeirão Preto. In: 10º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto, 2009, Ribeirão Preto.
17. HERNANDES, C.; **ALVES, T. B.**; PEREIRA, S.I.V; FRANÇA, S.C; LOURENÇO, M.V. Bioengenharia da Vinhaça e Produção de Ácido Jasmônico por *Botryosphaeria rhodina*. In: 10º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto, 2009, Ribeirão Preto.

Apresentações de trabalhos e/ou palestras

1. **ALVES, T.B.**; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Production and characterization of chitinase from *Aspergillus niveus*. 46ª Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, 2017. (Trabalho)

2. **ALVES, T.B.**; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Ribotoxins secreted by filamentous fungi *Aspergillus niveus*: biological activity on tumor cells. 46^a Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, 2017. (Trabalho)
3. **ALVES, T.B.** Proteínas bioativas secretadas por *Aspergillus niveus*. Seminário Geral da Biotecnologia, Instituto de Química UNESP, 2016, Araraquara. (Palestra)
4. **ALVES, T.B.**; PARENTE, M.L.F.; SATO, V.S.; JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L.H.S. Production of chitinase by *Aspergillus niveus*. In: International Symposium of Graduate and Research, SINPOSPq, 2016, Ribeirão Preto. (Trabalho)
5. **ALVES, T. B.**; SOUZA-MOREIRA, T. M.; VALENTINI, S. R.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. Cloning of oxidosqualene cyclases from *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2012, Ilhéus. (Trabalho)
6. **ALVES, T. B.**; SOUZA-MOREIRA, T. M.; VALENTINI, S. R.; FURLAN, M.; ZANELLI, C. F. Strategy for cloning of oxidosqualene cyclases from *Maytenus ilicifolia*. In: Search for new drug targets using molecular and cell biology approaches, 2012, Araraquara. (Trabalho)
7. **ALVES, T. B.**; FAGGION, S. A.; FACHIN, A.L.; FRANÇA, S.C; MARINS, M. Detecção de *Mycoplasma haemocanis* e Candidatus *Mycoplasma haematoparvum* em cães da cidade de Ribeirão Preto com a técnica de PCR em Tempo Real. In: VI Curso de Inverno de Genética, 2010, Jaboticabal. (Trabalho)
8. **ALVES, T. B.**; FAGGION, S. A.; FACHIN, A.L.; FRANÇA, S. C.; MARINS, M. Application of real time PCR technique for routine detection of canine hemoplasmas. In: Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza.
9. **ALVES, T. B.**; FAGGION, S. A.; FRANÇA, S. C.; MARINS, M. Identificação de *Mycoplasma haemocanis* e Candidatus *Mycoplasma haematoparvum* em cães

na cidade de Ribeirão Preto. In: Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Unaerp, 2010, Ribeirão Preto. (Trabalho)

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

ZANELLI, C. F.; WATANABE, T.F.; **ALVES, T.B.** Participação em banca de Cristina Carvalho Barbosa. Clonagem de genes de oxidoesqualeno ciclases das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek. 2015. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. 46ª Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia. 2017. (Congresso).
2. International Symposium of Graduate and Research, SINPOSPq, Ribeirão Preto. 2016. (Simpósio).
3. VI Seminário sobre rotas tecnológicas da biotecnologia: oportunidades de investimentos e inovações no Brasil, Ribeirão Preto. 2015. (Encontro)
4. VIII Mostra da Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto. 2013. (Encontro).
5. Search for new drug targets using molecular and cell biology approaches, Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, Araraquara. 2012. (Simpósio).
6. Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Ilhéus. 2012. (Simpósio).
7. 11º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da UNAERP, Ribeirão Preto. 2010. (Congresso).
8. 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, Fortaleza. 2010. (Congresso).

9. I Curso de Biossegurança: Condutas e Riscos, UNAERP. 2010. (Encontro).
10. I Curso de Limpeza e Manutenção de Micropipetas do tipo Eppendorf, UNAERP, Ribeirão Preto. 2010. (Encontro).
11. 4ª Semana de Palestras da Biotecnologia UNAERP, Ribeirão Preto. 2010. (Encontro).
12. Product show, teórico e prático de PCR em Tempo Real "Análise de expressão gênica e mutação pontual por PCR em Tempo Real", Ribeirão Preto. 2010.
13. VI Curso de Inverno de Genética, Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP), Unesp/FCAV, Jaboticabal. 2010. (Outra).
14. IV Seminário sobre rotas tecnológicas da biotecnologia: oportunidades de investimentos e inovações no Brasil, Ribeirão Preto. 2009. (Encontro)
15. 10º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Unaerp, Ribeirão Preto. 2009. (Congresso).
16. III Curso de Inverno de Bioinformática da Faculdade de Medicina da USP Ribeirão Preto. 2009. (Outra).
17. 3ª Semana de Palestras da Biotecnologia, UNAERP, Ribeirão Preto. 2009. (Encontro).
18. II Congresso de Bioética de Ribeirão Preto. 2008. (Congresso).
19. 2ª Semana de Palestras da Biotecnologia, UNAERP, Ribeirão Preto. 2008. (Encontro).

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Valéria e Cleber,
A minha irmã Letícia*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida! Pela força, proteção, fé e luz para enfrentar todos os desafios da caminhada.

À minha mãe, Valéria, razão do meu viver, meu porto seguro. Agradeço a Deus por tê-la em minha vida! Obrigada por tudo que fez e faz por mim, obrigada por ser essa mãe e amiga maravilhosa e por estar comigo em todos os momentos. Amo você infinitamente!

À meu pai, Cleber (*in memoriam*), por seu exemplo de alegria com a vida e por ter sido um pai maravilhoso. Agradeço a Deus por ser meu pai e pelo tempo que estivemos juntos neste plano. A saudade é enorme! Amo você infinitamente!

À minha irmã, Letícia, minha razão de viver, minha companheira e amiga de todos os momentos. Minha linda, sua alegria de viver é contagiante. Obrigada por ser minha irmã! Amo você infinitamente!

Àos meus avós, Maria do Carmo e Antônio (*in memoriam*). A saudade é grande! Obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo de humildade, generosidade e pela sabedoria.

À minha avó, Maria Aparecida, a vó mais doidinha do mundo e também exemplo de fé, humildade e generosidade.

À Luiz Guilherme, pessoa maravilhosa! Obrigada pelo amor, amizade, pelo companheirismo, atenção e dedicação. Obrigada por tudo! Amo você infinitamente!

Aos meus padrinhos, Ana e Cecílio, pelo auxílio, incentivo, carinho e pela torcida, por estarem sempre junto de mim.

À Rosângela e Antônio, por toda ajuda e incentivo. Muito obrigada!

Aos cunhados Adailton, Ana e Mauro e suas famílias por toda ajuda e torcida. Muito obrigada!

À toda minha família, tias e tios, primos e primas. Tantas pessoas especiais. Vocês são demais!

Aos amigos do laboratório, Maysa, Rayza, Pedro, Chadia, Larissa, Fernanda e Isabela. Melhor presente deste laboratório. Obrigada pelo companheirismo, pelas conversas, brincadeiras e sobremesas, claro!

A Prof. Dr. Luís Henrique, pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos e orientação. Muito obrigada!

Ao técnico Maurício, pelo auxílio e suporte no laboratório durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. João Atílio, pela atenção e disposição para ajudar sempre. Pelos conselhos científicos. Grande exemplo de dedicação a ciência e a docência.

À Prof.^a Maria de Lourdes, pela disponibilização de parte de sua estrutura laboratorial para a realização deste projeto.

À Prof.^a Rosemeire, pela atenção e boa vontade. Pelo estágio docência e pela colaboração com os ensaios antimicrobianos. Por sempre estar disponível para ajudar.

À doutoranda Vanessa e ao técnico Rodrigo, pelo auxílio com os ensaios antimicrobianos.

Ao Prof. Hamilton e a técnica Natália, pela ajuda com a concentração e liofilização de amostras.

Aos Professores Arthur e Ricardo pela ajuda com o sequenciamento de proteínas.

A Prof.^a Maria Sol e a mestranda Gabriela Molinari, pela ajuda e colaboração para realização dos ensaios de proliferação celular.

A Glaucia, pelo auxílio assim que cheguei no laboratório. Esse trabalho não teria começado sem você.

Aos amigos do laboratório Vanessa, Gabriela, Cynthia, Larissa, Josana, José, Paulo, Paula, Marita e Rosi por terem me recebido tão bem no laboratório e pelo companheirismo, pela ajuda científica e técnica em muitos momentos.

À todos os professores já passaram pelo meu caminho, pelas disciplinas e conhecimentos científicos. Aos meus professores da graduação e meus professores da pós-graduação. Aprendi muito com vocês.

Aos funcionários da USP e do Instituto de Química da UNESP, especialmente, a Wennia e ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, pela disposição em ajudar.

À todos os Brasileiros, que direta ou indiretamente, através dos seus impostos contribuíram para a realização deste projeto.

À CAPES e aos Brasileiros pela bolsa de doutorado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto,
Muito obrigada!



***Nunca é fácil, mas também não é impossível.
Aproveitar o caminho pode ser uma grande aventura.
(Autor desconhecido)***

RESUMO

Produtos naturais bioativos podem ser produzidos por organismos de todos os reinos, de procariotos a eucariotos. Entre esses, os fungos filamentosos são fontes abundantes de diversos metabólitos, como proteínas e enzimas, as quais vêm se destacando devido as suas diversas atividades biológicas, com aplicações não só na área farmacêutica e médica como também, nas indústrias alimentícia, de materiais e na agricultura. Recentemente, a resistência microbiana frente aos antibióticos disponíveis no mercado e o aparecimento de linhagens tumorais cada vez mais agressivas, torna urgente a investigação por novas moléculas bioativas, especialmente aquelas com baixa ou nenhuma toxicidade contra as células de mamíferos. Devido ao grande potencial das proteínas fúngicas, como promissoras moléculas com aplicações biotecnológicas, o objetivo deste projeto foi realizar a prospecção de proteínas bioativas secretadas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Entre as diferentes espécies estudadas, *Aspergillus niveus* cultivado em fermentação submersa (FSbm), em meio YPD por 120 h, foi capaz de secretar uma proteína com massa molecular de 19 kDa. A proteína foi analisada por espectrometria de massas e os peptídeos identificados apresentaram identidade de 88 a 100% com outras ribotoxinas já descritas na literatura, como α -sarcina, restrictocina e Asp f1. A ribotoxina inibiu a proliferação celular *in vitro* de linhagens tumorais de glioblastoma (até 32%), melanoma (43%), osteossarcoma (41%) e meduloblastoma (50%), em concentrações de 20 μ g/mL e incubação por 72 h. A ribotoxina foi capaz de inibir o crescimento de *A. niger*, mas não o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *T. rubrum* e *A. fumigatus*. O fungo *A. niveus* também foi capaz de secretar quitinases quando cultivado em FSbm, em meio mínimo contendo quitina de casca de camarão como fonte de carbono. A maior produção da quitinase foi obtida com 192 h de cultivo em meio mínimo contendo 1% quitina. A enzima foi purificada por precipitação com sulfato de amônio (80%) e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100). A quitinase foi purificada 1,97 vezes com rendimento de 40%. Apresentou massa molecular de 44 kDa, temperatura e pH ótimos de atividade de 65°C e 5,0, respectivamente, sendo estável a 60°C por até 120 minutos. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram 3,51 mM e 9,68 U/mg de proteína, respectivamente. A quitinase foi capaz de inibir o crescimento de *A. niger*, mas não o crescimento de *A. fumigatus*. Desse modo o fungo *A. niveus* apresentou a capacidade produzir ribotoxinas com potencial para diferentes aplicações biotecnológicas como, por exemplo, na construção de imunotoxinas. Adicionalmente, *A. niveus* ainda foi capaz de secretar uma quitinase com potencial de aplicação no tratamento de resíduos da indústria pesqueira, na produção de derivados da quitina e no controle de fungos e larvas patogênicas de plantas.

Palavras-chave: *Aspergillus*; Proteínas Fúngicas; Quitinases; Ribotoxinas; Ribonucleases.

ABSTRACT

Natural products can be produced by organisms from all kingdoms, from prokaryotes to eukaryotes. Among these, filamentous fungi are abundant sources of various metabolites, such as proteins and enzymes, which have been outstanding due to their diverse biological activities, with applications not only in the pharmaceutical and medical areas but also in the materials and food industries and in agriculture. Recently, microbial resistance to available antibiotics and the increasingly of aggressive tumor cell lines, makes urgent the investigation of new bioactive molecules, especially those with low or without toxicity to mammalian cells. Due to the great potential of fungal proteins, as promising molecules with biotechnological applications, the objective of this project was the prospection of bioactive proteins secreted by filamentous fungi of the genus *Aspergillus*. Among the different species studied, *Aspergillus niveus* cultured under submerged fermentation (Sbmf), in YPD medium for 120 h, was able to secrete a protein with molecular mass of 19 kDa. The protein was analyzed by mass spectrometry and the peptides identified showed 88 to 100% of identity with other ribotoxins described in the literature, such as α -sarcin, restrictocin and Asp f1. The ribotoxin inhibited, *in vitro*, the cell proliferation of glioblastoma tumor cell line (up to 32%), melanoma (43%), osteosarcoma (41%) and medulloblastoma (50%) at concentration of 20 μ g / mL and incubation for 72 h. The ribotoxin was able to inhibit *A. niger* growth and did not inhibit the growth of *S. aureus*, *E. coli*, *T. rubrum* and *A. fumigatus*. The fungus *A. niveus* was also able to secrete chitinases when cultured under Sbmf in minimal medium containing chitin from crab shells as carbon source. The best period for the enzymatic production was 192 h using minimal medium containing 1% chitin. The enzyme was purified by 80% ammonium sulfate precipitation and molecular exclusion chromatography (Sephadex G-100). The chitinase was purified 1.97-fold with yield of 40%. Showed molecular mass of 44 kDa, optimum temperature and pH of activity at 65 °C and 5.0, respectively, being stable at 60 °C for up to 120 minutes. The values of K_m and V_{max} were 3.51 mM and 9.68 U/mg of protein, respectively. The enzyme was able to inhibit the *A. niger* growth, but it was not able to inhibit the *A. fumigatus* growth. Thus, the fungus *A. niveus* showed the ability to produce ribotoxins with potential for different biotechnological applications, such as in the construction of immunotoxins, in the production of recombinant allergens, in biological control and in the study of ribosomopathies. Moreover, the filamentous fungus *A. niveus* was able to secrete a chitinase with potential of application in the treatment of waste of the fishing industry, in the production of chitin derivatives and in the control of fungi and larvae pathogenic of plants.

Key Words: *Aspergillus*; Fungal Proteins; Chitinases; Ribotoxins; Ribonucleases.

ABREVIATURAS

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute	TCA – ácido tricloroacético
DNA – ácido desoxirribonucleico	µg – micrograma
D.O. – densidade óptica	µL – microlitros
DTT – ditionitrito	UV – ultravioleta
EDTA – ácido etileno diamino tetracético	V – volts
g – grama	V _{máx} – velocidade máxima
<i>g</i> – força centrífuga	YPD – Yeast Peptona Dextrose”
HCl – ácido clorídrico	°C – graus Celsius
K _m – constante de Michaelis-Menten	
L – litros	
M – molar	
MM – Meio Mínimo	
M5 – meio de cultivo	
mg – miligrama	
mmol.L ⁻¹ – milimolar	
min – minutos	
n – coeficiente de Hill	
ng – nanograma	
NCBI – <i>National Center for Biotechnology Information</i>	
OMS - Organização Mundial da Saúde	
pb – pares de base	
pH – potencial hidrogeniônico	
RNA – ácido ribonucleico	
rRNA – RNA ribossômico	
rpm – rotações por minuto	
s – segundo	
SDS – dodecil sulfato de sódio	
SR – Segato Rizzatti	
SRL – alça sarcina ricina	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional da ribotoxina α -sarcina produzida por <i>Aspergillus giganteus</i>	33
Figura 2 - O alvo das ribotoxinas: o ribossomo.	36
Figura 3 - Estrutura da SRL.....	37
Figura 4 - Estrutura tridimensional da RNase T1 e das ribotoxinas mais representativas.....	39
Figura 5 - Reprodução de <i>Aspergillus</i> e possível localização das ribotoxinas.....	43
Figura 6 - Ribotoxinas como agentes imunoterapêuticos.....	47
Figura 7 - Biogênese dos ribossomos. As ribotoxinas poderiam ter acesso ao núcleo? Seriam capazes de clivar a SRL nos pré-RNAs 60S?	51
Figura 8 - Estrutura química da molécula de quitina	52
Figura 9 - Estruturas polimórficas de quitina: α -quitina, β -quitina e γ -quitina.	53
Figura 10 - Estrutura química da molécula de quitosana obtida a partir da desacetilação da quitina.....	54
Figura 11 - Hidrólise da quitina pela quitinase.....	55
Figura 12 - Quitinases e seus produtos gerados a partir da hidrólise da quitina	58
Figura 13 - Estrutura de quitinases fúngicas da família 18.....	59
Figura 14 - Componentes da parede celular de fungos.....	62
Figura 15 - Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho	72
Figura 16 - Concentração de proteínas nos filtrados brutos dos cultivos de linhagens de <i>Aspergillus</i> em meio YPD em função do tempo de fermentação.	94
Figura 17 - Perfil protéico obtido por eletroforese em condição desnaturante das proteínas secretadas pelas diferentes espécies de <i>Aspergillus</i>	95
Figura 18 - Análise de perfil proteico para filtrados extracelulares de <i>A. niveus</i> obtidos em diferentes meios de cultivos nos períodos de 120 h e 240 h	97
Figura 19 - Purificação de proteínas secretadas por <i>A. niveus</i> em meio YPD	98
Figura 20 - Alinhamento dos peptídeos identificados neste trabalho com as ribotoxinas α -sarcina, restrictocina e Asp f1.....	102
Figura 21 - Avaliação da atividade antimicrobiana das ribotoxinas secretadas por <i>A. niveus</i> frente a <i>A. niger</i> e <i>A. fumigatus</i>	105
Figura 22 - Efeito do filtrado extracelular de <i>A. niveus</i> em meio YPD por 120 h na proliferação celular frente a linhagens celulares tumorais.....	107

Figura 23 - Efeito do pool I obtido da cromatografia em DEAE-Celulose na proliferação celular frente a linhagens celulares tumorais.....	109
Figura 24 - Efeito do filtrado extracelular de <i>A. niveus</i> em meio M5 por 120 h na proliferação celular frente a linhagens celulares tumorais.....	111
Figura 25 - Atividade quitinásica específica de <i>Aspergillus</i> em diferentes meios de cultivo	116
Figura 26 - Análise do perfil protéico dos filtrados de <i>A. niveus</i> cultivado em diferentes meios	119
Figura 27 - Influência das diferentes concentrações de quitina em função do tempo de cultivo na produção de quitinases por <i>A. niveus</i> em meio mínimo	120
Figura 28 - Perfil de proteínas obtido para espécie <i>A. niveus</i> cultivada em meio ímimo por diferentes períodos.....	122
Figura 29 - Sequência de aminoácidos da quitinase produzida por <i>A. fumigatus</i> utilizada como base para identificação da quitinase secretada por <i>A. niveus</i>	123
Figura 30 - Purificação da quitinase de <i>A. niveus</i> em DEAE-Celulose.....	125
Figura 31 - Purificação da quitinase de <i>A. niveus</i> em Sephadex 100.....	127
Figura 32 - Perfil proteico em SDS-PAGE 12 % do filtrado extracelular de <i>A. niveus</i> após precipitação com sulfato de amônio	129
Figura 33 - Purificação de quitinases de <i>A. niveus</i> por Sephadex G-100 após precipitação com sulfato de amônio 80%	130
Figura 34 - Determinação da temperatura ótima (A) e pH ótimo (B) de atividade para a quitinase purificada de <i>A. niveus</i>	133
Figura 35 - Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH da quitinase purificada de <i>A. niveus</i>	134
Figura 36 - Gráfico sigmoide gerado através do programa SigrafW® a partir dos parâmetros cinéticos da quitinase purificada de <i>A. niveus</i>	139
Figura 37 - Avaliação da atividade antifúngica da quitinase de <i>Aspergillus niveus</i> frente a <i>A. niger</i> e <i>A. fumigatus</i>	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise por espectrometria de massas das proteínas presentes nos picos I, II e III obtidos da aplicação do filtrado em DEAE-Celulose e da banda proteica presente no filtrado de <i>A. niveus</i> em meio YPD recortada do gel de SDS-PAGE...	100
Tabela 2 - Determinação da CIM e CBM para os filtrados de <i>Aspergillus</i> sp e frações purificadas de <i>A. niveus</i> frente as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	103
Tabela 3 - Valores de CIM e CFM para filtrados de <i>Aspergillus</i> e frações purificadas obtidos frente aos fungos <i>A. nidulans</i> e <i>T. rubrum</i>	104
Tabela 4 - Avaliação da atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar	105
Tabela 5 - Análise por espectrometria de massas da proteína removida do gel de SDS-PAGE.	123
Tabela 6 - Purificação da quitinase produzida por <i>A. niveus</i>	128
Tabela 7 - Purificação da quitinase produzida por <i>A. niveus</i>	131
Tabela 8 - Influência de diferentes compostos sobre a atividade da quitinase secretada por <i>A. niveus</i>	137
Tabela 9 - Avaliação da atividade antifúngica da quitinase produzida por <i>A. niveus</i>	140

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	28
2	Revisão Bibliográfica	31
2.1	Proteínas produzidas por diferentes espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	31
2.2	<i>Aspergillus niveus</i>	32
2.3	Ribotoxinas fúngicas	33
2.3.1	Atividade ribonucleolítica das ribotoxinas fúngicas.....	35
2.3.2	Características estruturais das ribotoxinas	38
2.3.3	Habilidade das ribotoxinas em atravessar membranas e interação com ribossomo.....	40
2.3.4	Ribotoxinas produzidas por fungos e seu possível papel biológico	42
2.3.5	Aplicações biotecnológicas das ribotoxinas.....	46
2.3.5.1	Imunotoxinas	46
2.3.5.2	Papel das ribotoxinas em alergias e infecções causadas por <i>Aspergillus</i>	47
2.3.5.3	Controle biológico utilizando ribotoxinas	48
2.3.5.4	Estudo de doenças relacionadas aos ribossomos	50
2.4	Quitina e quitosana	52
2.5	Quitinases	55
2.5.1	Classificação e estrutura das quitinases produzidas por fungos	56
2.5.2	Quitinases em fungos	61
2.5.3	Aplicações das quitinases	64
2.5.3.1	Controle de fungos fitopatogênicos	64
2.5.3.2	Tratamento de resíduos industriais e produção de derivados da quitina	65
2.5.3.3	Controle de larvas	66
2.5.3.4	Aplicações farmacêuticas/médicas	67
3	OBJETIVOS.....	69
3.1	Objetivo Geral	69
3.2	Objetivos específicos	69
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.1	Linhagens fúngicas utilizadas	73
4.2	Manutenção das cepas em laboratório	73

4.3	Obtenção das culturas de diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> em meio YPD.....	73
4.3.1	Obtenção dos filtrados dos cultivos	73
4.3.2	Quantificação de proteínas totais	74
4.3.3	Análise do perfil proteico por SDS-PAGE.....	74
4.4	Prospecção de proteínas bioativas secretadas por <i>Aspergillus niveus</i> em diferentes meios de cultivo	75
4.4.1	Purificação de proteínas secretadas por <i>Aspergillus niveus</i>	75
4.4.2	Análise de proteínas por espectrometria de massas	76
4.4.2.1	Preparo de proteínas removidas de SDS-PAGE.....	76
4.4.2.2	Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA)	76
4.4.2.3	Digestão das proteínas com tripsina e análise por espectrometria de massas.....	76
4.5	Ensaio antimicrobianos	77
4.5.1	Microrganismos	77
4.5.2	Preparo das amostras	77
4.5.3	Preparo dos antifúngicos	78
4.5.4	Preparo dos antibióticos	78
4.5.5	Atividade antibacteriana	78
4.5.5.1	Preparo do inóculo	79
4.5.5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	79
4.5.6	Atividade antifúngica pela técnica de diluição em microplacas	80
4.5.6.1	Preparo do inóculo	80
4.5.6.2	Determinação da CIM frente a <i>T. rubrum</i> e <i>A. nidulans</i>	81
4.5.7	Atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar	82
4.6	Efeito das ribotoxinas na proliferação celular de linhagens tumorais	82
4.6.1	Linhagens celulares e condições de cultura	82
4.6.2	Preparo das amostras	83
4.6.3	Ensaio de proliferação celular	83
4.6.4	Análise da proliferação celular por coloração com Giemsa	83
4.6.5	Análise Estatística	84
4.7	Prospecção de quitinases produzidas por diferentes espécies de fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	84

4.7.1	Cultivos para produção de quitinases por fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	84
4.7.2	Determinação da atividade quitinásica	85
4.7.3	Influência da concentração de quitina e tempo de cultivo para produção de quitinases por <i>A. niveus</i>	85
4.7.4	Análise do perfil proteico por SDS-PAGE	86
4.7.5	Análise da quitinase por espectrometria de massas.....	86
4.8	Purificação da quitinase secretada por <i>A. niveus</i>	86
4.8.1	Precipitação com sulfato de amônio	87
4.8.2	Purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose).....	87
4.8.3	Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100).....	87
4.9	Caracterização Bioquímica	88
4.9.1	Determinação da massa molecular	88
4.9.2	Determinação da temperatura e pH ótimos de atividade enzimática.....	88
4.9.3	Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH.....	88
4.9.4	Influência de diferentes compostos na atividade quitinásica	89
4.10	Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}).....	89
4.11	Avaliação da atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar	89
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5.1	Quantificação de proteínas totais	93
5.2	Análise do perfil proteico por SDS-PAGE	95
5.3	Prospecção de proteínas bioativas produzidas pelo fungo filamentoso <i>Aspergillus niveus</i>	96
5.4	Purificação de proteínas bioativas secretadas por <i>A. niveus</i>	97
5.5	Análise das proteínas por espectrometria de massas.....	99
5.6	Ensaio antimicrobianos	103
5.6.1	Determinação da concentração inibitória mínima bacteriana (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	103
5.6.2	Determinação da atividade antifúngica pela técnica de diluição em microplaca.....	104
5.6.3	Determinação da atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar.....	104
5.7	Ensaio de proliferação celular pela coloração com Giemsa.....	106

5.8	Produção de quitinases por diferentes espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	115
5.8.1	Análise do perfil proteico nos filtrados de <i>A. niveus</i> em diferentes meios de cultivo	118
5.8.2	Influência da concentração de quitina e do tempo de cultivo para produção de quitinases por <i>A. niveus</i>	119
5.8.3	Análise das quitinases por espectrometria de massas	122
5.9	Purificação da quitinase secretada por <i>A. niveus</i>	124
5.9.1	Cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose).....	124
5.9.2	Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex - G100).....	126
5.9.3	Precipitação com sulfato de amônio 80%.....	128
5.9.4	Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex - G100).....	129
5.10	Caracterização Bioquímica	131
5.10.1	Determinação da massa molecular	131
5.10.2	Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade.....	132
5.10.3	Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH.....	133
5.10.4	Influência de diferentes compostos na atividade quitinásica	135
5.11	Determinação dos parâmetros cinéticos	137
5.12	Avaliação da atividade antifúngica da quitinase de <i>A. niveus</i>	139
6	CONCLUSÕES	142
	REFERÊNCIAS	144
	ANEXOS	169

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A descoberta acidental da penicilina, a partir do fungo filamentoso *Penicillium notatum* por Fleming, em 1929, promoveu uma intensa investigação da natureza como fonte de agentes bioativos. Nessa busca os microrganismos apresentam-se como uma fonte abundante de diversos metabólitos bioativos, os quais originaram alguns dos produtos mais importantes da indústria farmacêutica, como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossupressores, antitumorais, inibidores enzimáticos, hipocolesterolêmicos, antiparasitários, entre outros (HASSAN et al., 2012).

O rápido aparecimento de microrganismos patogênicos e células tumorais resistentes aos fármacos disponíveis no mercado tem sido um dos maiores problemas de saúde da população, gerando a necessidade de uma intensa investigação por novas moléculas antimicrobianas e antitumorais. Além disso, drogas utilizadas nos tratamentos clínicos apresentam alta toxicidade e, portanto, diversos efeitos colaterais, o que torna necessária a busca por novas moléculas que sejam mais eficazes e não apresentem toxicidade contra as células de mamíferos, eliminando ou reduzindo efeitos colaterais (MARX, 2004).

O interesse por novos agentes antimicrobianos não se restringe somente à área farmacêutica, mas também a área de alimentos, na qual a utilização de proteínas antimicrobianas produzidas por microrganismos tem se apresentado como uma alternativa para a preservação de alimentos como, por exemplo, as bacteriocinas (SHULZ et al., 2003). Outras aplicações incluem a utilização dessas moléculas para impedir a colonização e o crescimento de microrganismos em materiais poliméricos sintéticos, tais como os cateteres intravenosos de uso médico como, por exemplo, o peptídeo antimicrobiano maiganina (ZASLOFF, 2002). Além disso, diversas proteínas isoladas de microrganismos apresentam-se ainda como potentes inibidoras de microrganismos patogênicos de plantas, sendo de especial interesse para aplicações na agricultura como, por exemplo, as quitinases (HEGEDÜS; MARX, 2012; THEIS et al., 2005).

Atualmente, proteínas com ações biológicas (antimicrobiana, antitumoral, inseticida e larvicida, entre outras) têm sido isoladas a partir de uma ampla variedade de organismos como plantas, insetos, algas, bactérias e fungos (PETERS et al., 2010). Entre essas proteínas estão as ribotoxinas e quitinases, as quais vêm sendo identificadas e isoladas especialmente a partir de fungos. Os fungos filamentosos

destacam-se na produção de biomoléculas, uma vez que apresentam habilidades únicas para, economicamente, produzir e secretar diferentes tipos de produtos e crescer em uma ampla variedade de substratos de baixo custo (GUIMARÃES et al., 2006). Além disso, os fungos filamentosos, especialmente algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, têm um longo histórico de uso nas indústrias de alimentos e bebidas, e são geralmente reconhecidos como organismos seguros (SCHUSTER et al., 2002). Portanto, neste trabalho utilizamos diferentes espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* para prospecção de proteínas bioativas como as ribotoxinas e quitinases, uma vez que apresentam atividades biológicas (por exemplo, antitumoral ou antimicrobianas) com uma ampla possibilidade de aplicações biotecnológicas que vão desde a área farmacêutica e de pesquisa até na agricultura.

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas produzidas por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*

Fungos do gênero *Aspergillus* constituem um grupo complexo composto por cerca de 250 espécies, sendo relatado pela primeira vez em 1729, por Pier Antonio Micheli (GEISER et al., 2007). O gênero *Aspergillus* é considerado cosmopolita e amplamente distribuído na natureza, sendo facilmente encontrado no solo e em folhas secas, apresentando maior prevalência nas regiões tropicais e subtropicais.

O gênero *Aspergillus* inclui desde espécies patogênicas para animais e/ou plantas (por exemplo *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*), até espécies com importantes aplicações industriais (por exemplo *A. oryzae*, *A. niger*, *A. terreus*) (SHUSTHER et al., 2002). As espécies desse gênero se destacam de outros microrganismos (bactérias e leveduras) devido a sua habilidade em tolerar condições extremas de cultivo, podendo ser cultivados em uma ampla faixa de temperatura, pH, salinidade, em condições oligotróficas ou ricas em nutrientes (MEYER et al., 2011). Uma das características mais interessantes dos *Aspergillus* é sua capacidade de degradar diversos polímeros como amido, celulose, quitina, pectina, xilana, entre outros, permitindo que eles sejam cultivados em recursos renováveis como, por exemplo, em resíduos industriais (MEYER et al., 2011).

Enquanto algumas espécies como *A. fumigatus* são capazes de provocar doenças em humanos, outras produzem metabólitos que são utilizados como fármacos como, por exemplo, a lovastatina produzida por *A. terreus*, a qual é utilizada no controle do colesterol (KNUF; NIELSEN, 2012). Já *A. niger* e *A. oryzae*, são utilizados há anos na produção industrial de ácido cítrico e saquê, respectivamente (MEYER et al., 2011).

Entre as diversas moléculas produzidas por *Aspergillus*, estão também, as ribonucleases (entre elas as ribotoxinas), proteínas antifúngicas (AFP), xilanases, quitinases, celulasas e proteases (NG, 2004). Essas proteínas têm aplicações que vão desde as áreas médica e farmacêutica, até nas indústrias alimentícia, química e na agricultura. As ribotoxinas e quitinases são as proteínas de especial interesse nesse trabalho.

As ribonucleases giganteína (*A. giganteus*), α -sarcina (*A. giganteus*), clavina (*A. clavatus*), restrictocina e mitogilina (*A. restrictus*), são capazes de inibir a síntese de proteínas através de clivagens em regiões específicas do RNA ribossomal e, por isso,

têm despertado o interesse para seu uso no estudo de ribossomopatias e no tratamento de doenças humanas (como parte de imunotoxinas e na produção de alérgenos recombinantes (NG, 2004; OLOMBRADA et al., 2017). As proteínas e peptídeos antifúngicos de *A. giganteus* (AFP) e *A. niger* (Anafp) são capazes de inibir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos e, por isso, despertam interesse como agentes antifúngicos (LEE et al., 1999). As quitinases de *A. terreus* e *A. niger* apresentam a capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos e de outros microrganismos, podendo ser utilizadas no controle de fitopatógenos (FARAG et al., 2016; BREZINSKA et al., 2012). A quitinases ainda têm outras aplicações como na geração de produtos de maior valor agregado como a quitosana e os quitoooligossacarídeos, no tratamento de efluentes e resíduos da indústria pesqueira, na geração de protoplastos e ainda apresentam potencial larvicida (DAHIYA et al., 2006). A diversidade de aplicações apresentada pelas moléculas produzidas por *Aspergillus* desperta um grande interesse na identificação de novas proteínas produzidas por fungos desse gênero.

2.2 *Aspergillus niveus*

A linhagem de *Aspergillus niveus* utilizada neste trabalho foi isolada em nosso laboratório a partir de *Mangifera indica* e identificado na Universidade Federal de Pernambuco.

Dados da literatura demonstram a habilidade de linhagens de *A. niveus* em produzir diferentes enzimas de interesse comercial, tais como amilases (SILVA et al., 2009a; SILVA, 2013), xilanases (ANGAYARKANNI et al., 2006), inulinases (SOUZA-MOTTA et al., 2005), α -glicosídeos (SILVA et al., 2009b), endoglucanases (TAJ-ALDEEN & ALKENANE, 1996), enzimas pectinolíticas (MALLER et al., 2011), lacases (PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2015) e invertases (GUIMARÃES et al., 2009).

A. niveus também já foi utilizado para o tratamento de efluentes industriais. Os efluentes industriais apresentam elevadas concentrações de matéria orgânica em termos de Demanda de Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), cor e compostos com elevada toxicidade, o que torna o tratamento destes efluentes problemáticos (JERÔNIMO et al., 2012; AMARAL et al., 2013). Estudos demonstraram que *A. niveus* cultivado em efluentes adicionados de bagaço de cana como fonte de carbono, foi eficiente para reduzir a cor (60%), a DQO (96%)

e a DBO (97%) dos efluentes, em escalas laboratorial e piloto (ANGAYARKANNI et al., 2003).

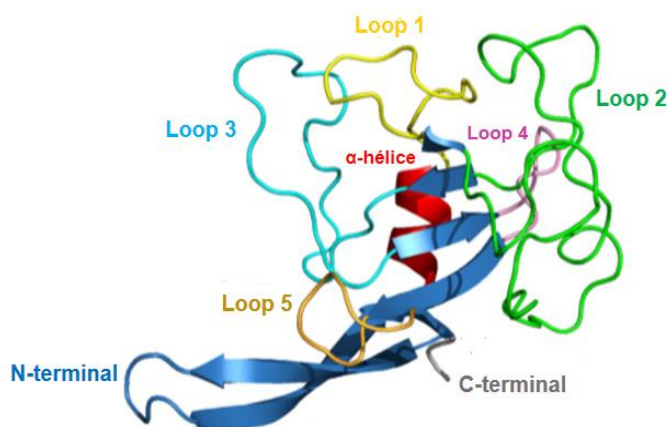
Neste trabalho *A. niveus*, foi utilizado para a prospecção de ribotoxinas (proteínas com específica atividade ribonucleásica) e quitinases, ambas proteínas com potencial para diversas aplicações biotecnológicas.

2.3 Ribotoxinas fúngicas

Ribotoxinas fúngicas são uma família de ribonucleases (RNases) extracelulares e citotóxicas capazes de inibir a síntese de proteínas por inativação dos ribossomos, levando a morte celular por apoptose (KAO et al., 2001; OLOMBRADA et al., 2017).

A primeira ribotoxina fúngica foi descoberta em 1960, durante um programa do Departamento de Saúde de Michigan para busca por novos agentes antibióticos e antitumorais (LACADENA et al., 2007). Neste programa, foi identificada, no filtrado da cultura do fungo *Aspergillus giganteus*, isolado do solo em uma fazenda de Michigan, uma proteína capaz de inibir sarcoma 180 e carcinoma 755 induzidos em ratos, sendo essa proteína nomeada como α -sarcina (Figura 1) (OLSON; GOERNER, 1965).

Figura 1. Estrutura tridimensional da ribotoxina α -sarcina produzida por *Aspergillus giganteus*, a primeira ribotoxina descrita (PDB ID 1DE3).



Fonte: Lacadena et al. (2007).

Posteriormente foram identificadas outras proteínas, como a restrictocina e mitogilina, ambas secretadas pelo fungo *Aspergillus restrictus*, com atividades similares a α -sarcina, as quais, foram incluídas no mesmo grupo de moléculas

antitumorais (BRANDSHORT et al., 1992; ÁLVAREZ-GARCIA, 2009). A ribotoxina Asp f1, secretada por *Aspergillus fumigatus*, foi identificada como o principal alérgeno envolvido em alergias e doenças relacionadas a *Aspergillus*, causando graves infecções em pacientes imunocomprometidos (ARRUDA et al., 1990; ARRUDA et al., 1992; LAMY et al., 1992).

Embora as ribotoxinas mostrassem uma potente inibição da biossíntese de proteínas, em baixíssimas concentrações (0,1 nM), os estudos sobre essas proteínas foram abandonados, em meados da década de 70, devido a descoberta da citotoxicidade inespecífica dessas moléculas, o que inviabilizaria seu uso clínico (ROGA et al., 1971; LACADENA et al., 2007). Lamy e colaboradores (1991) demonstraram que a atividade da α -sarcina era tão efetiva que apenas uma molécula foi suficiente para matar uma célula. Mais tarde, o interesse por essas proteínas ressurgiu, uma vez que poderiam ser utilizadas como parte de imunotoxinas em terapias antitumorais (OLOMBRADA et al.; 2017)

Entre as ribotoxinas melhor estudadas estão a α -sarcina, restrictocina e Asp f1, secretadas por diferentes espécies de *Aspergillus* spp. e, a hirsutelina A (HtA), produzida pelo fungo entomopatogênico *Hirsutella thompsonii* (LACADENA et al., 2007). As três primeiras compartilham alta identidade (85%) entre suas sequências proteicas, sendo a HtA a mais diferente (25% identidade) (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 1999a; HERRERO-GALÁN et al., 2008). Já a recém descrita, anisoplina, isolada de *Metarhizium anisopliae*, compartilha 70% de identidade com a HtA (OLOMBRADA et al., 2016). A identificação de novas ribotoxinas em outras espécies leva a acreditar que a sua presença entre os fungos é maior do que se considerava inicialmente (ÁLVAREZ-GARCIA et al., 2009).

A estrutura atômica de várias ribotoxinas já é conhecida e estudos de mutação têm demonstrado o papel específico de alguns resíduos de aminoácidos, como sua implicação na catálise, reconhecimento do ribossomo ou na interação com membranas (YANG; MOFFAT 1996; PÉREZ-CAÑADILLAS et al. 2000; VIEGAS et al., 2009). A toxicidade das ribotoxinas está relacionada a específica atividade ribonucleásica e devido a sua habilidade para atravessar membranas (OLMO et al., 2001).

A função biológica das ribotoxinas não foi esclarecida até o momento, porém estudos demonstraram as propriedades inseticidas de ao menos duas dessas proteínas, sugerindo seu envolvimento em mecanismos de defesa contra predadores

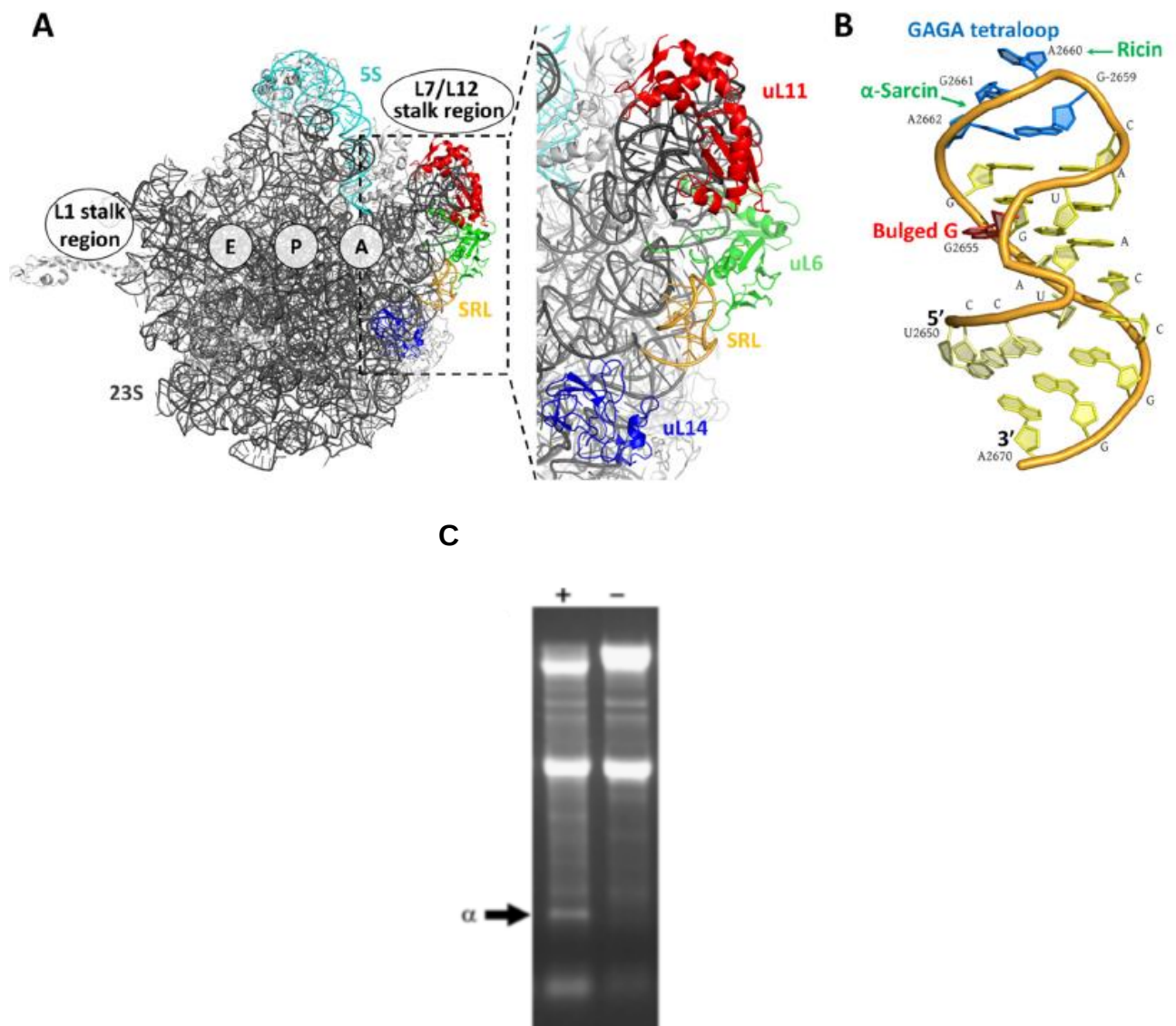
(BRANDSHORT et al., 1996; OLOMBRADA et al. 2013). Diversos estudos sobre a estrutura e função dessa família de proteínas têm destacado seu potencial para uso em aplicações biotecnológicas como, por exemplo, como bioinseticidas para controle de pragas (BRANDSHORT et al., 1996; OLOMBRADA et al., 2013; OLOMBRADA et al., 2014b), como agentes antitumorais em terapia humana (TOMÉ-AMAT et al., 2015a,b) ou ainda, como ferramentas para o estudo de doenças humanas relacionadas aos ribossomos (NARLA et al., 2010; NAKHOUL et al., 2014).

2.3.1 Atividade ribonucleolítica das ribotoxinas fúngicas

A atividade ribonucleolítica das ribotoxinas é extremamente específica e acontece através da clivagem de uma única ligação fosfodiéster, presente na alça sarcina-ricina (SRL) da subunidade maior do RNA ribossomal (rRNA), inativando rápida e irreversivelmente todos os ribossomos da célula (SCHINDLER; DAVIES, 1977; WOOL, 1984; WOOL et al., 1990; WOOL et al., 1992). A SRL apresenta uma sequência conservada universalmente e sua estrutura é muito similar em ribossomos de arqueas, procariotos e eucariotos (OLOMBRADA, 2017).

Durante a tradução, a SRL juntamente com a região de ligação a uL-11, a região L7/L12 e as proteínas ribossomais uL6 e uL14, constituem o sítio de ligação dos fatores de alongação, os quais são essenciais para o correto funcionamento do ribossomo (Figura 2 A) (GARCÍA-ORTEGA et al., 2010; VOORHEES et al., 2010; OLOMBRADA et al., 2017). A estrutura da SRL consiste de um hairpin distorcido e suas características estruturais mais significativas são o tetraloop GAGA e o motivo G saliente (Figura 2 B) (SZEWCZAK et al., 1993). Ribotoxinas clivam uma única ligação fosfodiéster na sequência GAGA, produzindo fragmentos de 300-400 nucleotídeos de rRNA, conhecido como fragmento α (Figura 2 C) (GARCÍA-ORTEGA et al., 2010; OLOMBRADA et al., 2017). A quebra desta ligação demonstra sua elevada especificidade uma vez que um ribossomo possui mais de 5000 ligações deste tipo e promove um dano irreversível ao ribossomo, impossibilitando a ligação dos fatores de alongação (EF-1 e EF-2), impedindo a síntese de proteínas e levando a morte celular (KAO; DAVIES, 2000; OLMO et al., 2001).

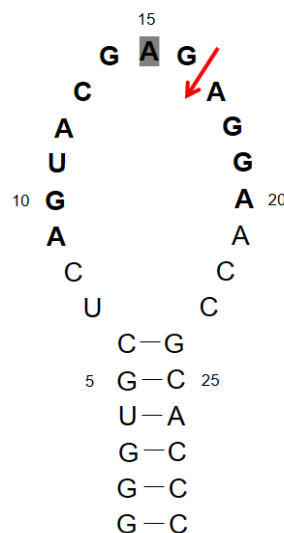
Figura 2. O alvo das ribotoxinas: o ribossomo. **(A)** Estrutura tridimensional da subunidade ribossomal maior de *Escherichia coli*. A localização das regiões L1 e L7/L12 e dos sítios E, P e A são indicados. São mostrados a SRL (laranja) e as proteínas uL6 (verde), uL11 (vermelho), uL 14 (azul). Outras proteínas ribossomais aparecem em cinza claro. rRNA 23S (cinza escuro) e 5S (ciano) também são mostrados. **(B)** Estrutura da SRL. O motivo G saliente (vermelho), o tetraloop GAGA (azul), a ligação clivada pela α -sarcina são mostradas. **(C)** Ensaio para verificar a atividade ribonucleolítica de ribotoxinas utilizando rRNA. Pode ser verificada a presença (+) ou ausência (-) da α -sarcina. O fragmento liberado está indicado pela seta.



Fonte: Olombrada et al. (2017) e Kao et al. (2001).

As proteínas inativadoras dos ribossomos (RIPs) são outro grupo de proteínas tóxicas, produzidas por plantas e fungos, que atuam na mesma região do rRNA que as ribotoxinas (SCHINDLER; DAVIES, 1977; ENDO; WOOL, 1982). Desta perspectiva, as ribotoxinas poderiam ser incluídas no grupo das RIPs, porém alguns autores preferem que o nome RIPs seja relacionado apenas as N-glicosidades de plantas, as quais têm como sua melhor representante a ricina, uma toxina encontrada na semente de mamona (*Ricinus communis*) (SCHROT et al., 2015; WALSH, et al., 2013; NIELSEN; BOSTON, 2001). Como as ribotoxinas e RIPs atuam na mesma sequência conservada do rRNA essa região foi denominada alça sarcina/ricina (SRL) (ÁLVAREZ-GARCIA 2009). Embora a região de ação dessas proteínas seja a mesma, as ribotoxinas clivam uma única ligação fosfodiéster presente na sequência (GAGA) da SRL, enquanto as RIPs atuam depurinando um único nucleotídeo (Adenina) presente na sequência da SRL (Figura 3) (ENDO; TSURUGI, 1987a; SZEWCZAK et al., 1993;).

Figura 3. Estrutura da SRL. Os resíduos 5-25 correspondem a sequência presente na subunidade 28S do rRNA de ratos. Resíduos universalmente conservados (arqueas, bactérias e eucariotos) são indicados em negrito. A clivagem da ligação fosfato pela α -sarcina é indicada pela seta, e a adenina removida pela ricina é sombreada.



Fonte: Szewczak et al. (1993).

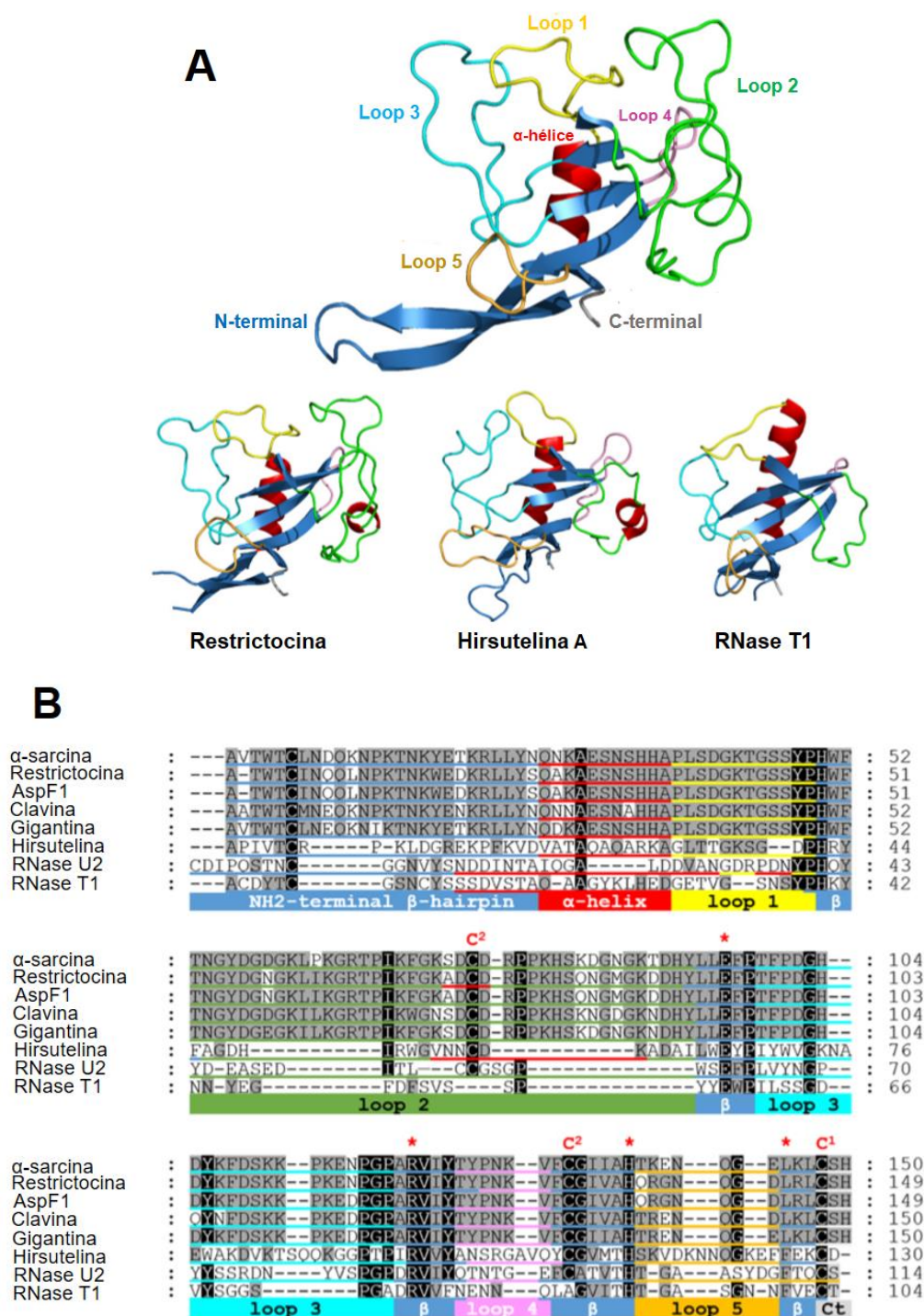
2.3.2 Características estruturais das ribotoxinas

As ribotoxinas fazem parte de um amplo grupo de ribonucleases (RNases) extracelulares fúngicas, porém são as únicas proteínas neste grupo com atividade citotóxicas (LACADENA et al., 2007). A comparação entre as estruturas tridimensionais da α -sarcina, restrictocina, hirsutelina A e das RNases não tóxicas, T1 e U2, revela que elas compartilham elementos da estrutura secundária, assim como a disposição dos resíduos relacionados ao centro catalítico (Figura 4 A e B) (YANG; MOFFAT., 1996; YANG et al., 2001; PÉREZ-CAÑADILLAS et al., 2000; MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2001; GARCÍA-MAYORAL et al., 2005; VIEGAS et al., 2009).

Entretanto, algumas diferenças são observadas entre as ribotoxinas e as RNases não tóxicas. Uma delas é que as ribotoxinas apresentam tamanho menor comparado com as RNases não tóxicas, embora ainda sejam pequenas proteínas (~150 aminoácidos) e, geralmente, básicas. Outra diferença envolve suas estruturas, pois as ribotoxinas apresentam loops maiores e positivamente carregados, os quais têm sido relacionados a sua citotoxicidade (Figura 4 A e B) (MARTINEZ-DEL-POZO et al., 1988). As identificações dessas características estruturais são avanços importantes que contribuem para o conhecimento dessas proteínas e, conseqüentemente, para sua possível aplicação como agentes específicos no tratamento de patologias humanas ou como inseticidas (OLOMBRADA et al., 2017).

As ribotoxinas α -sarcina, restrictocina e Asp f1, secretadas por diferentes espécies de *Aspergillus* spp., apresentam alta identidade entre suas sequências (acima de 85%) (LACADENA et al., 2007). A hirsutelina A (HtA), produzida pelo fungo *Hirsutella thompsonii*, é 20 resíduos menor que as outras três ribotoxinas, e compartilha apenas 25% de identidade com elas (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 1999a; HERRERO-GALÁN et al., 2008). Já a recém descrita, anisoplina, isolada de *Metarhizium anisopliae*, compartilha 70% de identidade com a HtA (OLOMBRADA et al., 2016).

Figura 4. (A) Estrutura tridimensional da RNase T1 e das ribotoxinas mais representativas. **(B)** Alinhamento entre seqüências de aminoácidos das RNases (citotóxicas: α -sarcina, restrictocina, Asp f1, clavina, gigantina, hirsutalina e não tóxicas: T1 e U2). Resíduos conservados do centro catalítico (*) e as cisteínas conservadas que formam as pontes dissulfeto (C). Aminoácidos conservados são destacados em negrito e os elementos da estrutura secundária são indicados em cores diferentes na parte inferior do alinhamento



Fonte: Álvarez-Garcia et al. (2009).

Estudos utilizando mutações sítio-dirigidas demonstraram o papel de diferentes resíduos envolvidos na catálise, no reconhecimento da SRL e do ribossomo e na interação com a membrana (LACADENA et al., 1995; MARTÍNEZ-RUIZ et al., 1999a). Para a α -sarcina, os resíduos catalíticos são His 50, Glu 96 e His 137. Estes três resíduos são essenciais para inativação específica dos ribossomos, enquanto os resíduos Tyr 48, Arg 121 e Leu 145, embora não sejam essenciais, contribuem para a atividade catalítica da α -sarcina (LACADENA et al., 1995). Os resíduos equivalentes na hirsutelina A (HtA) (His 42, Glu 66 e His 113) foram identificados por comparação de sua estrutura com outras ribotoxinas mostrando que os resíduos essenciais são conservados, apesar da HtA apresentar algumas características mais parecidas com as RNases do tipo T1 (Phe no lugar da Leu 145), ou apresentar outras características completamente novas (Asp 40 no lugar da Tyr 48) (HERRERO-GALÁN et al., 2012a,b). Herrero-Galán e colaboradores (2012) demonstraram, através de mutações, que nenhum dos seus resíduos catalíticos da hirsutelina A é indispensável para a catálise, como acontece com a α -sarcina.

2.3.3 Habilidade das ribotoxinas em atravessar membranas e interação com ribossomo

A citotoxicidade das ribotoxinas está relacionada a sua potente e específica atividade ribonucleásica, e a sua habilidade em atravessar membranas lipídicas, embora nenhum receptor proteico tenha sido relacionado a elas (OLOMBRADA et al., 2017).

Até o momento, a capacidade das ribotoxinas em atravessar as membranas celulares não foi completamente esclarecida, porém alguns estudos sugerem quais seriam os mecanismos pelos quais elas conseguem interagir com as membranas. Dados da literatura mostram, por exemplo, que as ribotoxinas são mais eficientes em células transformadas ou infectadas por vírus, provavelmente devido a permeabilidade e/ou composição alterada da membrana celular (TURNAY et al., 1993; OLMO et al., 2001). Outros estudos mostram que as membranas das células de insetos têm uma composição lipídica particular, sendo mais finas e fluidas, o que parece torná-las mais sensíveis e acessíveis as ribotoxinas (MARHEINEKE et al., 1988; OLOMBRADA et al., 2013).

Estudos utilizando vesículas lipídicas modelos demonstraram que a α -sarcina é capaz de interagir com vesículas ricas em fosfolipídios ácidos, produzindo a agregação dessas, seguida por fusão, com intercâmbio de fosfolipídios, levando a liberação de seu conteúdo aquoso (GASSET et al, 1990; GASSET et al., 1994). Porém este não é um mecanismo geral para todas as ribotoxinas, uma vez que, estudos demonstraram que a hirsutelina A embora apresente uma maior capacidade de permeabilização das membranas não promove agregação de vesículas como a α -sarcina (HERRERO-GALÁN et al., 2008; OLOMBRADA et al., 2013).

Para a α -sarcina é descrito que resíduos da região 116-139 e os resíduos Lys 111 e 114, parecem participar da interação hidrofóbicas e eletrostáticas com a membrana, sendo que essas interações permitem o contato entre as vesículas, necessária para a fusão (CASTAÑO-RODRIGUEZ et al., 2015). Na HtA os resíduos, Trp 71 e 78, parecem ser os responsáveis pela interação com as membranas (HERRERO-GALÁN et al., 2012).

A habilidade das ribotoxinas para interagir com membranas também parece estar relacionada ao hairpin N-terminal uma vez que, a deleção desta região carregada positivamente gerou uma RNase ativa, mas não tóxica e com alterada capacidade para interagir com membranas (GARCÍA-ORTEGA et al., 2001). A região do hairpin N-terminal apresenta grande variabilidade entre as ribotoxinas, apresentando menor tamanho na HtA e, por isso, pesquisadores sugerem que uma alteração estrutural poderia ser compensada pelo aumento do *loop* 5 da HtA (Figura 4 B), o qual possui uma maior quantidade de cargas positivas (HERRERO-GALÁN et al., 2012).

A superfície positivamente carregada das ribotoxinas parece não só favorecer as interações eletrostáticas com as membranas, mas também, com o ribossomo (GARCÍA-MAYORAL et al., 2005; KORENNYKH et al., 2006; ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2009). Para a alta especificidade das ribotoxinas é necessária a participação de outros elementos, além dos que compõem o sítio ativo, capazes de interagir com outras regiões do ribossomo e reconhecer a SRL e, portanto, diversas regiões capazes de atuar nesse reconhecimento estão sendo propostas. Foi proposto que a região rica em lisinas no *loop* 3 interagiria com as cargas negativas dos fosfatos na região do motivo G na SRL, enquanto os resíduos 51 a 55 do *loop* 2 da α -sarcina e alguns dos resíduos do *loop* 5 seriam os responsáveis por contatar o tetraloop GAGA,

que depois é clivado pela ribotoxina (YANG et al., 2001; GARCÍA-MAYORAL et al., 2005).

Modelos de ajuste (*docking*) entre a estrutura do ribossomo da bactéria *Haloarcula marismortui* e da α -sarcina, sugerem que a α -sarcina poderia interagir com outras proteínas ribossomais além da SRL (GARCÍA-MAYORAL et al., 2005). Esta análise prediz que uma pequena sequência do *loop* 2 interagiria com a proteína uL6, enquanto os resíduos 11 e 16 da região do harpin N-terminal interagiriam com a proteína uL14 (Figura 2 A) (GARCÍA-MAYORAL et al., 2005; OLOMBRADA et al., 2017).

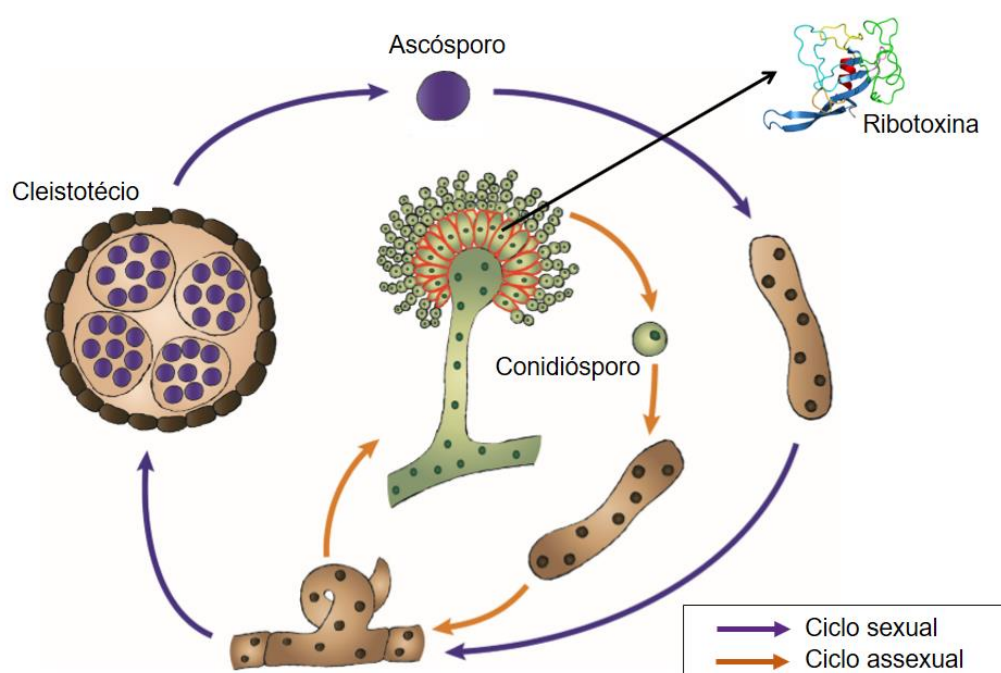
Baseando-se nessas observações parece sensato pensar que as toxinas poderiam também estabelecer interações com outras regiões ribossomais responsáveis por interagir com fatores de alongação. Como acontece, por exemplo, com as proteínas do *stalk* ribossomal e RIPs como a ricina (CHIOU et al., 2008; TUMER; LI., 2012). O *stalk* ribossomal é uma estrutura saliente do ribossomo que serve como uma plataforma de ancoragem para fatores de alongação e para várias RIPs, para o posterior reconhecimento da SRL pelas RIPs (OLOMBRADA, 2005). Entretanto, apesar de compartilharem o mesmo alvo, nem todas as RIPs se comportam da mesma forma, uma vez que não foram observadas interações entre a proteína PAP (*Pokeweed antiviral protein*, uma RIP isolada das folhas de *Phytolacca americana*) e as proteínas do *stalk* ribossomal (AYUB et al., 2008; DI; TUMER, 2015). Este também é o caso das ribotoxinas, no qual o *stalk* ribossomal não participa da inativação dos ribossomos pela α -sarcina, o que sugere que as ribotoxinas apresentam um mecanismo de reconhecimento ribossomal diferente da maioria das RIPs de plantas (OLOMBRADA et al., 2014a).

2.3.4 Ribotoxinas produzidas por fungos e seu possível papel biológico

Fungos filamentosos geralmente apresentam um ciclo de vida complexo e algumas espécies de *Aspergillus* podem alternar entre os ciclos de reprodução sexual e assexual (Figura 5). *A. nidulans* é uma espécie que apresenta ambos os tipos de reprodução (CASSELTON; ZOLAN, 2002). Na reprodução sexual, acontece a cariogamia (fusão nuclear) e meiose, o fungo desenvolve o corpo frutífero (cleistotécio), que produzirá esporos sexuais (ascóporos). Durante o ciclo assexual, o

micélio, que se desenvolve a partir de um esporo haploide, se diferencia em vários esporos idênticos (conidiósporos), capazes de formar novas hifas.

Figura 5. Reprodução de *Aspergillus* e possível localização das ribotoxinas. *Aspergillus* podem apresentar um ciclo reprodutivo sexual ou assexual. Durante o ciclo sexual, o micélio forma o cleistotécio, que contém os ascósporos que formaram novas hifas. Na reprodução assexual, o micélio se diferencia em esporos assexuais idênticos, os conidiósporos. As ribotoxinas seriam produzidas durante a maturação dos conídios, localizando-se nas fiáldes, como um mecanismo de proteção até sua maturação completa.



Fonte: Modificado de Olombrada et al. (2017).

Existem poucos estudos sobre a expressão das ribotoxinas e seu papel no ciclo de vida dos fungos. Foi demonstrado que a produção de restrictocina por *Aspergillus restrictus*, durante a reprodução assexual, ocorre em um momento específico do desenvolvimento do fungo: nas primeiras etapas da formação do conidióforo (BRANDHORST; KENEALY., 1992; YANG; KENEALY, 1992). Brandhorst e Kenealy (1992) observaram que, em *A. restrictus*, os níveis de restrictocina aumentam progressivamente até a maturação dos conídios, sendo degradada logo em seguida. Este resultado sugere que a restrictocina participe do processo de maturação dos conídios ou tenham um papel de proteção contra predadores até a completa maturação dos conídios, sendo posteriormente degradada, para que insetos

fungívoros possam transportar e disseminar os esporos para outros locais (BRANDHORST; KENEALY., 1992).

A análise do comportamento alimentar do besouro *Carpophilus freemani*, durante a produção de restrictocina, mostrou que o fungívoro se alimentou menos de *A. restrictus* durante a formação de conídios, algo que não ocorreu quando se alimentou de *A. nidulans* (espécie não produtora de ribotoxinas) (BRANDHORST et al., 1996). O inseto demonstrou o mesmo comportamento observado para *A. restrictus* ao se alimentar de um mutante de *A. nidulans* capaz de produzir restrictocina, relacionando este comportamento as ribotoxinas (BRANDHORST et al., 2001). Foi observado ainda que a inclusão de restrictocina na dieta de insetos foi capaz de matar larvas de *Carpophilus freemaniae* e *Spodoptera frugiperda* (BRANDHORST et al., 1996).

A ideia de que as ribotoxinas atuariam como inseticidas naturais, corrobora com o fato de que *Aspergillus*, o maior produtor de ribotoxinas, compartilha o nicho ecológico com vários insetos e como um método de sobrevivência poderia ter desenvolvido a produção de ribotoxinas como armas para sua auto-defesa (SCULLY; BIDOCHKA, 2009).

Espécies fúngicas de outros gêneros também são capazes de produzir ribotoxinas (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 1999b; HWU et al., 2001; VARGA et al., 2007; LANDI et al., 2017). Um exemplo é fungo entomopatogênico *Hirsutella thompsonii* produtor da hirsutelina A (HtA) (HERRERO-GALÁN et al., 2008). Este fungo é conhecido por causar epidemias em populações de ácaros eriofídeos (PENG et al., 2002). Os filtrados dos cultivos desse fungo também mostraram toxicidade para a classe *Acarí*, para traças, moscas e larvas de insetos (VEY et al., 1993). Estudos mostraram que o filtrado do cultivo de *H. thompsonii* produziam resultados tão letais para as larvas de *Galleria mellonella* quanto aqueles obtidos com peptídeos secretados por outros fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* e *Bauveria bassiana* (DE BEKKER et al., 2013). A HtA também demonstrou atividade inseticida para larvas de *Aedes aegypti* (LIU et al., 1995; MAZET; VEY, 1995). Apesar do seu menor tamanho e baixa identidade, comparado a outras ribotoxinas descritas, a HtA foi relacionada às ribotoxinas, após intensivas caracterizações estruturais e funcionais, e devido a sua capacidade de clivar especificamente o rRNA de células de *Spodoptera frugiperda* (LIU et al., 1995; HERRERO-GALÁN et al., 2008; VIEGAS et al., 2009; HERRERO-GALÁN et al., 2012).

Recentemente, também foi identificada uma ribotoxina, a anisoplina, produzida pelo fungo *Metarhizium anisopliae* (OLOMBRADA et al., 2016). A proteína apresentou uma maior identidade com HtA, sendo conservados entre elas os resíduos de cisteína e do sítio ativo, o que se encaixa com o fato que, do ponto de vista evolucionário, *Metarhizium* e *Hirsutella* são mais próximos filogeneticamente que *Aspergillus* (LAI et al., 2014; OLOMBRADA et al., 2016).

Genes de ribotoxinas também foram identificados em espécies do gênero *Penicillium* (HWU et al., 2001). Entre diversas espécies de *Penicillium* analisadas, seis delas (*P. resedanum*, *P. spinulosum*, *P. daleae*, *P. digitatum*, *P. aculeatum* e *P. chermesinum*) possuem o gene de ribotoxinas (*sar* gene), mas somente quatro espécies (*P. resedanum*, *P. spinulosum*, *P. aculeatum* e *P. chermesinum*) foram capazes de secretar ribotoxinas ativas capazes de clivar ribossomos (HWU et al., 2001). Hwu e colaboradores (2001) mostraram que as sequências de DNA e aminoácidos das ribotoxinas de *Penicillium* são altamente conservadas e apresentam alta similaridade com a α -sarcina de *Aspergillus giganteus*. Três espécies que secretaram ribotoxinas ativas, com exceção de *P. aculeatum*, pertencem ao subgênero *Aspergiloides*, o qual é proximamente relacionado a *Aspergillus*. Por outro lado, as espécies que apresentaram o gene das ribotoxinas, mas não foram capazes de inativar os ribossomos, pertencem ao subgênero *Furcatum* e são mais distantes de *Aspergillus*. Essas observações podem ajudar a elucidar a relação evolutiva entre os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (BERBEE et al., 1995). Apesar de não existirem evidências que confirmem, encontrar genes praticamente idênticos nos dois gêneros, sugere que possa ter ocorrido transferência gênica horizontal através do ciclo de vida sexual (HWU et al., 2000; HWU et al., 2001).

A distribuição das ribotoxinas entre espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Hirsutella*, *Penicillium* e *Metarhizium* sugere que elas estão mais amplamente distribuídas do que se considerava inicialmente. As razões pelas quais esses microrganismos carregam esses genes são questionadas por não serem genes constitutivos em todas as espécies que os possuem (LAMY; DAVIES et al., 1991; LIN et al., 1995; HWU et al., 2000; HWU et al., 2001). Além disso, como as ribotoxinas são capazes de inativar qualquer ribossomo, resta a dúvida sobre como os fungos protegem seus próprios ribossomos (MILLER; BODLEY, 1988). Não existem evidências da produção de antitoxinas que inibam sua citotoxicidade antes de serem liberadas para o meio extracelular, como ocorre com algumas toxinas bacterianas

(MUÑOZ-GÓMEZ et al., 2005). As ribotoxinas são sintetizadas como precursores, porém a caracterização da pro- α -sarcina, produzida por *Pichia pastoris*, revelou que esse precursor é ribonucleolicamente ativo (ENDO et al., 1993 a,b; MARTÍNEZ-RUIZ et al., 1998).

Esses dados sugerem, que o fungo deve possuir um sistema muito eficiente de reconhecimento de sequência peptídeo sinal e compartimentalização subcelular para que essas toxinas sejam secretadas unicamente no meio extracelular (ENDO et al., 1993 a,b; MARTÍNEZ-RUIZ et al., 1998; LACADENA et al., 2007). Foi demonstrado que, após alteração da sequência do peptídeo sinal, a expressão heteróloga de restrictocina em *A. nidulans*, mostrou níveis reduzidos de transcrição, maior lise celular e alteração da localização da ribotoxina no fungo (que sempre aparece nos conidiósporos), sugerindo que o peptídeo sinal da restrictocina é altamente eficiente na proteção do fungo durante a secreção (BRANDHORST; KENEALY, 1995). Além disso, o gene da restrictocina contém um íntron no início de sua sequência e, estudos mostraram, que íntrons podem ser utilizados para atenuar a toxicidade de algumas toxinas para seu uso em terapia gênica suicida (CHEN, 2012). Dessa forma, a presença do íntron na restrictocina poderia atuar neste sentido, mostrando como o fungo pode utilizar estratégias adicionais para proteger seus próprios ribossomos durante a síntese e secreção das ribotoxinas (OLOMBRADA, 2017).

2.3.5 Aplicações biotecnológicas das ribotoxinas

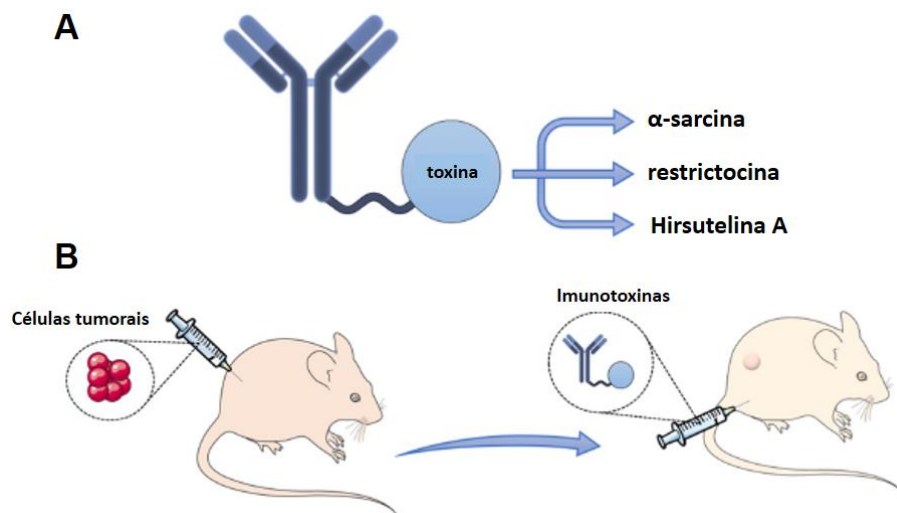
2.3.5.1 Imunotoxinas

Imunotoxinas são moléculas compostas por um anticorpo específico, responsável por reconhecer um tipo celular específico, ligado a uma molécula tóxica que promove a morte celular (REITER; PASTAN, 1998).

Algumas características das ribotoxinas como, pequeno tamanho, alta termoestabilidade, resistência a proteases e eficiência em inativar ribossomos, as tornam interessantes candidatas para a construção de imunotoxinas. Pesquisadores construíram imunotoxinas específicas para câncer de colorretal, contendo ribotoxinas (α -sarcina) e outras RNases fúngicas (RNase T1) como domínio tóxico (Figura 6) (CARRERAS-SANGRÀ et al., 2012; TOMÉ-AMAT et al., 2012). Tomé-Amat e

colaboradores (2015a) criaram uma imunotoxina utilizando a hirsutelina A (HtA), incapaz de atravessar as membranas lipídicas, mas mantendo sua atividade ribonucleolítica. Esta imunotoxina seria, portanto, inócua para as células que não contêm o antígeno específico reconhecido pela imunotoxina, por isso, seria segura e reduziria os efeitos secundários da terapia antitumoral (TOMÉ-AMAT et al., 2015a).

Figura 6. Ribotoxinas como agentes imunoterapêuticos. (A) Estrutura de uma imunotoxina: anticorpo específico, responsável por alcançar um tipo de célula específica e ribotoxinas, que promoverá a morte celular; (B) Imunotoxina é testada em ratos, levando a morte celular e reduzindo tumores.



Fonte: Modificado de Olombrada et al. (2017).

Uma imunotoxina contendo α -sarcina como domínio tóxico (IMTXA33as) foi capaz de inibir o crescimento tumoral e a angiogênese em ratos xenotransplantados com tumores humanos de câncer de colorretal, demonstrando assim sua eficiência *in vivo* (TOMÉ-AMAT et al., 2015c). Esses resultados obtidos em estudos desenvolvidos nos últimos anos demonstram o grande potencial das ribotoxinas como ferramentas com possíveis aplicações em terapias antitumorais.

2.3.5.2 Papel das ribotoxinas em alergias e infecções causadas por *Aspergillus*

Algumas espécies de *Aspergillus* são reconhecidos patógenos humanos provocando doenças respiratórias, com maior incidência em pacientes debilitados (LATGÉ et al., 1991; DAGENAIS; KELLER, 2009). Quando inalados, os esporos de

Aspergillus, podem afetar o sistema respiratório de muitas maneiras, desencadeando uma cascata de reações inflamatórias que podem resultar em asma, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), sinusite alérgica, aspergiloma e infecções graves em pacientes imunocomprometidos (SHAH; PANJABI, 2016; BENTO; ARROBAS, 2009).

Aspergillus fumigatus é o agente etiológico de 80% dessas enfermidades, e o diagnóstico e tratamento de alergias produzidas por ele consistem do uso de extratos do fungo, o qual contém diversos moléculas, o que leva a uma difícil padronização e um grande risco de efeitos anafiláticos (AGARWAL et al., 2013). Uma alternativa para melhorar o diagnóstico e tratamento dessas doenças tem sido a produção de alérgenos recombinantes. Uma vez que a ribotoxina Asp f1 recombinante ainda mantém sua citotoxicidade, alternativas estão sendo pesquisadas e, mostraram que a região do hairpin N-terminal dessa ribotoxina é uma região alergênica, permitindo a criação de variantes hipoalergênicas de Aspf1 (KURUP et al., 1998; GARCÍA-ORTEGA et al., 2002). Variantes mutantes não citotóxicas e hipoalergênicas de Asp f1 e α -sarcina são candidatos promissores para uso no diagnóstico e em terapias imunomoduladoras de hipersensibilidade a *Aspergillus*. Algumas delas já estão sendo produzidas em *Lactococcus lactis*, as quais poderiam ser utilizadas para vacinação em protocolos de imunoterapia contra doenças relacionadas à Asp f1 (ÁLVAREZ-GARCIA et al., 2008). Álvarez-García e colaboradores (2010) também estabeleceram um modelo animal, utilizando ratos, o qual pode ser útil em testes pré-clínicos de alérgenos recombinantes e seus derivados.

2.3.5.3 Controle biológico utilizando ribotoxinas

O crescimento exponencial da população mundial requer um aumento paralelo dos recursos alimentares. Entretanto, pragas como insetos, nematoides, vírus e bactérias entre outros, causam perdas de 40% na produção agrária mundial a cada ano (CARRER et al., 2010). Há décadas, pesticidas químicos têm sido utilizados no controle de pragas, e apesar de serem muito potentes, baratos e fáceis de aplicar são extremamente tóxicos e levam ao aparecimento de resistência por diversas pragas. Estima-se que dos anos 40 aos anos 90, mais de 500 espécies de ácaros e insetos desenvolveram resistência ao DTT. Além do mais, o custo para descobrir, desenvolver e registrar novos pesticidas é tão alto que têm despertado um novo interesse por

métodos alternativos de controle biológico. Os biopesticidas tem se convertido em alternativa importante para o controle de pragas, agredindo menos o meio ambiente, porém seu uso ainda não é muito difundido, constituindo apenas 2 a 3% do mercado de inseticidas (GLARE et al., 2012).

O termo biopesticidas inclui aquelas técnicas de controle de pragas que utilizam tanto microrganismos (bactérias, vírus, nematoides ou fungos) como também os metabólitos secundários desses organismos, incluindo proteínas e peptídeos. Abrange também aqueles cultivos de plantas modificadas geneticamente para melhorar a resistência aos danos causados por insetos, fungos vírus ou herbicidas (CARLI; GROSSI-DE-AS, 2002; COCA et al., 2004).

Os fungos entomopatogênicos vêm sendo utilizados como agentes de controle de certas pragas, inclusive alguns deles são comercializados, como o caso de *Bauveria bassiana*, utilizada no controle da proliferação de vários insetos, e de *Metarhizium anisopliae*, recentemente estudado para o controle do mosquito *Anopheles gambiae*, transmissor da malária (SHAW et al., 2002; WHETSTONE; HAMMOCK, 2007; KIM et al., 2014). O entomopatógeno, *Hirsutella thompsonii*, produtor da ribotoxina HtA, é utilizado no controle do ácaro *Varroa destructor*, que infesta colônias de abelhas e no controle de ácaros que infestam o citrus e, inclusive já chegou a ser comercializado como micoacaricida, porém devido a problemas relacionados a sua formulação e estabilidade reduziram sua comercialização (McCOY; COUCH, 1982; SHAW et al., 2002). Novas formulações vêm sendo estudadas a fim de melhorar sua vida média e eficácia no campo (SREERAMA KUMAR; SINGH, 2008).

A manipulação genética poderia também ser utilizada para aumentar a virulência de fungos entomopatogênicos, como foi realizado com *M. anisopliae*, para a superexpressão de uma protease degradadora da cutícula de insetos (ST LEGER; WANG, 2010). Uma vez que as ribotoxinas fúngicas já demonstraram atividade contra insetos, elas poderiam ser utilizadas como bioinseticidas, de forma independente ou combinadas com outros compostos, porém elas teriam que ser utilizadas em formas mutantes capazes de atuar especificamente em seus alvos (OLOMBRADA et al., 2013; HERRERO-GALÁN et al., 2012; TOME-AMAT et al., 2015a).

Os vírus patógenos de insetos, os baculovírus naturais, já são utilizados no controle de pragas, e apresentam algumas vantagens como: fórmula simples, estável e ação específica para o hospedeiro (CORY et al., 1994; INCEOGLU et al., 2001).

Alguns baculovírus geneticamente melhorados para produzir proteínas de *Aspergillus* já foram desenhados, e as ribotoxinas também poderiam ser utilizadas neste sentido, gerando baculovírus específicos para insetos e minimizando os efeitos secundários em outros organismos (GRAMKOW et al., 2010). Também, já foram desenhados alguns baculovírus “ecologicamente corretos”, capazes de perder sua atividade, voltando ao fenótipo silvestre, à medida que se sucedem os ciclos infectivos (SHIM et al., 2013).

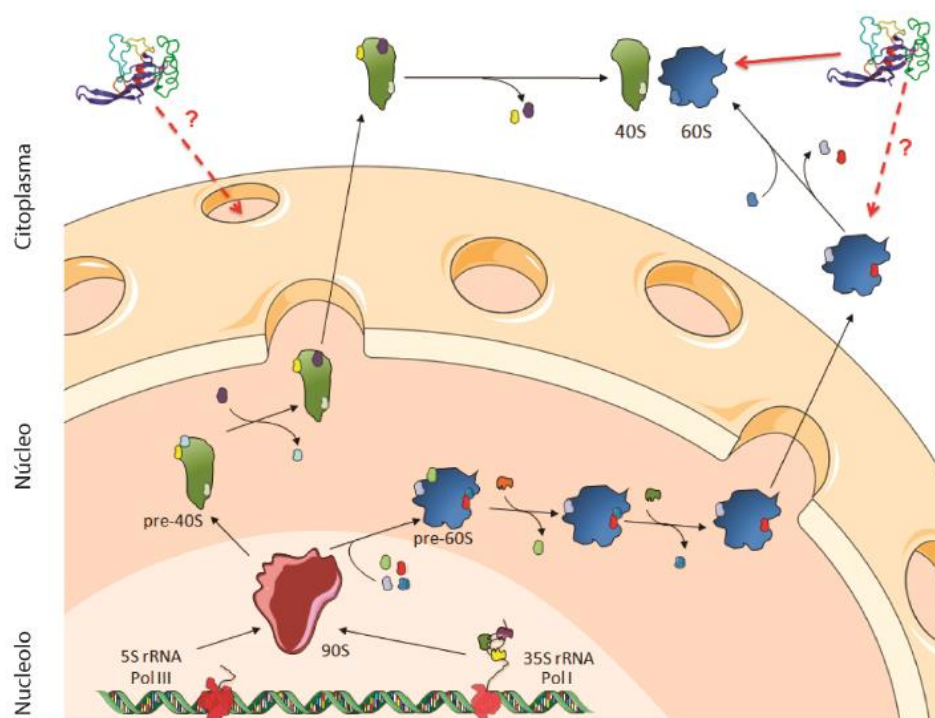
2.3.5.4 Estudo de doenças relacionadas aos ribossomos

Ribossomos são as maquinarias celulares responsáveis pela síntese de proteínas em todos os organismos (KRESSLER et al., 1999). Ribossomopatias ocorrem devido a alterações nos ribossomos ou nas moléculas envolvidas em sua correta estrutura e função. Essas doenças levam a diversos defeitos no desenvolvimento, desordens hematológicas, síndromes e câncer (CHARETTE; BASERGA, 2010). As ribossomopatias podem ocorrer devido a mutações nas proteínas ribossomais, como a síndrome de Schwachman-Diamond, ou devido a defeitos no processo de biogênese do ribossomo, como a síndrome de Treacher-Collins (NARLA; EBERT, 2010; MA et al., 2016).

A biogênese dos ribossomos é um processo complexo no qual as subunidades ribossomais se unem para formar uma unidade funcional. Centenas de proteínas e RNAs participam diretamente da síntese de ribossomos e permitem que o processo de maturação dos ribossomos ocorra com velocidade, precisão e direção necessárias (GARCÍA-GÓMEZ et al., 2011). Em eucariotos, a síntese de ribossomos inicia-se no nucléolo e as subunidades movimentam-se através do nucleoplasma e citosol à medida que amadurecem (Figura 7).

Grande parte do conhecimento sobre este assunto vem se desenvolvendo nos últimos 20 anos, graças à combinação de técnicas de biologia molecular e bioquímica aplicadas a *Saccharomyces cerevisiae* (KRESSLER et al., 1999; KRESSLER et al., 2010). Esta levedura é um modelo eucarioto ideal para estudar a montagem do ribossomo e a função de fatores não ribossomais envolvidos neste processo (MENNE et al., 2007). Apesar das descobertas dos últimos anos, ainda existem muitas questões a serem solucionadas. Nesse sentido, as ribotoxinas poderiam ajudar a responder algumas delas funcionando como ferramentas para analisar a rota de

Figura 7. Biogênese dos ribossomos. A síntese de ribossomos inicia-se no nucléolo e as subunidades movimentam-se através do nucleoplasma e citosol a medida que amadurecem. As ribotoxinas poderiam ter acesso ao núcleo? Seriam capazes de clivar a SRL nos pré-RNAs 60S?



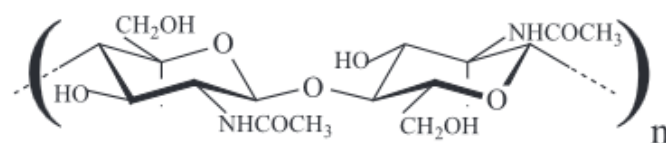
Além das ribotoxinas produzidas por fungos também foram estudadas neste projeto as quitinases, proteínas as quais possuem diversas aplicações biotecnológicas, tanto na geração de subprodutos da quitina como na área farmacêutica e agricultura, atuando especialmente como agentes antifúngicos e, portanto, nos próximos tópicos esse assunto será abordado.

2.4 Quitina e quitosana

A quitina foi observada pela primeira vez, há mais de 200 anos atrás, por Henri Braconnot como uma substância presente em cogumelos (HARTL et al, 2012). É uma molécula amplamente distribuída na natureza, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante, após a celulose, e o principal constituinte do exoesqueleto de insetos e crustáceos, nematoides e da parede celular de muitos fungos filamentosos e leveduras (BINOD et al., 2005; MACK et al, 2015).

A quitina é um polímero linear composto por resíduos de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (N-acetil-D-glicosamina ou NAG) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, predominando as unidades de NAG (Figura 8) (THIMOTEO, 2011; CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 8. Estrutura química da molécula de quitina, onde n é o grau de polimerização.

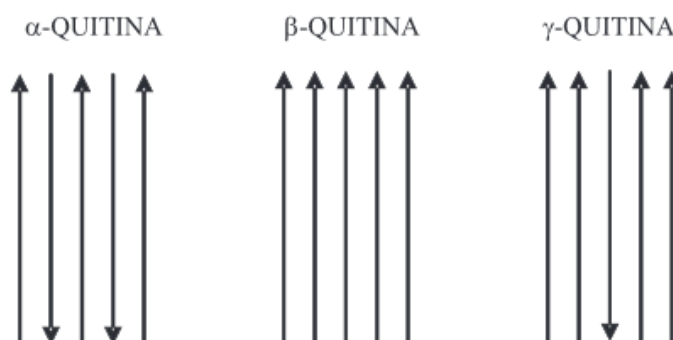


Fonte: Campana-Filho et al. (2007).

A composição da quitina, em diferentes organismos, é variável quanto ao comprimento das cadeias, conteúdo de unidades de glicosamina acetiladas e desacetiladas e sua distribuição ao longo das cadeias (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

A quitina é insolúvel em água e solventes orgânicos e sua análise através de difrações de raios X revelou que ela pode ocorrer em três formas na natureza: α -quitina, β -quitina e γ -quitina (Figura 9) (DAHIYA et al., 2006). A α -quitina corresponde a um empacotamento denso resultante da disposição antiparalela das cadeias poliméricas, o que favorece a existência de numerosas ligações hidrogênio inter e intra-cadeias na mesma folha (SEIDL, 2008). No caso da β -quitina as cadeias dispõem-se paralelamente, o que dificulta o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares e, por isso, é menos densamente empacotada. Já na γ -quitina, estrutura menos estudada e conhecida, ocorrem as duas formas de cadeias poliméricas, sendo duas cadeias paralelas e uma antiparalela (SEIDL, 2008).

Figura 9. Estruturas polimórficas de quitina: α -quitina, β -quitina e γ -quitina.



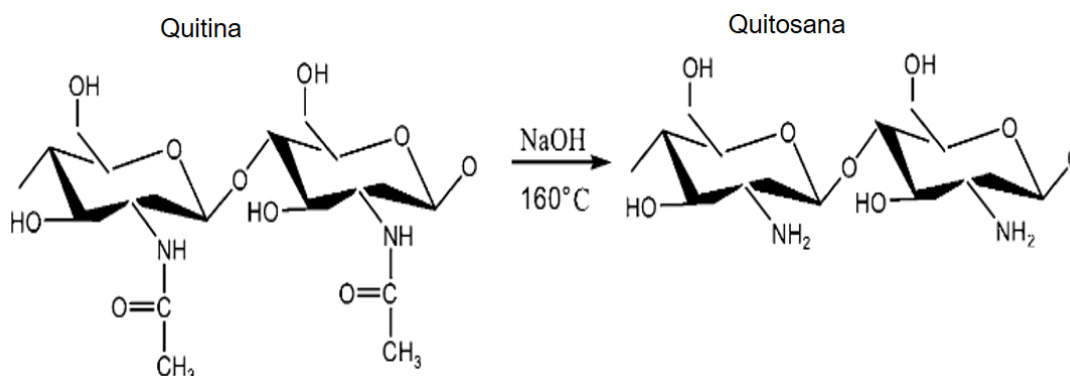
Fonte: Campana-Filho et al. (2007).

Cada uma dessas formas polimórficas parece estar relacionada com a função no organismo e com o papel que desempenham (RATHORE; GUPTA, 2015). A α -quitina, considerada a forma mais estável, é encontrada em estruturas rígidas e resistentes e fortemente associada a proteínas e/ou materiais inorgânicos, um exemplo é a quitina presente na cutícula de artrópodes. Já a β e γ quitina, ocorrem em estruturas flexíveis embora também resistentes, sendo encontradas por exemplo nas lulas, a β quitina nos gládios ou plumas, e a γ quitina na cutícula que reveste partes do estômago (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

A porcentagem de quitina encontrada em diferentes organismos também é variável, sendo a maior porcentagem encontrada em crustáceos, que representam a principal matéria-prima para a produção de quitina (RATHORE; GUPTA, 2015). As cascas secas de crustáceos são rejeitos da indústria pesqueira, e possuem cerca de 15-20% de quitina, além de proteínas, carbonato de cálcio, pigmentos e lipídeos em pequenas quantidades. A quitina é separada de outros componentes da carapaça por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteinização com soluções diluídas de ácidos e bases, respectivamente, seguida por descoloração com solvente (etanol ou acetona) ou por branqueamento (KMnO_4 , NaOCl ou H_2O_2).

A desacetilação da quitina leva à obtenção da quitosana (Figura 10), a qual difere da quitina apenas pela prevalência de unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e pela solubilidade em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos (RINAUDO, 2006; AZEVEDO et al., 2007).

Figura 10. Estrutura química da molécula de quitosana obtida a partir da desacetilação da quitina.



Fonte: Islam (2016).

Quitooligossacarídeos (QOs) são oligômeros produzidos pela hidrólise ácida ou enzimática de quitosana. Na hidrólise enzimática são utilizadas glicosil hidrolases como quitinases e quitosanases (AAM et al., 2010). Essas moléculas têm atraído considerável interesse de diversas áreas devido as suas propriedades biológicas (antitumoral, antioxidante, antiinflamatória e imunoestimulante) (LODHI et al, 2014)

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, produzidos por fontes naturais renováveis e cujas propriedades são exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há muitos anos (SILVA et al., 2006). Essas moléculas apresentam aplicações em diversas áreas como na agricultura, no tratamento de água, na área médica e farmacêutica, na cosmética e na indústria alimentícia (AZEVEDO et al., 2007).

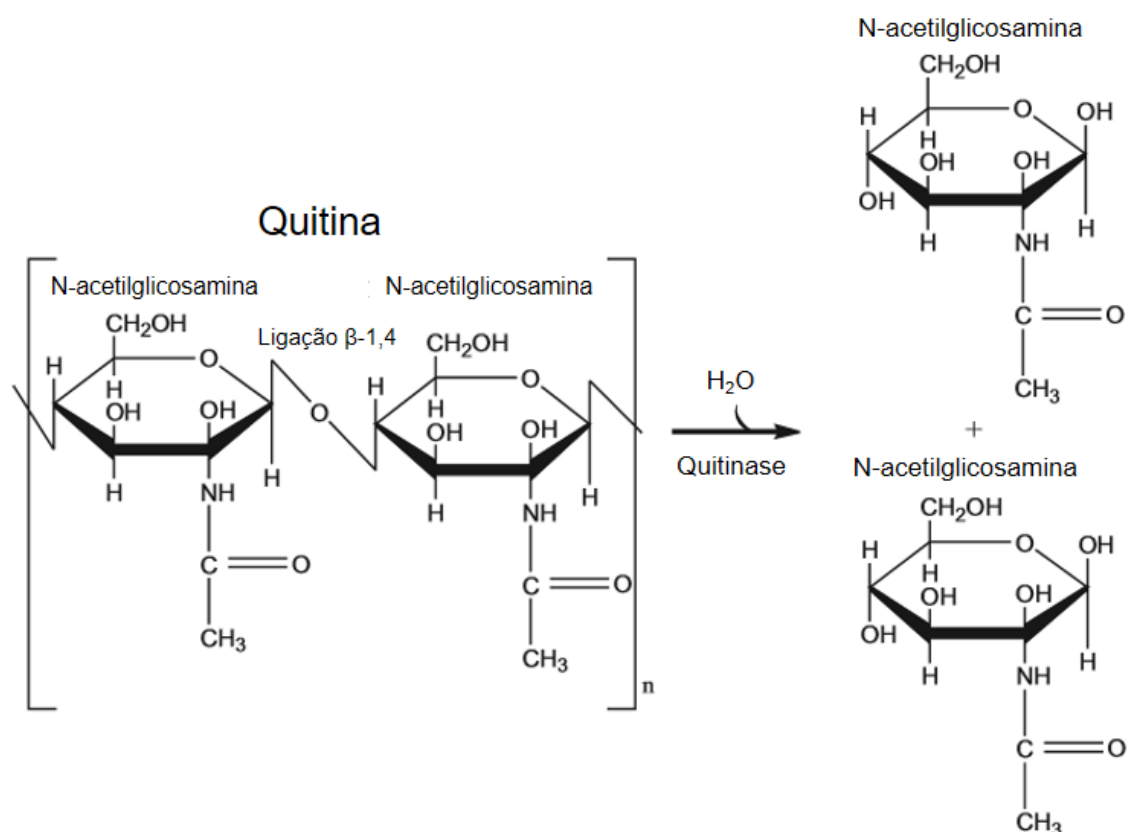
Nos últimos anos, o interesse comercial na produção de quitina, quitosana e seus derivados aumentou vertiginosamente, entretanto, os processos para obtenção da quitina e quitosana envolvem etapas químicas que fazem uso de ácidos e bases fortes, bem como o uso de solventes, gerando resíduos que causam prejuízos ambientais. Uma alternativa para diminuir os danos ambientais durante o processo de obtenção da quitina seria o uso de enzimas capazes de hidrolisar o polímero em substituição aos produtos químicos utilizados (CAMPANA-FILHO et al., 2007). Ainda assim o custo para a degradação do polímero de quitina por quitinases mesotérmicas nas indústrias ainda é muito alto (HAKI, RAKSHIT, 2003) e a hidrólise das ligações glicosídicas não é tão facilmente realizada por essas enzimas uma vez que a quitina é encontrada em suas formas cristalinas α , β e γ as quais são insolúveis em água (ROBERTS, 1988). Essa propriedade de cristalização, e conseqüentemente,

insolubilidade da quitina necessita de quitinases termoestáveis, uma vez que elevadas temperaturas diminuem a viscosidade e aumentam a solubilidade da quitina e seus produtos (KRAHE et al., 1996; HAKI, RAKSHIT, 2003).

2.5 Quitinases

As enzimas do complexo quitinolítico hidrolisam ligações β -1,4 entre unidades de N-acetil-D-glicosamina (NAG) na molécula de quitina (Figura 11), originando oligômeros e monômeros de NAG (SEIDL, 2008). Essa é uma performance extraordinária, uma vez que seu substrato, a quitina, em muitos casos é insolúvel e pode assumir diversas formas dependendo do seu papel no organismo vivo (MUZZARELLI, 2012).

Figura 11. Hidrólise da quitina pela quitinase



Fonte: Fleuri et al. (2005).

Essas enzimas são altamente conservadas em diferentes espécies e reinos, e exercem várias funções nos organismos vivos (BOOT et al., 2001; GIANFRANCESCO; MUSUMECI, 2004). Por exemplo, em leveduras e fungos elas

participam de processos de morfogênese (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998), em plantas elas tem um papel importante contra patógenos (SHARMA et al., 2011), e em insetos elas estão envolvidas em etapas de desenvolvimento e crescimento, por exemplo, durante a ecdise (muda ou eliminação do exoesqueleto) (KASPRESEWSKA, 2003; CHEN et al., 2014).

Já as quitinases humanas parecem estar relacionadas ao sistema imune frente a parasitas, com a função de ligar e hidrolisar estruturas que contenham quitina como paredes celulares, cascas de ovos, e cistos produzidos por fungos, protozoários e nematoides (FUSETTI et al., 2002; MALAGUARNERA et al., 2003). De acordo com essa ideia, um estudo demonstrou um alto nível de atividade quitotriosidase no plasma de crianças Africanas infectadas com malária aguda (BARONE et al., 2003). Estudos mostraram que algumas proteínas semelhantes a quitinase (quitinases-like) humanas apresentam a capacidade de ligar a quitina, porém não apresentam atividade catalítica, devido a mutações em seus sítios ativos (BLEAU et al., 1999; CHANG et al., 2001). Outros autores demonstraram que, a AMCase, uma quitinase humana, é adaptada para funções diferentes em tecidos específicos, sugerindo que ela tenha uma dupla função atuando no sistema imune durante inflamações asmáticas e na digestão de alimentos (ZHU et al., 2004; BOOT et al., 2005; BOOT et al., 2012).

2.5.1 Classificação e estrutura das quitinases produzidas por fungos

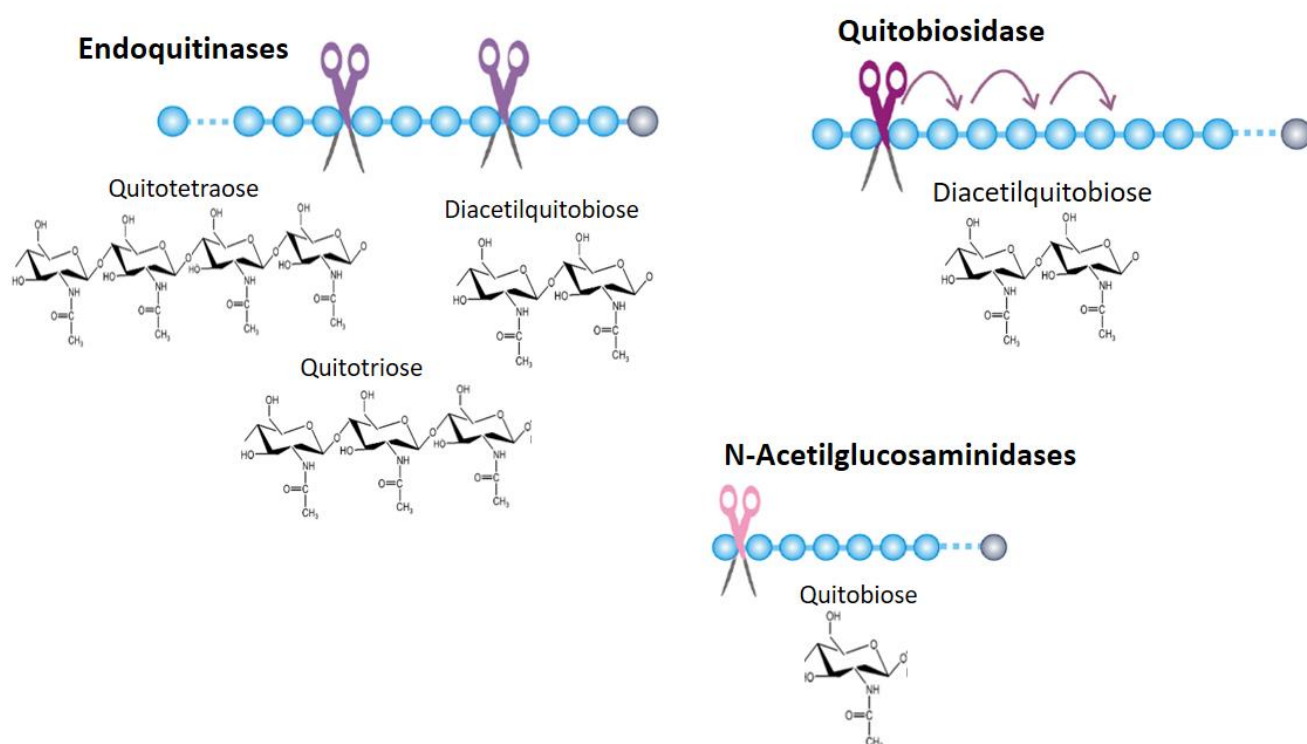
A hidrólise completa da quitina ocorre através de um complexo quitinolítico, contendo diferentes enzimas, as quais atuam de maneira sinérgica e consecutiva (PATIL et al., 2000). As enzimas quitinolíticas podem ser divididas de acordo com seus padrões de clivagem no polímero da quitina (HARMAN et al., 1993). Porém, a classificação dessas enzimas é um pouco confusa e, na ausência de um consenso, diferentes autores aceitam diferentes classificações.

Uma das nomenclaturas proposta sugere o uso do termo quitinases ao invés de enzimas quitinolíticas, e define quitinases como qualquer enzima que catalisa a clivagem do polímero de quitina (GRAHAM; STICKLEN, 1994). De acordo com essa nomenclatura as quitinases podem ser divididas em duas categorias principais: as endoquitinases e as exoquitinases (GRAHAM; STICKLEN, 1994; DUO-CHUAN, 2006; HAMID et al., 2013). As endoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam a molécula de quitina em pontos aleatórios no interior do polímero, liberando múltímeros de N-acetilglicosamina

de baixa massa (quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose), os quais são solúveis (Figura 12). As exoquitinases podem ser divididas em duas subclasses: as quitobiosidases e as β -(1,4)-N-acetilglicosaminidases. As quitobiosidases (EC 3.2.1.29) clivam a molécula de quitina a partir da sua extremidade não redutora, liberando progressivamente apenas dímeros de N-acetilglicosamina (diacetilquitobiose), sem ocorrer a liberação de mono ou oligossacarídeos (DUO-CHUAN, 2006; SEIDL, 2008). As N-acetilglicosaminidases (ou quitobiasas, EC 3.2.1.30), clivam a quitina e os multímeros gerados pelas outras quitinases (diacetilquitobiose, quitotriose e quitotetraose), liberando monômeros de N-acetilglicosamina (NAG). As N-acetilglicosaminidases atuam de uma forma exo, ou seja, a partir da extremidade não redutora da quitina e, em geral, tem alta afinidade pelos multímeros gerados pelas outras quitinases, especialmente pelos dímeros de NAG (SEIDL, 2008; HAMID et al., 2013).

As quitinases parecem ser um grupo ainda mais complexo do que propõe a classificação endo/exo. Um exemplo é a quitinase de *M. anisopliae* que apresenta ambas atividades endo e exo (SILVA et al., 2005). Já a quitobiosidase Cfcl de *Aspergillus niger* atua sobre diversos substratos liberando exclusivamente monômeros de NAG (VAN MUNSTER et al., 2012). Outro exemplo é a exoquitinase de *Paenibacillus barengoltzii*, a qual possui atividade N-acetilglucosaminidase convertendo quitina em NAG (FU et al., 2014).

Figura 12. Quitinases e seus produtos gerados a partir da hidrólise da quitina. Endoquitinases clivam a quitina aleatoriamente, liberando multímeros (diacetilquitobiose, quitotriose e quitotetraose). Quitobiosidases clivam a quitina a partir da extremidade não redutora, liberando diacetilquitobiose (dímeros de N-acetilglicosamina). N-acetilglicosaminidases clivam a quitina a partir da extremidade não redutora, liberando monômeros de N-acetilglicosamina (quitobiose). As subunidades de quitina (N-acetilglicosamina) são representados em azul claro e a extremidade redutora em azul escuro.



Fonte: Modificado de Seidl (2008); Islam et al (2016).

As quitinases pertencem a superfamília das glicosil hidrolases (GH). De acordo com esse sistema de classificação, que é baseado na similaridade das sequências de aminoácidos dos domínios catalíticos, as quitinases são membros das famílias 18, 19 e 20 das GH (HENRISSAT; BAIROCHI., 1993). As quitinases da família 18 são encontradas em bactérias, fungos, leveduras, vírus, plantas e animais, sendo uma família diversa em termos evolucionários. Os membros da família 19 são, quase exclusivamente, encontrados em plantas, sendo poucas exceções encontradas como a quitinase de *Streptomyces griseus*, *Haemophilus influenzae* e *Caenorhabditis elegans* (WATANABE et al., 1999). As quitinases das famílias 18 e 19 não compartilham similaridade em suas sequências de aminoácidos e tem estruturas

tridimensionais e mecanismos moleculares completamente diferentes (SEIDL, 2008). A família 20 consiste das β -N-acetilhexoaminidases ou β -N-acetilglicosaminidases de bactérias, fungos e humanos (DUO-CHUAN, 2006).

A maioria das quitinases produzidas por fungos pertence a família 18 das glicosil hidrolases (HENRISSAT et al., 1999). A característica dessa família é sua estrutura multidomínio, sendo geralmente, compostas por cinco domínios ou regiões: região do N-terminal contendo peptídeo sinal, domínio catalítico, região rica em serina/treonina, domínio de ligação a quitina (ChBD) e região C-terminal extensa (Figura 13) (DUO-CHUAN, 2006). Entretanto, os três últimos domínios parecem não ser necessários para a atividade quitinásica, já que diversas quitinases ativas produzidas por fungos não possuem essas regiões (KURANDA et al., 1991; YANAI et al., 1992; PETERBAUER et al., 1996).

Figura 13. Estrutura de quitinases fúngicas da família 18. (a) endoquitinase de *Saccharomyces cerevisiae*; (b) quitinase de *Rhizopus oligosporus* e (c) quitinase de *Trichoderma harzianum*. 1-região do peptídeo sinal; 2- Domínio catalítico; 3- Região rica em serina/treonina; 4- Domínio de ligação a quitina e 5- Região C-terminal.



Fonte: Duo-Chuan (2006).

Cada domínio das quitinases produzidas por fungos têm diferentes funções bioquímicas (HENRISSAT et al 1999). O peptídeo sinal intermedia a secreção da enzima e é clivado por peptidases após a proteína ser transportada através da membrana. As quitinases que não possuem essa sequência sinal para secreção são quitinases intracelulares e parecem funcionar durante a morfogênese (DUO-CHUAN, 2006). O domínio catalítico, responsável pela hidrólise do substrato, compreende a metade N-terminal da enzima, onde duas regiões altamente conservadas são encontradas: o motivo SxGG, sítio de ligação ao substrato, e o motivo DxxDxDxE, domínio catalítico (HENRISSAT et al, 1991; SEIDL et al, 2005).

Algumas quitinases produzidas por fungos, apresentam regiões ricas em serina/treonina, a qual é geralmente glicosilada com cadeias de açúcares após a tradução. Esses sítios de glicosilação podem ser necessários para a secreção da proteína e manutenção da sua estabilidade frente a proteases (KURANDA et al., 1991).

Algumas quitinases fúngicas também apresentam domínios de ligação a quitina (ChBD) (DUO-CHUAN, 2006). Esse domínio contém um motivo conservado de seis cisteínas, o qual, provavelmente, atua na estrutura terciária e na interação proteína-proteína através da formação de pontes dissulfeto (COLUSSI et al., 2005). O ChBD difere do sítio de ligação do substrato no domínio catalítico, e cada um funciona independentemente. Foi demonstrado, por exemplo, que a presença do ChBD de *S. cerevisiae* não aumenta a hidrólise de quitina e a adição de ChBD em *T. harzianum* aumenta a capacidade da sua quitinase em se ligar a quitina (KURANDA et al., 1991; LIMON et al., 2001).

A função da região C-terminal não é clara e não está presente em todas quitinases de fungos (DUO-CHUAN, 2006). Foi encontrado que, na região C-terminal de quitinases de *C. albicans* e *A. fumigatus*, existem prováveis sítios de clivagem e ancoramento de glicosilfosfatidilinositol (GPI), um glicofosfolípídeo complexo que tem por função ancorar proteínas na superfície celular, o que sugere que as quitinases desses fungos estariam ancoradas na parede celular e desempenhariam papéis durante o crescimento e a morfogênese (TAKAYA et al., 1998; JAQUES et al., 2003).

As quitinases da família 18 possuem domínios não catalítico de ligação a quitina, e um domínio catalítico do tipo barril α/β , formado por oito folhas β inclinadas em direção ao interior do mesmo, com igual número de α -hélices formando um arcabouço em forma de anel externo, o qual é considerado o centro ativo (HOLLIS et al., 2000). A catálise assistida pelo substrato é o modelo aceito para o mecanismo catalítico dessa família, o qual envolve resíduos conservados no motivo DXDXE e o grupo N-acetil do açúcar (BRAMELD et al., 1998). A reação de catálise retém a configuração anomérica do substrato, ocorrendo um mecanismo de duplo deslocamento (VAAJE-KOLSTAD et al., 2004). Primeiramente o grupo carboxila de um resíduo da enzima protona o oxigênio da ligação glicosídica, o grupo acetamido do próprio substrato age com o ataque nucleofílico formando um íon oxazolinium intermediário, sendo que uma molécula de água é destinada a hidrólise do íon, é dirigida ao carbono anomérico (VAAJE-KOLSTAD et al., 2004). O resíduo de ácido

glutâmico na posição (E171) é essencial ao mecanismo catalítico, e como demonstrado, a mutação deste resíduo, em *Coccidioides immitis*, elimina qualquer atividade enzimática (HOLLIS et al., 2000).

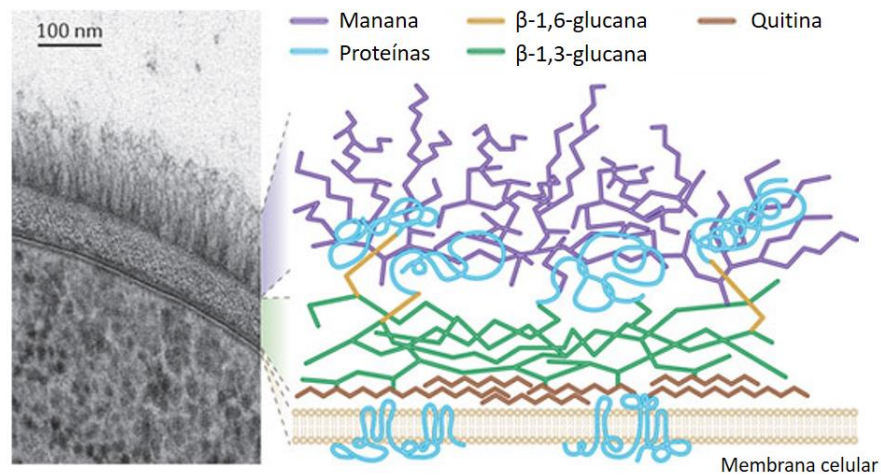
Estudos sobre as β -N-acetilglicosaminidases fúngicas, pertencentes a família 20 das GH, vêm sendo realizados nos últimos anos. Alguns genes dessas enzimas foram clonados de fungos como *T. harzianum*, *C. albicans* e *A. nidulans*, revelando que suas estruturas são compostas por peptídeo sinal, propeptídeo, domínio catalítico e segmento C-terminal (CANNON et al., 1994; PETERBAUER et al., 1996; KIM et al., 2002; PLIHAL et al., 2004).

De acordo com análises filogenéticas, as quitinases fúngicas da família 18 podem ainda ser divididas em três subgrupos: A, B e C (SEIDL et al., 2005; KARTIK et al., 2014). Os subgrupos A e B correspondem, respectivamente, as classes V (quitinases de fungos/bactérias) e III (quitinases de fungos/plantas). Esses subgrupos diferem quanto a arquitetura da sua fenda de ligação ao substrato, nas suas atividades catalíticas (endo ou exo) e também na presença de módulos de ligação a carboidratos (CBMs, *Carbohydrate-Binding Modules*) (DAHIYA et al., 2006; HARTL et al., 2012). As quitinases do subgrupo A contêm um domínio catalítico, mas não contêm domínios de ligação a quitina, e têm uma massa molecular média de 40-50 kDa. No subgrupo B as quitinases possuem domínios estruturais e tamanhos variáveis, sendo que as menores (30-45 kDa) geralmente contêm CBMs, enquanto as maiores (~90 kDa) estão ligadas a membrana plasmática. No subgrupo C estão as quitinases fúngicas com um tamanho médio de 140-170 kDa e possuem um domínio de ligação a quitina (SEIDL et al., 2008). A presença do CBM nessas enzimas permite que elas se liguem mais fortemente ao substrato de quitina insolúvel, o que aumenta sua processividade (SEIDL et al., 2008).

2.5.2 Quitinases em fungos

As células fúngicas são rodeadas por uma parede rígida que confere a estabilidade mecânica e protege a célula contra estresse ambiental (BOWMAN et al., 2006). A parede celular contém uma camada de quitina, a qual através de ligações covalentes a glucanas (β -1,3 ou β -1,6) e manana-proteínas, constituem o esqueleto estrutural da célula (Figura 14) (GOW et al., 2011).

Figura 14. Componentes da parede celular de fungos. A parede celular fúngica envolve a membrana celular e suas várias proteínas de membrana, e contém uma camada protetiva de quitina (marrom) bem como glucanas, e manana-proteínas na superfície. A parede celular de diferentes fungos contém diferentes glucanas. Por exemplo, a parede celular de *A. fumigatus* contém β -1,3 e β -1,4-glucana, e α -1,3-glucana, enquanto, *C. albicans* contém β -1,3 e β -1,6-glucana.



Fonte: Gow et al (2012).

Durante o crescimento e a morfogênese, há uma quebra dentro e entre os polímeros, realizada pela ação de quitinases ou glucanases (FLEURI; SATO, 2008). A construção de uma nova parede celular é realizada por quitina e glucana sintases as quais formam cadeias de β -1,4-N-acetilglicosamina e β -1,3-glucana, respectivamente (CABIB et al., 2001). O equilíbrio deve ser regulado para manter a plasticidade durante o crescimento celular e separação das células mães e filhas (MARTÍN-CUADRADO et al., 2003; BOWMAN et al., 2006).

Durante o brotamento de *Sacharomyces cerevisiae*, a degradação da quitina no broto leva a separação celular e envolve a atividade de uma endoquitinase extremamente glicosilada com massa molecular de 130 kDa (CABIB et al., 2001; MATSUMOTO, 2006). A inativação do gene CTS1, o qual codifica essa enzima, ou o uso de alosaminidina, leva a um defeito na separação celular e inclusive promove o crescimento de pseudohifas, o que depende da atividade da quitina sintase 1 (CABIB et al., 2001). O gene CTS2, o qual codifica outra quitinase em *S. cerevisiae*, parece ter papel durante a esporulação já que sua inativação levou a biossíntese anormal da parede celular dos esporos (CABIB et al., 2001).

O fungo *A. fumigatus* contém ao menos onze domínios de sítios-ativos conservados para quitinases (MATSUMOTO, 2006). Taib e colaboradores (2005) relataram que as quitinases ChiA1 e ChiB1 de *A. fumigatus* são diferencialmente expressas durante o crescimento do fungo. O nocaute do gene de ChiB1 não teve efeito no crescimento e morfogênese do fungo e os autores sugerem que essa enzima possa contribuir para a utilização e digestão de quitina exógena como uma fonte de nutrientes orgânicos para energia e biossíntese (TAIB et al., 2005; JAQUES et al., 2003). Muitos dos múltiplos genes de quitinases presentes nos fungos filamentosos podem codificar enzimas com papéis nutricionais ao invés de atuarem no crescimento e morfogênese desses organismos (HORSH et al., 1997).

O micoparasitismo está relacionado a produção de enzimas degradadoras da parede celular (CWDEs), como as β -1,3-glucanases, proteases e quitinases. A maioria dos genes de quitinases conhecidos e envolvidos no micoparasitismo é de espécies de *Trichoderma* como, por exemplo, os genes *chit33*, *ech42*, *chit42* e *nag1* (CARSOLIO et al., 1994; GARCIA et al., 1994; MACH et al., 1994). Em *Trichoderma*, os genes *ech42* e *prb1*, codificam uma endoquitinase e uma protease, respectivamente. São altamente expressos quando o fungo é cultivado em meio rico em quitina ou em co-cultura contendo o hospedeiro (CARSOLIO et al., 1994). Além disso, plantas transgênicas contendo o gene *ech42* apresentaram grande resistência contra vários fungos (LORITO et al., 1994), o que sugere o envolvimento direto desse gene no micoparasitismo.

O micoparasitismo é uma característica marcante das espécies de *Trichoderma* e esse processo envolve várias etapas: a) crescimento quimiotrópico, no qual um estímulo químico atrai o fungo antagonista; (b) reconhecimento específico, provavelmente mediado por lectinas na superfície celular de ambos (patógeno e antagonista); (c) ataque e enrolamento de *Trichoderma* em torno da hifa hospedeira; (d) secreção de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular do hospedeiro (HARMAN et al.; 2004). *Trichoderma atroviride* foi estudado como produtor de CWDEs e as suas mais importantes enzimas são a endoquitinase ECH42 e a N-acetilglucosaminidase NAG1, as quais estão envolvidas em mecanismos de ação primária do fungo durante o micoparasitismo (MACH et al., 1999; LUTZ et al., 2004). O micoparasita, *Stachybotrys elegans*, produz N-acetilhexoaminidase e uma quitinase, a qual apresentou similaridade com outras quitinases envolvidas no micoparasitismo de diferentes espécies de *Trichoderma* (MORISSETTE et al., 2003).

A associação de raízes de plantas com fungos micorrízicos proporciona à planta uma maior chance de encontrar recursos através da rápida colonização pelo fungo devido a sua plasticidade fisiológica e morfológica. *Hebeloma syrjense*, um fungo simbiote, secreta enzimas como quitinases, fosfatases, fitases e proteases para conversão de resíduos orgânicos como nitrogênio e fósforo (TIBBETT et al., 2002).

Fungos endofíticos são aqueles encontrados em associação com plantas e beneficiam suas hospedeiras reduzindo o ataque por insetos e animais. Um exemplo, seria a associação entre o fungo *Neotyphodium* e a gramínea *Poa ampla* (LI et al., 2005). Nessa associação uma quitinase do fungo foi detectada na planta sugerindo que seu papel pode estar envolvido na nutrição, crescimento ou defesa contra nematoides (LI et al., 2005).

2.5.3 Aplicações das quitinases

2.5.3.1 Controle de fungos fitopatogênicos

A degradação de quitina pelas quitinases na natureza revela a importância dessas enzimas na biosfera, principalmente em organismos que não contém quitina, mas utilizam essas enzimas em mecanismos de defesa, como é o caso de plantas, e no consumo de carbono e nitrogênio, e sua reciclagem no ambiente, no caso de bactérias (VAAJE-KOLSTAD, et al., 2004).

Quitinases são capazes de lisar a parede celular de diversos fungos fitopatogênicos, já que a parede celular de muitos deles possui quitina, auxiliando assim na redução de doenças fúngicas que são um problema global na agricultura. Os fungos estão entre os mais agressivos patógenos de plantas e são combatidos com um uso excessivo de fungicidas os quais causam contaminação e degradação do meio ambiente (BRZEZINSKA et al., 2012). Microrganismos produtores de enzimas quitinolíticas podem ser uma alternativa aos agentes químicos e podem ser empregados como um método natural de proteção das plantas contra fitopatógenos. Comparado aos fungicidas sintéticos, essas proteínas não contaminam o meio ambiente o que aumenta ainda mais seu interesse no uso como controle ou combate aos fitopatógenos (KARTHIK et al, 2014).

Marco e colaboradores (2000) observaram que a quitinase purificada de *Trichoderma harzianum* destruiu a parede celular de *Moniliophthora perniciosa* (anteriormente conhecida como *Crinipellis perniciosa*), o agente causador da “vassoura de bruxa” no cacaueiro (*Theobroma cacao*). Brzezinska e colaboradores (2012) observaram que a quitinase isolada de *Aspergillus niger* inibiu o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Farag e colaboradores (2014) observaram que o extrato bruto de *Aspergillus terreus* contendo quitinase inibiu o crescimento das diferentes espécies fúngicas como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium oxysporium*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporium*.

Mauch e colaboradores (1988) mostraram que a inibição *in vitro* de *Trichoderma viride* foi eficiente após a aplicação de quitinases purificadas. Diversos trabalhos têm estudado a inserção de genes de quitinases em plantas de interesse agrícola para que elas tenham uma maior resistência a microrganismos patogênicos, potencializando as defesas naturais dessas plantas durante o ataque de fungos (LIU et al., 2005; DAHIYA et al., 2006). Kumar e colaboradores (2003) estudaram os efeitos da inserção do gene de quitinase *chi11* em variedades de arroz, inoculados com *Rhizoctonia solani*, e mostraram que as plantas apresentaram grande resistência ao patógeno quando comparadas com plantas controle. Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos realizados por Roby (1990), mostrando a síntese de quitinases em tecidos de tabaco infectados com *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*. Estes resultados evidenciam a importância da aplicação de quitinases na agricultura para o controle de patógenos de plantas (KARASUDA et al., 2003).

2.5.3.2 Tratamento de resíduos industriais e produção de derivados da quitina

Outra importante aplicação das quitinases é sua utilização no tratamento de resíduos da indústria pesqueira contendo quitina para geração de produtos de maior valor agregado como a quitosana e seus oligossacarídeos (KRISHNAVENI et al., 2014). A quitosana é uma forma desacetilada da quitina, componente principal das cascas de camarão e conchas de mariscos, e os quitoooligossacarídeos são produtos da degradação da quitina e quitosana (YOUNES; RINAUDO, 2015). Nos países costeiros há um grande consumo de crustáceos, sendo somente a carne consumida e o exoesqueleto jogado fora durante o processamento, levando a um grande acúmulo

de resíduos de quitina (GHANEM et al., 2010; SALES, 2009). Krishnaveni e colaboradores (2014) descreveram a biodegradação, com sucesso, de quatro diferentes resíduos marinhos (casca de caranguejo, conchas de caramujo, casca de camarão e escamas de peixe) quando utilizados para produção de quitinases por *Aspergillus terreus*.

Além da produção de quitosona e N-acetilglicosaminas, as quitinases, em suas aplicações biotecnológicas podem ser empregadas para a elaboração de quitoooligossacarídeos (QUOs) (DAHIYA et al., 2006). Essas moléculas têm atraído o interesse devido a suas atividades biológicas e potencial aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, na agricultura e meio ambiente. Estudos recentes indicam seus efeitos hipocolesterolêmico, antimicrobiano, imunoestimulante, antitumoral e anticâncer, na aceleração da absorção de cálcio e ferro e anti-inflamatório, entre outras (XIA et al., 2011). A produção comercial de quitoooligossacarídeos é bem estabelecida para fins científicos. Algumas empresas comercializam diversos produtos derivados da degradação da quitina como, por exemplo, quitobiase, quitoooligossacarídeos, glicosamina e N-acetilglicosamina para instituições de pesquisa.

2.5.3.3 Controle de larvas

Alguns autores descreveram o potencial inseticida e larvicida das enzimas quitinolíticas. Regev e colaboradores (1996) desenvolveram linhagens de *E. coli* recombinantes capazes de produzir uma proteína com atividade inseticida (Crylc, de *Bacillus thuringiensis*), e uma quitinase (*Serratia marcesens*), as quais apresentaram um efeito sinérgico contra larvas de *Spodoptera littoralis*, sendo a toxicidade de Crylc maior com a adição da quitinase.

Shaikh e Desphande (1993) mostraram que o fungo saprofítico *Myrothecium verrucaria* (Alb. & Schwein.) Ditmar, produz um complexo enzimático de degradação da cutícula de insetos. Este complexo enzimático, composto principalmente por quitinases, foi utilizado por Mendonsa e colaboradores (1996) para avaliar a morte de larvas de *Aedes aegypti*, sendo observado que o Tempo Letal (TL50) chega a 100% dentro de 48 e 120 h, respectivamente, para o primeiro e quarto estágios larvar do mosquito.

2.5.3.4 Aplicações farmacêuticas/médicas

Algumas preparações oftálmicas, como em manipulações farmacêuticas de colírios para infecções fúngicas, são suplementadas com quitinases e antibióticos, potencializando o efeito inibitório e destrutivo dos fungos patogênicos (DAHIYA et al., 2006). A aplicação terapêutica de quitinases em fármacos, loções e cremes de uso tópico como antifúngicos foram estudados por Pope e Davis (1979) e por Orunsi e Trinci (1985). Estes produtos farmacêuticos suplementados com quitinases e/ou outras enzimas que degradam parede celular de fungos, como as β -glucanases, podem ser comercializados em farmácias de manipulação, melhorando o efeito dessas drogas em doenças fúngicas (DAHIYA et al., 2006).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a prospecção de proteínas bioativas secretadas por diferentes espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e avaliar suas possíveis atividades biológicas antimicrobianas e inibidora da proliferação de células tumorais.

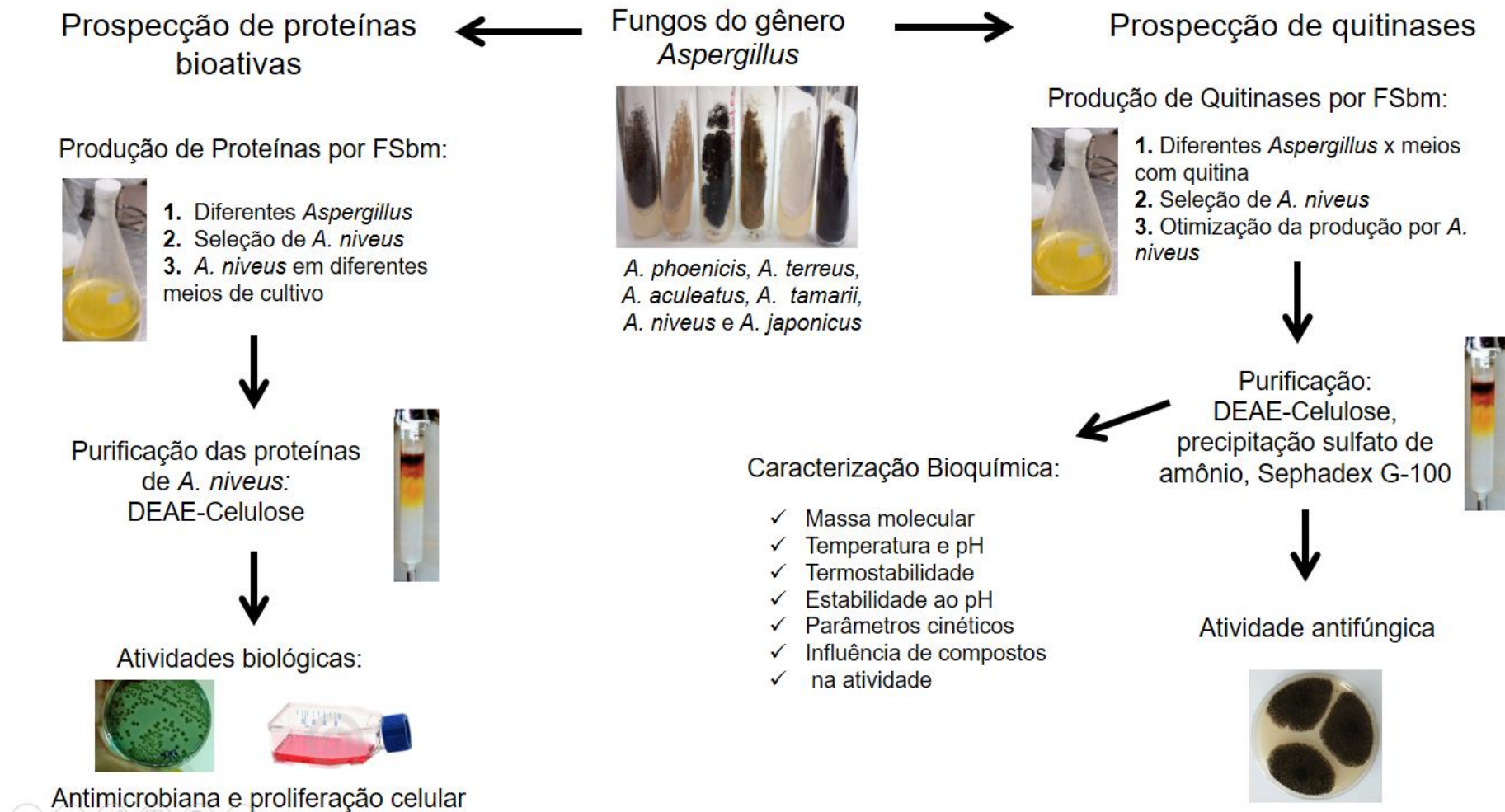
3.2 Objetivos específicos

- Seleção da linhagem de *Aspergillus* com maior potencial para produção de proteínas de interesse biotecnológico;
- Padronização e otimização da produção de proteínas pela linhagem de *Aspergillus* selecionada;
- Purificação das proteínas por cromatografia de troca iônica e/ou exclusão molecular;
- Avaliação de atividades biológicas (antifúngica, antibacteriana e proliferação celular frente a linhagens tumorais) utilizando os filtrados e frações purificadas.
- Seleção da linhagem de *Aspergillus* com maior potencial para produção de quitinases;
- Padronização e otimização da produção de quitinases pela linhagem de *Aspergillus* selecionada;
- Purificação das quitinases por cromatografia de troca iônica e/ou exclusão molecular;
- Avaliação da atividade antifúngica das quitinases.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP - USP). A Figura 15 descreve simplificadaamente os procedimentos realizados no presente trabalho.

Figura 15. Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho

Fonte: Autora.

4.1 Linhagens fúngicas utilizadas

Foram utilizadas 6 espécies do gênero *Aspergillus*: *A. niveus*, *A. terreus*, *A. tamarii*, *A. japonicus*, *A. aculeatus* e *A. phoenicis*, disponíveis na coleção de culturas de fungos filamentosos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

4.2 Manutenção das cepas em laboratório

As linhagens fúngicas foram mantidas em tubos de ensaios contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) inclinado e previamente autoclavados a 121 °C, 1 atm, por 15 min. Os meios foram inoculados retirando-se, com auxílio de uma alça de platina, uma pequena quantidade de esporos de um cultivo estoque de cada fungo. Os cultivos foram mantidos a 30°C por até 7 dias e posteriormente estocados em geladeira (4°C). Repiques periódicos foram realizados a cada 30 dias.

4.3 Obtenção das culturas de diferentes espécies de *Aspergillus* em meio YPD

Tubos de ensaio contendo os cultivos das espécies de *Aspergillus* foram adicionados com 10 mL de água destilada autoclavada e por raspagem superficial das culturas foram obtidas suspensões de esporos. Em seguida, frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio YPD (LEE et al., 1999), com pH ajustado para 6,0, previamente autoclavados (121 °C, 1 atm, 15 min) foram inoculados com a suspensão de esporos, sob condições assépticas, de modo a se obter uma concentração final de 10⁵ esporos/mL em cada frasco. As culturas foram então incubadas a 30°C, por diferentes períodos (24 a 240 h), sob agitação orbital de 100 rpm.

4.3.1 Obtenção dos filtrados dos cultivos

O filtrado bruto extracelular, obtido após o cultivo de cada linhagem fúngica, foi separado da massa micelial por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº1 em funil de Bunchner. O filtrado bruto extracelular resultante foi utilizado para quantificação de proteínas totais.

4.3.2 Quantificação de proteínas totais

Para a determinação da concentração protéica dos filtrados de cada cultivo foi utilizado o reagente “Bradford” (BioRad), baseado no método de Bradford (1976) seguindo as especificações do fabricante e utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As leituras referentes à concentração de proteínas totais foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm e expressas em mg de proteína por mL de amostra.

4.3.3 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE

Os perfis proteicos de algumas amostras foram analisados por SDS-PAGE, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970).

Alíquotas de cada amostra analisada foram liofilizadas, em seguida ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl 40 mM pH 6,8; glicerol 8%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e DTT 200 mM), incubadas a 96 °C por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel de empacotamento continha acrilamida:bis-acrilamida (30:1) 5%; Tris-HCl 380 mM pH 6,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 1 µL/mL de TEMED e o gel de separação acrilamida:bis-acrilamida (30:1) 10%; Tris-HCl 380 mM pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; 0,4 µL/mL de TEMED. O gel foi submetido a voltagem de 120 V, 40 mA, em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%), por aproximadamente 45 minutos.

Após a corrida os géis foram corados em solução de Coomassie Blue R (Coomassie Brilliant Blue R 0,25% (m/v) em metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)) por 30 minutos e descorados em solução descorante (etanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)). Alternativamente, os géis foram corados com Blue Silver conforme descrito por Candiano e colaboradores (2004). Após descoloração, os géis obtidos foram fotografados com câmera fotográfica com resolução de 16 MP e abertura F/2,0.

As proteínas de baixa massa molecular (<25 kDa) presentes no filtrado de *A. niveus* foram recortadas do gel de SDS-PAGE e utilizadas para análise por espectrometria de massas.

4.4 Prospeção de proteínas bioativas secretadas por *Aspergillus niveus* em diferentes meios de cultivo

A prospecção de proteínas bioativas produzidas pelo fungo selecionado, *Aspergillus niveus*, foi realizada em diferentes meios de cultivo¹. Foram utilizados meios de cultivo Khanna (KHANNA et al., 1995), Adams (ADAMS, 1990), Czapeck (WISEMAN, 1975), SR (RIZZATI et al., 2001), M5 (PERALTA et al, 1990) ou meio mínimo - MM (HILL, 2001), em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio, com pH ajustado para 6,0. Os meios foram previamente autoclavados a 121 °C, 1 atm, por 15 min e inoculados com uma suspensão de esporos, de modo a obter uma concentração final de 10⁵ esporos/mL. As culturas foram então incubadas a 30°C por diferentes períodos (120 e 240 h) e sob agitação orbital de 100 rpm.

Os filtrados obtidos com os diferentes meios de cultivo, nos períodos de cultivo de 120 h e 240 h, após diálise, foram analisados por SDS-PAGE 12%. Para tanto, alíquotas de cada filtrado obtido foram liofilizadas e submetidas à SDS-PAGE, seguindo o protocolo citado anteriormente (Item 4.3.3).

4.4.1 Purificação de proteínas secretadas por *Aspergillus niveus*

O filtrado obtido da cultura de *A. niveus* em meio YPD por 120 h de cultivo, após ser dialisado por 24 h (4°C) contra água destilada, foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (2 x 12 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,0). Após aplicação de 200 mL da amostra, as proteínas foram eluídas por gradiente linear de 0 a 1,5 M de NaCl em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,0) e frações de 3 mL foram coletadas com vazão constante de 1 mL/min. As amostras coletadas foram utilizadas para leitura da absorbância a 280 nm e para determinação da concentração de proteínas como descrito anteriormente. As frações contendo proteínas foram reunidas em *pools*, dialisadas por 24 h (4°C) contra água destilada. Alíquotas de cada *pool* proteico foram liofilizadas para análise por SDS-PAGE ou precipitadas para análise por espectrometria de massas.

¹ A composição dos meios de cultivos é descrita detalhadamente nos Anexos.

4.4.2 Análise de proteínas por espectrometria de massas

As proteínas de interesse foram submetidas a análise por espectrometria de massas para possível identificação das proteínas presentes em extratos brutos ou frações purificadas. Duas metodologias diferentes (remoção da banda protéica do gel de SDS-PAGE ou precipitação de proteínas com ácido tricloroacético) foram utilizadas para o preparo das proteínas. O preparo das amostras foi realizado no laboratório de desenvolvimento deste projeto e a análise por espectrometria de massas realizada em colaboração com Prof. Dr. José César Rosa, Hemocentro, USP, Ribeirão Preto.

4.4.2.1 Preparo de proteínas removidas de SDS-PAGE

As proteínas de baixa massa molecular (<25 kDa) presentes no filtrado bruto de *A. niveus*, obtido em meio YPD por 120 h, observadas no gel de SDS-PAGE 10% foram recortadas do gel com uma lâmina esterilizada e o *spot* submetido a lavagem para remoção do Coomassie. Para lavagem o *spot* proteico foi transferido para um microtubo e foram adicionados 1000 µL de solução (1:1) de bicarbonato de amônio (0,1M pH 8,0) e acetonitrila, seguido por incubação por 24 h a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi removida e foram adicionados 200 µL de acetonitrila, incubando-se por 2 h a temperatura ambiente para desidratação do *spot*. Após a incubação, a acetonitrila foi removida e o *spot* mantido a temperatura ambiente, até que todo o resíduo de acetonitrila secasse completamente. Em seguida as proteínas foram submetidas a digestão com tripsina.

4.4.2.2 Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA)

As proteínas presentes em cada *pool* (I e II), obtidas na cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose), foram precipitadas com 20 % de TCA (ácido tricloroacético, Sigma) e submetidas ao processo de digestão com tripsina.

4.4.2.3 Digestão das proteínas com tripsina e análise por espectrometria de massas

As proteínas presentes no *spot* recortado do gel e previamente lavado e, também, as proteínas dos picos de purificação previamente precipitadas, foram digeridas com

adição de 0,5 µg de tripsina (Promega) + 17 µL de tampão bicarbonato de amônio 0,1M pH 8,0. Depois da digestão os peptídeos foram aplicados em coluna de fase reversa poros 50 R2 (PerSeptive Biosystems). Os peptídeos purificados foram hidratados em 6 µL de solução matriz (5 mg mL⁻¹ ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetronitrila e 0,1% de ácido trifluoracético (v/v). Após a hidratação, 2 µL de cada amostra foram aplicados na placa de MALDI-TOF/TOF (Axima Performace, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). Os perfis MS/MS obtidos de cada *spot* digerido foram analisados utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e o banco de dados SwissProt. Alguns dos peptídeos identificados por espectrometria de massas foram alinhados no programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) com sequências de ribotoxinas já conhecidas (α-sarcina, restrictocina e Asp1).

4.5 Ensaios antimicrobianos

4.5.1 Microrganismos

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 6538). A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* foi realizada frente aos microrganismos *Aspergillus nidulans* e *Trichophyton rubrum*.

Os ensaios antibacterianos e antifúngico frente a *A. nidulans* foram realizados no próprio laboratório de desenvolvimento deste projeto utilizando-se linhagens disponíveis na nossa coleção de microrganismos. Já os ensaios com *T. rubrum* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos (UNESP) em colaboração com a Prof.^a Dra. Rosemeire Pietro.

4.5.2 Preparo das amostras

As seguintes amostras foram utilizadas para avaliação das atividades antimicrobianas: os filtrados dos cultivos de *A. japonicus*, *A. phoenicis*, *A. tamaritii*, *A. aculeatus* em meio YPD por 120 h; os filtrados brutos obtidos dos cultivos de *A. niveus* nos meios YPD, Czapek, SR, Khanna, Meio Mínimo e M5 por 120 e 240 h e as frações

I e II obtidas na purificação, das proteínas de *A. niveus* cultivado em meio YPD por 120h, em DEAE-Celulose.

Para dissolução das amostras, foram utilizados microtubos tipo Eppendorf e como solvente utilizou-se água ultra-pura autoclavada. Os filtrados dos cultivos, previamente liofilizados, foram dissolvidos a uma concentração de 100 mg/mL (massa seca). A partir dos filtrados dissolvidos em água, prepararam-se soluções mãe em meio RPMI ou MM (Meio Mínimo), de modo a obter uma concentração de 4 mg/mL, para *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus nidulans*, respectivamente, e outra solução mãe em meio MH (Mueller Hinton) na concentração de 4 mg/mL para ensaios com bactérias.

4.5.3 Preparo dos antifúngicos

Os antifúngicos miconazol e anfotericina B foram utilizados como controles, respectivamente, nos ensaios antifúngicos frente a *A. nidulans* e *T. rubrum*. Foram preparadas soluções estoques de ambos antifúngicos em DMSO em concentrações iniciais de 1,6 mg/mL para anfotericina B e 1,0 mg/mL para miconazol. Antes de ser aplicada na placa, a solução de anfotericina B foi diluída na proporção de 1:25 (V/V) em meio RPMI e a solução de miconazol foi diluída na proporção de 1:10 (V/V) em meio mínimo.

4.5.4 Preparo dos antibióticos

Os antibióticos penicilina G e estreptomicina foram utilizados como controles, respectivamente, nos ensaios antimicrobianos frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Foi preparada solução estoque de ambos antibióticos em água destilada numa concentração inicial de 0,5 mg/mL, sendo diluída na proporção de 1:10 (V/V) em meio MH antes de aplicar à placa.

4.5.5 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana dos filtrados, frações purificadas e padrões comerciais foi realizada segundo metodologia preconizada pelo *Clinical and*

Laboratory Standards Institute (CLSI) norma aprovada M7-A9 (2012), com modificações. O método utilizado foi a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em microplacas. O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller Hinton (MH).

4.5.5.1 Preparo do inóculo

Para realização dos ensaios utilizaram-se suspensões bacterianas padronizadas a partir de uma cultura de 24 h de crescimento em caldo Mueller Hinton. Alíquotas de 100 µL do cultivo crescido foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de solução salina 0,9% autoclavada até a obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias UFC/mL). Em seguida, para o preparo do inóculo, 100 µL da solução salina contendo as bactérias foram adicionados a 9,9 mL de caldo Mueller Hilton. A solução foi homogeneizada antes de ser aplicada nos poços da microplaca.

4.5.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os poços das microplacas foram preenchidos com 100 µL de caldo MH e, em seguida foram adicionados 100 µL das soluções dos filtrados, frações purificadas ou substâncias padrões avaliadas. Em seguida procedeu-se a diluição seriada até o último poço da microplaca, permitindo a obtenção de concentrações entre 0,97 a 1000 µg/mL para as amostras. Para os antibióticos padrões foram obtidas as concentrações de 0,012 a 12,5 µg/mL. Após adição das amostras, a cada poço foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana, exceto nos controles de amostra e esterilidade do meio. Como controles foram realizados o controle de esterilidade dos filtrados e frações, o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano e o controle do solvente utilizado para solubilizar as amostras e antibióticos.

As microplacas foram incubadas em estufa de cultura, a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação foram retiradas alíquotas de cada poço, utilizando-se a ponta de palitos esterilizados, e semeadas em placas de cultura contendo ágar MH. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para determinação da CBM.

Após o período de incubação, foi determinada a CIM a qual indica a concentração de amostra para qual houve inibição de crescimento. A CIM foi determinada através de leitura visual e, em seguida, por revelação com resazurina. Foram adicionados 30 μ L de solução de resazurina, na concentração de 0,01%, a cada poço da microplaca. Foram considerados positivos para ação antibacteriana os poços que não apresentaram turvação (leitura visual) ou mudança de coloração de azul para rosa (resazurina), indicando assim, ausência de crescimento bacteriano. A menor concentração onde não se observou mudança de coloração foi considerada a CIM.

Foram consideradas como CBM, as menores concentrações capazes de inibir definitivamente o crescimento bacteriano, com base em alíquotas dos poços onde não houve crescimento na determinação da CIM, os quais foram semeados em placas de cultura contendo ágar MH, conforme descrito anteriormente.

4.5.6 Atividade antifúngica pela técnica de diluição em microplacas

Para o fungo dermatófito *T. rubrum* a avaliação da atividade antifúngica dos filtrados, frações purificadas e padrões comerciais foi realizada segundo metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma aprovada M38-A2 (2008) para fungos filamentosos, com modificações. O método utilizado foi a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em microplacas. O meio de cultivo utilizado para realização dos experimentos foi o caldo RPMI-1640, com glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado com [ácido 3-(N-morfolino) - propanosulfônico] MOPS), pH 7,0.

Para o fungo, *A. nidulans*, a avaliação da atividade antifúngica dos filtrados, frações purificadas e padrões comerciais foi realizada seguindo a metodologia descrita por Mania e colaboradores (2010) para o *screening* de peptídeos antifúngicos, com modificações.

4.5.6.1 Preparo do inóculo

A linhagem de *T. rubrum* foi cultivada em placas com ágar Sabouraud por 7 dias e a linhagem de *A. nidulans* foi cultivada em placas com PDA por 4 dias. Após o

desenvolvimento, colônias foram removidas com auxílio de uma alça de platina, desgrudando-as do meio e colocando-as em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% esterilizada. Após esse procedimento, misturou-se, em vortex. Os esporos foram contadas em câmara de Neubauer e o número de esporos foi ajustado para que se obtivesse uma concentração final de $5,0 \times 10^3$ esporos em meio RPMI para *T. rubrum* ou a uma concentração final de 10^4 em meio mínimo para *A. nidulans*. As suspensões foram homogeneizadas antes de serem aplicadas nas microplacas.

4.5.6.2 Determinação da CIM frente a *T. rubrum* e *A. nidulans*

Os poços das microplacas foram preenchidos com 100 µL de meio RPMI (*T. rubrum*) ou MM (*A. nidulans*) e, em seguida, foram adicionados 100 µL das soluções dos filtrados, frações ou substâncias padrões a serem avaliadas. Procedeu-se a diluição seriada até o último poço da microplaca, permitindo a obtenção de concentrações entre 0,97 a 1000 µg/mL para as amostras. Para os antifúngicos padrões foram obtidas as concentrações de 0,015 a 16 µg/mL para anfotericina B e de 0,02 a 25 µg/mL para miconazol. Após adição das amostras, a cada poço foram adicionados 100 µL de suspensão fúngica, exceto nos controles de amostra e esterilidade do meio.

Como controles foram realizados o controle de esterilidade dos filtrados e frações, o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano e o controle do solvente utilizado para solubilizar as amostras e antifúngicos.

Para os experimentos com *T. rubrum*, as microplacas foram incubadas em estufas de cultura a 28 °C, com agitação de 80 rpm, por 7 dias. Para os experimentos com *A. nidulans*, as microplacas foram incubadas em estufas de cultura, a 30 °C, por 48 h, sem agitação.

Após o período de incubação, foi realizada a determinação da CIM, através de leitura visual e, em seguida, por revelação com resazurina. Foram adicionados 30 µL de solução de resazurina, na concentração de 0,01% (m/v), a cada poço da microplaca. Foram considerados positivos para ação antifúngica os poços que não apresentaram turvação e/ou crescimento micelial (leitura visual) ou mudança de coloração de azul para rosa (resazurina), indicando assim, ausência de crescimento fúngico. A menor concentração onde não se observou mudança de coloração foi considerada a CIM.

4.5.7 Atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar

A avaliação da atividade antifúngica também foi realizada pela técnica de difusão em ágar seguindo a metodologia descrita por Farag e colaboradores (2016). As amostras utilizadas foram o filtrado de *A. niveus* em meio YPD por 120h e os *pools* I e II obtidos na purificação de proteínas de *A. niveus* em DEAE-Celulose. Após liofilização 100 mg de cada amostra foi solubilizada em 1 mL água autoclavada, originando uma solução na concentração 100 mg/mL. Como controle da inibição de crescimento foi utilizada uma solução de miconazol 50 µg/mL. Suspensões de esporos 10^4 dos fungos *Aspergillus niger* ou *Aspergillus fumigatus* foram espalhados, com auxílio de um *swab*, por placas de Petri contendo meio BDA, poços de 1 cm foram perfurados nos meios com auxílio de ponteiros autoclavados e 300 µL das amostras e 20 µL do antifúngico controle foram aplicadas em diferentes poços nas placas. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. O diâmetro do halo de inibição obtido foi anotado.

4.6 Efeito das ribotoxinas na proliferação celular de linhagens tumorais

Os ensaios de proliferação celular foram realizados no laboratório de Pediatria do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em colaboração com a Prof.^a Dra. María Sol Brassesco.

4.6.1 Linhagens celulares e condições de cultura

A avaliação da proliferação celular *in vitro* foi realizada frente as linhagens celulares tumorais T98G-glioblastoma, HOS-osteossarcoma, HT144T-melanoma, ONS-meduloblastoma, e frente a linhagem de células normais MRC5 fibroblasto.

As linhagens celulares HT144T e ONS foram mantidas em meio RPMI e as linhagens T98G, HOS e MRC5 foram mantidas em meio HAM F10 (Gibco BRL, Life Technologies®), ambos, suplementados com 10% de SBF (Soro fetal bovino), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina. As linhagens foram cultivadas em garrafas para cultura celular em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37 °C.

4.6.2 Preparo das amostras

As amostras avaliadas nos ensaios de proliferação celular foram o filtrado do cultivo de *A. niveus* obtido em meio YPD 120 h, o filtrado do cultivo de *A. niveus* obtido em meio M5 120 h e o pico I obtido na cromatografia em DEAE-Celulose. Estas amostras após diálise por 24 h a 4°C, foram liofilizadas e a massa seca obtida utilizada nos ensaios. Conforme descrito anteriormente tais cultivos e o pico I possuem uma pequena proteína identificada como ribotoxina e, por isso, essas amostras foram escolhidas para avaliação do seu potencial frente a linhagens tumorais.

Para tanto, uma solução estoque de 1 mg/mL (massa seca) de cada amostra foi preparada em água Milli-Q esterilizada e estocada em alíquotas a -80 °C. As amostras foram adicionadas ao meio de cultura imediatamente antes de serem aplicadas nas células, obtendo-se as concentrações finais de 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL das amostras nas microplacas.

4.6.3 Ensaio de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada por coloração com Giemsa. Para o ensaio de proliferação, as linhagens foram semeadas em densidades iniciais de 2×10^3 células em microplacas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24 h. Após este período, as células foram lavadas com PBS 1X e tratadas adicionando-se o meio com diferentes concentrações das amostras (2,5 a 20 µg/mL) ou meio sem adição amostra (controle). A partir deste ponto, considerado o tempo zero, a proliferação celular foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.6.4 Análise da proliferação celular por coloração com Giemsa

Para verificar os resultados de inibição do crescimento obtido, foram realizados ensaios de proliferação pelo método de coloração em Giemsa, seguindo-se a metodologia descrita por Galfi e colaboradores (2005), com modificações. Para tanto as células presentes nas microplacas foram lavadas adicionando-se 100 µL de PBS 1X. Após a remoção do tampão as células foram fixadas com 100 µL de metanol por

15 minutos, sendo descartado em seguida. As placas foram armazenadas a temperatura ambiente para evaporação dos resíduos de metanol. Após a fixação, as células foram coradas com Giemsa (1%) e descoradas em solução metanol:ácido acético (1:3). O valor de absorbância de cada poço, foi determinado a 655 nm utilizando o leitor iMark Microplate Absorbance reader (BioRad). Os experimentos foram realizados em triplicatas em momentos diferentes.

4.6.5 Análise Estatística

Para análise dos resultados foi utilizada a análise de variância ANOVA (*two-way*), acompanhado do pós-teste não paramétrico de Bonferroni. Todos os testes incluíram comparações com amostras não tratadas. A significância estatística foi indicada como * $P < 0,05$. Os resultados são apresentados como o valor da média $\pm$ desvio padrão (DP). As porcentagens de proliferação celular foram apresentadas graficamente em forma de histogramas usando o programa GraphPad Prism versão 7.0.

4.7 Prospecção de quitinases produzidas por diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus*

Quitinases são enzimas com ampla aplicação biotecnológica e conhecidas por suas variadas atividades biológicas. Devido ao potencial dessas enzimas, principalmente a sua potente atividade antifúngica, uma nova abordagem foi realizada neste projeto a fim de rastrear a produção de quitinases produzidas pelas espécies *A. niveus*, *A. terreus*, *A. tamarii*, *A. phoenicis* e *A. aculeatus*. Para tanto as linhagens foram cultivadas inicialmente em diferentes meios de cultivo suplementados com quitina de casca de caranguejo (Sigma).

4.7.1 Cultivos para produção de quitinases por fungos do gênero *Aspergillus*

Para a seleção de linhagens produtoras de quitinases, os fungos *A. niveus*, *A. terreus*, *A. tamarii*, *A. aculeatus* e *A. phoenicis* foram inoculados em 7 diferentes meios de cultivos: meio Khanna (KHANNA et al., 1995), meio Czapeck (WISEMAN, 1975),

meio SR (RIZZATI et al., 2001), meio YPD (LEE et al., 1999), meio Adams (ADAMS, 1990), meio M5 (PERALTA et al, 1990) e meio mínimo - MM (HILL, 2001), contendo 1% de quitina de casca de caranguejo (Sigma) como fonte adicional de carbono. As culturas foram mantidas a 30 °C, sob agitação orbital de 100 rpm, por 96 h.

Após cultivo os filtrados extracelulares, de cada cultivo, foram separados da massa micelial por filtração a vácuo em funil de Buchner utilizando papel de filtro Whatman nº 1, e utilizados para quantificação de proteínas de acordo com Bradford, e para determinação da atividade quitinásica.

4.7.2 Determinação da atividade quitinásica

A determinação da atividade quitinásica foi realizada utilizando-se 1 mM do substrato sintético 4-nitrofenil-N-Acetil- β -D glucosaminideo (NP-GlcNAc) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A mistura da reação foi constituída de 200 μ L da solução de substrato e 200 μ L de amostra. Após incubação da reação na temperatura de 40 °C esta foi interrompida, em diferentes intervalos de tempo, adicionando-se 1 mL de NaOH 1M. O branco consistiu de 200 μ L da solução de substrato + 1 mL de NaOH e, posteriormente, a adição de 200 μ L de enzima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O paranitrofenolato liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de substrato, por minuto, nas condições do ensaio. A atividade específica (U/mg de proteína) foi calculada pela razão da atividade da enzima (U/mL) e o teor de proteína (mg/mL).

4.7.3 Influência da concentração de quitina e tempo de cultivo para produção de quitinases por *A. niveus*

Para otimização da produção de quitinases por *A. niveus*, espécie que demonstrou maior produção de quitinases, foram realizadas variações na concentração de quitina presente no meio e no tempo de cultivo. Para tanto, as concentrações de quitina de casca de caranguejo (Sigma) utilizadas foram 0,5%, 1%, 1,5% e 2%, sendo os cultivos incubados por diferentes períodos: 48, 96, 144, 192 e 240 horas a 30 °C sob agitação orbital constante de 100 rpm.

4.7.4 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE

Os perfis proteicos dos filtrados de *A. niveus* obtidos em diferentes meios de cultivo e dos filtrados obtidos em meio mínimo contendo 1% de quitina foram analisados por SDS-PAGE 12%, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970) e citado anteriormente no Item 4.3.3. O processo de purificação que será descrito no Item 4.8 também foi acompanhado por SDS-PAGE 12%.

4.7.5 Análise da quitinase por espectrometria de massas

A proteína intensamente secretada observada no gel SDS-PAGE 12%, foi submetida à identificação por espectrometria de massas. Para tanto a banda proteica foi recortada do gel, e submetida a preparação como descrito anteriormente (Item 4.4.2.3), para identificação de proteínas por MALDI-TOF/TOF. O MS/MS obtido foi analisado utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e o banco de dados SwissProt.

4.8 Purificação da quitinase secretada por *A. niveus*

Para purificação da quitinase secretada por *A. niveus* cultivado em meio mínimo (+ 1% quitina) por 192 horas de cultivo, foram utilizadas diferentes estratégias utilizando-se combinações entre diferentes metodologias como precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose) e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100). As estratégias utilizadas foram:

- Cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose) + Cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100),
- Precipitação com sulfato de amônio (80%) + Cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100)

Cada uma das técnicas é descrita a seguir.

4.8.1 Precipitação com sulfato de amônio

As quitinases presentes no filtrado extracelular de *A. niveus* (meio mínimo adicionado com 1% quitina, 192 h) foram precipitadas pela adição de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ao sobrenadante (0-80% de saturação), como descrito por England e Seifter (1990). Após incubação por 16 h a 4 °C, a suspensão foi centrifugada a 10.000 x *g*, por 20 min, a 4 °C, e o sedimento foi ressuspenso em 3 mL de tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. A solução foi dialisada por 24 h contra água destilada a 4 °C.

4.8.2 Purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose)

O filtrado obtido do cultivo de *A. niveus* (MM + 1% quitina, 192 h) foi submetido à cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose (2,5 x 11 cm) pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0. Após aplicação de 200 mL da amostra, as proteínas foram eluídas por gradiente de 0 a 1,5 M de NaCl em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 e frações de 3 mL foram coletadas, sendo a vazão mantida em 1,5 mL/min. As frações coletadas foram utilizadas para leitura da absorbância a 280 nm e determinação da atividade quitinásica. As frações que apresentaram atividade quitinásica foram reunidas em um único *pool*, dialisadas por 24 h (4 °C) contra água destilada, liofilizadas e analisadas por SDS-PAGE 12%.

4.8.3 Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100)

O *pool* que apresentou atividade quitinásica obtido na cromatografia de troca iônica e as proteínas precipitadas com sulfato de amônio, após diálise e liofilização, foram solubilizado em solução tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0 e aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100 (1 x 60 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Frações de 1 mL foram coletadas, sendo a vazão mantida em 150 µL/min. Foram realizadas a leitura de absorbância a 280 nm e a determinação da atividade quitinásica em cada fração. As frações que apresentaram atividade quitinásica foram reunidas em um único *pool*, dialisadas por 24 h (4 °C) contra água destilada, liofilizadas e analisadas por SDS-PAGE 12%.

4.9 Caracterização Bioquímica

4.9.1 Determinação da massa molecular

A massa molecular nativa da quitinase foi determinada utilizando-se amostras proteicas dialisadas por 24 h (4°C) contra água destilada, liofilizadas e ressuspensas em 2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7 adicionado de 100 mM de KCl, sendo posteriormente aplicadas em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sepharose CL6B (1 x 70 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado para ressuspender a amostra. A vazão foi mantida constante de 0,4 mL/min e frações de 1 mL coletadas e utilizadas para leitura da absorbância a 280 nm e determinação da atividade quitinásica. Como marcadores de massa molar foram utilizados β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa) e albumina de soro bovino (66 kDa). O volume livre da coluna (V_o) foi de 56 mL, determinado com Blue Dextran 2000.

4.9.2 Determinação da temperatura e pH ótimos de atividade enzimática

A temperatura ótima aparente de atividade da enzima contida no filtrado extracelular e da enzima purificada foi determinada utilizando temperaturas de 30 °C a 85 °C, com variação de 5°C na faixa de temperatura analisada. Já para determinação do melhor pH aparente de atividade foi utilizado o tampão ácido cítrico 50 mM com valores de pH variando de 2,0 a 6,0, com variação de 0,5°C na faixa de pH analisada.

4.9.3 Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH

A enzima purificada de *A. niveus* foi utilizada em ensaios de termoestabilidade e estabilidade ao pH. Para determinação da termoestabilidade a enzima purificada foi incubada em diferentes temperaturas (40 °C, 50 °C e 60 °C) por diferentes períodos de tempo (5 a 120 min), sendo a amostra sem incubação utilizada como controle. Após o tempo de incubação alíquotas foram retiradas e mantidas em banho de gelo, sendo posteriormente utilizadas na reação enzimática para se avaliar a estabilidade térmica.

Para determinação da estabilidade ao pH a enzima purificada foi incubada em tampão ácido cítrico (50 mM) com diferentes valores de pH (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) por diferentes períodos de tempo (2h ou 24h), a 4°C, sendo a amostra sem incubação utilizada como controle. Após o tempo de incubação as amostras foram utilizadas na reação enzimática para se avaliar a estabilidade ao pH.

4.9.4 Influência de diferentes compostos na atividade quitinásica

O efeito de vários compostos químicos sobre a atividade quitinásica foi determinada adicionando os seguintes compostos na mistura de reação: sais (CoCl_2 , MgSO_4 , MnCl_2 , KI , CuSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 , ZnSO_4), EDTA, SDS, Uréia, β -Mercaptoetanol, DTT, HCl e Acetona na concentração final de 1mM ou 1% (v/v).

4.10 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max})

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para a enzima purificada foi realizada utilizando-se concentrações crescentes 0,05 a 1,7 mM do substrato sintético 4-nitrofenil-N-Acetil- β -D glucosaminideo em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados com o auxílio do programa SigrafW (LEONE et al., 1992).

4.11 Avaliação da atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar

A avaliação da atividade antifúngica da quitinase de *A. niveus* foi realizada pela técnica de difusão em ágar seguindo a metodologia descrita por Farag (2016). As proteínas do filtrado de *A. niveus* foram precipitadas com sulfato de amônio 80%, solubilizadas em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0, dialisadas por 24 h, 4 °C, contra água destilada e utilizadas no ensaio antifúngico. Como controle da inibição de crescimento foi utilizada uma solução de miconazol 50 $\mu\text{g/mL}$. Suspensões de esporos 10^4 dos fungos *Aspergillus niger* ou *Aspergillus fumigatus* foram espalhados, com auxílio de um swab, por placas de Petri contendo meio BDA, poços de 1 cm foram perfurados nos meios e 300 μL da amostra (6 U da enzima) e 20 μL do antifúngico controle foram aplicadas em diferentes poços nas placas. As placas foram incubadas a 40°C por 48 horas. O diâmetro do halo de inibição obtido foi anotado.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão, os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados em duas partes:

- Parte I: Prospecção de proteínas bioativas secretadas por espécies do gênero *Aspergillus*.
- Parte II: Prospecção de quitinases secretadas por espécies do gênero *Aspergillus*.

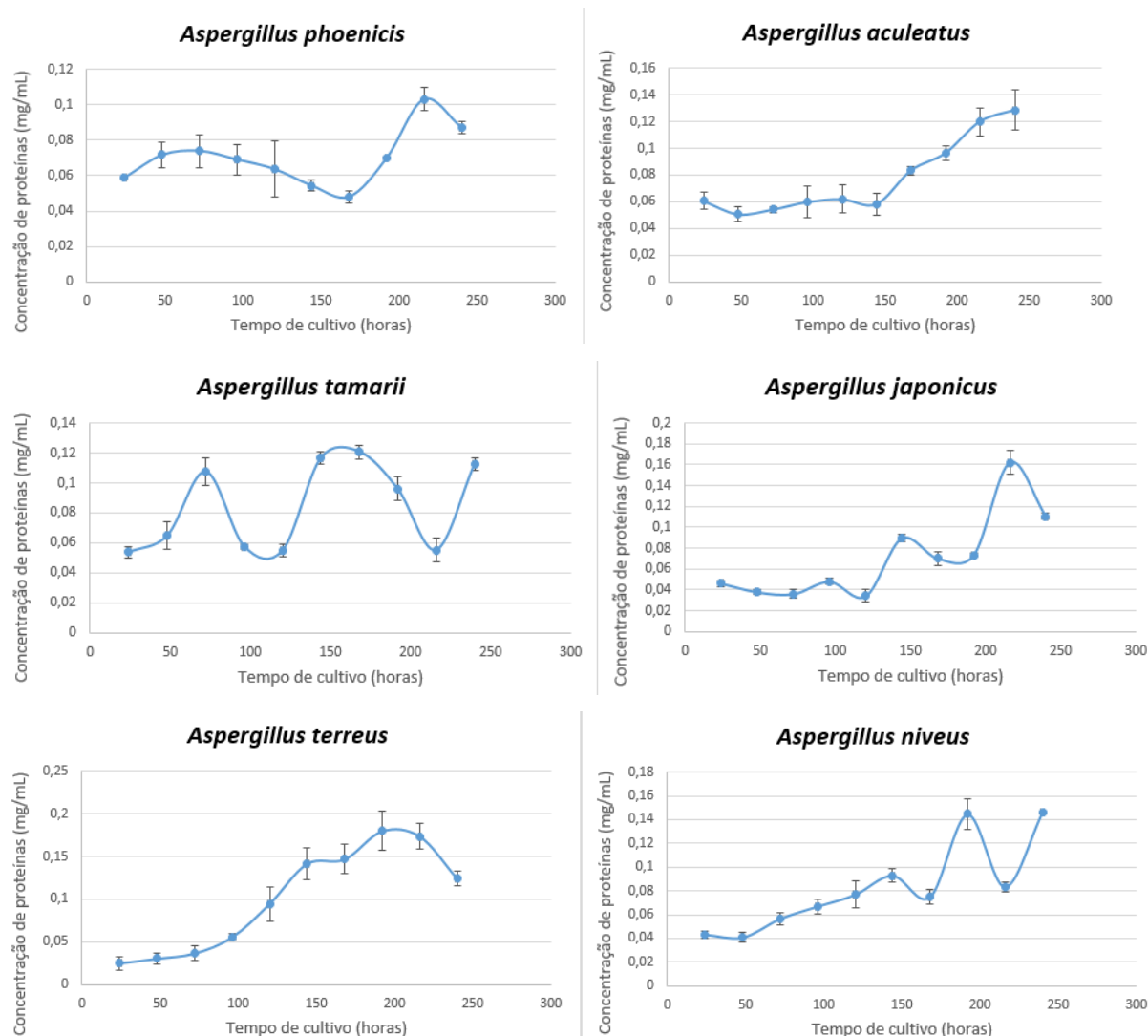
Parte I

Prospecção de proteínas bioativas secretadas por espécies do gênero *Aspergillus*

5.1 Quantificação de proteínas totais

Na Figura 16 pode-se observar o perfil proteico em função do tempo de cultivo para cada uma das linhagens utilizadas. Para o fungo *Aspergillus phoenicis* observa-se que a maior concentração de proteínas obtida nos períodos iniciais de cultivo foi de 0,073 mg/mL com 72 h de cultivo, seguida por queda e um novo aumento na concentração de proteínas a partir de 192 h de cultivo, atingindo a maior concentração (0,1 mg/mL) no período de 216 h. Para o fungo *Aspergillus aculeatus* ocorreu uma baixa variação na concentração de proteínas nos períodos iniciais de cultivo seguido por um aumento da concentração a partir do período de 168 h, sendo a maior concentração de proteínas (0,13 mg/mL) observada no período de 240 h de cultivo. Para o fungo *Aspergillus tamaraii* observa-se que as maiores concentrações de proteínas foram 0,1 mg/mL e 0,12 mg/mL nos períodos de 72 e 168 h, respectivamente. Para o fungo *Aspergillus japonicus* a maior concentração de proteínas, 0,16 mg/mL, foi obtida no período de 216 h. Para o fungo *Aspergillus terreus* observa-se aumento da presença de proteínas nos cultivos, chegando a maior concentração de 0,17 mg/mL no período de 192 h, seguida por diminuição na concentração de proteínas a partir de 216 h de cultivo. Já para o fungo *Aspergillus niveus* pode ser observado um aumento constante na concentração de proteínas até o período 144 h de cultivo, seguida por uma leve queda no período de 168 h, sendo a maior concentração de proteínas de 0,14 mg/mL obtida no período de 192 h.

Figura 16. Concentração de proteínas nos filtrados brutos dos cultivos de linhagens de *Aspergillus* em meio YPD em função do tempo de fermentação.



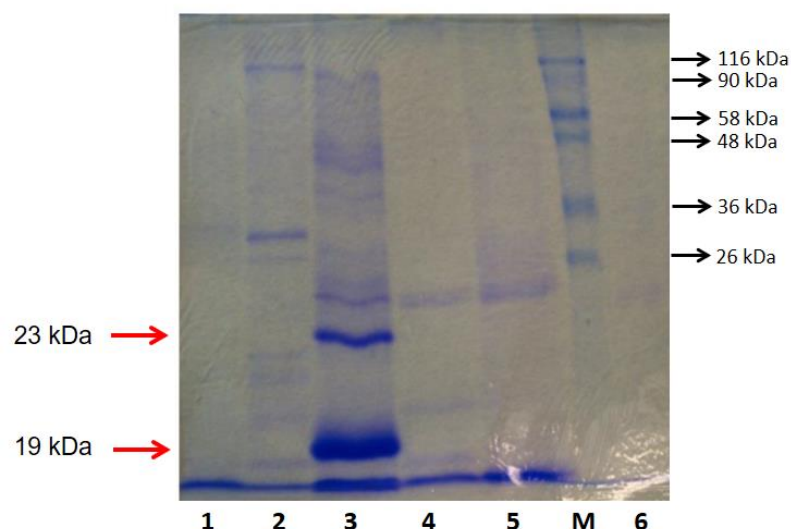
Fonte: Autora.

Inicialmente os cultivos haviam sido realizados somente até o período de 120 h e, portanto, o filtrado obtido do cultivo de cada espécie de *Aspergillus*, com maior concentração de proteínas até este período foi selecionado para uma análise preliminar do perfil proteico por SDS-PAGE, conforme descrito abaixo.

5.2 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE

Para uma análise preliminar, as amostras, que apresentaram a maior concentração de proteínas, foram selecionadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 10%) (Figura 17).

Figura 17. Perfil protéico obtido por eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE 10%) das proteínas secretadas pelas diferentes espécies fúngicas em meio YPD: 1) *A. japonicus* (0,04 mg/mL, 96 h); 2) *A. aculeatus* (0,06 mg/mL, 120 h); 3) *A. niveus* (0,076 mg/mL, 120 h); 4) *A. tamarii* (0,1 mg/mL, 72 h); 5) *A. terreus* (0,094 mg/mL, 120 h); 6) *A. phoenicis* (0,073 mg/mL, 72 h). M) Marcador de massa molecular: Triose-fosfato Isomerase (26 kDa), Desidrogenase Lactica (36 kDa), Fumarase (48 kDa), Piruvato quinase (58 kDa), Lactoferrina (90 kDa), β - Galactosidase (116 kDa). As setas vermelhas indicam as proteínas do filtrado de *A. niveus* que foram utilizadas para análise por espectrometria de massas (Item 5.5).



Fonte: Autora.

Esta análise permitiu observar a presença de proteínas de massas variadas nos diferentes cultivos e a presença de proteínas de baixas massas moleculares (< 25 kDa) no extrato bruto secretado por *Aspergillus niveus*, sendo duas proteínas com massa calculada de 23 kDa e 19 kDa as mais intensas. Uma vez que o foco inicial deste projeto era a identificação de peptídeos com baixa massa molecular, a identificação desta proteína com baixa massa molecular no filtrado de *A. niveus* despertou maior interesse sendo, portanto, este fungo selecionado para realização de novos cultivos em diferentes meios.

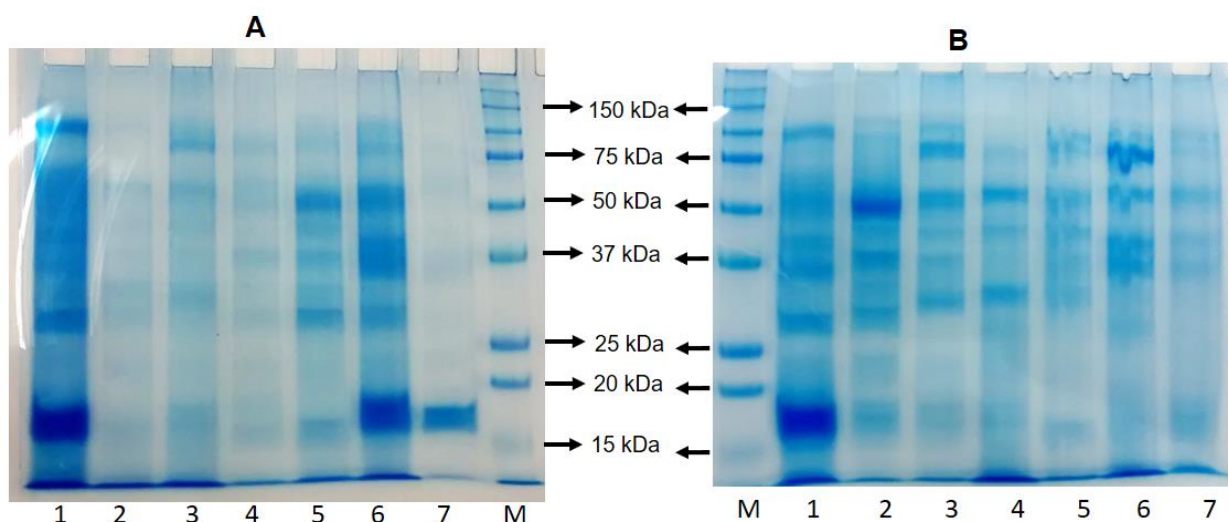
5.3 Prospeção de proteínas bioativas produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus*

A prospecção de proteínas bioativas pelo fungo selecionado, *A. niveus*, foi realizada cultivando-se o fungo em diferentes meios de cultivo: Khanna, Adams, Czapeck, Meio mínimo, SR, YPD e M5, por períodos de 120 a 240 horas. Alíquotas dos filtrados dos cultivos nos diferentes meios, após diálise, foram analisadas por SDS-PAGE 12% a fim de verificar-se o perfil de proteínas secretadas por *A. niveus*.

A Figura 18 A e B mostra os perfis proteicos obtidos em cada cultivo nos períodos de 120 h e 240 h, respectivamente. De acordo com os géis, é possível observar em todos os cultivos a presença de uma banda proteica, com massa molecular menor que 20 kDa e, também, como alguns meios e períodos de cultivo estimulam ou diminuem a produção de proteínas. O meio M5, no período de cultivo de 120 h é o que parece estimular mais a produção de proteínas com diversas massas e também da proteína de baixa massa observada anteriormente. No meio Czapeck, no período de cultivo de 120 h, observa-se que a pequena proteína também é secretada mais intensamente comparado aos outros meios utilizados. Para o meio de cultivo YPD, com período de cultivo de 120 h, nota-se a proteína de baixa massa secretada com maior intensidade enquanto não ocorre secreção intensa de outras proteínas de maior massa molecular. Devido a esse fato, o filtrado extracelular obtido deste meio seria o mais interessante para as etapas futuras de purificação.

De modo geral, essas análises forneceram sugestões sobre quais meios e períodos de cultivos seriam os melhores para a produção de proteínas secretadas por *A. niveus*.

Figura 18. Análise de perfil proteico para filtrados extracelulares de *A. niveus* obtidos em diferentes meios de cultivos nos períodos de 120 h (A) e 240 h (B): 1 – meio M5, 2 – meio Adams, 3 – Meio Mínimo, 4 – meio Khanna, 5 – meio SR, 6 – meio Czapeck, 7 – meio YPD e M – marcador de massa molecular. Aproximadamente 60 µg de proteínas dos filtrados foram aplicadas no gel.

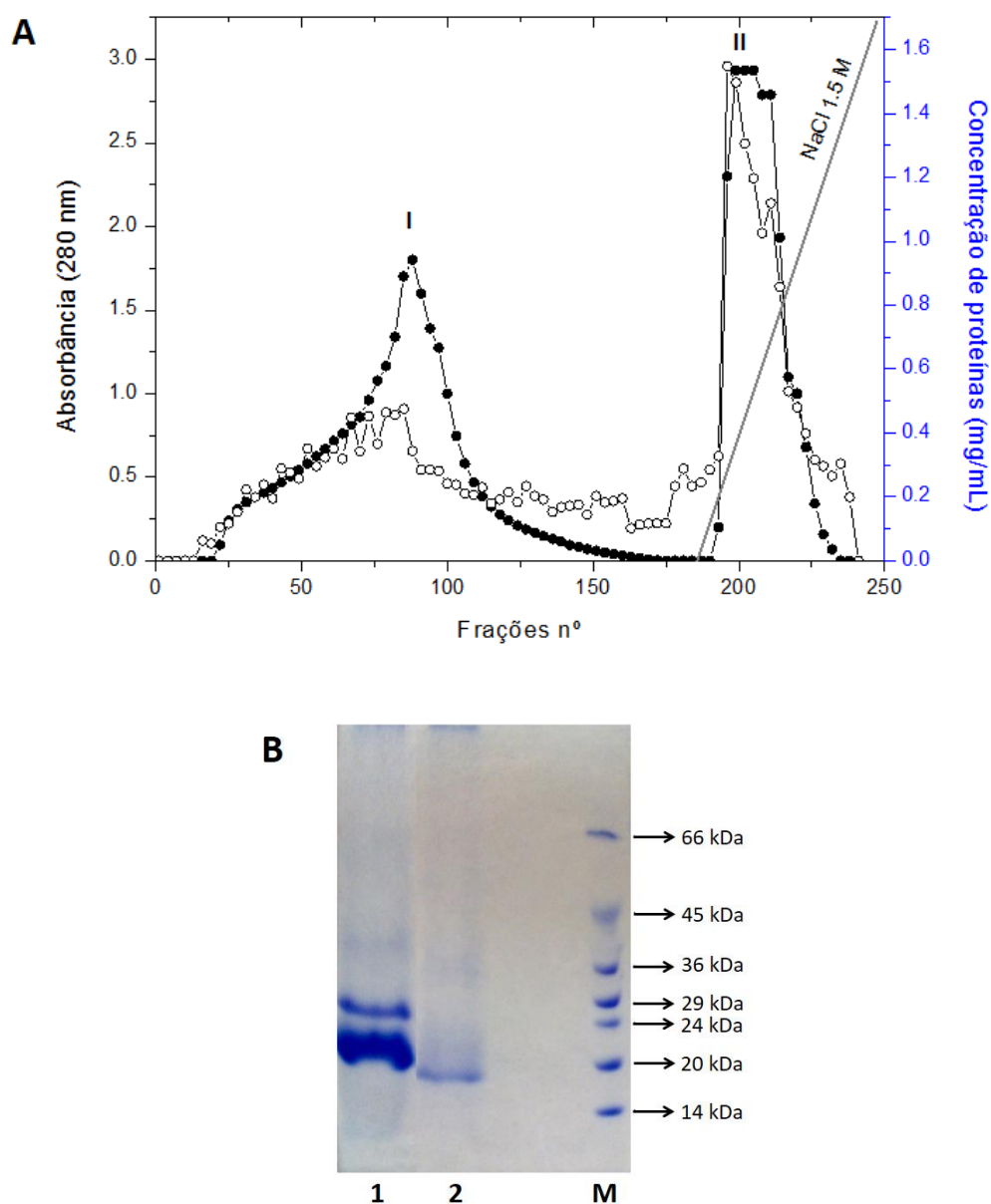


Fonte: Autora.

5.4 Purificação de proteínas bioativas secretadas por *A. niveus*

Para purificação das proteínas secretadas por *A. niveus*, 200 mL do filtrado obtido em meio YPD por 120h foi submetido à cromatografia de troca iônica utilizando a resina DEAE-Celulose. Na Figura 19 A pode ser observado o perfil cromatográfico, sendo obtido um pico anterior a aplicação do gradiente (I) e outro eluído com 220 mM de NaCl (II). As frações que apresentaram diferentes picos de proteínas foram reunidas em *pools* (I e II). Após diálise e liofilização tais *pools* foram analisados por SDS-PAGE 12% e submetidos a análise por espectrometria de massas (Item 5.5). A análise do gel de eletroforese (Figura 19 B) mostrou a presença de duas proteínas com massas moleculares de 23 e 19 kDa no *pool* I e a presença de uma proteína com massa molecular de 18 kDa no *pool* II.

Figura 19. Purificação de proteínas secretadas por *A. niveus* em meio YPD. **A)** Perfil em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose para as proteínas extracelulares produzidas pelo fungo *A. niveus* cultivado em meio YPD por 120 h. Símbolos: Absorbância a 280 nm (●-); Concentração de proteínas (○-) e (—) gradiente de NaCl 0 a 1,5 M. **B)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12 %) dos *pools* proteicos obtidos em DEAE-Celulose: 1 – *Pool* I, 2 – *Pool* II e M - marcador de massa molecular: lisozima (14 kDa); inibidor de tripsina (20 kDa); quimiotripsinogênio (25 kDa); lactato desidrogenase (35 kDa); ovalbumina (43 kDa) e albumina de soro bovino (66 kDa). 80 µg de proteínas foram aplicados no gel.



Fonte: Autora.

5.5 Análise das proteínas por espectrometria de massas

As duas proteínas de baixa massa molecular presentes no filtrado bruto de *A. niveus* em meio YPD observadas no gel SDS-PAGE 10% (Figura 17, canaleta 3, indicada pelas setas vermelhas) foram recortadas do gel e analisadas por espectrometria de massas. Já as proteínas presentes nos dois *pools* (Figura 19 B, canaletas 1 e 2) da purificação em DEAE-Celulose foram precipitadas com TCA e também analisadas por espectrometria de massas.

Na Tabela 1 podem ser observados os resultados obtidos para identificação das proteínas por espectrometria de massas. Quanto às proteínas presentes no filtrado bruto de *A. niveus*, observa-se que a proteína de menor massa molecular mostrou similaridade com o alérgeno Asp f1 de *Aspergillus fumigatus*, já a proteína de maior massa molecular foi similar a quitosanases. As proteínas presentes no *pool* I da cromatografia apresentaram similaridade com a ribotoxina mitogilina de *Aspergillus fumigatus*. Já a proteína do *pool* II obtido na cromatografia apresentou similaridade com as ribotoxinas mitogilina e α -sarcina de *A. fumigatus* e *A. giganteus*, respectivamente.

As proteínas secretadas por *A. niveus* apresentaram similaridade com várias ribotoxinas, como Asp f1, mitogilina e α -sarcina, já descritas na literatura para outras espécies de *Aspergillus*. A α -sarcina, restrictocina e Aspf 1 são os membros mais bem estudados da família das ribotoxinas e compartilham alta similaridade (~ 80%) entre suas sequências de aminoácidos e são capazes de inibir a síntese de proteínas através da sua ação ribonucleásica específica sobre a alça sarcina/ricina (SRL) presente no RNA 28S (OLOMBRADA et al., 2017).

Asp f1 é o alérgeno mais importante de *Aspergillus fumigatus* e está envolvido na sua patogenicidade (ARRUDA et al., 1992). Essa proteína não é exclusivamente produzida por *A. fumigatus*, e já foi detectada em culturas de *A. fischeri*, *A. ochraceus*, *Neosartorya aureola*, *N. stramenia*, embora não tenha sido observada nos cultivos de outras 14 espécies de *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. nidulans* (MARTINÉZ-RUIZ et al., 1999; LATGÉ et al., 1991). Neste trabalho entre as diferentes espécies de *Aspergillus* analisadas apenas *A. niveus* foi capaz de secretar essas ribotoxinas.

Tabela 1. Análise por espectrometria de massas das proteínas presentes nos picos I e II obtidos da aplicação do filtrado em DEAE-Celulose e da banda proteica presente no filtrado de *A. niveus* em meio YPD recortada do gel de SDS-PAGE.

Amostra	Similaridade	Score	Massa nominal (Da)	pI Calculado	Taxonomia	Cobertura	Peptídeos	
Banda proteica removida do gel (19 kDa)	Asp f1 alérgeno	174	14026	8.81	<i>Aspergillus fumigatus</i>	36 %	TGSSYPHWFTNGYDGDGK DDHYLLEFPTFPDGH DYK VFCGIVAH ER	1*
Banda proteica removida do gel (23 kDa)	Quitosanase	78	21522	5.76	<i>Aspergillus fumigatus</i>	20%	SFSYCGDIPGAIFISSSK CANDPSGQGETAFK FGISDL DANIHPYV VFGNEDHSPK	
Fração I	Ribonuclease mitogilina	73	19815	9.23	<i>Aspergillus fumigatus</i>	10 %	DDHYLLEFPTFPDGH DYK	
Fração II-A	Ribonuclease mitogilina	135	19811	9.23	<i>Aspergillus fumigatus</i>	26 %	TGSSYPHWFTNGYDGN GK DDHYLLEFPTFPDGH DYK VFCGIVAH QR	2*
Fração II-B	Ribonuclease α -sarcina	122	19940	9.26	<i>Aspergillus giganteus</i>	10 %	TGSSYPHWFTNGYDGDGK	3*

* Numeração dos peptídeos utilizados para alinhamento com ribotoxinas (Figura 20)

Fonte: Autora.

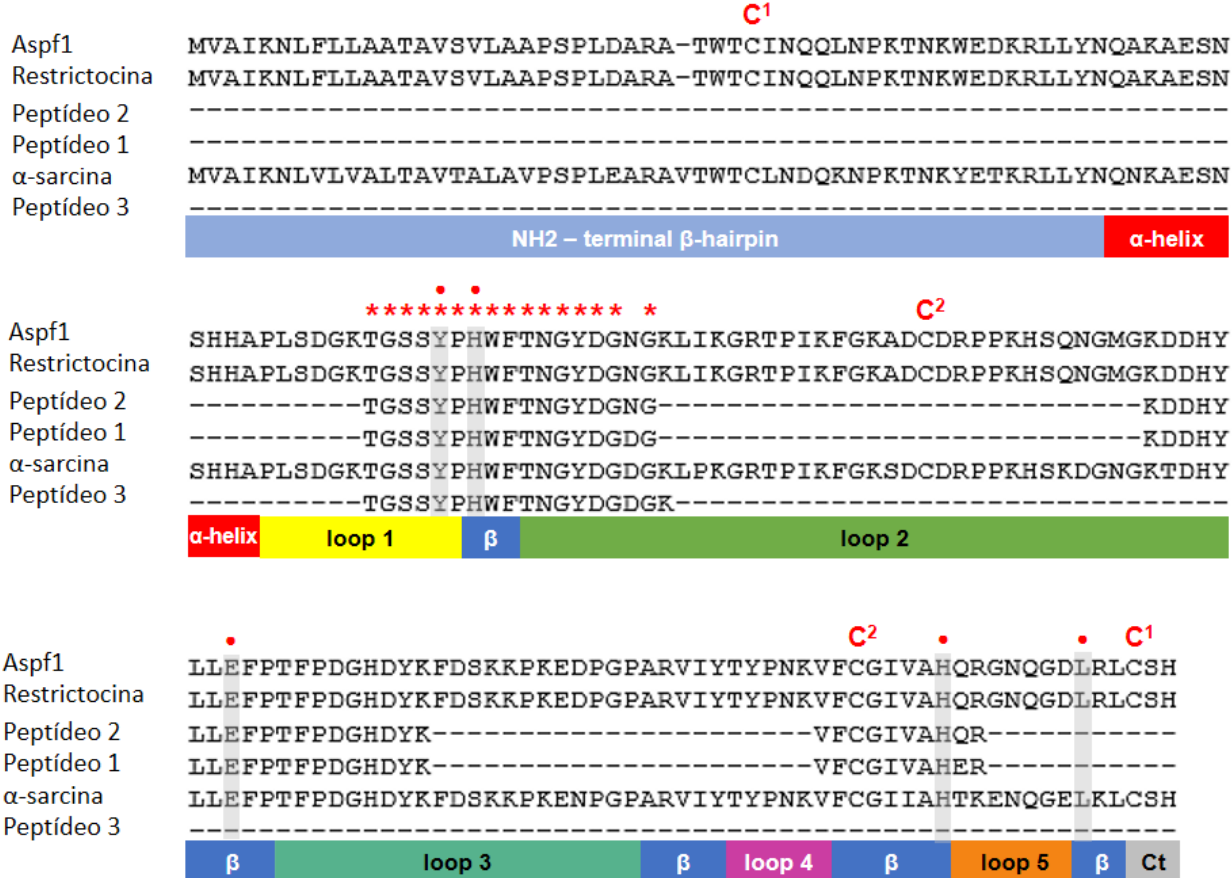
Os peptídeos de *A. niveus* identificados a partir da proteína de 19 kDa removida do gel e os peptídeos da Fração II A e B foram alinhados no programa Clustal Omega com sequências de aminoácidos das ribotoxinas α -sarcina, restrictocina e Asp f1 (Figura 20). Esta análise permitiu observar que os peptídeos identificados compartilham sequências de aminoácidos correspondentes a diferentes estruturas secundárias da α -sarcina como, por exemplo, resíduos envolvidos nas estruturas dos *loops* 1, 2 e 3 e nas regiões β , além de resíduos de cisteína (C²) envolvidos na formação de pontes dissulfeto e de resíduos que fazem parte do centro catalítico (tirosina (Y), ácido glutâmico (E) e histidina (H)).

A espécie utilizada neste estudo, *A. niveus*, é amplamente conhecida por sua alta capacidade como produtora de diversas enzimas com aplicações industriais (SOUZA-MOTTA et al, 2005, ANGAYARKANNI et al., 2006), porém, não existem relatos na literatura sobre a produção de ribotoxinas por *A. niveus*. O potencial antimicrobiano e a capacidade de inibição da proliferação celular frente a células tumorais das ribotoxinas encontradas neste trabalho foi avaliado conforme será descrito nos próximos itens.

Embora a função biológica dessas ribotoxinas não seja clara, estudos sugerem que seu papel está envolvido em mecanismos de defesa contra insetos. Um exemplo seria a hirsutelina A, uma ribotoxina tóxica quando injetada em larvas de *Galleria mellonella* e tóxica para larvas de *Aedes aegypti* (MAZET and VEY, 1995). O besouro *Carpophilus freemani* se alimenta menos de *Aspergillus restrictus* durante a produção de restrictocina (BRANDHORST et al., 1996). A anisoplina, produzida pelo fungo entomopatogênico, *Metarhizium anisopliae*, também parece estar envolvida em mecanismos de defesas do fungo (OLOMBRADA et al., 2016).

Varga e Samsom (2008) demonstraram que todas as espécies de *Aspergillus* seção *Clavati* possuem genes de ribotoxinas. Além das ribotoxinas descritas de *Aspergillus*, várias ribotoxinas secretadas por fungos de outros gêneros como, *Hirsutella*, *Metarhizium* e *Penicillium*, vêm sendo identificadas nos últimos anos, mostrando que elas são mais distribuídas na natureza do que se imaginava anteriormente.

fazem parte do centro catalítico. Elementos da estrutura secundária de α -sarcina são representados abaixo das sequências.



5.6 Ensaios antimicrobianos

5.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima bacteriana (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Na Tabela 2 são descritos os valores de CIM e CBM das amostras testadas, sendo possível observar que todas apresentaram CIM e CBM maiores que 1000 µg/mL e, portanto, nas concentrações testadas nenhuma amostra inibiu o crescimento bacteriano. A CIM e CBM para estreptomicina foi de 0,39 µg/mL frente a *E. coli* e para penicilina G foi de 0,006 µg/mL frente a *S. aureus*.

Tabela 2. Determinação da CIM e CBM para os filtrados de *Aspergillus* sp e frações purificadas de *A. niveus* frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Amostras	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Filtrados brutos: <i>A. japonicus</i> , <i>A. phoenicis</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. aculeatus</i> em meio YPD, 120 h	>1000	>1000	>1000	>1000
Filtrados brutos: <i>A. niveus</i> YPD, Czapek, SR, Khanna, MM, Adams e M5 (120 e 240 h)	>1000	>1000	>1000	>1000
Pools I e III obtidos nas purificações de proteínas de <i>A. niveus</i> em YPD por DEAE	>1000	>1000	>1000	>1000
Estreptomicina	-	-	0,39	0,39
Penicilina G	0,006	0,006	-	-

* Valores de CIM e CBM expressos em concentrações (µg/mL)

Fonte: Autora.

5.6.2 Determinação da atividade antifúngica pela técnica de diluição em microplaca

Na Tabela 3 são descritos os valores de CIMs das amostras, sendo possível observar que as amostras apresentaram CIM maior que 1000 µg/mL e, portanto, nas concentrações das amostras testadas não houve inibição de crescimento fúngico. As CIM do miconazol foram de 0,78 µg/mL frente a *A. nidulans* e de 1 µg/mL frente a *T. rubrum*.

Tabela 3. Valores de CIM e CFM para filtrados de *Aspergillus* e frações purificadas obtidos frente aos fungos *A. nidulans* e *T. rubrum*

Amostras	<i>A. nidulans</i>	<i>T. rubrum</i>
	CIM	CIM
Filtrados brutos: <i>A. japonicus</i> , <i>A. phoenicis</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. aculeatus</i> em meio YPD, 120 h	>1000	Não testada
Filtrados brutos: <i>A. niveus</i> em YPD, Czapek, SR, Khanna, MM, Adams e M5 (120 e 240 h)	>1000	>1000
Pools I e III obtidos nas purificações de proteínas de <i>A. niveus</i> em YPD por DEAE	>1000	>1000
Miconazol	0,78	-
Anfotericina B	-	1,0

Fonte: Autora.

É importante observar que quando utilizada a técnica de diluição em microplaca foi considerada a massa seca (1 mg/mL de massa seca dos filtrados) e não a concentração efetiva do agente na amostra e, portanto, a ausência de inibição de crescimento pode ter sido devido a baixa concentração do agente na amostra.

5.6.3 Determinação da atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar

A atividade antifúngica das proteínas secretadas por *A. niveus* em meio YPD 120 h e dos *pools* I e II obtidos na purificação de proteínas em DEAE também foi avaliada através da técnica de difusão em ágar. Na Tabela 4 são mostrados os diâmetros dos halos de inibição obtidos para as diferentes amostras frente aos fungos

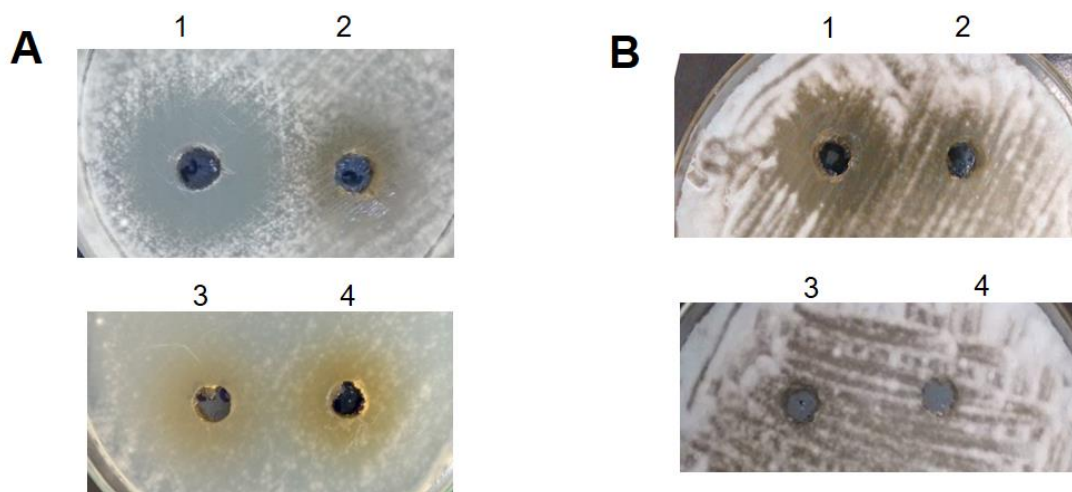
A. niger e *A. fumigatus*. Uma alta concentração de cada amostra (100 mg de massa seca das amostras por mL) foi utilizada neste ensaio e mostrou uma baixa inibição do crescimento de *A. niger*, sendo observados halos de inibição com diâmetros de 6 mm, 2 mm, 4 mm e 11 mm para o filtrado bruto, *pool* I, *pool* II e miconazol, respectivamente (Figura 21 A). As amostras não inibiram o crescimento de *A. fumigatus*, indicado pela ausência de halo de inibição no meio, enquanto para miconazol foi observado halo de 7 mm (Figura 21 B). Nos experimentos anteriores utilizando a técnica de diluição em microplacas e uma concentração menor (1 mg/mL massa seca) das amostras não foi observada inibição de crescimento frente aos fungos *A. nidulans* e *T. rubrum*.

Tabela 4. Avaliação da atividade antifúngica pela técnica de difusão em ágar. Foram testados o filtrado e frações de proteínas purificadas de *A. niveus* frente a *A. niger* e *A. fumigatus*

Amostra	Diâmetro halo de inibição (mm)	
	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>
Filtrado bruto de <i>A. niveus</i> em YPD 120h	6 ± 1	ND
<i>Pool</i> I obtido na purificação de proteínas de <i>A. niveus</i>	2 ± 0,5	ND
<i>Pool</i> II obtido na purificação de proteínas de <i>A. niveus</i>	4 ± 0,3	ND
Miconazol	11 ± 1	7 ± 1

ND: Não detectado.

Figura 21. Avaliação da atividade antifúngica das ribotoxinas secretadas por *A. niveus* frente a *Aspergillus niger* (A) e *Aspergillus fumigatus* (B). Poços: 1) Miconazol; 2) Filtrado bruto; 3) *Poll* I e 4) *Pool* II.



Fonte: Autora.

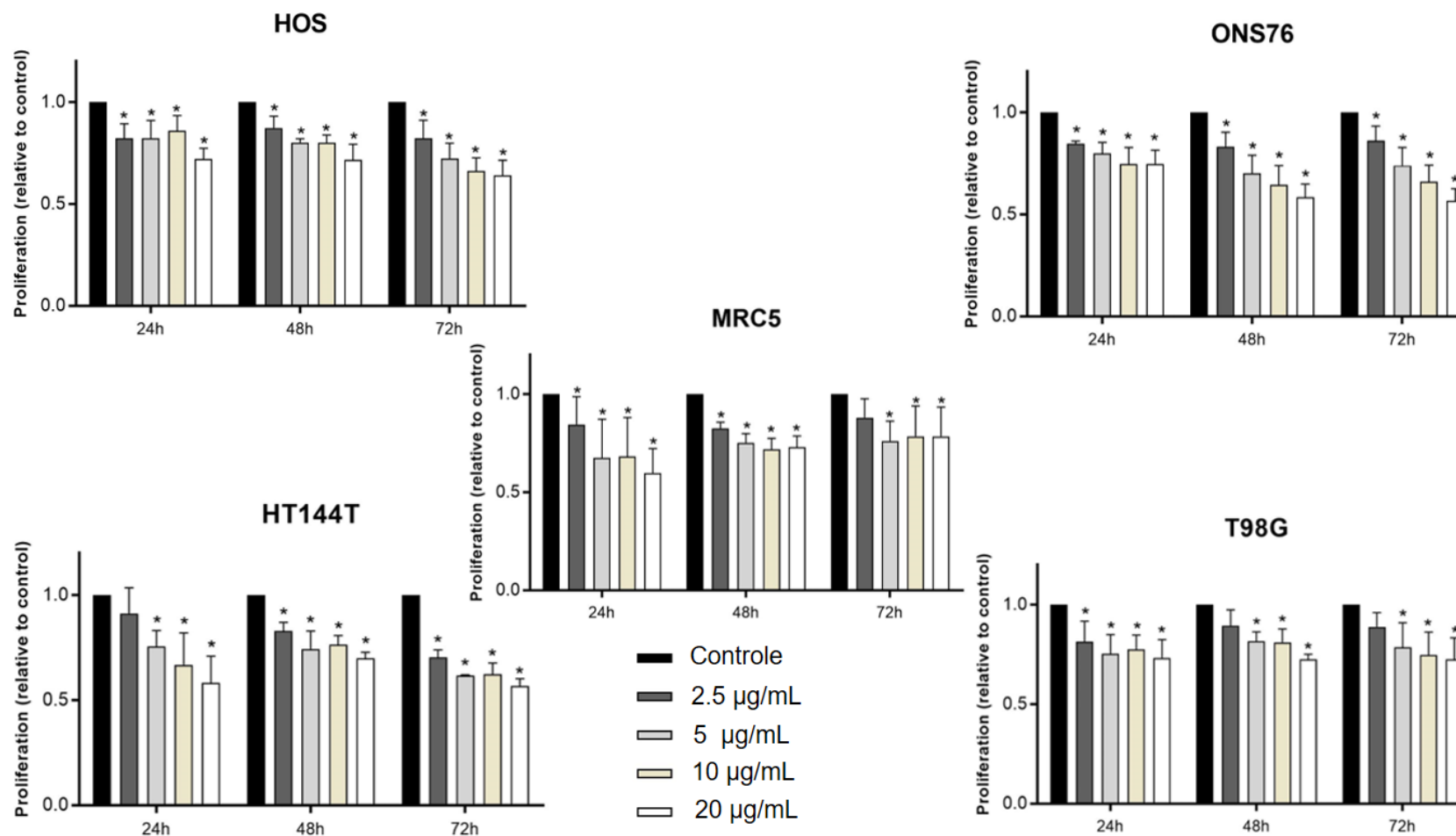
5.7 Ensaio de proliferação celular pela coloração com Giemsa

Os ensaios de proliferação celular foram realizados frente a linhagens celulares tumorais de glioblastoma (T98G), osteossarcoma (HOS), melanoma (HT144T), meduloblastoma (ONS), e frente a linhagem de fibroblastos (MRC5).

Nas Figuras 22, 23 e 24 podemos observar os resultados da proliferação celular obtidos para cada amostra avaliada após coloração com Giemsa. De acordo com os gráficos obtidos é possível observar que, de maneira geral, todas as amostras testadas inibiram a proliferação das linhagens celulares testadas, inclusive da linhagem MRC5 de fibroblastos (células saudáveis).

Na Figura 22 observa-se o efeito dos tratamentos, com o filtrado do cultivo de *A. niveus* obtido em meio YPD por 120 h, na proliferação das diferentes linhagens celulares. Para a linhagem de osteossarcoma (HOS) a menor inibição da proliferação, cerca de 12%, foi obtida no tratamento com 2,5 µg/mL da amostra no período de 48 h e a maior inibição da proliferação, cerca de 36%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h. Para a linhagem de melanoma (HT144T), a menor inibição da proliferação, cerca de 8%, ocorreu no período de 24 h com o tratamento de 2,5 µg/mL da amostra e a maior inibição da proliferação, cerca de 43%, ocorreu com o tratamento de 20 µg/mL da amostra no período de 72 h. Para a linhagem de meduloblastoma (ONS) a menor inibição da proliferação, cerca de 15%, foi observada no tratamento com 2,5 µg/mL para todos períodos analisados e a maior inibição da proliferação, cerca de 43%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 48-72 h. Para a linhagem de glioblastoma (T98G) a menor inibição da proliferação, cerca de 10%, ocorreu no tratamento com 2,5 µg/mL da amostra no período de 48-72 h e a maior inibição da proliferação, cerca de 27%, foi obtida no tratamento com 20 µg/mL em todos os períodos analisados. Já para a linhagem de fibroblastos (MRC5), a menor inibição da proliferação, cerca de 12%, foi obtida no tratamento com 2,5 µg/mL da amostra no período de 72 h e a maior inibição da proliferação, cerca de 40%, foi obtida no tratamento com 20 µg/mL no período de 24 h, mostrando um efeito mais tóxico para as células no primeiro período de tratamento (24 h), seguido por aumento da proliferação celular nos períodos seguintes.

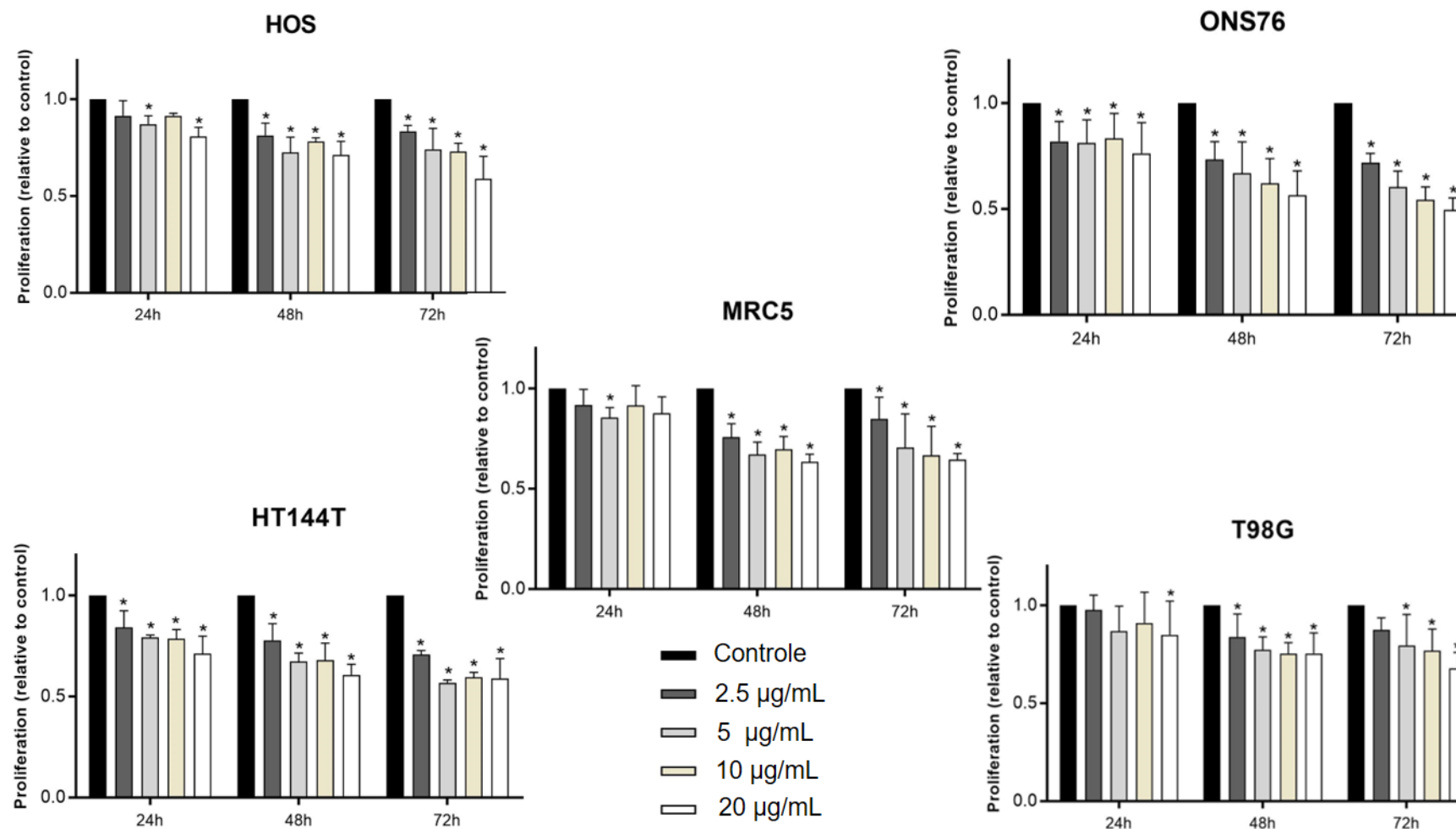
Figura 22. Avaliação do efeito do filtrado extracelular obtido do cultivo de *A. niveus* em meio YPD por 120 h na proliferação celular frente a linhagens celulares: T98G (glioblastoma), HOS (osteossarcoma), HT144T (melanoma), ONS (meduloblastoma) e MRC5 (fibroblastos). Células não tratadas representam o controle. * Indicam uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo controle.



Fonte: Autora.

Na Figura 23 observa-se o efeito dos tratamentos, utilizando o *pool* I obtido na cromatografia em DEAE-Celulose, na proliferação dos diferentes tipos de linhagens celulares. Para a linhagem de osteossarcoma (HOS) a menor inibição da proliferação, cerca de 8%, foi observada no tratamento com 2,5-10 µg/mL da amostra no período de 24 h e a maior inibição da proliferação, cerca de 41%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h. Para a linhagem de melanoma (HT144T), a menor inibição da proliferação, cerca de 15%, ocorreu no período de 24 h com o tratamento de 2,5 µg/mL da amostra enquanto a maior inibição da proliferação, cerca de 43%, ocorreu com o tratamento de 5 µg/mL da amostra no período de 72 h. Para a linhagem de meduloblastoma (ONS) a menor inibição da proliferação, cerca de 16%, foi obtida nos tratamentos com 2,5-10 µg/mL da amostra no período de 24 h enquanto a maior inibição da proliferação, cerca de 50%, foi observada no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h. Para a linhagem de glioblastoma (T98G) a menor inibição da proliferação, cerca de 2%, ocorreu no tratamento com 2,5 µg/mL da amostra no período de 24 h e a maior inibição da proliferação, cerca de 32%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h. Já para a linhagem de fibroblastos (MRC5), a menor inibição da proliferação, cerca de 8%, foi ocorreu no período de 24 h para todos as concentrações analisadas e a maior inibição da proliferação, cerca de 36%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL nos períodos de 48 e 72 h, mostrando um efeito citotóxico crescente dependente da concentração e tempo nos períodos de 24 para 48 h, seguido por estabilização na proliferação nos períodos de 48 para 72 h.

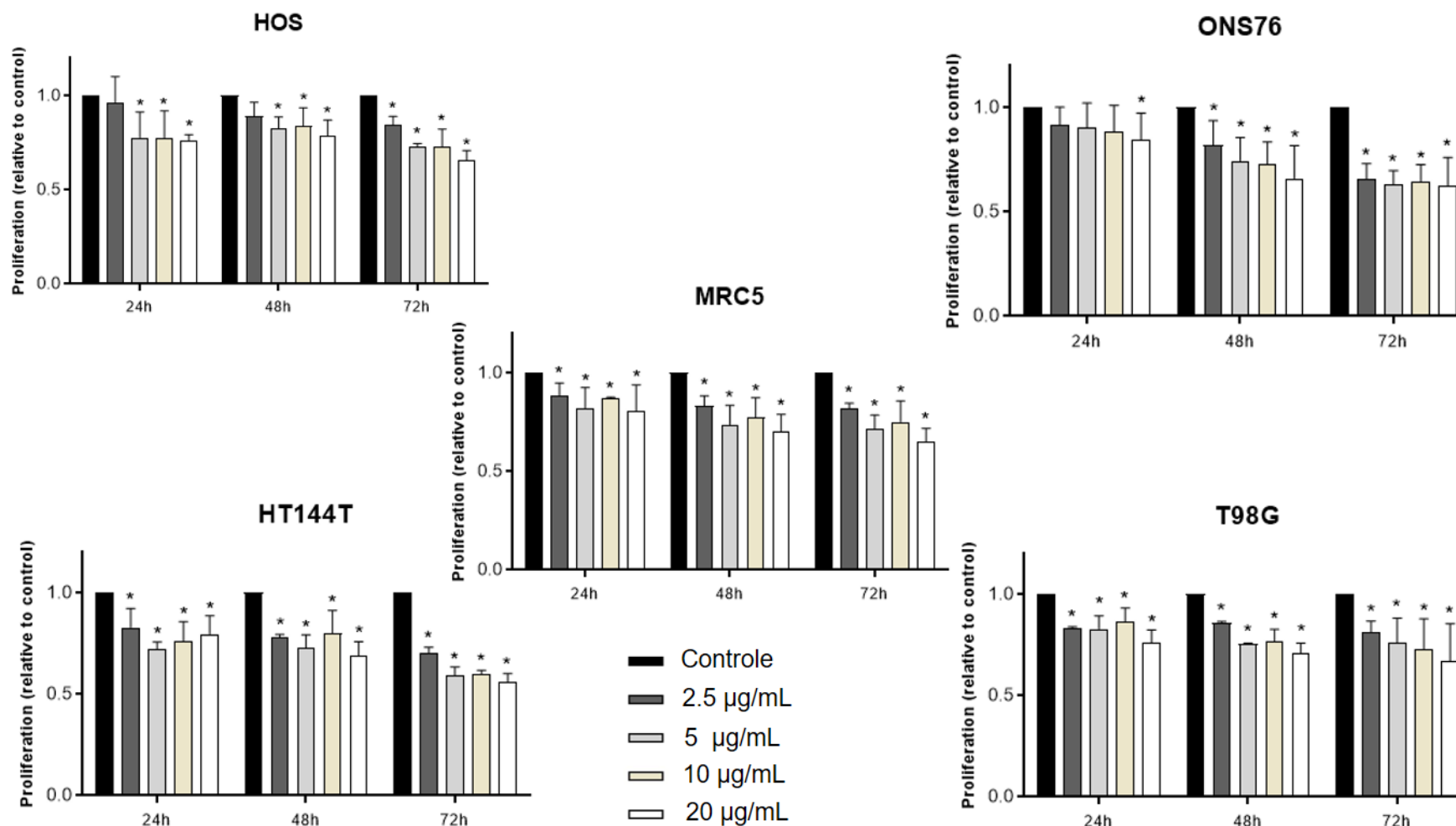
Figura 23. Avaliação do efeito do *pool* I obtido da cromatografia em DEAE-Celulose na proliferação celular frente a linhagens celulares: T98G (glioblastoma), HOS (osteossarcoma), HT144T (melanoma), ONS (meduloblastoma) e MRC5 (fibroblastos). Células não tratadas representam o controle. * Indicam uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo controle.



Fonte: Autora.

Na Figura 24 observa-se o efeito dos tratamentos utilizando o filtrado do cultivo de *A. niveus* obtido em meio M5 por 120 h, na proliferação dos diferentes tipos de linhagens celulares. Para a linhagem de osteossarcoma (HOS) a menor inibição da proliferação, cerca de 3%, ocorreu no tratamento com 2,5 µg/mL da amostra no período de 24 h enquanto a maior inibição da proliferação, cerca de 34%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h. Para a linhagem de melanoma (HT144T), a menor inibição da proliferação, cerca de 17%, ocorreu no período de 24 h com o tratamento de 2,5 µg/mL da amostra e a maior inibição da proliferação, cerca de 44%, ocorreu com o tratamento de 20 µg/mL da amostra no período de 72 h. Para a linhagem de meduloblastoma (ONS) a menor inibição da proliferação, cerca de 8%, ocorreu no período de 24 h na concentração de 5 µg/mL e a maior inibição da proliferação, cerca de 37%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h. Para a linhagem de glioblastoma (T98G) a menor inibição da proliferação, cerca de 13%, foi obtida no tratamento com 10 µg/mL da amostra no período de 24 h e a maior inibição da proliferação, cerca de 33%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h. Já para a linhagem de fibroblastos (MRC5), a menor inibição da proliferação, cerca de 11%, foi observada no tratamento com 2,5 µg/mL da amostra no período de 24 h e a maior inibição da proliferação, cerca de 34%, ocorreu no tratamento com 20 µg/mL no período de 72 h.

Figura 24. Avaliação do efeito do filtrado extracelular obtido do cultivo de *A. niveus* em meio M5 por 120 h na proliferação celular frente a linhagens celulares: T98G (glioblastoma), HOS (osteossarcoma), HT144T (melanoma), ONS (meduloblastoma) e MRC5 (fibroblastos). Células não tratadas representam o controle. * Indicam uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo controle.



Fonte: Autora.

Para as três amostras testadas, as maiores inibições de proliferação foram observadas frente às linhagens ONS (meduloblastoma) e HT144T (melanoma). Todas inibiram de 37 a 44% da proliferação de HT144T quando utilizadas concentrações acima de 10 µg/mL e incubação por 72 h. Para a linhagem ONS observa-se que a maior inibição da proliferação ocorreu quando utilizada o *pool* I e o filtrado do cultivo em meio YPD, reduzindo em 50% e 43%, respectivamente, a proliferação celular.

Essas amostras de filtrados e proteínas purificadas de *A. niveus* utilizadas nos ensaios de proliferação celular apresentam a presença de ribotoxinas potencialmente citotóxicas devido a suas habilidades para clivar ligações específicas no rRNA inibindo a síntese de proteínas. O potencial antitumoral de diferentes ribotoxinas contra várias linhagens neoplásicas vem sendo demonstrado. No entanto, estas moléculas também são tóxicas para células saudáveis (LANDI et al., 2017). A α -sarcina isolada de *Aspergillus giganteus* apresentou IC₅₀ de 1 µM contra linhagens celulares tumorais de carcinoma de colón (SW1222), rabdomiossarcoma humano (RD86) e carcinoma de pulmão (A431) (CARRERAS-SANGRÁ et al., 2012). Carreras-Sangrá e colaboradores (2012) ainda observaram que a imunotoxina construída utilizando a α -sarcina apresentou um valor de IC₅₀ de 0,03 µM frente a células SW1222, demonstrando assim um aumento notável em sua citotoxicidade. Outro exemplo é a recém descrita Ageritina, isolada do cogumelo *Agrocybe aegerita*, a qual apresentou IC₅₀ após 48 horas de exposição em doses de 4,58 µg/mL (0.316 µM) frente a células de tumorais de glia (C6), de 8,41 µg/mL frente a células de neuroblastoma (SK-N-BE(2)-C) e de 9,46 µg/mL frente a células de glioma (U-251) (LANDI et al., 2017).

Algumas características dessas ribotoxinas como baixa massa molecular, resistência a proteases, sua capacidade de atravessar membranas e sua específica atividade ribonucleásica, têm despertado o interesse para sua utilização na construção de imunotoxinas com aplicações em terapias antitumorais. De fato, a criação de imunotoxinas baseadas em ribotoxinas fúngicas já está em desenvolvimento. Carreras-Sangra e colaboradores (2012) construíram uma imunotoxina combinando a glicoproteína A33 (GPA33), uma proteína marcadora de câncer de cólon com a ribotoxina α -sarcina de *Aspergillus giganteus*. A imunotoxina gerada (IMTXA33 α S) demonstrou toxicidade específica frente a linhagens de células tumorais GPA33. Tomé-Amat et al. (2015) demonstrou o efeito antitumoral, *in vivo*, da IMTXA33 α S bem como a ausência de efeitos colaterais no nível histológico e no desenvolvimento dos camundongos testados, sugerindo que a imunotoxina

construída é um excelente candidato imunoterapêutico contra carcinomas de cólon. As ribotoxinas representam uma nova classe de agentes antitumorais, com um mecanismo de ação inteiramente diferente das drogas clinicamente usadas atualmente, portanto diversos estudos ainda são essenciais para avaliar suas características e seus efeitos *in vitro* e *in vivo* e contribuir com sua efetiva aplicação em terapias humanas.

Além de apresentarem excelentes características que permitem sua aplicação como domínios tóxicos de imunotoxinas, as ribotoxinas ainda poderiam ter outras aplicações biotecnológicas como na produção de alérgenos recombinantes para o diagnóstico de doenças relacionadas à *Aspergillus*, no estudo de doenças relacionadas aos ribossomos e no controle de pragas da agricultura. Nesse contexto, a identificação de novas ribotoxinas é importante devido não só as diferentes aplicações que elas podem possibilitar como na contribuição para o conhecimento de suas características estruturais, seu modo de ação, sua distribuição entre diferentes espécies na natureza e a identificação de seu possível papel biológico para os organismos que as produzem.

Parte II

Prospecção de Quitinases secretadas por espécies do gênero *Aspergillus*

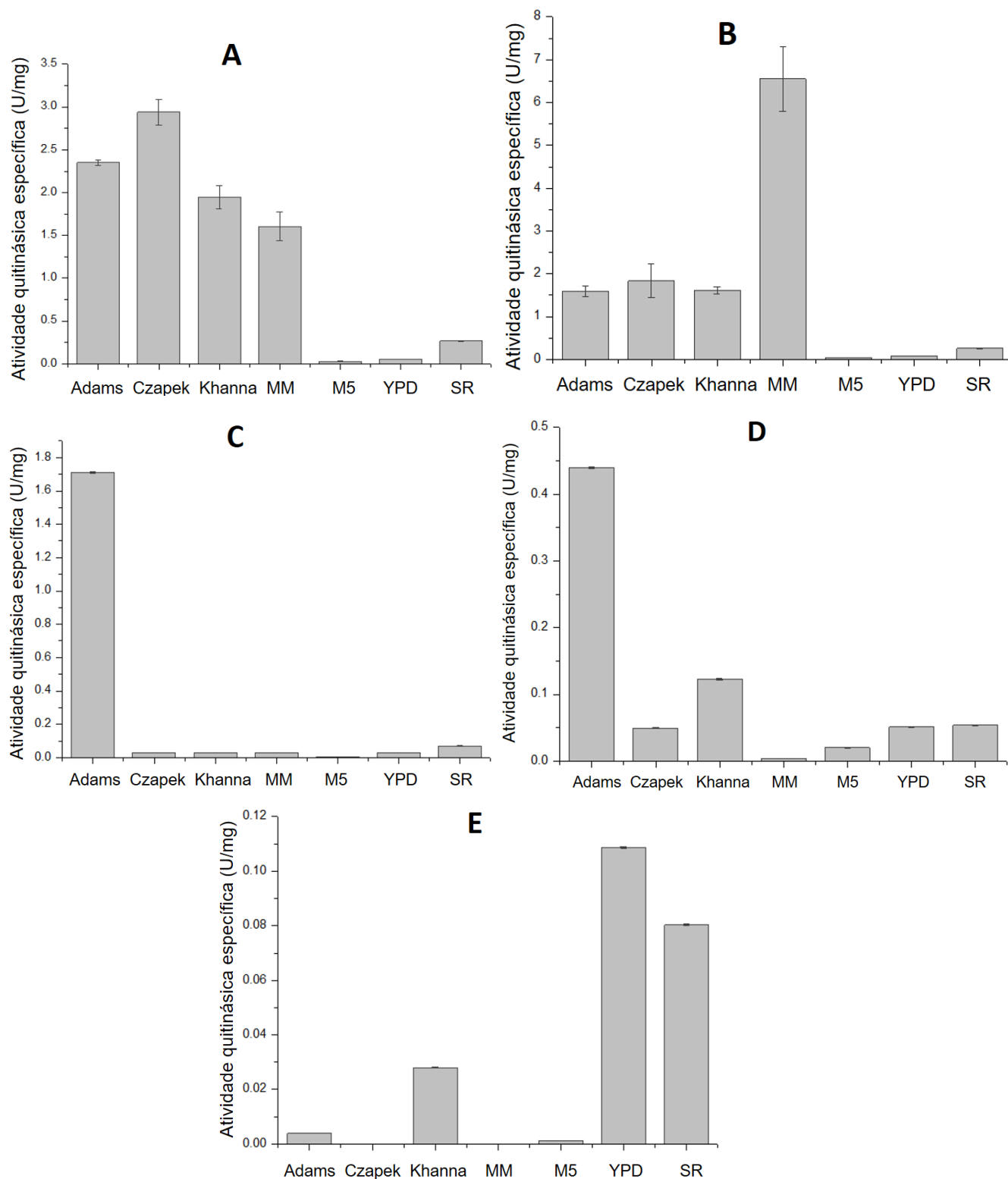
5.8 Produção de quitinases por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*

A prospecção de quitinases foi realizada utilizando-se as linhagens de *A. niveus*, *A. terreus*, *A. tamarii*, *A. phoenicis* e *A. aculeatus* cultivadas em diferentes meios de cultivo suplementados com 1% de quitina de casca de caranguejo, com incubação a 30°C, por 96 h, com agitação de 100 rpm.

Observa-se que os fungos *A. terreus* (Figura 25 A) e *A. niveus* (Figura 25 B) apresentaram maior produção de quitinases extracelulares. Para *A. terreus* a maior atividade específica foi obtida em meio Czapek (2,94 U/mg). Para *A. niveus* a maior atividade específica (6,55 U/mg) foi obtida em meio mínimo (MM), cerca de 3,5 vezes maior que a atividade observada em meio Czapeck. Para as espécies *A. tamarii* e *A. phoenicis* as maiores atividades específicas foram 1,71 U/mg e 0,43 U/mg, respectivamente, em meio Adams (Figuras 25 C e D), entretanto a produção de quitinases por esses fungos foi inferior comparada a produção pelas espécies *A. terreus* e *A. niveus*. Já a espécie *A. aculeatus* apresentou a menor produção de quitinases entre as espécies analisadas, sendo a maior atividade específica de 0,11 U/mg obtida em meio YPD (Figura 25 E).

Diversas espécies de fungos capazes de produzir diferentes quitinases são descritas na literatura como, por exemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp. S1-13, *Penicillium aculeatum*, *Penicillium* sp. LYG 0704, *Metharhizium anisopliae*, e *Trichoderma harzianum*, entre outras (FARAG et al., 2014; BRZEZINSKA et al., 2012; LEE et al., 2009; RATTANAKIT et al., 2007; BINOD et al. 2005; RUSTIGUEL, 2014; HARMAN et al., 1993). Diversas dessas quitinases foram obtidas em cultivos contendo quitina obtida a partir de resíduos pesqueiros. Farag e colaboradores (2016) purificaram uma quitinase produzida por *A. terreus*, utilizando pó de casca de camarão. Brzezinska e colaboradores (2012) purificaram uma quitinase produzida por *Aspergillus niger* LOCK 62 cultivado em casca de camarão e quitina coloidal. Rattanakit e colaboradores (2007) descreveram e purificaram duas endoquitinases e uma exoquitinase produzidas por *Aspergillus* sp. S1-13 quando cultivado em resíduos de cascas de mariscos.

Figura 25. Atividade quitinásica específica de *Aspergillus* em diferentes meios de cultivo, suplementados com 1% quitina de casca de caranguejo, por 96 h. A) *A. terreus* B) *A. niveus*; C) *A. tamarii*; D) *A. phoenicis* e E) *A. aculeatus*.



Fonte: Autora.

Sabe-se que quitinases produzidas por fungos são indutíveis na natureza. Desta forma, quando o fungo cresce em meio contendo quitina a atividade quitinásica é detectada (HARMAN et al., 1993; HARAN et al., 1995). A expressão gênica de quitinases em fungos é controlada por um sistema repressão/indução, no qual a quitina ou seus produtos de degradação (como N-acetil- β -D-glicosamina e glucosamina) atuam como indutores enquanto glicose ou fontes de carbono mais fáceis de metabolizar atuam como repressores (SAHAI et al.; 1993; BLAISEAU et al.; 1992). A regulação de genes de quitinases (*ech42* codifica uma endoquitinase de 42 kDa, *chit36* uma endoquitinase de 36 kDa, *chit33* uma endoquitinase de 33 kDa e *nag1* uma N-acetilglicosaminidase) de *T. harzianum* foi estudada detalhadamente. Os quatro genes foram induzidos por paredes celulares fúngicas, quitina coloidal ou ausência de carbono, enquanto na presença de altas concentrações de glicose ou glicerol a expressão desses genes foi inibida. A presença de N-acetilglicosamina, induziu os genes *chit33* e *nag1*, porém não induziu os genes *ech42* e *chit36* (VITERBO et al., 2002; LIMON et al., 1995; PETERBAUER et al., 1996; DRABORG et al., 1995; CARSOLO et al., 1994).

Alguns autores relatam que na presença da quitina, MgSO_4 e KH_2PO_4 tem-se um efeito positivo na produção de quitinase, enquanto extrato de levedura e peptona têm um efeito negativo na produção dessa enzima (KHAN et al., 2010). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o relatado acima. Observa-se que o meio mínimo, o qual levou a melhor produção de quitinases por *A. niveus* e uma boa produção por *A. terreus*, contém MgSO_4 e KH_2PO_4 em sua composição, porém não contém extrato de levedura e peptona (a composição dos meios de cultura é descrita nos Anexos). Os meios Adams, Czapeck e Khanna, os quais levaram a uma boa produção de quitinases por *A. terreus*, *A. niveus* e *A. tamarii* (apenas Adams), apresentam MgSO_4 , KH_2PO_4 e extrato de levedura em sua composição. Entretanto, o meio SR, o qual levou a uma baixa produção de quitinase por *A. niveus* e *A. terreus*, contém MgSO_4 e KH_2PO_4 (em sua solução de sais) mas também extrato de levedura e peptona em sua composição. Já os meios que levaram a menores ou nenhuma produção de quitinases foram YPD e M5, os quais não possuem MgSO_4 e KH_2PO_4 e apresentam uma maior concentração de extrato de levedura e peptona em sua composição.

Existem diversos relatos na literatura sobre quitinases produzidas pela espécie *A. terreus*, mas nenhum relato ainda sobre a utilização de *A. niveus* como produtor de

quitinases. Farag et al. (2014) demonstraram a atividade antifúngica de quitinases produzidas por *Aspergillus terreus*, quando cultivado em casca de camarão, contra diferentes fungos como *Aspergillus niger*, *Penicillium oxysporium* e *Fusarium oxysporium*.

Por ter apresentado a maior produção de quitinases, e pelo exposto anteriormente, a linhagem de *Aspergillus niveus* foi selecionada para continuidade deste trabalho. O meio de cultivo selecionado para produção de quitinases secretadas por *Aspergillus niveus* foi o Meio Mínimo, por ter levado a maior atividade quitinásica específica (menor produção de outras proteínas e a maior atividade quitinásica). Como discutido anteriormente, é interessante observar que o meio mínimo não contém extrato de levedura em sua composição. O extrato de levedura além de ser uma fonte de nitrogênio também fornece certa quantidade de carbono ao microrganismo e, portanto, em meio mínimo, na ausência de extrato de levedura, o metabolismo fúngico estaria direcionado para degradação da quitina, a única fonte de carbono disponível neste meio. Ao contrário, na presença do extrato de levedura o fungo terá preferência pela fonte de carbono mais facilmente metabolizada levando a uma menor produção quitinásica.

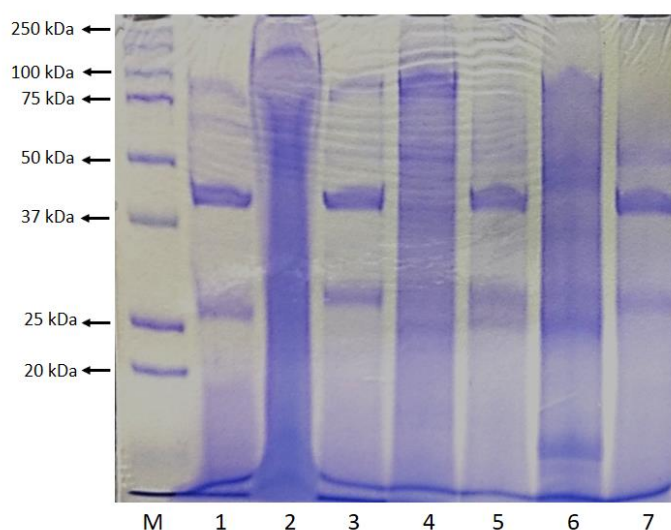
5.8.1 Análise do perfil proteico nos filtrados de *A. niveus* em diferentes meios de cultivo

O perfil das proteínas presente nos filtrados de *A. niveus* obtido em diferentes meios de cultivo foi analisado por SDS-PAGE 12% (Figura 26).

No filtrado obtido em Meio Mínimo observa-se a presença de proteínas com massas moleculares de 28,5 kDa, 44,03 kDa, 69,6 kDa e 90,7 kDa. No filtrado do meio Khanna verifica-se a presença de proteínas de 28,5 kDa, 44,03 kDa e 90,7 kDa. Para o filtrado do meio SR observa-se proteínas com massas de 28,5 kDa, 44,03 kDa, 51,4 kDa e 90,7 kDa. Nos meios Czapek e Adams observa-se proteínas com massas moleculares de 28,5 kDa, 44,03 kDa, 51,4 kDa. No meio M5 nota-se proteínas 15,6 kDa, 28,5 kDa e 51,4 kDa. No meio YPD foi observado apenas um arraste. Nos meios SR e M5 apesar de ser possível visualizar algumas proteínas também ocorreu arraste. A presença de arraste no gel provavelmente pode ter ocorrido devido a formação de complexos entre os componentes do meio com a peptona e extrato de levedura com

a quitina, já que apenas esses meios apresentam uma maior concentração desses compostos.

Figura 26. Análise do perfil protéico dos filtrados de *A. niveus* cultivado em diferentes meios: (1) Meio Mínimo; (2) YPD; (3) Khanna; (4) SR; (5) Czapek, (6) M5 (7) Adams e (M) Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad). Aproximadamente 50 µg de cada filtrado foi aplicado no gel

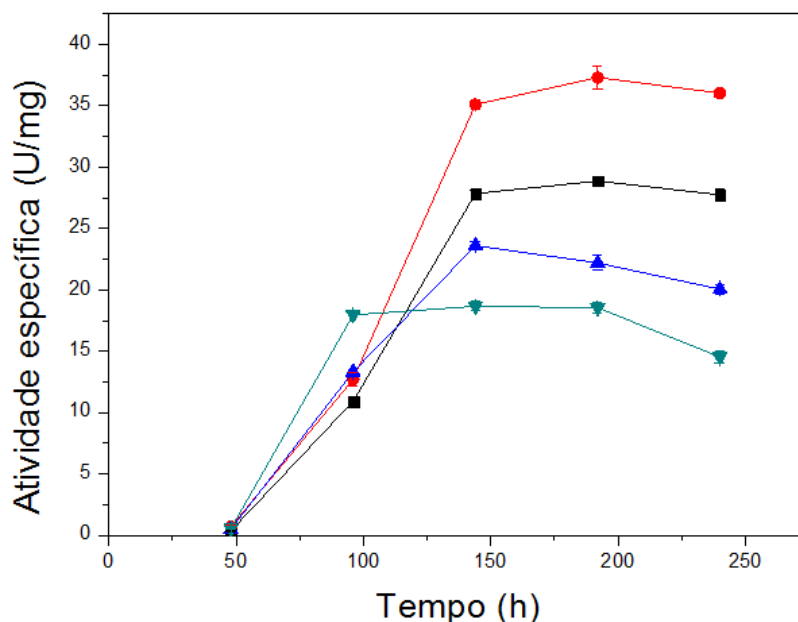


Fonte: Autora.

5.8.2 Influência da concentração de quitina e do tempo de cultivo para produção de quitinases por *A. niveus*

Na Figura 27 observa-se a influência da concentração de quitina presente no meio mínimo e a influência do tempo de cultivo na produção de quitinases por *A. niveus*. Foi possível verificar que a maior atividade quitinásica específica (36,65 U/mg) ocorreu na condição de cultivo utilizando-se meio mínimo acrescido com 1% de quitina de casca de caranguejo em um tempo de cultivo de 192 h e, portanto, estas condições de cultivo foram selecionadas para a obtenção de filtrados para produção e purificação de quitinases secretadas por *A. niveus*. No período inicial de cultivo (48 h) a atividade específica foi baixa para todas as concentrações de quitina utilizada, neste período também foi observado crescimento fúngico reduzido.

Figura 27. Influência das diferentes concentrações de quitina em função do tempo de cultivo na produção de quitinases por *A. niveus* em MM. Concentrações de quitina no meio: (-●-) 1%, (-■-) 0,5%, (-▲-) 1,5% e (-▼-) 2% nos tempos de cultivo de 48, 96, 144, 192 e 240 horas.



Fonte: Autora.

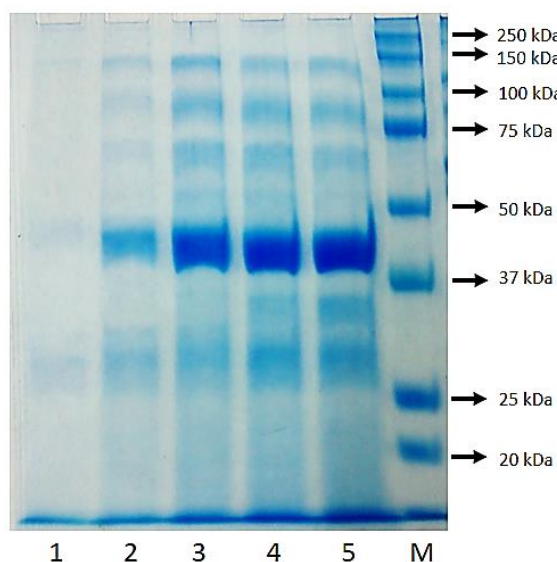
Neste trabalho, as concentrações de quitina que levaram a maior produção quitinásica foram 0,5% e 1%, enquanto, nos cultivos contendo as maiores concentrações, 1,5% e 2%, a produção quitinásica foi menor. Resultados semelhantes foram encontrados por Farag e Al-Nusarie (2014), que ao avaliarem o efeito da concentração do pó da casca de camarão no crescimento e produção de quitinases por *A. terreus*, observaram que em concentrações de 5 a 20 g/L a produção quitinásica aumentava e acima de 25 g/L o meio se tornava viscoso reduzindo o fornecimento de oxigênio levando a menor crescimento fúngico e produção enzimática. Resultados similares a este também foram encontrados em outros estudos (TRACHUCK et al., 1996; WANG e CHANG., 1997) e explicam a razão pela qual a maior produção quitinásica por *A. niveus* foi encontrada em meio contendo menores concentrações de quitina (0,5% e 1%).

O tempo de cultivo que levou a máxima produção de quitinases por *A. niveus* foi de 192 h, após este período observa-se estabilização na produção enzimática. O tempo de cultivo de um microrganismo influencia diretamente a produção enzimática.

A incubação por um breve período pode não levar a produção máxima da enzima, já que o microrganismo se encontra na fase de crescimento vegetativo. Em adição, o crescimento da cultura por um longo período pode levar a exaustão de nutrientes, conduzindo a um declínio no crescimento e produção enzimática (PELCZAR et al, 1991). Como descrito na literatura, cada microrganismo apresenta seu melhor tempo de crescimento e produção enzimática. A máxima produção de uma quitinase por *A. niger* LOCK 62 foi de 9,46 U/mg obtida em 144 h de cultivo (BRZEZINSKA et al., 2007). Lee e colaboradores (2009) observaram que a maior produção de quitinases por *Penicillium* sp. LYG 0704 foi de 0,7 U/mg obtida em 3 dias de cultivo. Uma quitinase secretada por *Aspergillus terreus* teve sua maior produção de 4,82 U/mg com 120 h de cultivo (FARAG; AL-NUSARIE, 2014). De acordo com Ratanakitt e colaboradores (2007), a máxima produção da endoquitinase (Endo-1) por *Aspergillus* sp. S1-13 de 0,02 U/mg foi obtida em 168 h de cultivo. Já Binod e colaboradores (2005) encontraram a máxima produção quitinásica de 0,085 U/mg pelo fungo *Penicillium aculeatum* com 72 h de cultivo.

Considerando a maior produção quitinásica utilizando 1% de quitina em meio mínimo foi realizada a análise, por SDS-PAGE 12%, do perfil de proteínas secretadas por *A. niger* nos diferentes períodos de cultivo. Na Figura 28 é possível observar a presença de proteínas com massas moleculares de 28,4 kDa, 44 kDa, 69,6 kDa, 90,7 kDa e 138,7 kDa nos filtrados dos cultivos. Observa-se ainda o aumento da expressão dessas proteínas com o aumento do tempo de cultivo, sendo a proteína com massa de 44 kDa a mais intensa nos cultivos.

Figura 28. Perfil de proteínas obtido para espécie *A. niveus* cultivada em Meio Mínimo, acrescido com 1% de quitina, por diferentes períodos: 1) 48 h; 2) 96 h; 3) 144 h; 4) 192 h, 5) 240 h e M) Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad). Aproximadamente 80 µg de amostra foi aplicado no gel.



Fonte: Autora.

5.8.3 Análise das quitinases por espectrometria de massas

A proteína com massa de 44 kDa observada no gel SDS-PAGE 12% foi submetida à identificação por espectrometria de massas. Para tanto, a banda proteica foi recortada do gel, preparada e submetida a identificação de proteínas por MALDI-TOF/TOF. O MS/MS obtido foi analisado utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e o banco de dados SwissProt. Na Tabela 5 e na Figura 29 pode ser observado o resultado referente à análise por espectrometria de massas demonstrando a similaridade da proteína de *A. niveus* com quitinases produzidas por *Aspergillus fumigatus*. Quando analisados por blastp os peptídeos de *A. niveus* identificados no sequenciamento também apresentaram identidade de 100% com quitinases de outras espécies fúngicas como *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. terreus*, *A. bombycis*, entre outros.

Tabela 5. Análise por espectrometria de massas da proteína removida do gel de SDS-PAGE.

Amostra	Similaridade	Score	Massa nominal (Da)	pl calculado	Taxonomia	Cobertura	Peptídeos
Proteína removida do gel (44 kDa)	Quitinase	125	47624	5,10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11%	VLLSIGGWYTSPNFAPAASTDAGR IVLGMPYGR FLISYDNPQVANLK

Fonte: Autora.

Figura 29. Sequência de aminoácidos da quitinase produzida por *A. fumigatus* utilizada como base para identificação da quitinase secretada por *A. niveus*. A região destacada em vermelho mostra os aminoácidos com identidade entre ambas as quitinases.

```

1  MRFATSTIVK  VALLLSSLCV  DAAVMWNRDT  SSTDLEARAS  SGYRSVVYFV
51  NWAIIYGRNHN  PQDLPVERLT  HVLYAFANVR  PETGEVHMTD  SWADIEKHYP
101 GDSWSDTGNN  VYGCIKQLYL  LKKQNRNLKV  LLSIGGWYTS  PNFAPAASTD
151 AGRKNFAKTA  VKLLQDLGFD  GLDIDWEYPE  NDQQANDFVL  LLREVRTALD
201 SYSAANAGGQ  HFLLTVASPA  GPDKIKVLHL  KDMDQQLDWF  NLMAYDYAGS
251 FSSLSGHQAN  VYNDTSNPLS  TPFNTQTALD  LYRAGGV PAN  KIVLGMPLYG
301 RSFANTDGP  KPYNGVGQGS  WENGVDYKA  LPQAGATEHV  LPDIMASYSY
351 DATNKFLISY  DNPQVANLKS  GYIKSLGLGG  AMWWDSSSDK  TGSDSLITTV

```

Fonte: Autora.

5.9 Purificação da quitinase secretada por *A. niveus*

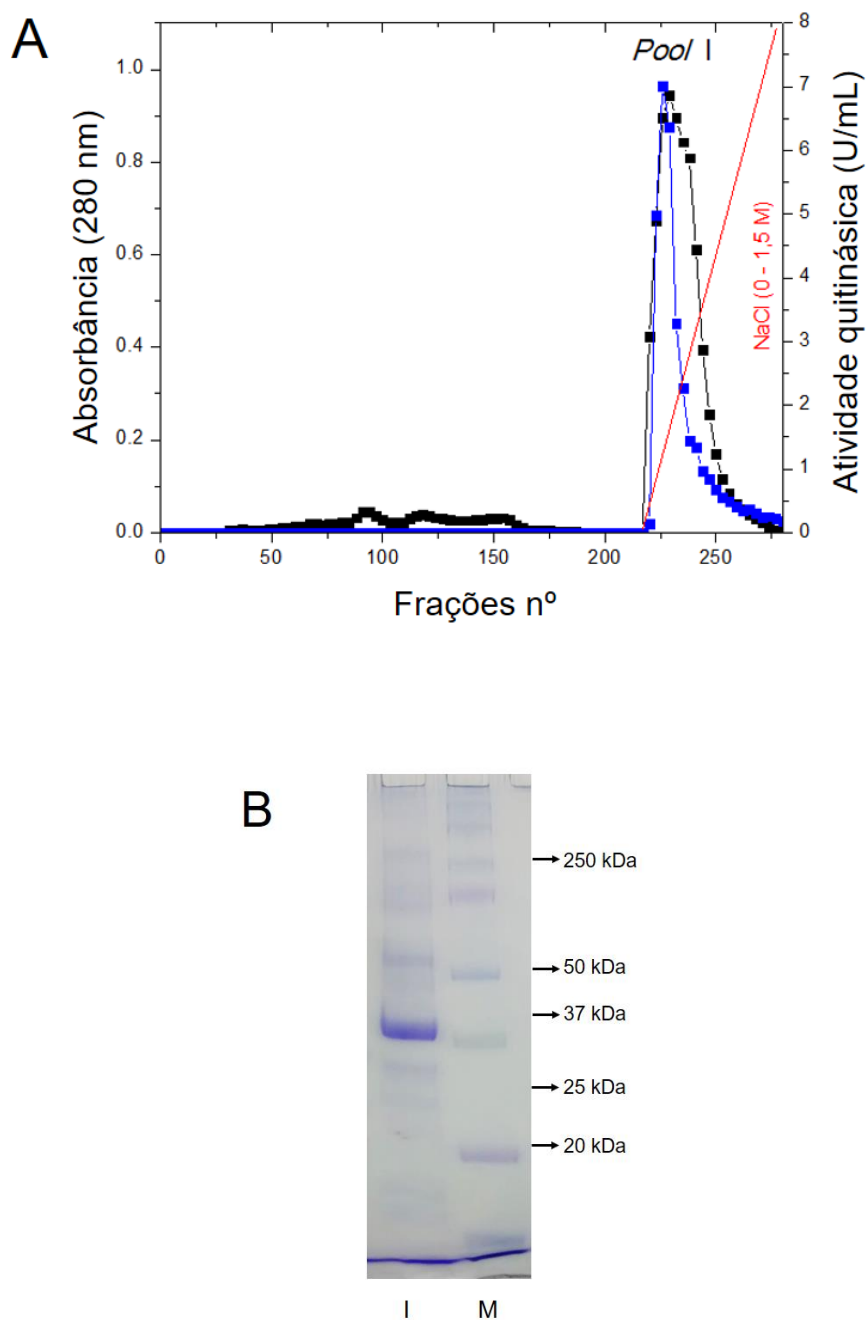
Diferentes estratégias de purificação foram realizadas, durante o desenvolvimento deste trabalho, a fim de se purificar a quitinase secretada por *A. niveus*.

- **Estratégia A:** Cromatografia de troca-iônica (DEAE-Celulose) + Cromatografia de exclusão molecular (Sephadex - G100)
- **Estratégia B:** Precipitação com sulfato de amônio 80% + Cromatografia de exclusão molecular (Sephadex - G100)

5.9.1 Cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose)

Um volume de 200 mL do filtrado obtido do cultivo de *A. niveus* (MM + 1% quitina, 192 h) foi submetido à cromatografia de troca iônica com a resina DEAE-Celulose, previamente pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0. A Figura 30 A mostra o perfil cromatográfico obtido, sendo observado um pico majoritário de proteínas eluído com 200 mM de NaCl. As frações que apresentaram atividade enzimática foram reunidas em um único *pool* (frações 220-280), o qual foi dialisado, liofilizado e analisado por SDS-PAGE 12% (Figura 30 B). Como pode ser observada com essa resina a purificação não foi muito eficiente, sendo poucas proteínas eluídas antes da aplicação do gradiente de NaCl. O *pool* que apresentou atividade quitinásica, foi utilizado para purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando a resina Sephadex G-100.

Figura 30. Purificação da quitinase de *A. niveus* em DEAE-Celulose. **A)** Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica DEAE-Celulose para as proteínas extracelulares produzidas pelo fungo *A. niveus* em Meio Mínimo contendo quitina de casca de caranguejo. Símbolos: Absorbância a 280 nm (■); Atividade enzimática a 405 nm (■). **B)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) do *pool* obtido na cromatografia de troca iônica: I – *Pool* I e M - marcador de massa molecular. Aproximadamente 50 µg de proteínas foram aplicados no gel.



Fonte: Autora

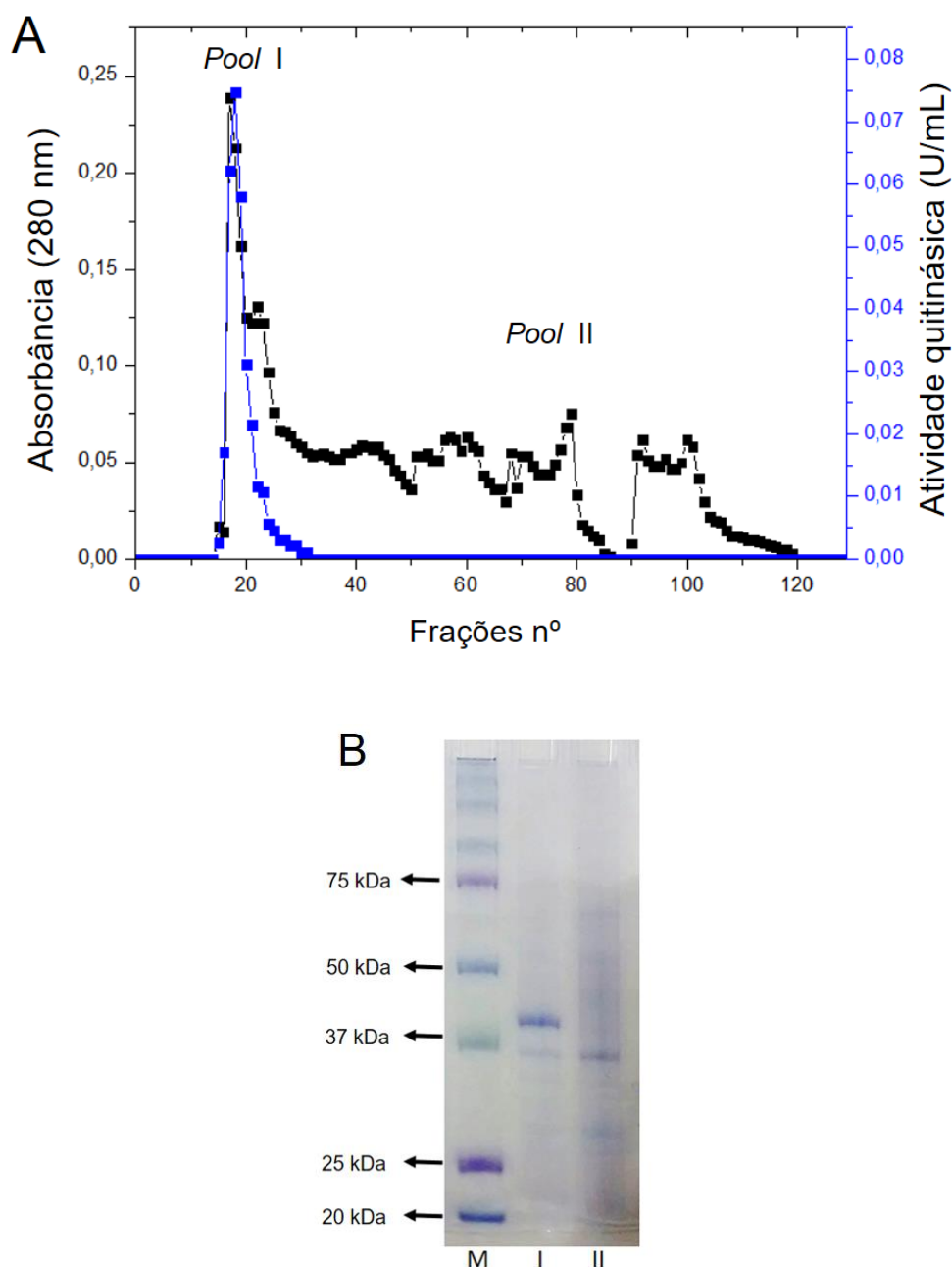
5.9.2 Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex - G100)

O *pool* que apresentou atividade quitinásica obtido na cromatografia de troca iônica, foi dialisado, liofilizado e, em seguida, solubilizado em solução tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 e aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100. A Figura 31 A mostra o perfil cromatográfico obtido, sendo as frações com atividade quitinásica reunidas em um único *pool* (*Pool* I: frações 16 a 32) e as frações sem atividade quitinásica reunidas em outro *pool* (*Pool* II: frações 33 a 115). A Figura 31 B mostra o perfil de proteínas por SDS-PAGE 12% para diferentes *pools*: a proteína de interesse no *pool* I (44 kDa) e a presença de outras proteínas menores no *pool* II.

Diferentes metodologias são descritas na literatura para a purificação de quitinases como, por exemplo, precipitação com sulfato de amônio e/ou solventes, cromatografias de troca iônica, cromatografias de interação hidrofóbica, cromatografias de gel filtração, cromatografias de afinidade por quitina e focalização isoeletrica (FARAG et al., 2016; BRZEZINSKA et al., 2012; LEE et al., 2009; RATANAKITT et al., 2007; XIA et al., 2001). Neste trabalho utilizando cromatografia de troca-iônica (DEAE-Celulose), seguida por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-100), não foi possível purificar completamente a enzima, por isso, outra estratégia foi realizada visando a obtenção da enzima purificada.

Os fatores de purificação e rendimento são descritos na Tabela 6 onde observa-se a purificação de 1,2 vezes e 13,2% de recuperação. De acordo com a literatura, geralmente, os valores dos fatores de purificação de quitinases fúngicas é baixo, provavelmente, devido a ação sinérgica das diferentes isoformas presentes no filtrado bruto e/ou devido a perda da atividade quitinásica durante o progresso da purificação (CRUZ et al., 1992). A quitinase de *A. niger* LOCK 62 foi purificada 2,3 vezes com um rendimento de 29% (BRZEZINSKA et al., 2012). A quitinase de *A. terreus* foi purificada 5,16 vezes com 12% de recuperação (FARAG et al., 2016). Binod e colaboradores (2005) purificaram a quitinase de *P. aculeatum* 2,9 vezes com rendimento de 60,3%. Lee e colaboradores (2009) purificaram 17,6 vezes com rendimento de 8,8% uma quitinase de *Penicillium* sp. LYG 0704. A quitinase de *Aspergillus* sp. S1-13 foi purificada 22 vezes com 1% de recuperação (RATANAKITT et al., 2007) enquanto a quitinase de *A. fumigatus* YJ-407 foi purificada 1,2 vezes com rendimento de 10,5% (XIA et al., 2001).

Figura 31. Purificação da quitinase de *A. niveus* em Sephadex G-100. **A)** Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Sephadex G-100 para a quitinase produzida por *A. niveus*. Símbolos: Absorbância a 280 nm (-■-) e Atividade enzimática a 405 nm (-■-). **B)** Perfil proteico obtido por eletroforese desnaturante (SDS PAGE 12%) dos *pools* obtidos na cromatografia de exclusão molecular: I – Pool I, II – Pool II, e M - marcador de massa molecular. 50 µg de proteínas foram aplicados no gel.



Fonte: Autora.

Tabela 6. Purificação da quitinase produzida por *A. niveus*

Etapa	Volume (mL)	Proteínas (mg Totais)	Atividade (U Totais)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (100%)	Fator de purificação (X)
Filtrado bruto	200	16	56	3,5	100	1
DEAE-Celulose Pico II	60	8,2	37	4,5	66,07	1,3
Sephadex G-100 Pico I	32	1,8	7,4	4,1	13,21	1,2

Fonte: Autora.

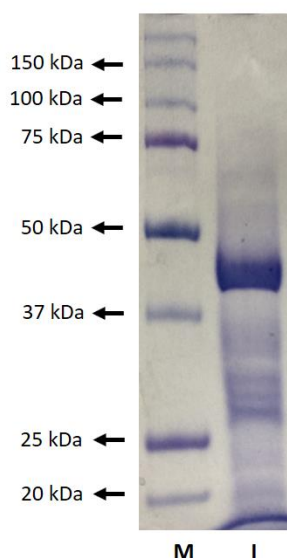
5.9.3 Precipitação com sulfato de amônio 80%

Um volume de 150 mL do filtrado extracelular de *A. niveus* (Meio Mínimo adicionado com 1% quitina, 192 h) foi utilizado para precipitação de proteínas. A precipitação foi realizada pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao sobrenadante até atingir 80% de saturação. As proteínas precipitadas foram ressuspensas em 3 mL de tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. Um volume de 2,5 mL foi aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular (Sephadex G-100). A Figura 32 mostra o perfil proteico em SDS-PAGE 12% obtido após precipitação com sulfato de amônio onde observa-se a presença da proteína com massa molecular de 44 kDa além de outras proteínas menores.

A precipitação de proteínas pelo aumento gradativo da concentração de sais é um processo muito importante para separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína (ENGLARD e SEIFTER, 1990). O sulfato de amônio tem sido o sal mais comumente utilizado na precipitação de proteínas devido algumas de suas características como alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade (DUONG-LY e GABELLI, 2014). Diversos autores utilizaram a precipitação com sulfato de amônio em etapas de purificação de quitinases. Farag e colaboradores (2016) purificaram uma quitinase de *A. terreus* utilizando precipitação com sulfato de amônio 65% seguida por cromatografia em Sephadex-G100 e DEAE-Sephadex A-50. Brzezinska e colaboradores (2012) purificaram uma quitinase de *A. niger* através de precipitação com sulfato de amônio 85% e cromatografia de afinidade com quitina. Já Ratanakitt e

colaboradores (2007) precipitaram diferentes quitinases de *Aspergillus* sp. S1-13 com 90% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ antes de outras etapas de purificação.

Figura 32. Perfil proteico em SDS-PAGE 12 % do filtrado extracelular de *A. niveus* (meio mínimo adicionado com 1% quitina, 192 h) após precipitação com sulfato de amônio (80%). M - Marcador de massa molecular e I - Proteínas obtidas após precipitação. 100 µg de proteínas foram aplicadas no gel.

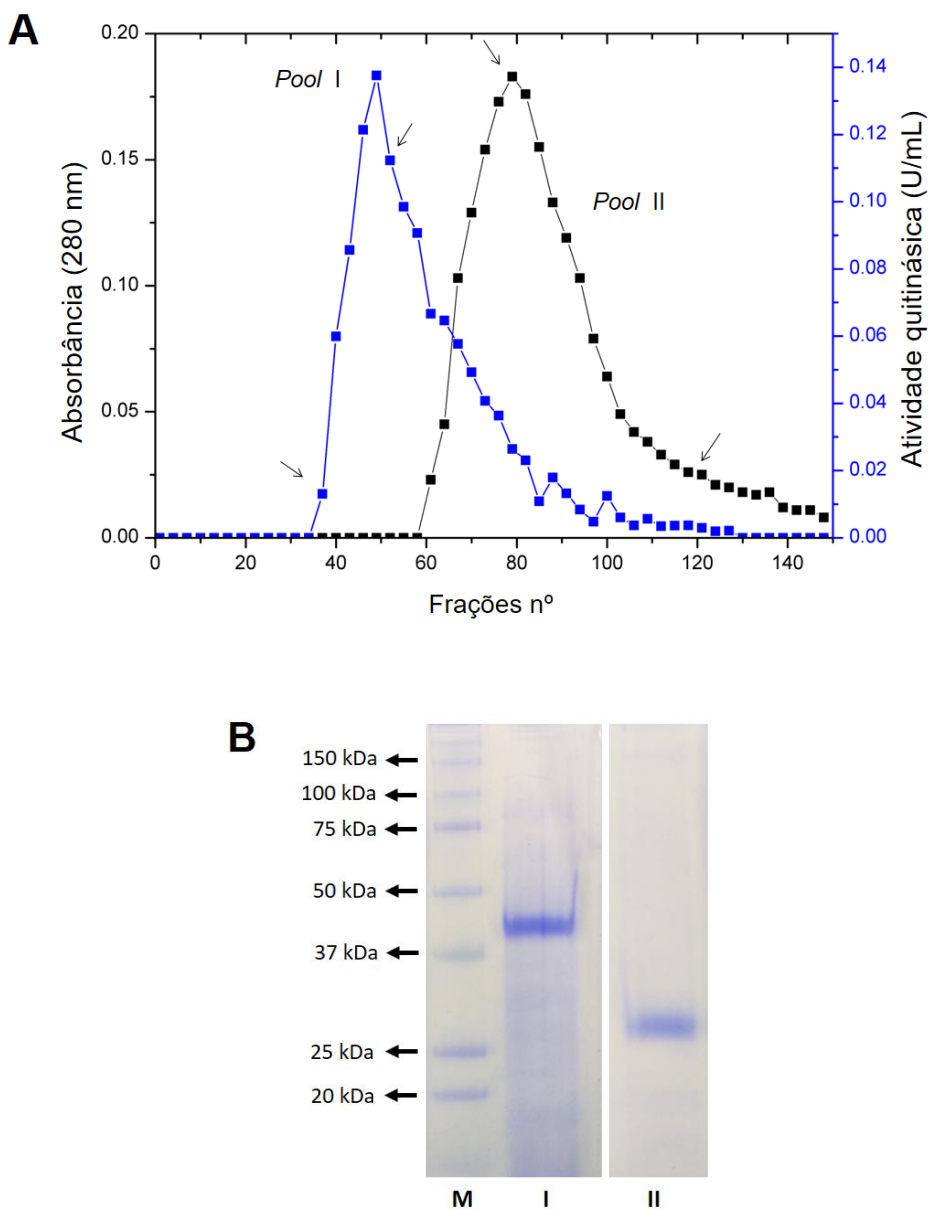


Fonte: Autora.

5.9.4 Purificação por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex - G100)

As proteínas precipitadas com sulfato de amônio foram aplicadas na resina Sephadex G-100. A Figura 33 A mostra o perfil cromatográfico obtido, identificando-se dois picos de proteínas (I e II) e a atividade quitinásica observada apenas no primeiro. Os picos obtidos foram dialisados, liofilizados e analisados por SDS-PAGE 12% (Figura 33 B). Observa-se no pico I uma banda proteica com massa molecular de 44 kDa, referente a quitinase produzida por *A. niveus*, já no pico II podemos observar uma proteína com massa molecular de 28 kDa. A quitinase produzida por *A. niveus*, foi purificada 1,97 vezes com recuperação de 40% (Tabela 7) e utilizada nas etapas de caracterização bioquímica e determinação dos parâmetros cinéticos.

Figura 33. Purificação de quitinases de *A. niveus* por Sephadex G-100 após precipitação com sulfato de amônio 80%. **A)** Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Sephadex G-100 (A) para a quitinase produzida por *A. niveus*. Símbolos: Absorbância a 280 nm (-■-) e Atividade enzimática a 405 nm (-■-). **B)** perfil proteico obtido por eletroforese desnaturante (SDS PAGE 12%), dos pools obtidos na cromatografia de exclusão molecular: I – Pico I, II – Pico II, e M - marcador de massa molecular. As frações reunidas são indicadas pelas setas.



Fonte: Autora.

Tabela 7. Purificação da quitinase produzida por *A. niveus*

Etapa	Volume (mL)	Proteínas (mg Totais)	Atividade (U Totais)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação (X)
Filtrado bruto	100	13,3	88	6,61	100	1
Precipitação com (NH ₄) ₂ .SO ₄	5	7,8	60	7,69	68,18	1,16
Sephadex G-100 Pico I	12	2,7	35,2	13,03	40	1,97

Fonte: Autora.

5.10 Caracterização Bioquímica

5.10.1 Determinação da massa molecular

A massa molecular nativa da quitinase de *A. niveus* foi de 44,57 kDa, determinada por coluna de filtração Sepharose CL-6B. Este perfil foi confirmado por SDS-PAGE 12% que revelou a presença de uma banda proteica com massa molecular aparente de $44,03 \pm 2,7$ kDa.

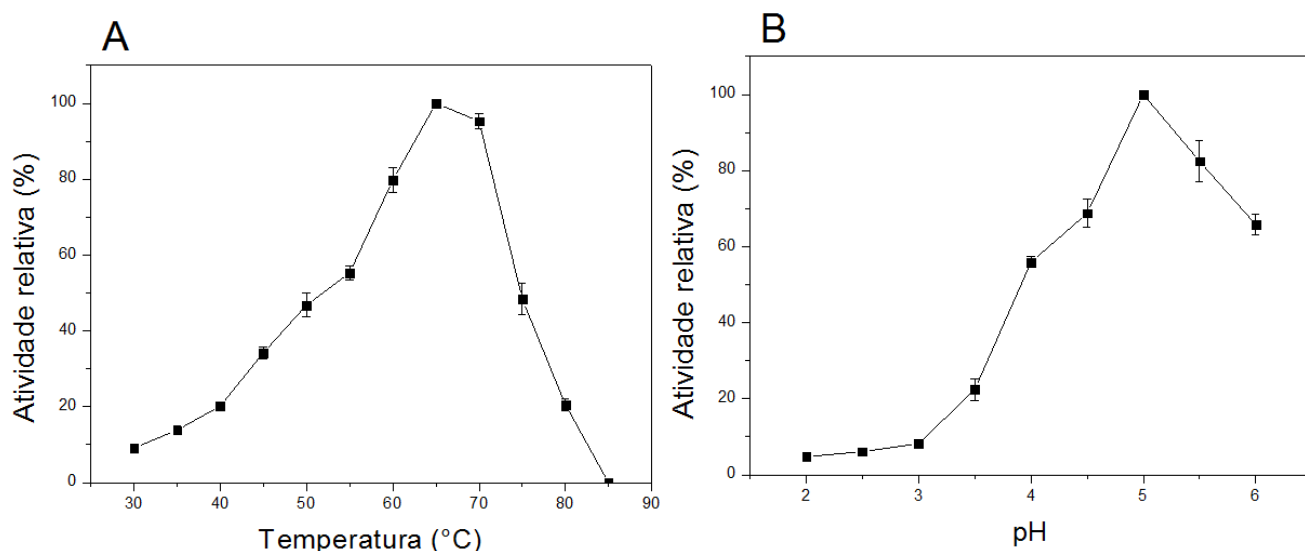
De acordo com Duo-Chuan (2006) a massa molecular de quitinases fúngicas varia de 27 a 190 kDa. A quitinase de *A. terreus* apresentou massa molecular de 60 kDa (FARAG et al, 2016) enquanto a quitinase purificada de *A. niger* LOCK apresentou massa de 43 kDa (BRZEZINSKA et al., 2012). Lee e colaboradores (2009) purificaram uma quitinase produzida por *Penicillium* sp. LYG 0704 com massa molecular de 47 kDa. Rattanakit e colaboradores (2007) purificaram três quitinases de *Aspergillus* sp. S1-13 com massas moleculares de 45 kDa, 51 kDa e 73 kDa. Binod e colaboradores (2005) purificaram quitinases produzidas por *Penicillium aculeatum* NRRL 2119 com massas moleculares estimadas de 82,7 kDa, 44,6 kDa, 28,2 kDa e 26,9 kDa. Três quitinases isoladas de *Trichoderma harzianum* apresentaram massas de 33 kDa, 37 kDa e 42 kDa (CRUZ et al., 1999), enquanto a quitinase de *Penicillium oxalicum* mostrou massa molecular de 54,9 kDa (RODRIGUEZ et al., 1995). Já a quitinase purificada de *A. fumigatus* YJ-407 apresentou massa molecular de 46 kDa (XIA et al., 2001).

5.10.2 Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade

As Figuras 34 A e 34 B mostram, respectivamente, os resultados obtidos para a temperatura ótima e pH ótimo de atividade da enzima purificada. Para a determinação da temperatura ótima observa-se um aumento progressivo da atividade quitinásica a partir de 25°C, sendo a maior atividade enzimática obtida na temperatura de 65°C (Figura 34 A). De acordo com Duo-Chuan (2006) a temperatura ótima de atividade para a maioria das quitinases produzidas por fungos varia, geralmente, de 40 a 50°C. Entretanto temperaturas de atividade mais altas como a encontrada neste trabalho para a quitinase de *A. niveus* já foram descritas para outras fúngicas. Brzezinska e colaboradores (2012) relataram a temperatura ótima de 40°C para a quitinase purificada de *A. niger* LOCK 62. Munster e colaboradores (2012) clonaram uma exoquitinase de *A. niger* com temperatura ótima de atividade de 55 a 65°C. A temperatura ótima de atividade das quitinases de *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 e *A. terreus* foi de 50°C (BINOD et al., 2005; FARAG et al., 2016). Diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* apresentaram atividade quitinásica ótima nas temperaturas de 50°C e 60°C (RUSTIGUEL, 2014). A temperatura ótima da quitinase purificada de *Aspergillus fumigatus* YJ-407 foi de 60°C (XIA et al., 2001). Já a quitinase dos termófilos, *Thermomyces lanuginosus* e *Talaromyces emersonii*, apresentaram atividade máxima a 55°C e 65°C, repectivamente (GUO et al., 2005; MCCORMACK et al., 1991).

Para a determinação do pH ótimo de atividade da enzima purificada foi observado um aumento da atividade enzimática a partir do pH 2,0 até atingir a maior atividade em pH 5,0, seguida por queda a partir do pH 5,5 (Figura 34 B). O pH ótimo de atividade da quitinase de *A. niveus* foi similar ao de outras quitinases descritas na literatura, que geralmente varia de 4,0 a 7,0 (DUO-CHUAN, 2006). O pH ótimo de atividade da quitinase purificada de *A. niger* LOCK 62 foi de 6,0 (BRZEZINSKA et al., 2012). Para as enzimas purificadas de *A. terreus* e *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 o pH ótimo foi de 5,6 e 5,5, respectivamente (FARAG et al., 2016; BINOD et al., 2005). Para as quitinases de *Trichothecium roseum* e *A. fumigatus* YJ-407 o pH ótimo foi de 5,0 (DUO-CHUAN et al., 2004; XIA et al., 2001). De acordo com Wang e colaboradores (2002), a quitinase de *Monascus purpureus* (Went) apresenta pH ótimo de 7,0.

Figura 34. Determinação da temperatura ótima (A) e pH ótimo (B) de atividade para a quitinase purificada de *A. niveus*. A temperatura ótima foi determinada incubando-se as reações em diferentes temperaturas (25 a 85°C). O pH ótimo foi determinado utilizando-se tampão ácido cítrico (50 mM) na faixa de pH 2,0 a 6,0.



Fonte: Autora.

5.10.3 Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH

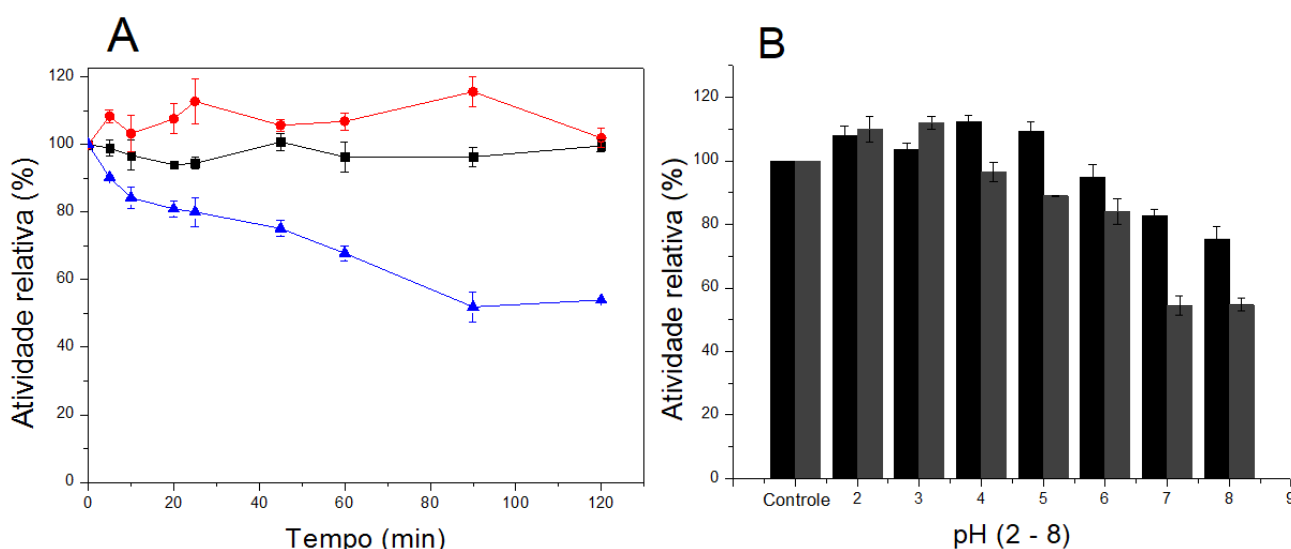
A Figura 35 A e B mostra os resultados obtidos na determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH da quitinase purificada de *A. niveus*.

Os resultados obtidos para termoestabilidade (Figura 35 A) mostram que, quando incubada na temperatura de 40°C, a quitinase apresenta atividade enzimática constante até o período de 120 h. Para a estabilidade a 50°C observa-se o aumento da atividade quitinásica em todos os períodos de incubação, ocorrendo um aumento de 17% na atividade após incubação por 90 min. Já para a termoestabilidade a 60°C, foi observado queda progressiva na atividade quitinásica a partir de 5 minutos de incubação e após 120 min a enzima ainda manteve 51% de sua atividade. Na literatura são relatadas diferentes termoestabilidades para as quitinases isoladas de diferentes microrganismos. Segundo Xia e colaboradores (2001) a quitinase de *A. fumigatus* YJ-407, reteve 40% de atividade quando incubada a 60°C por 30 min. A quitinase purificada de *A. niger* LOCK 62 perdeu 25% quando incubada a 40°C por 180 min (BRZEZINSKA et al., 2012). As endoquitinases 1 e 2 e uma exoquitinase de *Aspergillus* sp. S1-13 perderam, respectivamente, 50% a 60°C, 60% a 70°C e 50% a 70°C, de suas atividades enzimáticas (RATANAKITT et al., 2007). A quitinase de

Penicillium sp. LYG 0704 foi estável a 40°C (LEE et al., 2009) enquanto a quitinase de isolada de *Penicillium oxalicum* foi estável a 45°C (RODRÍGUEZ et al., 1995). Já a quitinase pura de *A. terreus* reteve 66% e 42% de sua atividade quando incubada a 60°C e 70°C por 60 min, respectivamente, e perdeu 90% de sua atividade após aquecimento a 90°C por 60 min (FARAG et al., 2016).

Os resultados obtidos para a estabilidade ao pH (Figura 35 B) mostram que a quitinase incubada por 2 horas em pH 2 e 3 manteve sua atividade, em pH 4 e 5 ocorreu um leve aumento, cerca de 10 %, da atividade enzimática, seguido por redução progressiva da atividade em pH 6, 7 e 8 (cerca de 25%). A enzima incubada por 24 horas em pH 2 e 3 apresentou um leve aumento da atividade (~10%) e, nos demais valores de pH a atividade foi decrescente, com a maior redução de 45% em pH 8. Rustiguel (2015) relatou que a quitinase do isolado IBCB 384 de *M. anisopliae* manteve 100% de sua atividade quando incubada no pH 7, a quitinase do isolado IBCB 425 manteve 70% da atividade em valores de pH 2,5 a 7,0 e a quitinase do isolado IBCB 167 manteve 60% de sua atividade no pH 5,5.

Figura 35. Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH da quitinase purificada de *A. niveus*. **A)** A termoestabilidade foi determinada incubando-se a enzima nas temperaturas de 40 °C (-■-), 50 °C (-●-) e 60 °C (-▲-), por diferentes períodos de tempo (5 a 120 minutos). **B)** A estabilidade ao pH foi determinada incubando-se a enzima em diferentes valores de pH (2 a 8) em tampão ácido cítrico (mM), por períodos de 2 h (preto) ou 24h (cinza).



Fonte: Autora.

5.10.4 Influência de diferentes compostos na atividade quitinásica

Com relação a ativação ou inibição das enzimas sabe-se que diferentes íons desempenham importantes funções influenciando as propriedades dos sistemas biológicos. Para as enzimas, a presença de íons pode gerar alterações cinéticas, além de alterar a sua estrutura terciária tornando-a mais ativa ou inativa. Podem ainda interferir na solubilidade levando a precipitação da enzima, podendo inclusive modificar a carga elétrica global da molécula (LEHNINGER et al., 2011). Outros compostos químicos que podem influenciar a atividade enzimática são os surfactantes, quelantes, desnaturantes e solventes orgânicos.

Avaliando o efeito de diversos compostos sobre a atividade enzimática (Tabela 8) observa-se que composto $MnCl_2$ foi o único capaz de ativar a quitinase de *A. niveus*, aumentando em 122,95% a atividade. Outros autores relataram o aumento da atividade enzimática na presença de íons Mn^{2+} para as quitinases de *M. anisopliae* (RUSTIGUEL, 2014), de *A. terreus* (FARAG et al., 2016), de *Penicillium* sp. (LEE et al., 2009) e de *Serratia marcescens* (ZAREI et al., 2011). Alguns autores ainda relataram a ativação de quitinases fúngicas por íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} (FARAG et al., 2016; BRZEZISNSKA et al., 2012; LEE et al., 2009). Entretanto neste trabalho não foi observada a ativação da enzima na presença desses íons.

Houve redução da atividade quitinásica na presença dos compostos KI, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $CaCl_2$, e $ZnSO_4$, destacando-se $CuSO_4$ (26%) e $ZnSO_4$ (22%). A redução da atividade da quitinase de *Penicillium* sp. LYG 0704 foi observada na presença de íons Fe^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} (LEE et al., 2009). Xia e colaboradores (2001) observaram a uma forte redução da atividade enzimática da quitinase de *A. fumigatus* YJ-407 na presença de íons Fe^{2+} e Zn^{2+} . A inibição da atividade enzimática na presença de Zn^{2+} e Cu^{2+} foi relatada para a quitinase de *Bacillus* sp. (LEE et al., 2007). Três quitinases produzidas por diferentes isolados de *M. anisopliae* também apresentaram forte redução de atividade na presença de $CuSO_4$ (RUSTIGUEL, 2014).

O EDTA é um composto quelante e capaz de formar complexos estáveis com vários íons metálicos e na maioria das enzimas afeta negativamente a atividade catalítica, entretanto, neste trabalho a enzima foi fracamente afetada pelo EDTA, mantendo 91% de sua atividade na presença desse composto. A atividade enzimática das quitinases de *A. fumigatus* YJ-407 e *A. niger* LOCK 62 também não foi influenciada pela presença de EDTA (XIA et al., 2001; BRZEZISNSKA et al., 2012).

Já a quitinase de *A. terreus* foi fortemente inibida por EDTA enquanto a quitinase de *M. anisopliae* foi ativada na presença deste composto (FARAG et al., 2016; RUSTIGUEL, 2014).

A presença de agentes desnaturantes, HCl e acetona não influenciou significativamente a atividade enzimática da quitinase de *A. niveus*. Na presença de uréia a enzima manteve 85% de sua atividade. De acordo com outros autores, a uréia pode provocar alteração conformacional na estrutura terciária de enzimas, promovendo a desnaturação. Na presença de β -mercaptoetanol e DTT, agentes desnaturantes capazes de clivar pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteínas, a enzima manteve 95% e 90% de sua atividade, respectivamente. Na presença de SDS e acetona a enzima manteve 100% da sua atividade enquanto na presença de HCl a enzima manteve 90% de sua atividade.

A quitinase de *A. fumigatus* YJ-407 manteve sua atividade quando incubada na presença de uréia e apresentou redução de apenas 20% de sua atividade na presença de SDS (XIA et al., 2001). Diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho, Farag e colaboradores (2016) observaram que a quitinase de *A. terreus* foi fortemente inibida na presença de acetona. Já Rustiguel (2014) demonstrou que a quitinase de *M. anisopliae* foi ativada na presença de β -mercaptoetanol. A resistência à desnaturação em solventes orgânicos, tensoativos e agentes desnaturantes são características favoráveis para aplicação industrial da quitinase de *A. niveus*.

Tabela 8. Influência de diferentes compostos sobre a atividade da quitinase secretada por *A. niveus*.

Composto	Concentração	Atividade relativa (%)
Ausente		100
MnCl ₂	1 mM	222,95 ± 0,56
MgSO ₄	1 mM	96,97 ± 0,28
KI	1 mM	79,93 ± 2,64
CuSO ₄	1 mM	74,45 ± 2,07
FeSO ₄	1 mM	87,95 ± 0,1
CoCl ₂	1 mM	99,24 ± 4,25
CaCl ₂	1 mM	83,08 ± 1,41
ZnSO ₄	1 mM	78,12 ± 0,09
EDTA	1 mM	91,32 ± 8,58
SDS	1 mM	103,19 ± 3,49
Uréia	1 mM	85,21 ± 4,44
β-Mercaptoetanol	1 mM	94,30 ± 1,41
DTT	1 mM	90,09 ± 1,70
HCl	1%	90,54 ± 1,73
Acetona	1%	100,18 ± 2,38

Fonte: Autora

5.11 Determinação dos parâmetros cinéticos

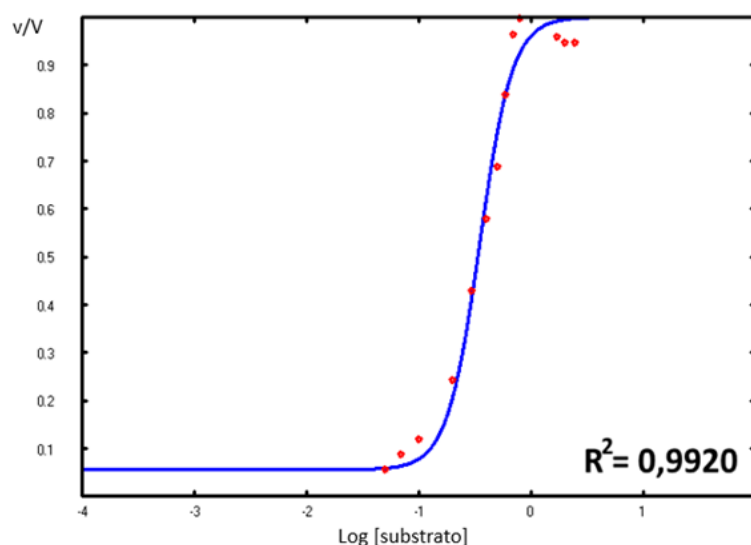
As constantes cinéticas dependem do substrato utilizado e da fonte de enzima. Para hidrólise da quitina existem na natureza uma multiplicidade de quitinases, que estão relacionadas com a necessidade de produzir isoformas com atividades de quitina diacetilase, endo e exoquitinases para hidrolisar totalmente o polímero de quitina (NAHAR et al., 2004). Neste contexto, as propriedades cinéticas da quitinase purificada de *A. niveus* foram avaliadas utilizando o substrato 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminideo.

Na Figura 36 pode ser observado o gráfico sigmoide gerado através do programa SigrafW a partir dos parâmetros cinéticos da quitinase purificada de *A. niveus*. A quitinase de *A. niveus* apresentou K_m de 3,51 mM, $V_{máx}$ = 9,68 U/mg de proteína e coeficiente de Hill (n) de 2,98, indicando cooperatividade positiva. O coeficiente de Hill (n) é uma medida do grau de cooperatividade, o qual é um

fenômeno bastante comum e pode ser crucial na regulação da resposta enzimática a mudanças na concentração do substrato. A cooperatividade positiva faz com que a enzima seja muito mais sensível à concentração de substrato e, com isso, a atividade pode variar fortemente mesmo em intervalos muito estreitos de concentrações de substrato (PORTER; MILLER, 2012; RICARD; CORNISH-BOWDEN, 1987). Thimoteo e colaboradores (2017) estimaram, para a quitinase MetaChi18A, utilizando quitina coloidal como substrato, n de 4,12, indicando também cooperatividade positiva. Segundo os autores esse fenômeno pode ocorrer devido a histerese, um atraso na enzima em atingir sua forma totalmente ativa que envolve mudanças conformacionais. Como a quitinase é uma enzima multidomínio, o substrato deve interagir com domínios de ligação que poderiam organizar a conformação facilitando o acesso do domínio catalítico ao substrato (THIMOTEO et al., 2017).

Rustiguel (2014) avaliou os parâmetros cinéticos das quitinases de quatro isolados de *M. anisopliae* utilizando o substrato 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminideo e verificou que o isolado IBCB 360 apresentou maior afinidade pelo substrato com K_m de 0,57 mM e V_{max} de 3,38 U/mg de proteína. Com o mesmo substrato utilizado neste trabalho, Godone (2011) observou um K_m de 0,51 mM para a quitinase de *Litopenaeus schimitt*. Guo e colaboradores (2004) avaliaram os parâmetros cinéticos da quitinase de *Aeromonas schubertii* utilizando quitina coloidal como substrato e encontraram um K_m de 2,9 mM. Zarei e colaboradores (2011) encontraram K_m de 8,3 mg/mL e V_{max} de 2,4 mg/mL para uma quitinase de *Serratia marcescens* B4A. Já a quitinase de *Aspergillus fumigatus* YJ-407 apresentou K_m de 1,12 mg.mL⁻¹ e 1,84 mg.mL⁻¹ quando utilizados os substratos quitina e quitosana, respectivamente (XIA et al., 2001).

Figura 36. Gráfico sigmoide gerado através do programa SigrafW® a partir dos parâmetros cinéticos da quitinase purificada de *A. niveus* utilizando o substrato 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminideo.



Fonte: Autora.

5.12 Avaliação da atividade antifúngica da quitinase de *A. niveus*

Na Tabela 9 são mostrados os diâmetros dos halos de inibição obtidos para a ação da quitinase de *A. niveus* frente aos fungos *A. niger* e *A. fumigatus*. A enzima inibiu o crescimento de *A. niger* como observado pela formação do halo de 2 mm (Figura 37 A). Para *A. fumigatus* não foi detectado halo de inibição (Figura 37 B). Para o miconazol foram observados halos de 5 e 3 mm, respectivamente para *A. niger* e *A. fumigatus*. Para o controle de crescimento com tampão acetato de sódio não foi observada a presença de halo. É importante destacar a ocorrência da inibição do crescimento de *A. niger* mesmo utilizando baixa concentração (6 U) da quitinase, quando comparado ao utilizado por outros autores. Por exemplo, a quitinase de *A. terreus* em concentrações de 10 U e 50 U foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *A. niger*, *Penicillium oxisporum*, *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* sendo as maiores inibições observadas quando utilizadas 50 U da enzima (FARAG et al., 2016). Ainda de acordo com Farag e colaboradores (2016), a quitinase de *A. terreus* na concentração de 50 U também foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Diversas quitinases são descritas na literatura devido ao seu potencial antifúngico. A quitinase isolada de *Aspergillus niger* LOCK 62 inibiu o crescimento de

Fusarium culmorum, *Fusarium solani* e *R. solani* (BRZEZINSKA et al., 2012). Já a quitinase de *Serratia marcescens* inibiu o crescimento dos fungos *R. solani*, *Bipolaris* sp., *Alternaria raphani* e *Alternaria brassicicola* (ZAREI et al., 2011). Quitinases produzidas por *Trichoderma* são as enzimas com efeito fungicida mais bem estudadas, sendo ativas contra diversos fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Mucor* sp. Essas enzimas são potentes inibidoras de importantes fitopatógenos. Estes estudos demonstram que a utilização de compostos de origem natural, como as quitinases, pode contribuir para o combate de doenças fúngicas em plantas além de diminuir o uso de compostos químicos tóxicos ao meio ambiente.

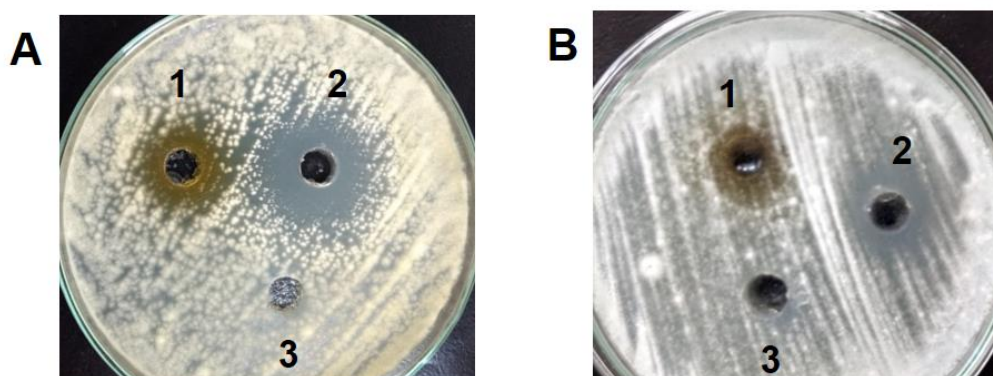
Tabela 9. Avaliação da atividade antifúngica da quitinase produzida por *A. niveus*.

Amostra	Diâmetro halo de inibição (mm)	
	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>
Quitinase produzida por <i>A. niveus</i>	2 ± 0,4	ND
Miconazol	5 ± 0,3	3 ± 0,3
Tampão acetato de sódio (20 mM, pH 5,0)	ND	ND

ND - Não detectado

Fonte: Autora.

Figura 37. Avaliação da atividade antifúngica da quitinase de *Aspergillus niveus* frente aos fungos *Aspergillus niger* (A) e *Aspergillus fumigatus* (B). Poços: 1) Quitinase; 2) Miconazol e 3) Tampão acetato de sódio.



Fonte: Autora

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Entre diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus* estudadas, o fungo *Aspergillus niveus* demonstrou ser uma espécie interessante com capacidade de secretar ribotoxinas e quitinases, ambas proteínas com potencial para diversas aplicações biotecnológicas;
- Foi identificada uma ribotoxina secretada por *A. niveus* com alta identidade a outras ribotoxinas descritas na literatura;
- A ribotoxina secretada por *A. niveus* foi capaz de inibir a proliferação celular de linhagens tumorais, sendo as maiores inibições de observadas para as linhagens meduloblastoma (ONS) e melanoma (HT144T). A ribotoxina também inibiu a proliferação frente a linhagem de fibroblastos (MRC5) indicando sua citotoxicidade para células saudáveis e, portanto, apresenta grande potencial para aplicação na construção de imunotoxinas.
- Não foram observadas atividades antimicrobianas frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* e frente aos fungos *A. nidulans* e *T. rubrum* para o filtrado bruto e frações purificadas das ribotoxinas analisadas. Entretanto, em altas concentrações a ribotoxina de *A. niveus* foi capaz de inibir o crescimento de *A. niger*.
- A quitinase secretada por *A. niveus* apresentou características interessantes para possíveis aplicações industriais como alta temperatura de atividade e termoestabilidade além de manter sua atividade na presença de diferentes compostos, incluindo agentes desnaturantes.
- Em baixa concentração, a quitinase foi capaz de inibir o crescimento de *A. niger* demonstrando seu potencial para possíveis aplicações biotecnológicas como, por exemplo, no controle de fungos fitopatogênicos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathology**, v. 112, p. 35-37, 1990.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A.; SHAHVERDI, A. R.; SEPEHRIZADEH, Z. Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 402-407, 2010.
- AGARWAL, R.; CHAKRABARTI, A.; SHAH, A.; GUPTA, D.; MEIS, J. F.; GULERIA, R.; MOSS, R.; DENNING, D. W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. **Opinions in Allergy**, v. 43, p. 850-873, 2013.
- ÁLVAREZ-GARCÍA, E.; ALEGRE-CEBOLLADA, J.; BATANERO, E.; MONEDERO V.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; GARCIA-FERNÁNDEZ, R.; GAVILANES, J. G.; MARTINEZ-DEL-POZO, A. *Lactococcus lactis* as a vehicle for the heterologous expression of fungal ribotoxin variants with reduced IgE-binding affinity. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 1-8, 2008.
- ÁLVAREZ-GARCIA, E.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANEZ, J. G. Role of the basic character of α -sarcin's NH₂-terminal β -hairpin in ribosome recognition and phospholipid interaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 481, p. 37-44, 2009.
- ÁLVAREZ-GARCIA, E.; BATANERO, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, R.; VILLALBA, M.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A. A deletion variant of the *Aspergillus fumigatus* ribotoxin Asp f 1 induces an attenuated airway inflammatory response in a mouse model of sensitization. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 20, p. 69-75, 2010.
- AMARAL, M. C. S.; ANDRADE, L. H.; LANGE, L. C.; BORGES, C. P. Evaluation of the biotreatability of bleach pulp mill effluent by aerobic and anaerobic process. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, p. 253-262, 2013.
- ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M.; SWAMINATHAN, K. Biotreatment of distillery effluent using *Aspergillus niveus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, p. 268-277, 2003.
- ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M.; PRADEEP, B. V.; SWAMINATHAN, K. Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 921-929, 2006.
- ARRUDA, L. K.; MANN, B. J.; CHAPMAN, M. D. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f I, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus* related diseases. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 3354-3359, 1992.

- ARRUDA, L. K.; PLATTS-MILLS, T. A.; FOX, J. W.; CHAPMAN, M. D. *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 1529-1532, 1990.
- AYUB, M. J.; SMULSKI, C. R.; MA, K. W.; LEVIN, M. J.; SHAW, P. C.; WONG, K. B. The C-terminal end of P proteins mediates ribosome inactivation by trichosanthin but does not affect the pokeweed antiviral protein activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, p. 314-319, 2008.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2/3, p. 27-34, 2007.
- BARONE, R.; SIMPORE, J.; MALAGUARNERA, L.; PIGNATELLI, S.; MUSUMECI, S. Plasma chitotriosidase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinica Chimica Acta**, v. 331, p. 79-85, 2003.
- BENTO, A.; ARROBAS, A. M. Asthma and its differential diagnoses. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, p. 1185-1191, 2009.
- BERBEE, M. L.; YOSHIMURA, A.; SUGIYAMA, J.; TAYLOR, J. W. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. **Mycologia**, v. 87, p. 210-222, 1995.
- BINOD, P.; PUSZTAHELYI, T.; NAGY, V.; SANDHYA, C.; SZAKÁCS, G.; PÓCSI, I.; PANDEY, A. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 880-887, 2005.
- BLAISEAU, P. L.; KUNZ, C.; GRISON, R.; BERTHEAU, Y.; BRYGOO, Y. Cloning and expression of chitinase gene from the hyperparasitic fungus *Aphanocladium album*. **Current Genetics**, v. 21, p. 61-66, 1992.
- BLEAU, G.; MASSICOTTE, F.; MERLEN, Y.; BOISVERT, C. Mammalian chitinase-like proteins. **EXS**, v. 87, p. 211-221, 1999.
- BOOT, R. G.; BLOMMAART, E. F.; SWART, E.; GHARHARALI-VAN DER VLUGT, K.; BIJL, N.; MOE, C. Identification of a novel acid mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 6770-6778, 2001.
- BOOT, R. G.; BUSSINK, A. P.; VERHOEK, M.; DE BOER, P. A.; MOORMAN, A. F.; AERTS, J. M. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 53, p. 1283-1292, 2005.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMELD, K. A.; SHRADER, W. D.; IMPERIALI, B.; GODDARD, W. A. Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 280, p. 913-923, 1998.

BRANDHORST, T.; KENEALY, W. R. Effects of leader sequences upon the heterologous expression of restrictocin in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 601-611, 1995.

BRANDHORST, T.; KENEALY, W. R. Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 1429-1435, 1992.

BRANDHORST, T.; DOWD, P. F.; KENEALY, W. R. The effect of fungal ribosome inactivating proteins upon feeding choice in *C. freemani*, and indications of a mutualistic relationship with *A. restrictus*. Environmental mycology. **Mycopathologia**, v. 152, p. 155-158, 2001.

BRANDHORST, T.; DOWD, P. F.; KENEALY, W. R. The ribosome-inactivating protein restrictocin deters insect feeding on *Aspergillus restrictus*. **Microbiology**, v. 142, p. 1551-1556, 1996.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U. Production of chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Current Microbiology**, v. 65, p. 666-672, 2012.

CABIB, E.; ROH, D.-H.; SCHMIDT, M.; CROTTI, L. B.; VARMA, A. The yeast cell and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 19679-19682, 2001.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CANNON, R. D.; NIIMI, K.; JENKINSON, H. F.; SHEPHERD, M. G. Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2640-2647, 1994.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 149-164, 2010.

CARRERAS-SANGRÀ, N.; TOMÉ-AMAT, J. GARCÍA-ORTEGA, L.; BATT, C. A.; ONÑADERRA, M.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G.; LACADENA, J. Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin α -sarcin. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 25, p. 425-435, 2012.

CARSOLIO, C.; GUTIERREZ, A.; JIMENEZ, B.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Characterization of ech42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 91, p. 10903-10907, 1994.

CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 638-697, 2002.

CASTAÑO-RODRÍGUEZ, C.; OLOMBRADA, M.; PARTIDA-HANON, A.; LACADENA, J.; ONÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G.; GARCÍA-ORTEGA, L.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A. Involvement of loops 2 and 3 of α -sarcin on its ribotoxic activity. **Toxicon**, v. 96, 2015. doi:10.1016/j.toxicon.2015.01.007.

CHANG, N. C.; HUNG, S. I.; HWA, K. Y.; KATO, I.; CHEN, J. E.; LIU, C. H. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 17497-17506, 2001.

CHEN, H. Exploiting the intron-splicing mechanism of insect cells to produce viral vectors harboring toxic genes for suicide gene therapy. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 1, 2012. doi:10.1038/mtna.2012.48.

CHEN, J.-K.; SHEN, C.-R.; LIU, C.-L. N-Acetylglucosamine: production and applications. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2493-2516, 2010.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHOU, Y.; CHEN, Q.; SHEN, X.; YANG, Q. Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting. **Acta Crystallographica**, v. 70, p. 932-942, 2014.

CHIOU, J. C.; LI, X. P.; REMACHA, M.; BALLESTA, J. P.; TUMER, N. E. The ribosomal stalk is required for ribosome binding, depurination of the rRNA and cytotoxicity of ricin A chain in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 70, p. 1441-1452, 2008.

COCA, M.; BORTOLOTTI, C.; RUFAT, M.; PENAS, G.; ERITJA, R.; THARREAU, D.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; MESSEGUER, J.; SAN SEGUNDO, B. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus Giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe Grisea*. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 245-259, 2004.

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

COLUSSI, P. A.; SPECHT, C. A.; TARON, C. H. Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2862-2869, 2005.

CORY, J. S.; HIRST, M. L.; WILLIAMS, T.; HAILS, R. S.; GOULSON, D.; GREEN, B. M.; CARTY, T. M.; POSSEE, R. D.; CAYLEY, P. J.; BISHOP, D. H. L. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. **Nature**, v. 370, p. 138-140, 1994.

CRUZ, J. de la; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTO-TORO, J. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, p. 859-867, 1992.

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 447-465, 2009.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.

DE BEKKER, C.; SMITH, P. B.; PATTERSON, A. D.; HUGHES, D. P. Metabolomics reveals the heterogeneous secretome of two entomopathogenic fungi to ex vivo cultured insect tissues. **PLoS One**, v. 8, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0070609.

DI, R.; TUMER, N. E. Pokeweed antiviral protein: its cytotoxicity mechanism and applications in plant disease resistance. **Toxins**, v. 7, p. 755-772, 2015.

DUO-CHUAN, C.; HEN, S.; JING, LU. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 223-229, 2005.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, p. 345-360, 2006.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. **Methods in Enzymology**, v. 541, p. 85-94, 2014.

ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A chain. Mechanism of action of the toxic lectin on eukaryotic ribosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 8128-8130, 1987.

ENDO, Y.; WOOL, I. G. The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 9054-9060, 1982.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M. Y.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5908-5912, 1987.

ENDO, Y.; TSURUGI, K.; OKA, T.; NATORI, Y. The biosynthesis of a cytotoxic protein, alpha-sarcin, in a mold of *Aspergillus giganteus*. I Synthesis of pre- and pro alpha-sarcin in vitro. **The Tokushima Journal of Experimental Medicine**, v. 40, p. 1-6, 1993a.

ENDO, Y.; OKA, T.; TOKOTA, S.; TSURUGI, K.; NATORI, Y. The biosynthesis of a cytotoxic protein, α -sarcin, in a mold of *Aspergillus giganteus*. II Maturation of precursor form of α -sarcin in vivo. **Tokushima Journal of Experimental Medicine**, v. 40, p. 7-12, 1993b.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 285-300, 1990.

FARAG, A. M.; ABD-ELNABEY, H. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-SHENAWY, M. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 185-192, 2016.

FARAG, M. A.; AL-NUSARIE, S. T. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 1567-1578, 2014.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1224-1231, 2008.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, p. 871-879, 2005.

FU, X.; YAN, Q.; YANG, S.; YANG, X.; GUO, Y.; JIANG, Z. An acidic, thermostable exochitinase with β -N-acetylglucosaminidase activity from *Paenibacillus barengoltzii* converting chitin to N-acetyl glucosamine. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014. doi:10.1186/s13068-014-0174-y.

FUSETTI, F.; VON MOELLER, H.; HOUSTON, D.; ROZEBOOM, H. J.; DIJKSTRA, B. W.; BOOT, R. G. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 25537-25544, 2002.

GALFI, P.; NEOGRADY, Z.; AMBERGER, A.; MARGREITER, R.; CSORDAS, A. Sensitization of colon cancer cell lines to butyrate-mediated proliferation inhibition by combined application of indomethacin and nordihydroguaiaretic acid. **Cancer Detection and Prevention**, v. 29, p. 276-285, 2005.

GARCÍA, I.; LORA, J. M.; CRUZ, J. de la; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-TORO, J. A. Cloning and characterization of a chitinase (chit42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v. 27, p. 83-89, 1994.

GARCÍA-GÓMEZ, J. J.; BABIANO, R.; LEBARON, S.; FROMENT, C.; MONSARRAT, B.; HENRY, Y.; CRUZ, J. de la. Nop6, a componente of 90S pre-ribosomal particles, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **RNA Biology**, v. 8, p. 112-124, 2011.

GARCÍA-MAYORAL, F.; GARCÍA-ORTEGA, L.; ÁLVAREZ-GARCÍA, E.; BRUIX, M.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A. Modeling the highly specific ribotoxin recognition of ribosomes. **FEBS Letters**, v. 579, p. 6859-6864, 2005.

GARCÍA-ORTEGA, L.; LACADENA, J.; MANCHEÑO, J. M.; OÑADERRA, M.; KAO, R.; DAVIES, J.; OLMO, N.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G. Involvement of the amino-terminal β -hairpin of the *Aspergillus* ribotoxins on the interaction with membranes and nonspecific ribonuclease activity. **Protein Science**, v. 10, p. 1658-1668, 2001.

GARCÍA-ORTEGA, L.; MASIP, M.; MANCHEÑO, J. M.; OÑADERRA, M.; LIZARBE, M. A.; GARCÍA-MAYORAL, M. F.; BRUIX, M.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G. Deletion of the NH₂-terminal β -hairpin of the ribotoxin α -sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease. **Journal of Biology Chemistry**, v. 277, p. 18632-18639, 2002.

GARCÍA-ORTEGA, L.; ÁLVAREZ-GARCÍA, E.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; JOSEPH, S. Cleavage of the sarcin-ricin loop of 23S rRNA differentially affects EF-G and EF-Tu binding. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 4108-4119, 2010.

GASSET, M.; OÑADERRA, M.; THOMAS, P. G.; GAVILANES, J. G. Fusion of phospholipid vesicles produced by the anti-tumor protein α -sarcin. **Biochemistry Journal**, v. 265, p. 815-822, 1990.

GASSET, M.; MANCHEÑO, J. M.; LACADENA, J.; TURNAY, J.; OLMO, N.; LIZARBE, M. A.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; OÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G. α -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles. **Current Topics Peptide Protein Research**, v. 1, p. 99-104, 1994.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 1-10, 2007.

GHANEM, K. M.; AL-GARNI, S. M.; AL-MAKISHAH, N. H. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 5135-5146, 2010.

GIANFRANCESCO, F.; MUSUMECI, S. The evolutionary conservation of the human chitotriosidase gene in rodents and primates. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 105, p. 54-56, 2004.

GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KOHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 250-258, 2012.

GOW, N. A. R.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 112-122, 2011.

GRAHAM, L. S.; STICKLEN, M. B. Plant chitinases. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 1057-1083, 1994.

GRAMKOW, A. W.; PERECMANIS, S.; SOUSA, R. L.; NORONHA, E. F.; FELIX, C. R.; NAGATA, T.; RIBEIRO, B. M. Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses. **Virology Journal**, v. 7, p. 1-10, 2010.

GUIMARÃES, L. H. S.; NOGUEIRA-PEIXOTO, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENCE, H. F.; MORAES, M. de L. T. de; JORGE, J. A. Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niger* using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 237-241, 2009.

GUO, R. F.; LI, D. C.; WANG, R. Purification and properties of a thermophilic chitinase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 45, p. 270-274, 2005.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p.17-34, 2003.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHAMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: an update. **Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences**, v. 5, p. 21-29, 2013.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Mycology Research**, v. 99, p. 441-446, 1995.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, p. 313-318, 1993.

HARMAN, G. E.; HOWELL C. R.; VITERBO, A.; CHET, L.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 533-543, 2012.

- HASSAN, M.; KJOS, M.; NES, I. F.; DIEP, D. B.; LOTFIPOUR, F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 723-736, 2012.
- HEGEDÜS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: more than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 132-145, 2013.
- HENRISSAT, B. Classification of chitinase modules. **EXS**, v. 87, p.137-156, 1999.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.
- HERRERO-GALÁN, E.; LACADENA, J.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; BOUCIAS, D. G.; OLMO, N.; OÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G. The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* is a ribotoxin. **Proteins**, v. 72, p. 217-228, 2008.
- HERRERO-GALÁN, E.; GARCÍA-ORTEGA, L.; LACADENA, J.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; OLMO, N.; GAVILANES, J. G.; OÑADERRA, M. Implication of an Asp residue in the ribonucleolytic activity of hirsutellin A reveals new electrostatic interactions at the active site of ribotoxins. **Biochimie**, v. 94, p. 427-33, 2012a.
- HERRERO-GALÁN, E.; GARCÍA-ORTEGA, L.; LACADENA, J.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; OLMO, N.; GAVILANES, J. G.; OÑADERRA, M. A non-cytotoxic but ribonucleolytically specific ribotoxin variant: implication of tryptophan residues in the cytotoxicity of hirsutellin A. **Biological Chemistry**, v. 393, p. 449-456, 2012b.
- HILL, T. W.; KAFER, E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 48, p. 20-21, 2001.
- HOLLIS, T.; MONZINGO, A. F.; BORTONE, K.; ERNST, S. R.; ROBERTUS, J. D. The X-ray structure of a chitinase from the fungus pathogenic *Coccidioides immitis*. **Protein Science**, v. 9, p. 544-551, 2000.
- HORSH, M.; MAYER, C.; SENNHAUSER, U.; RAST, D. M. β -N-acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 76, p. 187-218, 1997.
- HWU, L.; HUANG, K. C.; CHEN, D. T.; LIN, A. The action mode of the ribosome-inactivating protein α -sarcin. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, p. 420-428, 2000.
- HWU, L.; CHO, C. J.; TZEANZ, S. S.; LIN, A. Nucleotide sequence and the action of ribotoxin gene (sar gene) of *Penicillium* isolates from Taiwan. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 42, p. 101-107, 2001.

INCEOGLU, A. B.; KAMITA, S. G.; HINTON, A. C.; HUANG, Q.; SEVERSON, T. F.; KANG, K.; HAMMOCK, B. D. Recombinant baculoviruses for insect control. **Pest Management Science**, v. 57 p. 981-987, 2001.

ISLAM, S.; BHUIYAN, R. B.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, 2016. doi:10/1007/s10924-016-0865-5.

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

JERÔNIMO, C. E. M.; FERNANDES, H. G.; MELO, H. N. S.; SOUSA, J. F. Estudo comparativo entre técnicas de determinação da matéria orgânica em efluentes industriais de composição carbonácea. **Holos**, v. 2, p. 34-44, 2012.

KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 3, p. 276-281, 1999.

KAO, R.; DAVIES, J. Single amino acid substitutions affecting the specificity of the fungal ribotoxin mitogillin. **FEBS Letters**, v. 466, p. 87-90, 2000.

KAO, R.; MARTÍNEZ-RUIZ, A.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; CRAMERI, R.; DAVIES, J. Mitogillin and related fungal ribotoxins. **Methods in Enzymology**, v. 341, p. 324-335, 2001.

KASPRESEWSKA, A. Plant chitinases: regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 809-824, 2003.

KARASUDA, S.; TANAKA, S.; KAJIHARA, H.; YAMAMOTO, Y.; KOGA, D. Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 221-224, 2003.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. **Protein Expression and Purification**, v. 2, p. 210-220, 2003.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KIM, C. S.; LEE, J. B.; KIM, B. S.; NAM, Y. H.; SHIN, K. S.; KIM, J. W.; KIM, J. E.; KWON, G. S. A technique for the prevention of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* M130. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1-7, 2014.

KIM, S.; MATSUO, I.; AJISAKA, K.; NAKAJIMA, H.; KITAMOTO, K. Cloning and characterization of the nagA gene that encoded b-N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, p. 2168-2175, 2002.

KNUF, C; NIELSEN, J. Aspergilli: systems biology and industrial applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, p. 1147-1155, 2012.

KORENNYKH, A. V.; CORRELL, C. C.; PICCIRILLI, J. A. Evidence for the importance of electrostatics in the function of two distinct families of ribosome inactivating toxins. **RNA**, v. 13, p. 1391-1396, 2007.

KRAHE, M.; ANTRANIKIAN, G.; MARKEL, H. Fermentation of extremophilic microorganisms. **FEMS Microbiology**, v. 18, p. 271-285, 1996.

KRESSLER, D.; HURT, E.; BASSLER, J. Driving ribosome assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, p. 673-683, 2010.

KRESSLER, D.; LINDER, P.; CRUZ, J. de. Proteins trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 7897-7912, 1999.

KRISHNAVENI, B.; RAGUNATHAN, R. Chitinase production from marine wastes by *Aspergillus terreus* and its application in degradation studies. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, p. 76-82, 2014.

KUMAR, K. K.; POOVANNAN, K.; NANDAKUMAR, R.; THAMILARASI, K.; GEETHA, C.; JAYASHREE, N.; KOKILADEVI, E.; RAJA, J. J.; SAMIYAPPAN, R.; UDHAKAR, D.; BALASUBRAMANIAN, P. A high throughput functional expression assay system for a defence gene conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. **Plant Science**, v.165, p. 969-976, 2003.

KUMAR, P. S.; SINGH, L. Enabling mycelial application of *Hirsutella thompsonii* for managing the coconut mite. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p. 169-182, 2008.

KURANDA, M. J.; ROBBINS, P. W. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 19758-19767, 1991.

KURUP, V. P.; BANERJEE, B.; MURALI, P. S.; GREENBERGER, P. A.; KRISHNAN, M.; HARI, V.; FINK, J. N. Immunodominant peptide epitopes of allergen, Asp f 1 from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Peptides**, v. 19, p. 1469-1477, 1998.

LACADENA, J.; MANCHEÑO, J. M.; MARTÍNEZ-RUIZ, A.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GASSET, M.; OÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G. Substitution of histidine-137 by glutamine abolishes the catalytic activity of the ribosome-inactivating protein α -sarcin. **Biochemical Journal**, v. 309, p. 581-586, 1995.

LACADENA, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, E.; CARRERAS-SANGRÀ, N.; HERRERO-GALÁN, E.; ALEGRE-CEBOLLADA, J.; GARCÍA-ORTEGA, L.; ONÁDERRA, M.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A. Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 212-237, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, Y.; LIU, K.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; LI, K.; WANG, N.; SHU, C.; WU, Y.; WANG, C.; BUSHLEY, K. E.; XIANG, M.; LIU, X. Comparative genomics and transcriptomics analyses reveal divergent lifestyle features of nematode endoparasitic fungus *Hirsutella minnesotensis*. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, p. 3077-3093, 2014.

LAMY, B.; DAVIES, J. Isolation and nucleotide sequence of the *Aspergillus restrictus* gene coding for the ribonucleolytic toxin restrictocin and its expression in *Aspergillus nidulans*: the leader sequence protects producing strains from suicide. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1001-1006, 1991.

LAMY, B.; MOUTAOUAKIL, M.; LATGE, J. P. Y.; DAVIES, J. Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 1811-1815, 1991.

LANDI, N.; PACIFICO, S.; RAGUCCI, S.; IGLESIAS, R.; PICOLELLA, S.; DI GIUSEPP, A. M. A.; DI MARO, A. Purification, characterization and cytotoxicity assessment of Ageritin: the first ribotoxin from the basidiomycete mushroom *Agrocybe aegerita*. **Biochimica et Biophysic Acta**, v. 1861, p. 1113-1121, 2017.

LATGÉ, J. P.; MOUTAOUAKIL, M.; DEBEAUPUIS, J. P.; BOUCHARA, J. P.; HAYNES, K.; PRÉVOST, M. C. The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2586-2594, 1991.

LEE, D. G.; SHIN, S. Y.; MAENG, C. Y.; JIN, Z. Z.; KIM, K. L.; HAHM, K. S. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, p. 646-651, 1999.

LEE, Y. G.; CHUNG, K. C.; WI, S. G.; LEE, J. C.; BAE, H. J. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. **Protein Expression and Purification**, v. 65, p. 244-250, 2009.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIE, R. P.; BORIN, I. A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, p. 399-403, 2005.

LIMON, M. C.; LORA, J. M.; GARCIA, I.; CRUZ, J. de la; LLOBELL, A.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v. 28, p. 478-483, 1995.

- LIMON, M. C.; MARGOLLES-CLARK, E.; BENITEZ, T.; PENTTILA, M. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 198, p. 57-63, 2001.
- LIN, A.; HUANG, K.-C. L.; HWU, L.; TZEAN, S. S. Production of ribotoxins among *Aspergillus* species and its related fungi. **Toxicon**, v. 33, p. 105-110, 1995.
- LIU, B.; QING, Z.; FENGMING, Y.; HAIGEN, X.; CHONGREN, X. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**, v. 271, p. 1-13, 2005.
- LIU, W.-Z.; BOUCIAS, D. G.; McCOY, C. W. Extraction and characterization of the insecticidal toxin hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. **Experimental Mycology**, v. 19, p. 254-262, 1995.
- LODHI, G.; KIM, Y. S.; HWANG, J. W.; KIM, S. K.; JEON, Y. J.; JE, J. Y.; AHN, C. B.; MOON, S. H.; JEON, B. T.; PARK, P. J. Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications. **BioMedical Research International**, v. 1, 2014. doi:10.1155/2014/654913.
- LORITO, M.; PETERBAUER, C.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. **Microbiology**, v. 140, p. 623-629, 1994.
- LUTZ, M. P.; WENGER, S.; MAURHOFER, M.; DEFAGO, G.; DUFFY, B. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, p. 447-455, 2004.
- MA, C.; YAN, K.; TAN, D.; LI, N.; ZHANG, Y.; YUAN, Y.; LI, Z.; DONG, M. Q.; LEI, J.; GAO, N. Structural dynamics of the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) on the ribosome and its implication in the 60S subunit maturation. **Protein Cell**, v. 7, p. 187-200, 2016.
- MACH, R. L.; SCHINDLER, M.; KUBICEK, C. P. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. **Current Genetics**, v. 25, p. 567-570, 1994.
- MACK, I.; HECTOR, A.; BALBACH, M.; KOHLHÄUFL, J.; FUCHS, K. J.; WEBER, A.; MALL, M. A.; HARTL, D. The role of chitin, chitinases, and chitinase-like proteins in pediatric lung diseases. **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 2, p. 2-8, 2015.
- MALAGUARNERA, L.; SIMPORE, J.; PRODI, D. A.; ANGIUS, A.; SASSU, A.; PERSICO, I. A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. **Genes and Immunology**, v. 4, p. 570-574, 2003.

- MALLER, A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niger*. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011. doi:10.4061/2011/289206.
- MANIA, D.; HILPERT, K.; RUDEN, S.; FISCHER, R.; TAKESHITA, N. Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 76, p. 7102-7108, 2010.
- MARCO, J. L. de; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 383-386, 2000.
- MARHEINEKE, K.; GRUNEWALD, S.; CHRISTIE, W.; REILANDER, H. Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. **FEBS Letters**, v. 441, p. 49-52, 1988.
- MARTÍN-CUADRADO, A. B.; DUENAS, E.; SIPICZKI, M.; VAZQUEZ DE ALDANA, C. R.; DEL REY, F. The endo- β -1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 1689-1698, 2003.
- MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GASSET, M.; OÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G. Conformational study of the antitumor protein α -sarcin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 953, p. 280-288, 1988.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; LACADENA, J.; MANCHEÑO, M.; OÑADERRA, M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; GAVILANES, J. G. Secretion of recombinant pro- and mature fungal α -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-arg motif is required for maturation. **Protein and Expression Purification**, v. 12, p. 315-322, 1998.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; LACADENA, J.; OÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G. Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 96-97, 1999a.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A.; KAO, R.; DAVIES, J.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A. Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. **Toxicon**, v. 37, p. 1549-1563, 1999b.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A.; GARCÍA-ORTEGA, L.; KAO, R.; LACADENA, J.; OÑADERRA, M.; MANCHEÑO, J. M.; DAVIES, J.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G. RNase U2 and α -sarcin: a study of relationships. **Methods in Enzymology**, v. 341, p. 335-351, 2001.
- MARX, F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 133-142, 2004.

MATSUMOTO, K. S. Fungal chitinases. **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**, v. 6, p. 289-304, 2006.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. **Plant Physiology**, v. 88, p. 936-942, 1988.

MAZET, I.; VEY, A. Hirsutellin A, a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*. **Microbiology**, v. 141, p. 1343-1348, 1995.

MCCORMACK, J.; HACKETT, T. J.; TUOHY, M. G.; COUGHLAN, M. P. Chitinase production by *Talaromyces emersonii*. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 677-682, 1991.

MCCOY, C. W.; COUCH, T. L. Microbial control of the citrus rust mite with the mycoacaricide, Mycar. **The Florida Entomologist**, v. 65, p. 116-126, 1982.

MENDONSA, E. S.; VARTAK, P. H.; RAO, J. U.; DESHPANDE, M. V. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticle for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 373-376, 1996.

MENNE, T. F.; GOYENECHEA, B.; SANCHEZ-PUIG, N.; WONG, C. C.; TONKIN, L. M.; ANCLIFF, P. J.; BROST, R. L.; COSTANZO, M.; BOONE, C.; WARREN, A. J. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. **Nature Genetics**, v. 39, p. 486-495, 2007.

MILLER, S. P.; BODLEY, J. W. The ribosomes of *Aspergillus giganteus* are sensitive to the cytotoxic action of alpha-sarcin. **FEBS Letters**, v. 229, p. 388-390, 1988.

MORISSETTE, D. C.; DRISCOLL, B. T.; JABAJI-HARE, S. Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an endochitinase gene from the mycoparasite *Stachybotrys elegans*. **Fungal Genetic Biology**, v. 39, p. 276-285, 2003.

MUÑOZ-GÓMEZ, A. J.; LEMONNIER, M.; SANTOS-SIERRA, S.; BERZAL-HERRANZ, A.; DÍAZ-OREJAS, R. RNase/Anti-RNase activities of bacterial *parD* toxin-antitoxin system. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 3151-3157, 2005.

MUZZARELLI, R. A. A.; BOUDRANT, J. B.; MEYER, D.; MANNO, N.; DeMARCHIS, M.; PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: a tribute to Henri Branconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 995-1012, 2012.

NAKHOUL, H.; KE, J.; ZHOU, X.; ZENG, S. X.; LU, H. Ribosomopathies: mechanisms of disease. **Clinical Medicine Insights: Blood Disorders**, v. 7, p. 7-16, 2014.

NARLA, A.; EBERT, B. L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. **Blood**, v. 115, p. 3196-3205, 2010.

NG, T. B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, v. 25, p. 1055-1073, 2004.

NIELSEN, K.; BOSTON, R. S. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 785-816, 2001.

OLMO, N.; TURNAY, J.; GONZÁLEZ DE BUITRAGO, G.; LÓPEZ DE SILANES, I.; GAVILANES, J. G.; LIZARBE, M. A. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. Induction of cell death via apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 2113-2123, 2001.

OLOMBRADA, M.; HERRERO-GALÁN, E.; TELLO, D.; OÑADERRA, M.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GARCÍA-ORTEGA, L. Fungal extracellular ribotoxins as insecticidal agents. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 39-46, 2013.

OLOMBRADA, M.; RODRÍGUEZ-MATEOS, M.; PRIETO, D.; PLA, J.; REMACHA, M.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G.; BALLESTA, J. P.; GARCÍA-ORTEGA, L. The acidic ribosomal stalk proteins are not required for the highly specific inactivation exerted by α -sarcin of the eukaryotic ribosome. **Biochemistry**, v. 53, p. 1545-1547, 2014a.

OLOMBRADA, M.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; MEDINA, P.; BUDIA, F.; GAVILANES, J. G.; GARCÍA-ORTEGA, L. Fungal ribotoxins: natural protein-based weapons against insects. **Toxicon Journal**, v. 83, p. 69-74, 2014b.

OLOMBRADA, M.; MEDINA, P.; BUDIA, F.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GARCÍA-ORTEGA, L. Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: the ribotoxin anisoplin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 398, p. 135-142, 2016.

OLOMBRADA, M.; LÁZARO-GORINES, R.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, J. C.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; OÑADERRA, M.; MAESTRO-LÓPEZ, M.; LACADENA, J.; GAVILANES, J. G.; GARCÍA-ORTEGA, L. Fungal ribotoxins: a review of potential biotechnological applications. **Toxins**, v. 9, 2017. doi:103390/toxins9020071.

OLSON, B. H.; GOERNER, G. L. Alpha sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. **Applied Microbiology**, v. 13, p. 314-321, 1965.

OLSON, B. H.; JENNINGS, J. C.; ROGA, V.; JUNEK, A. J.; SCHUURMANS, D. M. Alpha sarcin, a new antitumor agent II. Fermentation and antitumor spectrum. **Applied Microbiology**, v. 13, p. 322-326, 1965.

ORUNSI, N. A.; TRINCI, A. P. J. Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. **Microbiology**, v. 43, p. 17-30, 1985.

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

- PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; CARVALHO, C. C.; LUCCA, A. L.; VICI, A. C.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Laccase production by *Aspergillus niveus* on SSF using wheat bran as alternative carbon source and its synergistic effect on pulp biobleaching using a mix of laccase/xylanase from the same microorganism. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, p. 929-937, 2015.
- PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Markron Books, 1996. v. 1, 517 p.
- PENG, C. Y.; ZHOU, X.; KAYA, H. K. Virulence and site of infection of the fungus, *Hirsutella thompsonii*, to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, p. 185-195, 2002.
- PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D-glycosidase activities of *Humicola grisea* var. *thermoidea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochimica and Biophysic Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.
- PÉREZ-CAÑADILLAS, J. M.; SANTORO, J.; CAMPOS-OLIVAS, R.; LACADENA, J.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G.; RICO, M.; BRUIX, M. The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, p. 1061-1073, 2000.
- PETERBAUER, C. K.; LORITO, M.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Molecular cloning and expression of the nag1 gene (N-acetyl- β -D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. **Current Genetics**, v. 30, p. 325-331, 1996.
- PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules of future drugs? **Plos Pathogens**, v. 6, 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1001067.
- PLIHAL, O.; SKLENAR, J.; KMONICKOVA, J.; MAN, P.; POMPACH, P.; HAVLICEK, V.; KREN, V.; BEZOUSKA, K. N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase. **Biochemical Society Transaction**, v. 32, p. 764-765, 2004.
- POPE, A. M. S.; DAVIS, D. A. L. The influence of carbohydrates on the growth of fungal pathogens in vitro and in vivo. **Postgraduate Medical Journal**, v. 55, p. 674-676, 1979.
- PORTER, C. M.; MILLER, B. G. Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites. **Bioorganic Chemistry**, v. 43, p. 44-50, 2012.
- RATHORE, A. S.; GUPTA, R. Chitinases from bacteria to human: properties, applications and future perspectives. **Enzyme Research**, 2015. doi:10.1155/2015/791907.

- RATTANAKIT, N.; YANO, S.; PLIKOMOL, A.; WAKAYAMA, M.; TACHIKI, T. Purification of *Aspergillus* sp. S1-13 chitinases and their role in saccharification of chitin in mash of solid-state culture with shellfish waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, p. 535-541, 2007.
- REGEV, A.; KOLLER, M.; STRIZHOV, N.; SNEH, B.; PRODOVSTY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMANN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Syneristic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endo chitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **BioTechniques**, v. 62, p. 3581-3586, 1996.
- REITER, Y.; PASTAN, I. Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 513-520, 1998.
- RICARD, J.; A, CORNISH-BOWDEN. Cooperative and allosteric enzymes: 20 years on. **European Journal of Biochemistry**, v. 166, p. 255-272, 1987.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- RIZATTI, A. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G.; POLIZELI, M. L. Purification and properties of a thermostable extracellular beta-D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 156-160, 2001.
- ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 169-176, 1988.
- ROBY, D.; BROGLIE, K.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; CHET, I.; BROGLIE, R. Activation of a bean chitinase promoter in transgenic tobacco plants by phytopathogenic fungi. **The Plant Cell**, v. 2, p. 999-1007, 1990.
- RODRÍGUEZ, J.; COPA-PATLÑO, A. L.; PÉREZ-LEBLIC, M. I. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 46-49, 1995.
- ROGA, V.; HEDEMAN, L. P. Y.; OLSON, B. H. Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 55, p. 101-113, 1971.
- RUSTIGUEL, C. B. **Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae***. 2014. 206 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Review**, v. 11, p. 317-338, 1993.

SALES, C. P. S. **Diversidade de bactérias quitinolíticas isoladas em amostras de água do mar e plâncton coletadas na região costeira do estado de São Paulo**. 2009. 205 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHINDLER, D. G.; DAVIES, J. E. Specific cleavage of ribosomal RNA caused by alpha-sarcin. **Nucleic Acids Research**, v. 4, p. 1097-1110, 1977.

SCHROT, J.; WENG, A.; MELZIG, M. F. Ribosome-inactivating and related proteins. **Toxins**, v. 7, p. 1556-1615, 2015.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, p. 229-235, 2003.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; DJICK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology & Biotechnology**, n. 59, p. 426-435, 2002.

SCULLY, L. R.; BIDOCHKA, M. J. An alternative insect pathogenic strategy in an *Aspergillus flavus* auxotroph. **Mycological Research**, v. 113, p. 230-239, 2009.

SEIBOLD, M. A.; REESE, T. A.; CHOUDHRY, S.; SALAM, M. T.; BECKMAN, K.; ENG, C. Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic mammalian chitinase protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 19650-19658, 2009.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 36-42, 2008.

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5923-5939, 2005.

SHAH, A.; PANJABI, C. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a perplexing clinical entity. **Allergy Asthma Immunology Research**, v. 8, p. 282-297, 2016.

SHAIKH, S. A.; DESPHANDE, M. V. Chitinolytic enzymes their contribution to basic and applied research. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 9, p. 468-475, 1993.

SHARMA, N.; SHARMA, K. P.; GAUR, R. K.; GUPTA, V. K. Role of chitinase in plant defense. **Asian Journal of Biochemistry**, v. 6, p. 29-37, 2011.

SHAW, K. E.; DAVIDSON, G.; CLARK, S. J.; BALL, B. V.; PELL, J. K.; CHANDLER, D.; SUNDERLAND, K. D. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. **Biological Control**, v. 24, p. 266-276, 2002.

SHIM, H. J.; CHOI, J. Y.; WANG, Y.; TAO, X. Y.; LIU, Q.; ROH, J. Y.; KIM, J. S.; KIM, W. J.; WOO, S. D.; JIN, B. R.; JE, Y. H. NeuroBactrus, a novel, highly effective, and environmentally friendly recombinant baculovirus insecticide. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, p. 141-149, 2013.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS K.; LI, W.; LOPEZ, R.; McWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, 2011. doi:10.1038/msb.2011.75.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.

SILVA, M. V. da; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M. da; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. **Research Microbiology**, v. 156, p. 382-392, 2005.

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 216 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVA, T. M.; MICHELIN, M.; DAMÁSIO, A. R. L.; MALLER, A.; ALMEIDA, F. B. R.; RULLER, R.; WARD, R. J.; ROSA, J. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Production and biochemical characterization of a novel α -glucosidase from *Aspergillus niveus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 569-578, 2009a.

SILVA, T. M.; ALARCON, R. F.; MICHELIN, M.; DAMÁSIO, A. R. L.; MICHELIN, M.; MALLER, A.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Use of cassava peel as carbon source for production of amylolytic enzymes by *Aspergillus niveus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, p. 1-13, 2009b.

SILVA, T. M.; MALLER, A.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Evidence of high production levels of thermostable dextrinizing and saccharogenic amylases by *Aspergillus niveus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 1874-1881, 2013.

SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; LIMA FILHO, J. L. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 343-350, 2005.

ST. LEGER, R. J.; WANG, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 901-907, 2010.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: production, purification and application. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 30-38, 2014.

SZEWCZAK, A. A.; MOORE, P. B.; CHAN, Y.-L.; WOOL, I. G. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 9581-9585, 1993.

TAIB, M.; PINNEY, J. W.; WESTHEAD, D. R.; McDOWALL, K. J.; ADAMS, D. J. Differential expression and extent of fungal/plant and fungal/bacterial chitinases of *Aspergillus fumigatus*. **Archives of Microbiology**, v. 184, p. 78-81, 2005.

TAJ-ALDEEN, S. J.; ALKENANE, K. I. Separation and partial purification of β -glucosidase and two endoglucanases in *Aspergillus niveus*. **Microbiologia**, v. 12, p. 91-98, 1996.

TAKAYA, N.; YAMAZAKI, D.; HORIUCHI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 60-65, 1998.

THEIS, T.; MARX, F.; SALVENMOSER, W.; STAHL, U.; MEYER, V. New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 47-56, 2005.

THIMOTEO, S. S. **Isolamento e caracterização molecular de três quitinases de uma biblioteca metagenômica**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

THIMOTEO, S. S.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F.; MOERSCHBACHER, B. M.; PEDROSA, F. O. A broad pH range and processive chitinase from metagenome library. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2017. doi:10.0.6.54/1414-431x20165658.

TIBBETT, M.; SANDERS, F. E. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. **Annals of Botany**, v. 89, p. 783-789, 2002.

TOMÉ-AMAT, J.; MENÉDEZ-MÉNDEZ, A.; GARCÍA-ORTEGA, L.; BATT, C. A.; ONÑDERRA, M.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G.; LACADENA, J. Production and characterization of scFvA33T1, an immunoRNase targeting colon cancer cells. **The FEBS Journal**, v. 279, p. 3022-3032, 2012.

TOMÉ-AMAT, J.; HERRERO-GALÁN, E.; ONÑDERRA, M.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G.; LACADENA, J. Preparation of an engineered safer immunotoxin against colon carcinoma based on the ribotoxin hirsutellin A. **The FEBS Journal**, v. 282, p. 2131-2141, 2015a.

TOMÉ-AMAT, J.; OLOMBRADA, M.; RUIZ-DE-LA-HERRAN, J.; PÉREZ-GÓMEZ, E.; ANDRADAS, C.; SÁNCHEZ, C.; MARTÍNEZ, L.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G.; LACADENA, J. Efficient in vivo antitumor effect of an immunotoxin based on ribotoxin α -sarcin in nude mice bearing human colorectal cancer xenografts. **SpringerPlus**, 2015b. doi:10.1186/s40064-015-0943-5.

- TOMÉ-AMAT, J.; RUIZ-DE-LA-HERRAN, J.; MARTÍNEZ-DEL-POZO, A.; GAVILANES, J. G.; LACADENA, J. α -sarcin and RNase T1 based immunoconjugates: the role of intracellular trafficking in cytotoxic efficiency. **FEBS Journal**, v. 282, p. 673-684, 2015c.
- TUMER, N. E.; LI, X. P. Interaction of ricin and Shiga toxins with ribosomes. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2012. doi:10.1007/82_2011_174.
- TURNAY, J.; OLMO, N.; JIMÉNEZ, A.; LIZARBE, M. A.; GAVILANES, J. G. Kinetic study of the cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus-giganteus*, on tumour cell lines - protein biosynthesis inhibition and cell binding. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 122, p. 39-47, 1993.
- VAAJE-KOLSTAD, G.; HOUSTON, D. R.; RAO, F. V.; PETER, M. G.; SYNSTAD, B.; VAN AALTEN, D. M. F.; EIJSINK, V. G. H. Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 103-111, 2004.
- VAN MUNSTER, J. M.; KAAIJ, R. M.; DIJKHUIZEN, L.; MAAREL, M. J. E. C. Biochemical characterization of *Apergillus niger* Cfcl, a glycoside hydrolase family 18 chitinase that releases monomers during substrate hydrolysis. **Microbiology**, v. 158, p. 2168-2179, 2012.
- VARGA, J.; SAMSON, R. A. Ribotoxin genes in isolates of *Aspergillus* section *Clavati*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 481-485, 2008.
- VARGA, J.; DUE, M.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 89-106, 2007.
- VEY, A.; QUIOT, J. M.; MAZET, I.; McCOY, C. W. Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 131-137, 1993.
- VIEGAS, A.; HERRERO-GALÁN, E.; OÑADERRA, M.; MACEDO, A. L.; BRUIX, M. Solution structure of hirsutellin A. New insights into the active site and interacting interfaces of ribotoxins. **FEBS Journal**, v. 276, p. 2381-2390, 2009.
- VITERBO, A.; MONTERO, M.; RAMOT, O.; FRIESEM, D.; MONTE, E.; LLODELL, A.; CHET I. Expression regulation of the endochitinase vhit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Current Genetics**, v. 42, p. 114-122, 2002.
- VOORHEES, R. M.; SCHMEING, T. M.; KELLEY, A. C.; RAMAKRISHNAN, V. The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome. **Science**, v. 330, p. 835-838, 2010.
- WALSH, M. J.; DODD, J. E.; HAUTBERGUE, G. M. Ribosome-inactivating proteins. Potent poisons and molecular tools. **Virulence**, v. 4, p. 774-784, 2013.

- WANG, S. L.; CHANG, W. T. Purification and characterization of two bifunctional chitinases lysozyme extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 380-386, 1997.
- WANG, S. L.; SHIH, I. L.; LIANG, T. W.; WANG, C. H. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellular produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, p. 2241-2248, 2002.
- WATANABE, T.; KANAI, R.; KAWASE, T.; TANABE, T.; MITSUTOM, I. M.; SAKUDA, S.; MIYASHITA, K. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. **Microbiology**, v. 145, p. 3353-3363, 1999.
- WHETSTONE, P. A.; HAMMOCK, B. D. Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 576-596, 2007.
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. Chichester: E. Horwood, 1975.
- WOOL, I. G. The mechanism of action of the cytotoxic nuclease α -sarcin and its use to analyse ribosome structure. **Trends in Biochemical Science**, v. 9, p. 14-17, 1984.
- WOOL, I. G.; GLÜCK, A. Y.; ENDO, Y. Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. **Trends in Biochemical Science**, v. 17, p. 266-269, 1992.
- XIA, G.; JIN, C. Z.; HOU, J. Y.; ANG, S. Z.; HANG, S.; JIN, C. A novel chitinases having a unique model of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. **European Journal of Biochemistry**, v. 208, p. 4079-4085, 2001.
- XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 170-179, 2011.
- YANAI, K.; TAKAYA, N.; KOJIMA, N.; HORIUCHI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 7398-7406, 1992.
- YANG, R.; KENEALY, W. R. Regulation of restrictocin production in *Aspergillus restrictus*. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 1421-1427, 1992.
- YANG, X.; GERCZEI, T.; GLOVER, L. T.; CORRELL, C. C. Crystal structures of restrictocin-inhibitor complexes with implications for RNA recognition and base flipping. **Nature Structural and Biology**, v. 8, p. 968-973, 2001.
- YANG, X. J.; MOFFAT, K. Insights into specificity of cleavage and mechanism of cell entry from the crystal structure of the highly specific *Aspergillus* ribotoxin, restrictocin. **Structure**, v. 4, p. 837-852, 1996.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1133-1174, 2015.

ZAREI, M.; AMINZADEH, S.; ZOLGHARNEIN, H.; SAFAHIEH, A.; DALIRI, M.; AKBARI, N.; GHOROGHI, A.; MOTALLEBI, A. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1017-1029, 2011.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZHU, Z.; ZHENG, T.; HOMER, R. J.; KIM, Y. K.; CHEN, N. Y.; COHN, L. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. **Science**, v. 304, p. 1678-1682, 2004.

Anexos

ANEXOS**Composição dos meios de cultivo****Meio YPD (LEE et al., 1999)**

- Peptona.....1 g
- Extrato de levedura.....0,5 g
- Fonte de carbono.....1 g
- Água destilada.....q.s.p. 100mL

Meio Czapeck (WISEMAN, 1975)

- NaNO_30,3 g
- KH_2PO_40,1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,05 g
- KCl0,05 g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,001 g
- Extrato de levedura.....0,1 g
- Fonte de carbono.....1 g
- Água destilada.....q.s.p. 100mL

Meio M5 (PERALTA et al., 1990)

- Extrato de levedura.....0,6 g
- Peptona.....0,1 g
- CaCO_30,1 g
- NaCl1 g
- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$0,6 g
- Fonte de carbono.....1 g
- Água destilada.....q.s.p. 100 mL

Meio SR (RIZZATI et al., 2001)

- Solução de sais SR [20x].....5 mL
- Peptona.....0,02 g
- Extrato de levedura.....0,45 g
- Fonte de carbono.....1 g
- Água destilada..... q.s.p.100mL

Solução de sais SR [20x]

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,24 g
- KH_2PO_40,3 g
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$1 g
- Água destilada..... q.s.p. 100mL

Meio Khanna (KHANNA et al., 1995)

- Solução de sais Khanna [20x].....5mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Fonte de carbono.....1g
- Água destilada.....q.s.p. 100mL

Solução de sais Khanna [20x]

- NH_4NO_32g
- KH_2PO_41,3g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,362g
- KCl0,098g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,007 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,0138 g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,0066 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,0062 g

Meio Adams (ADAMS, 1990)

- Extrato de levedura.....0,2 g
- KH_2PO_40,1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,05 g
- Fonte de carbono.....1 g
- Água destilada.....q.s.p. 100mL

Meio Mínimo (HILL, et al. 2001)

- Mix de sais (20X)5 mL
- Solução de MgSO_4 (200X)0,5 mL
- Solução estoque de elementos traços.....0,1 mL
- Fonte de carbono.....1 g
- Água destilada.....q.s.p. 100mL

Solução de mix de sais (20X) para meio mínimo

- NaNO_3120.0 g
- KCl10.4 g
- KH_2PO_416.3 g
- K_2HPO_420.9 g
- Água destilada.....q.s.p. 1000 mL

Solução de MgSO_4 (200X) para meio mínimo

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$10.4 g
- Água destilada.....q.s.p. 1000 mL

Solução Estoque de elementos traços para meio mínimo

Combine as soluções A e B, ajustar o pH para 6.5 com pellets de KOH. Completar o volume para 200 mL. Armazenar a 4 °C.

Solução A

Para o preparo desta solução é necessário primeiro dissolver o $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em água, e em seguida, adiciona-se o EDTA. O pH deve ser ajustado para cerca de 5.5, gerando uma solução amarelo dourado.

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$1 g
- EDTA.....10 g
- Água destilada.....q.s.p. 80 mL

Solução B

Para o preparo desta solução os reagentes devem ser dissolvidos na água na seguinte ordem:

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$4.4 g
- H_3BO_32.2 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$1 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.32 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.32 g
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g
- Água destilada.....q.s.p. 80 mL