
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LÍTICO DE ENDOLISINAS PRODUZIDAS POR
FAGOS DE *Xanthomonas citri***

MARIO NICOLAS CACCALANO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LÍTICO DE ENDOLISINAS PRODUZIDAS POR
FAGOS DE *Xanthomonas citri*

MARIO NICOLAS CACCALANO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientador: Dr. Henrique Ferreira

C118a

Cacalano, Mario Nicolas

Avaliação do potencial lítico de endolisinas produzidas por fagos de xanthomonas citri / Mario Nicolas Cacalano. -- Rio Claro, 2024

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Henrique Ferreira

1. Cancro cítrico. 2. Bacteriófago. 3. Enzima. 4. Peptidoglicano. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LÍTICO DE ENDOLISINAS PRODUZIDAS POR FAGOS DE *Xanthomonas citri*

AUTOR: MARIO NICOLAS CACCALANO

ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Prof. Dr. GUILHERME DILARRI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Pesca e Ciências Biológicas / Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica / USP

Rio Claro, 06 de março de 2024

“Without error there can be no brilliancy”

— **Emanuel Lasker**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à FAPESP, pelo apoio financeiro através do processo nº2022/01814-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que permitiu a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu orientador Henrique Ferreira por toda ajuda e ensinamento durante minhas iniciações científicas e agora durante o meu mestrado.

Agradeço aos membros do LGB – Caio, Natalia, Giovane, Vitor, Victor, Rayanne, Gabriel, João, Igor, Guilherme, Giovanna.

Agradeço meus pais Danilo e Tânia, ao meu irmão Matias.

Agradeço meus amigos Natalia, Talita, Juliana, Lourenço, Gustavo.

Agradeço ao grupo de pesquisa do professor Carlos Henrique Inacio Ramos e ao aluno Leonardo Alves Linhares pela ajuda com os ensaios de Dicroísmo Circular.

RESUMO

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Essa bactéria é responsável por diversas perdas na produção de citrus. Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de endolisinas de bacteriófagos como possíveis antimicrobianos *anti - X. citri*. Selecionamos 4 genes, dois de cada bacteriófago, para isolamento e construção de sistemas de expressão heteróloga em bactérias. Para os genes do bacteriófago CP1 não fomos capazes de realizar a amplificação por PCR de nenhum dos genes selecionados. Para os dois genes selecionados do bacteriófago CP2, conseguimos amplificar ambos, mas não observamos expressão aparente da endolisina CP2_29-His. Conseguimos, entretanto, expressar e purificar a proteína His-CP2_07. Com a caracterização estrutural por meio do dicroísmo circular (CD), observamos presença de cerca de 40,8% de alfa-hélices. Além disso, realizamos ensaios de estabilidade térmica na faixa de 20 °C a 90 °C, onde observamos perda de estrutura a partir dos 50 °C. Entretanto, com o resfriamento da amostra, observamos um possível ganho de estrutura ocasionado por provável re-enovelamento da proteína. Avaliamos a atividade enzimática da endolisina, onde observamos a degradação de fragmentos celulares de *Pseudomonas aeruginosa*, bem como degradação do peptidoglicano purificado de *Bacillus subtilis*. Observamos também ação bactericida da endolisina em *X. citri*, bem como de outros isolados de interesse clínico (*P. aeruginosa* e *E. coli*). Avaliamos também a lise celular de *X. citri* tratadas com a His-CP2_07 e EDTA 0,375 mM. Estabelecemos a estabilidade de nossa endolisina em pHs próximos ao neutro ou levemente alcalinos e salinidades próximas de 60 mM. Desta forma, nossos resultados demonstram o potencial bactericida de His-CP2_07 contra *X. citri* e abre caminho para o desenvolvimento de formulações alternativas para controle desta bactéria, bem como de outras bactérias de interesse clínico.

Palavras-chave: Cancro-cítrico; Bacteriófagos; Enzima, Peptidoglicano

ABSTRACT

Citrus canker is a disease caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). This bacteria is responsible for several losses in citrus production. Thus, the objective of the present work was to evaluate the potential of bacteriophage endolysins as possible anti-*X. citri* antimicrobials. We selected 4 genes, two from each bacteriophage, for isolation and construction of heterologous expression systems in bacteria. For the CP1 bacteriophage genes, we were unable to perform PCR amplification of any of the selected genes. For the two genes selected from bacteriophage CP2, we were able to amplify both, but we did not observe apparent expression of the CP2_29-His endolysin. We were, however, able to express and purify the His-CP2_07 protein. With structural characterization using circular dichroism (CD), we observed the presence of around 40.8% alpha-helices. Furthermore, we carried out thermal stability tests in the range of 20 °C to 90 °C, where we observed loss of structure from 50 °C onwards. However, as the sample cooled, we observed a possible gain in structure caused by probable refolding of the protein. We evaluated the enzymatic activity of endolysin, where we observed the degradation of cellular fragments of *Pseudomonas aeruginosa*, as well as degradation of peptidoglycan purified from *Bacillus subtilis*. We also observed the bactericidal action of endolysin in *X. citri*, as well as other isolates of clinical interest (*P. aeruginosa* and *E. coli*). We also evaluated cell lysis of *X. citri* treated with His-CP2_07 and 0.375 mM EDTA. We established the stability of our endolysin at pHs close to neutral or slightly alkaline and salinities close to 60 mM. Thus, our results demonstrate the bactericidal potential of His-CP2_07 against *X. citri* and paves the way for the development of alternative formulations to control this bacterium, as well as other bacteria of clinical interest.

Keywords: Citrus canker; Bacteriophages; Enzyme, Peptidoglycan

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Importância da Citricultura	9
1.2 Bacteriófagos	10
1.3 Estrutura do peptidoglicano	11
1.4 Endolisinas.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Bacteriófagos como alternativa ao combate a isolados de interesse clínico	15
2.2 Uso de bacteriófagos na agricultura e como forma de aumentar o shelf-life de alimentos ...	17
2.3 Endolisinas como forma de controle antimicrobiano em alimentos	18
2.4 Endolisinas como forma de combate a isolados de interesse clínico	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	22
4.2 Propagação e manutenção dos bacteriófagos.....	23
4.3 Procedimentos gerais de biologia molecular	24
4.4 Bioinformática: busca por genes candidatos.....	25
4.5 Modelagem in silico das endolisinas	25
4.6 Desenho dos primers.....	25
4.7 Amplificação dos genes do bacteriófago CP1	26
4.8 Amplificação dos genes do bacteriófago CP2	28
4.9 Condições de expressão da endolisina His-CP2_07 e CP2_29-His	29
4.10 Condições de purificação da endolisina	29
4.11 Quantificação proteica.....	30
4.12 Avaliação da atividade das endolisinas	30
4.13 Dicroísmo Circular (CD) e estabilidade térmica	31
4.14 Purificação e coloração do extrato bruto de peptidoglicano de <i>X. citri</i>	31
4.15 Avaliação da ação do NaCl e pH na atividade enzimática	32
4.16 Purificação do peptidoglicano de <i>B. subtilis</i> e avaliação da atividade enzimática	33
4.17 Avaliação do efeito bactericida da endolisina	34
4.18 Curva de crescimento com endolisina e EDTA	34
4.19 Análise estatística e construção dos gráficos	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

5.1 Propagação dos bacteriófagos	36
5.2 Avaliação da estrutura e classificação das endolisinas	37
5.2.1 Gene CP1_30	37
5.2.2 Gene CP1_21	38
5.2.3 Gene CP2_07	39
5.2.4 Gene CP2_29	40
5.3 Clonagem das endolisinas	41
5.3.1 Amplificação dos genes do bacteriófago CP1	41
5.3.2 Amplificação e clonagem dos genes do bacteriófago CP2	41
5.4 Expressão das endolisinas	46
5.4.1 Expressão da endolisina His-CP2_07	46
5.4.2 Expressão da endolisina CP2_29-His	48
5.5 Purificação da proteína His-CP2_07.....	49
5.6 Potencial de degradação do peptidoglicano de <i>P. aeruginosa</i> pela endolisina His-CP2_07.....	50
5.7 Avaliação da estrutura da His-CP2_07 por dicroísmo circular (CD)	51
5.8 Avaliação da estabilidade térmica da endolisina His-CP2_07.....	52
5.9 Estabilidade da endolisina em diferentes concentrações de NaCl.....	56
5.10 Estabilidade da endolisina em diferentes pHs.....	57
5.11 Avaliação da atividade enzimática da endolisina His-CP2_07 em peptidoglicano purificado de <i>B. subtilis</i>	58
5.12 Avaliação da atividade bactericida da endolisina His-CP2_07	59
5.13 Curva de crescimento com <i>X. citri</i>	65
6.0 CONCLUSÃO	67
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da Citricultura

A citricultura é uma atividade econômica que gera diversos empregos no setor agrícola, apresentando assim uma alta importância na economia brasileira (Neves, 2010). Atualmente o Brasil é líder mundial na produção de laranjas doce com produção estimada de 309,34 milhões de caixas referente a safra 2023/2024 (FUNDECITRUS, 2023). O Brasil é responsável por 80% do total de suco de laranja exportado do mundo. E somente a região sudeste é responsável por mais de 70% da produção de laranjas do país, o que se deve à enorme produtividade da citricultura no estado de São Paulo (IBGE, 2016).

Apesar disso, essa produção é constantemente ameaçada por diversas doenças infecciosas, dentre elas, o cancro cítrico e o huanglongbing (HLB) que juntas já tomam 30-40% das árvores do cinturão cítrico brasileiro (FUNDECITRUS). O cancro cítrico é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), classificada como Proteobactérias. *X. citri* é aeróbia obrigatória, possui morfologia de bastonetes e apresenta um flagelo polar (DAS, 2003). O cancro cítrico é uma doença que acomete todas as variedades de citros de importância econômica (GOTTWALD et al., 2002). A infecção e doença ocorre quando a bactéria penetra o tecido vegetal através dos estômatos e lesões vegetais, causando a queda prematura de frutos e desfolha quando em alta severidade (GOTTWALD et al., 2002). Lesões causadas pelo cancro são superficiais e não interferem no uso da fruta para produção de suco. Contudo, os frutos sintomáticos perdem o valor como fruto de mesa e, portanto, há uma depreciação no seu valor agregado. A disseminação do fitopatógeno ocorre principalmente pela ação da chuva e do vento, podendo ser exacerbada pela larva minador dos citros, que ao se alimentar do mesófilo foliar produz galerias facilitando a infecção (CHAGAS, 2001).

A principal forma de manejo do cancro cítrico hoje no estado de São Paulo é feita através da aplicação recorrente de soluções à base de cobre, como o oxiclóreto de cobre e hidróxido de cobre, bem como uso de quebras-vento para conter a disseminação da doença, uso de mudas sadias para início de pomares e controle da larva minadora dos citros. Contudo, as formulações a base de cobre apresentam toxicidade para animais, vegetais e para a microbiota do solo (FONES & PRESTON 2013; BRUNETTO et al.,

2016; CORNU et al., 2017;). Em plantas, o excesso de cobre é capaz de causar estresse oxidativo através da formação de espécies reativas de oxigênio (YRUELA, 2009; RAVET & PILON, 2013;). Conseqüentemente, há a degradação de diversas proteínas e enzimas celulares que podem acarretar na inibição do crescimento vegetal (YRUELA, 2009). Plantas sujeitas a altas concentrações de cobre podem apresentar sintomas como clorose e necrose dos tecidos vegetais (DUCIC & POLLE, 2005). Finalmente, já houve relatos de isolados de *Xanthomonas* resistentes a esses compostos (BEHLAU et al., 2013). Sendo assim, se faz necessária a buscar por novas alternativas ao cobre para o combate desse fitopatógeno.

1.2 Bacteriófagos

Na biosfera existem cerca de 10^{31} partículas virais, presentes em diversos ambientes e ecossistemas, tendo papel fundamental na dinâmica de diversas populações nesses ambientes (STONE et al., 2019). Os vírus são capazes de infectar diversos organismos como bactérias, archaea e eucariontes (SUTTLE, 2007). Dentro da população viral, há um grupo de vírus que tem como hospedeiro as bactérias, são os chamados bacteriófagos (O'SULLIVAN et al., 2019). Ao injetarem seu material genético na célula hospedeira, os bacteriófagos se multiplicam usando a própria maquinaria celular bacteriana (SHARMA et al., 2017).

De maneira geral, os bacteriófagos são compostos por uma cabeça icosaédrica, na qual se encontra o material genético, que é normalmente um DNA de fita dupla, ligada a uma cauda longa, que pode ser contrátil ou não (NORTH & DAVIDSON, 2021). A cauda tem a função de canal de transporte do material genético viral para a célula hospedeira (NOBREGA et al., 2018). O reconhecimento do hospedeiro é feito mediante a interação de proteínas da cauda do bacteriófago e antígenos de superfície da bactéria hospedeira (processo denominado de adsorção) (NOBREGA et al., 2018).

Os bacteriófagos são geralmente classificados em relação ao tipo de ácido nucléico que possuem, sua morfologia, modo de infecção, filogenia, sua especificidade ao hospedeiro, sensibilidade a agentes físicos e químicos, bem como ao ambiente que é encontrado (ACKERMANN, 2009). Sua propagação ocorre de duas formas: por ciclo lítico ou lisogênico. No ciclo lítico, os fagos causam a lise das células bacterianas hospedeiras para liberar a progênie viral produzida durante infecção (YOUNG, 2002).

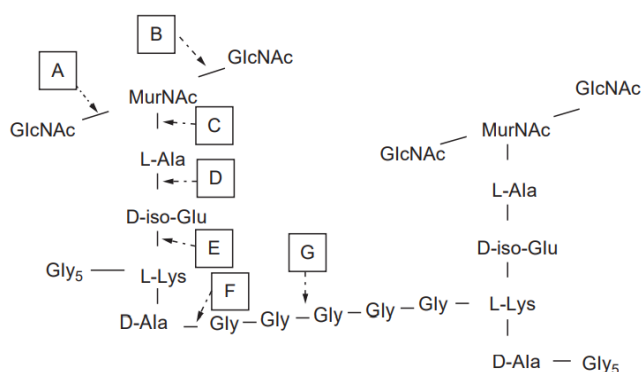
Para tal, fazem uso de enzimas (endolisinas) capazes de quebrar o peptidoglicano. Já no ciclo lisogênico, há a integração do material genético do fago no genoma do hospedeiro, que é replicado em conjunto com o DNA do hospedeiro (EREZ et al., 2017).

1.3 Estrutura do peptidoglicano

O peptidoglicano é uma estrutura que circunda a membrana celular bacteriana, oferece rigidez a célula e serve de moldura para a fixação de diversas proteínas e outros polímeros. Esta auxilia na manutenção da forma celular e permite a passagem de algumas substâncias químicas por difusão (PAZOS & PETERS, 2019). O peptidoglicano é uma estrutura tridimensional formada por uma porção peptídica e uma porção de açúcar (glicano). O peptidoglicano é um polímero que alterna o ácido-N-acetilmurâmico (MurNAc) e o N-acetilglicosamina (GlcNAc). Esses resíduos são ligados através de uma ligação beta (1-4) (figura 1) (Nelson et al.,2012). Essa cadeia é ligada covalentemente à cadeia peptídica através de uma ligação amida entre o MurNAc e a L-alanina, o primeiro aminoácido da cadeia peptídica. O restante dessa cadeia peptídica é formado por formas L e D alternadas de aminoácidos que variam de bactéria para bactéria (NELSON et al.,2012).

Nas bactérias Gram-negativas e em algumas bactérias Gram-positivas como o gênero *Bacillus*, há a presença de um resíduo do Ácido diaminopimélico na terceira posição da cadeia peptídica. Em contrapartida, na maior parte das Gram-positivas, essa posição é ocupada por uma L-lisina (NELSON et al.,2012).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do peptidoglicano (PG) de *Staphylococcus aureus*. **A** - N-acetilglicosaminidase hidrolisa o componente glicano da PG no lado redutor do GlcNAc. **B** - N-acetil muramidase (também conhecida como "muramidase" ou "lisozima") hidrolisa o componente glicano do PG no lado redutor do MurNAc. Da mesma forma, as transglicosilases líticas quebram a mesma ligação, mas formam intermediários N-acetil-1,6-anidromuramil durante a clivagem. **C** - A amidase N-acilmuramoil-L-alanina cliva uma ligação amida entre a parte glicana (MurNAc) e a parte peptídica (L-alanina) da parede celular. **D-G** - Uma endopeptidase cliva uma ligação amida entre os aminoácidos. Adaptado de NELSON et al.,2012.



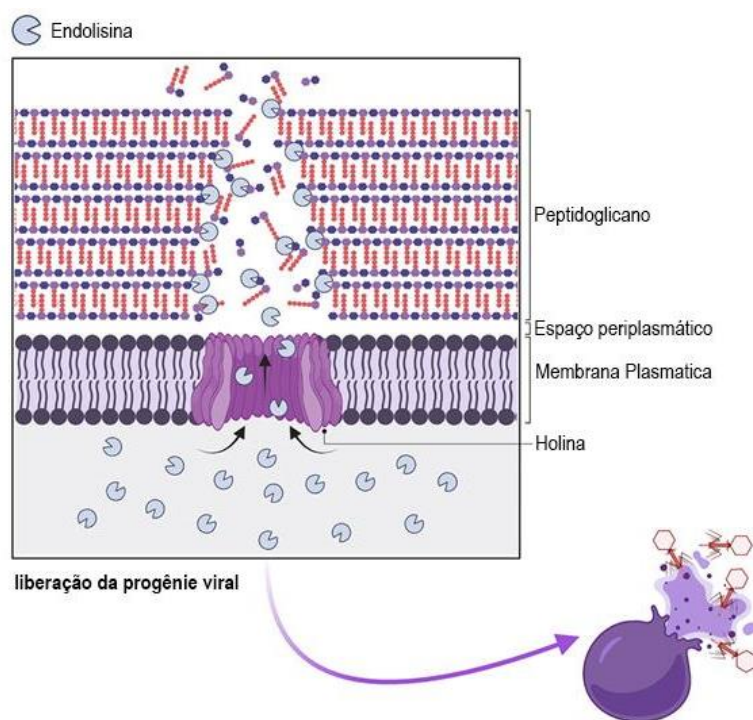
Por conta da alta taxa de conservação da estrutura do peptidoglicano entre os organismos, há um número limitado de sítios de clivagem para endolisinas e outras hidrolases (NELSON et al.,2012).

1.4 Endolisinas

Endolisinas são enzimas capazes de degradar o peptidoglicano presente na parede celular bacteriana. O primeiro relato de sua atividade ocorreu com a própria descoberta dos bacteriófagos por Frederick W (TWORT & LOND, 1915). Essas enzimas podem ser encontradas em quase todos os bacteriófagos (SCHMELCHER & LOESSNER, 2016). Elas são produzidas durante o ciclo lítico destes vírus (SCHMELCHER et al., 2012) e degradam a parede celular bacteriana de dentro para fora das células (STONE et al., 2019). De maneira geral, as endolisinas são agrupadas em 4 principais classes e mecanismos de lise do peptidoglicano. São elas as glicosidases, as endopeptidases, as amido hidrolases e as transglicosilases. As glicosidases clivam a região glicana do peptidoglicano no lado redutor do GlcNAc (Figura 1 A). Outra glicosidase cliva o peptidoglicano no lado redutor do MurNAc (Figura 1 B).

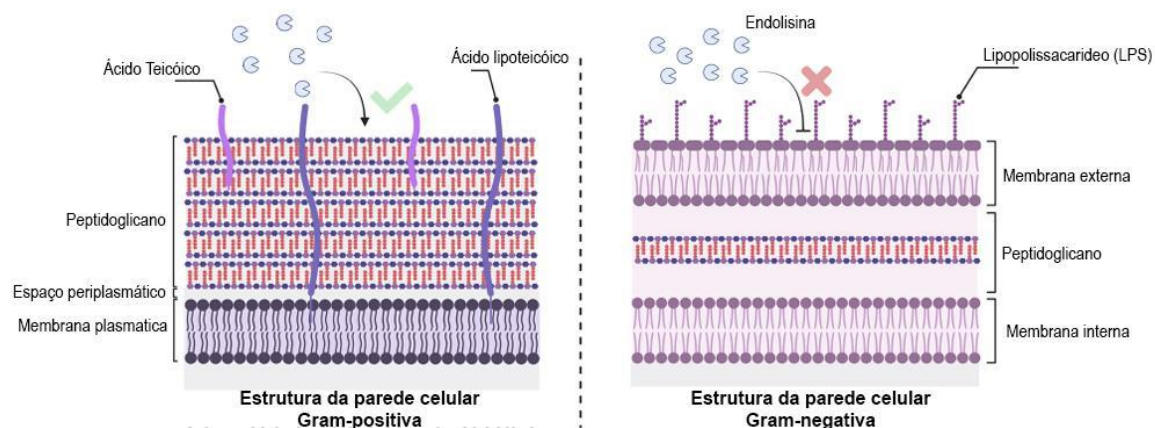
A segunda classe são as denominadas amido hidrolases que clivam uma ligação amida entre a cadeia glicana (MurNAc) e a cadeia peptídica (L-alanina) do peptidoglicano (figura 1C). A terceira classe são as endopeptidases que clivam as ligações peptídicas entre os aminoácidos (figura 1 D-1 G). Por fim, a última classe de endolisinas são as transglicosilases que não são verdadeiras hidrolases por não precisarem de água para realizar a clivagem do substrato (Nelson et al.,2012). Essas enzimas são bastante semelhantes às muraidases já que também clivam a ligação beta (1-4) entre os resíduos de N-acetilmuramico e N-acetilglicosamina (Figura 1 B).

Figura 2 – Esquema de lise celular por endolisinas. No fim do ciclo há liberação de holinas que formam poros na membrana plasmática da célula permitindo que as endolisinas acessem o peptidoglicano e o degradem. Adaptado de CARRATALÁ et al., 2023.



Para a liberação da progênie viral, diversas proteínas são produzidas no interior da bactéria. As endolisinas são responsáveis pela quebra do peptidoglicano (figura 2). Entretanto, em bactérias Gram-negativas, por conta da membrana externa, o acesso das endolisinas ao peptidoglicano é dificultado (figura 3). Desta forma, para acessar o peptidoglicano, há a produção de uma outra proteína denominada holina que causa poros na membrana permitindo o acesso das endolisinas ao peptidoglicano (figura 2) (CARRATALÁ et al., 2023).

Figura 3 – Ação da endolisina em diferentes bactérias. Em Gram-negativas, a presença da membrana externa dificulta o acesso das endolisinas ao peptidoglicano. Ao mesmo tempo, em bactérias Gram-positivas, por não apresentarem membrana externa, o acesso ao peptidoglicano é facilitado. Adaptado de CARRATALÁ et al., 2023.



As endolisinas apresentam uma estrutura monomérica ou globular (STONE et al., 2019). Em bactérias Gram-positivas, as endolisinas apresentam múltiplos domínios, incluindo domínios de ligação à parede celular, já em Gram-negativas, como é o caso da *X. citri*, são quase sempre pequenas com apenas um domínio enzimático (SCHMELCHER & LOESSNER, 2016). O uso dessas enzimas se estende em diversos setores como na agricultura, biotecnologia, medicina e controle de contaminantes em alimentos (SCHMELCHER & LOESSNER 2016; STONE et al., 2019; ÖZAL et al., 2022).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar uma endolisina codificada por bacteriófagos de *X. citri* (presentes na coleção do grupo) quanto ao seu potencial para controle de crescimento e prevenção de infecção causada por esta bactéria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bacteriófagos como alternativa ao combate a isolados de interesse clínico

Os bacteriófagos foram utilizados com sucesso para tratar infecções bacterianas duas décadas antes da descoberta da penicilina (TWORT, 1915; D'HERELLE, 1917). Bruynoghe e Maisin (1921) avaliaram o uso de bacteriófagos para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus*. Apesar desse sucesso inicial, a falta de compreensão da biologia básica dos bacteriófagos levou a uma série de fracassos clínicos (WITTEBOLE, DE ROOCK & OPAL, 2014). Por conta disso, a terapia baseada em bacteriófagos foi abandonada no Ocidente em favor dos recém-chegados antibióticos (HANLON, 2007). Há relatos de utilização de bacteriófagos pela Europa Oriental anteriormente conhecida como União Soviética na década de 1919 para tratamento de doenças clínicas bacterianas (CHANISHVILI, 2012).

Os antibióticos são uma parte importante da medicina moderna (PATIL et al., 2020). Entretanto, com o aumento da resistência principalmente por parte do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), bacteriófagos e suas enzimas estão sendo vistos mais uma vez como uma possível alternativa para o combate dessas bactérias e doenças. Segundo HANLON, 2007, bacteriófagos apresentam diversos pontos em que são superiores no tratamento de infecções bacterianas em relação a tratamentos baseados em antibióticos. Podemos citar o fato de que a infecção bacteriófago-célula hospedeira é bastante específica e assim, não afeta outras bactérias que muitas vezes são benéficas para a saúde como é o caso das bactérias intestinais. O segundo ponto está relacionado aos mecanismos de ação dos bacteriófagos, que são distintos dos mecanismos de ação clássicos dos antibióticos e assim, mesmo isolados bacterianos multirresistentes podem ser susceptíveis aos bacteriófagos. O terceiro ponto está relacionado com a farmacocinética que, em muitos casos, é bastante complexa com a utilização de antibióticos convencionais e passa ser mais simples com a utilização de bacteriófagos. Ao passo que a partir da infecção do bacteriófago na célula hospedeira este libera sua progênie viral e assim, não se faz necessário o uso de doses repetidas do bacteriófago. O quarto ponto é que não há muitos relatos de efeitos colaterais ou alergias com a sua utilização. O quinto ponto é que a produção/propagação desses bacteriófagos

é bastante simples e barata, entretanto, não é uma tarefa fácil obter um bacteriófago que se enquadre de maneira a ser utilizado no tratamento de doenças clínicas.

A terapia com bacteriófagos abrange o tratamento de infecções bacterianas utilizando bacteriófagos isolados, coquetéis de bacteriófagos, proteínas de bacteriófagos, bem como a ação combinada de bacteriófagos e suas enzimas com antibióticos convencionais (PATIL et al., 2020). Em relação ao grupo ESKAPE, a utilização de coquetéis de bacteriófagos, conforme relatado por Merabishvili et al., (2009); Wright et al., (2009); Nilsson, 2014, foram eficientes no tratamento de infecções de isolados resistentes a antibióticos. Em um estudo envolvendo oito pacientes, foram utilizados 82 bacteriófagos contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e oito bacteriófagos contra *Staphylococcus aureus* de maneira bem sucedida (Nilsson, 2014). O primeiro ensaio clínico envolvendo o coquetel de bacteriófagos AB-SAO1, contra *Staphylococcus aureus*, foi feito em pacientes com rinossinusite crônica, de forma bem sucedida (OOI et al., 2019).

No caso de infecções causadas por *Enterococcus* spp, diversos estudos apontam que bacteriófagos são uma forma eficiente de controle para esses isolados. Bacteriófagos como EFDG1 (KHALIF et al., 2015), vB_EfaS-Zi, vB_EfaP-Max (MELO et al., 2019), EF1TV (D'Andrea et al., 2019) e um coquetel composto por EFDG1 e EFLK1 na proporção 1:1 (KHALIFA et al., 2019) foram capazes de reduzir significativamente a carga de *Enterococci* em biofilmes.

Outro patógeno clínico de interesse é a *Klebsiella pneumoniae*. Estudos envolvendo o bacteriófago TKS-1, produtor de uma despolimerase, apresentou atividade contra biofilme bacteriano (TABASSUM et al., 2018). No caso de infecções causadas por *Acinetobacter baumannii*, que é associada a infecções urinárias, estudos *in vivo* com ratos (*Mus musculus*) demonstraram que a aplicação tópica do bacteriófago vB-GEC_AbM-G7 resultou na redução da população de *Acinetobacter baumannii* no organismo (KUSRADZE et al., 2016). Além disso, tratamentos com bacteriófagos vB_AbaM-IMEAB2 (WANG et al., 2016) e ϕ km18p (WANG et al., 2018) também foram capazes de reduzir a população de *Acinetobacter baumannii* em *Mus musculus*.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, a utilização de um coquetel de bacteriófagos (DL52, DL60, DL62, DL64 e DL68) foi capaz de causar uma redução significativa na formação do biofilme bacteriano (ALVES et al., 2015). Em *Galleria mellonella*, a

aplicação desse coquetel foi capaz de reduzir a população de *Pseudomonas aeruginosa* na hemolinfa do inseto (BEETON et al., 2015). No caso de *Enterobacter* spp, que é associada a diversas infecções gastrointestinais (PATIL et al., 2020), a aplicação de bacteriófagos como ELP140 ou a combinação de três outros bacteriófagos (ECP311, KPP235 e ELP140) em *Galleria mellonella* apresentou efeito bactericida (MANOHAR et al., 2018). Desta forma, essas evidências demonstram a possibilidade de utilização de bacteriófagos e suas enzimas como alternativas no controle de infecções causadas por patógenos resistentes a antibióticos.

2.2 Uso de bacteriófagos na agricultura e como forma de aumentar o *shelf-life* de alimentos

Estudos envolvendo bacteriófagos como forma de controle de infecções na alimentação é um tema de interesse por conta das bactérias patogênicas resistentes a tratamentos convencionais (STONE et al., 2019). A partir do início do século XXI, houve um maior interesse no uso de bacteriófagos, impulsionado pelos avanços na biotecnologia, como evidenciado pelo aumento no número de publicações, patentes e pedidos de patentes (HOLTAPPELS et al., 2019).

O crestamento bacteriano é uma doença que afeta a soja (*Glycine max*). É causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi*. Os danos causados pela bactéria, bem como o surgimento de resistência criaram uma maior demanda por alternativas de manejo. Taracanov et al. (2022), foi capaz de demonstrar que o bacteriófago P421 foi eficiente no controle dessa bactéria.

O gênero *Xanthomonas* tem um papel significativo devido à sua associação com diversas doenças que acometem plantas de interesse para produção agrícola global. As atuais práticas de manejo são vistas como insuficientes e prejudiciais aos ecossistemas naturais (NAKAYINGA et al., 2021). A empresa AgriPhage já desenvolveu formulações a base de bacteriófagos para combater *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Esses patógenos são responsáveis por doenças que causam manchas e pintas em tomate e pimentão, bem como o próprio o cancro cítrico.

O "Goss wilt", é causado pela bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. Essa é uma doença que afeta a produção de milho (*Zea mays*). A aplicação do bacteriófago CN8 nas sementes de milho resultou em uma redução de 76% na

população bacteriana. Ao ser aplicado nas raízes e caules, foi observada uma diminuição de 20% na incidência da população bacteriana (KIMMELSHUE et al., 2019). *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria que infecta a batata (*Solanum tuberosum*). Em plantas tratadas com o bacteriófago RsPod1EGY, não foi observado o desenvolvimento de sintomas da doença, e a avaliação por qPCR demonstrou uma redução significativa na população dessa bactéria no solo (ELHALAG et al., 2018).

Além disso, há estudos que demonstram o uso dos bacteriófagos como forma de proteger alimentos e prolongar seu *shelf-life*. Muitas formulações com base em bacteriófagos estão comercialmente disponíveis e são "reconhecidos como seguros", sendo aprovados pela *European Food Safety Authority* (EFSA) ou pela *US Food and Drug Administration* (FDA) (MOYE et al., 2018; POLASKA et al., 2019). Um estudo realizado por Gouvêa et al. (2015) avaliou filmes de acetato de celulose associado a uma solução contendo os bacteriófagos (BFSE16, BFSE18, PaDTA1, PaDTA9, PaDTA10 e PaDTA11). Esse estudo demonstrou que esses bacteriófagos apresentaram atividade antimicrobiana contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ATCC 14028). Além disso, o produto comercial LISTEX™ P100 apresentou eficácia contra *Listeria monocytogenes* (CHIBEU et al., 2013). Esses produtos já aprovados e estudos mostram o potencial dos bacteriófagos como ferramenta no controle de patógenos e na preservação da contaminação de alimentos.

2.3 Endolisinas como forma de controle antimicrobiano em alimentos

Apesar da eficácia no uso de bacteriófagos como método de controle, existem algumas desvantagens em seu uso. Dentre elas podemos citar a necessidade de um bacteriófago virulento para que este possa infectar a célula hospedeira (SHANNON et al., 2020). Assim, as endolisinas estão sendo investigadas como uma alternativa para aumentar a segurança dos alimentos e reduzir o risco de doenças (MISIOU et al., 2018). Diversos estudos demonstraram a eficiência do uso de endolisinas como forma de controle bacteriano afim de reduzir o risco de contaminação de alimentos (NAZIR et al., 2023).

Vegetais e frutas que são alimentos pouco processados e assim são os mais vulneráveis a contaminação por patógenos. Dessa forma, há a necessidade de se implementar formas para prevenção de contaminações e assim assegurar a segurança alimentar. Em folhas de alface *iceberg*, contaminadas com *Listeria monocytogenes*,

Schmelcher et al, (2012) observou ação antimicrobiana de endolisinas. Há também a utilização de endolisinas como sanitizante para evitar formação de biofilme em ferramentas e materiais em contato com alimentos em fábricas alimentícias, além de também evitar a contaminação cruzada (Nazir et al., 2023). Duas endolisinas, LysWL59 e LysWL60 do bacteriófago LPST10 apresentaram ação antimicrobiana ao serem aplicadas em conjunto com EDTA 0,5 mM (LIU et al., 2019). Estudos demonstraram também a eficiência dessas enzimas na degradação do biofilme de *Staphylococcus* e *Streptococcus* (SAS et al., 2007; SON et al., 2010).

Plantas de tomate codificando endolisinas produzidas pelo bacteriófago CMP1, foram resistentes à infecção por *Clavibacter michiganensis* (HAUSBECK et al., 2000). Em batatas transgênicas codificantes de endolisinas do bacteriófago T4 de *E. coli* apresentaram resistência ao fitopatógeno *Erwinia carotovora* (DÜRING et al., 1993). A ação sinérgica dessas enzimas com antimicrobianos clássicos é bastante estudada e apresenta potencial protetivo contra infecções bacterianas (ABEBE, 2020).

As endolisinas também podem ser utilizadas em laticínios e carnes. A endolisina do bacteriófago H5 de *Staphylococcus* reduziu a incidência de *Staphylococcus aureus* em leite pasteurizado em 1 log após 60 minutos e foi bactericida após 4 horas de tratamento (OBESO et al., 2008). A endolisina LysCs4 de *Cronobacter sakazakii* foi avaliada em fórmula infantil, em concentração de 50 µg/mL, onde foi observada degradação do peptidoglicano de *Cronobacter sakazakii* (ENDERSEN et al., 2015). Já a endolisina DLn1 foi capaz de reduzir a população de *Bacillus cereus* em 4,7 log após 24 h (LI et al., 2022). Carne de pato contaminada com *Clostridium perfringens* e tratada com endolisina em concentração de 100 µg/mL e 50 µg/mL apresentou uma redução de células viáveis de respectivamente 3,2 log e 3,08 após 48 horas a 4 °C (LU et al., 2023).

2.4 Endolisinas como forma de combate a isolados de interesse clínico

Terapias que associam endolisinas junto com antimicrobianos convencionais, são uma forma promissora de controle antimicrobiano, principalmente em relação ao grupo ESKAPE (VASINA et al., 2021). De acordo com Vasina et al, (2021), as endolisinas LysAm24, LysAp22, LysECD7 e LysSi3 apresentaram ação bactericida contra *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp., *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *A. baumannii* e

Enterobacter sp. Essas endolisinas não apresentaram citotoxicidade e não induziram resistência em curto prazo (VASINA et al., 2021); (HESELPOTH et al., 2022).

Em outro estudo, a endolisina Pa01Ply, modificada com um peptídeo catiônico, em ensaios *in vitro* apresentou ação bactericida contra diversos isolados do grupo ESKAPE, incluindo *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, abrangendo tanto bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas. Esse peptídeo apresentou atividade em uma ampla faixa de temperatura e pH, sem apresentar citotoxicidade em células humanas (HESELPOTH et al., 2022).

A endolisina modificada do bacteriófago vB_KpnS_MK54 apresentou atividade contra isolados de *K. pneumoniae* e também apresentou eficácia em ensaios *in vivo* em ratos (LU et al., 2022). As endolisinas dos bacteriófagos PBEC30 e PBEC56 apresentaram ação bactericida contra isolados de bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (JEONG et al., 2023).

Segundo Pallesen et al, (2023), a endolisina XZ.700 foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, presente na pele de pacientes. Já Son et al, (2020) demonstrou a eficácia de um peptídeo hibridizado, formado por duas endolisinas, LysSA11 e LysB4, que apresentou ação antimicrobiana contra isolados de *S. aureus* e *B. cereus*.

A endolisina LysSAP26, do bacteriófago SAP-26, apresentou atividade contra isolados de *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, bem como contra *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (KIM et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar endolisinas virais e avaliar seu potencial de controle sobre o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar genes codificadores para endolisinas em genomas de fagos líticos de *X. citri*;
- Isolar genes de endolisinas para construção de sistemas de expressão em bactérias;
- Expressar as endolisinas em sistemas bacterianos;
- Avaliar a estabilidade da endolisina em ensaios de dicroísmo circular (CD);
- Avaliar a estabilidade da endolisina em diferentes pHs e salinidades;
- Avaliar a atividade lítica da endolisina na degradação de peptidoglicano;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Utilizamos a linhagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (IBSBF1594) (SCHAAD et al. 2006), que teve o genoma sequenciado (da SILVA et al., 2002), linhagens de *Xanthomonas* cedidas gentilmente pela FUNDECITRUS (FDC 102 e FDC 02), (tabela 1). Para seu crescimento, foi utilizado o meio NYG (peptona 5 g/L, extrato de levedura 3 g/L, glicerol 20 g/L) com ou sem adição de ágar (15 g/L). O crescimento bacteriano foi realizado a 28 °C com ou sem agitação (200 rpm). Para a clonagem utilizamos a linhagem de *E. coli* DH10B (tabela 1) e para a expressão de proteínas utilizamos a linhagem *E. coli* T7 express (tabela 1). O cultivo das mesmas foi feito em meio LB (extrato de levedura 5 g/L, triptona 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L), com ou sem ágar (15 g/L) a 30 °C, e agitação a 200 rpm, se necessário. Utilizamos também linhagens de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) (tabela 1). O crescimento dessas linhagens foi feito em meio LB/LB-ágar (15 g/L) a 37 °C.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas ao longo do trabalho.

Linhagem	características relevantes	Referência
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306	<i>X. citri</i>	SCHAAD et al. 2006
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> FDC 102	FDC 102 (linhagem <i>host</i> para propagação dos bacteriófagos)	FUNDECITRUS
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> FDC 02	FDC 02 (linhagem <i>host</i> para propagação dos bacteriófagos)	FUNDECITRUS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	FIO CRUZ
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	FIO CRUZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	FIO CRUZ
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	FIO CRUZ
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> DH10B, linhagem para procedimentos de clonagem	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> T7 express	<i>E. coli</i> T7 express; linhagem para expressão heteróloga	Novagen

4.2 Propagação e manutenção dos bacteriófagos

Para a propagação dos bacteriófagos da nossa coleção (LGB - Laboratório de Genética de Bactérias), 100 µL da suspensão de bacteriófagos já purificados e conservados pelo grupo e 100 µL de cultura de FDC 102 ou FDC 02 D.O_{600nm} ~ 1,0 foram acrescentados a 3 mL de NYG soft (5 g/L de peptona; 3 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de glicerol e 0,65% de ágar (w/v) em placa já contendo uma fina camada de NYG sólido com 1,5% de ágar. As placas foram incubadas a 29 °C por 24 horas. Após incubação, as placas com formação *spider web-like*, foram incubadas em tampão SM (100

mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.01% ágar (v/v)) por 24 horas a 8°C para recuperação dos bacteriófagos. Após incubação a solução foi filtrada em filtro 0,22 µm. Posteriormente realizamos a quantificação através da diluição dos filtrados para cálculo da PFU/mL (unidades formadoras de placa/mL).

4.3 Procedimentos gerais de biologia molecular

Todas as enzimas de restrição, bem como as polimerases que foram utilizadas ao longo do projeto foram obtidas da empresa Thermo-Scientifics. Os genes referentes às endolisinas foram amplificados utilizando-se a enzima Pfu polimerase, ou Taq DNA polimerase conforme especificações do fabricante. Amplificações de DNA por PCR seguiram o padrão da tabela 2.

Tabela 2 – Reação padrão de PCR

Componente	Quantidade por reação
Água MiliQ autoclavada	Para completar 50 µL finais da reação
Tampão da enzima	Diluído para 1X
DNA molde	~5 ng
Primer <i>Forward</i>	1,0 µM
Primer <i>Reverse</i>	1,0 µM
DMSO	3% (v/v)
Mix dNTPs	100,0 µM de cada
Polimerase	1,0 U
Volume final	50 µL

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,7% em TBE 1%. Bandas de tamanho esperado foram extraídas do gel e purificadas com GeneJet Gel Extraction kit (Thermo-Scientifics). Os produtos foram ligados ao vetor pJET e após seleção em meio LB com ampicilina (50 µg/mL), três clones positivos para ligação foram selecionados e enviados para sequenciamento para confirmação da construção. Em seguida, cada produto de PCR foi liberado do pJET por digestão enzimática com suas respectivas enzimas de restrição (conforme planejamento prévio de clonagem) e ligado

ao vetor de expressão pET28a (Novagen) linearizado com as mesmas enzimas de restrição. Esse vetor permite a expressão de caudas de histidina para auxiliar no processo de purificação. Os vetores foram selecionados mediante transformação em *E. coli* DH10B na presença de canamicina 20 µg/mL (SAMBROOK, 1989).

4.4 Bioinformática: busca por genes candidatos

Os bacteriófagos CP1 (NCBI: NC_019933.2) e CP2 (NCBI: NC_020205.1) (AHMAD et al., 2014), de origem japonesa, gentilmente cedidos pelo professor Jeffrey Jones, University of Florida, tiveram seu genoma re-sequenciados e anotados em colaboração com o professor Mark Enright, Manchester Metropolitan University. Potenciais ORFs foram anotadas com auxílio do programa Prokka v.1.13 (SEEMAN et al., 2014). Para a visualização do genoma utilizamos o *software* Artemis v. 17.0.1 (CARVER et al., 2012). Para buscar os genes codificadores para enzimas de interesse utilizamos busca por homologia estrutural com o HHpred (SÖDING et al., 2005) no Protein Data Bank (PDB). Dentre as sequências investigadas, selecionamos duas endolisinas do bacteriófago CP1 (apêndice A) e duas endolisinas do bacteriófago CP2 (apêndice A).

4.5 Modelagem *in silico* das endolisinas

Todas as modelagens foram realizadas com auxílio da ferramenta Colab Fold (Alpha Fold2) (MIRDITA et al., 2021). Para a avaliação por Ramachandran utilizamos o SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018). Para a visualização e avaliação da estrutura, utilizamos o ChimeraX 1.7, para avaliação do domínio das enzimas utilizamos o InterPro (Paysan-Lafosse et al., 2022) e para busca por homólogos utilizamos o HHpred (SÖDING et al., 2005).

4.6 Desenho dos primers

Primers foram desenhados com base na sequência genômica do bacteriófago CP1 e CP2 para a amplificação dos genes candidatos. Para tal, utilizamos o *software* Artemis v. 17.0.1 (CARVER et al., 2012) para a visualização do genoma completo. Para avaliação dos parâmetros termodinâmicos e otimização dos primers contidos na tabela 3, utilizamos o *software* Gene Runner v. 6.5.50.

Tabela 3 – Sequência dos oligonucleotídeos desenhados e utilizados para amplificação das endolisinas. Os sítios das enzimas de restrição utilizadas encontram-se sublinhados.

Produto	Primer	Sequência 5' – 3'
CP1_21	CP1_21_F	AAACCATGGAA <u>ATGGACATCAACAAGTATG</u>
	CP1_21_R	TTTAAGCTT <u>CTCATAAGATGGCCTGTCAAG</u>
CP1_30	CP1_30_F	AAACCATGGAA <u>ATGCCTACAAAGAATGAAAG</u>
	CP1_30_R	TTTAAGCTT <u>CGGGCGAATGAAATTACTG</u>
CP2_07	CP2_07_F	AAACAT <u>ATGTCCGACCAAGCCGCGAAG</u>
	CP2_07_R	TTTAAGCTT <u>TCAGCCCGCCCGAAGGTACAG</u>
CP2_29	CP2_29_F	AAACCATGGAA <u>ATGGCCACCATCATTCCGCGC</u>
	CP2_29_R	TTTAAGCTT <u>GTTTCGACCCCGCGCTGTTGG</u>

4.7 Amplificação dos genes do bacteriófago CP1

A amplificação dos genes do bacteriófago CP1 (tabela 4) foi feita por PCR *touchdown*, bem como por PCR gradiente conforme a tabela 5 e 6. Todas as reações foram feitas em termociclador Bio Rad modelo T100. Para as reações de PCR utilizamos tanto a enzima Taq polimerase como também a Pfu polimerase. Avaliamos também a adição de alguns aditivos como DMSO (1-5%) bem como formamida (1-5%).

Tabela 4 – Genes do bacteriófago CP1 utilizado nesse trabalho

Bacteriófago (gene)	Coordenada genômica	Tamanho (pb)
CP1_21	15647..16051	405
CP_30	24591..25130	540

Tabela 5 – Ciclos para amplificação do bacteriófago CP1.

Ciclos		Temperatura	Tempo (min)
1X	Desnaturação Inicial	95 °C	2:30
	Desnaturação	95 °C	0:30
10X	Hibridização	50 °C (+2°C/ciclo)	0:30
	Extensão	72 °C	1:30
1X	Desnaturação	95°C	0:30
	Hibridização	54°C	0:30
25X	Extensão	72°C	1:30
	Extensão Final	72°C	5:00

Tabela 6 – Ciclos para amplificação dos genes do bacteriófago CP1

Ciclos		Temperatura	Tempo (min)
1X	Desnaturação Inicial	95 °C	2:30
	Desnaturação	95 °C	0:30
35X	Hibridização	55 °C – 67 °C	0:30
	Extensão	72 °C	1:00
1X	Extensão final	72 °C	3:00

4.8 Amplificação dos genes do bacteriófago CP2

A amplificação do gene CP2_07 (tabela 7) foi feita por PCR *touchdown*, conforme a tabela 8. Todas as reações foram feitas em termociclador Bio Rad modelo T100.

Tabela 7 - Genes do bacteriófago CP2 utilizado nesse trabalho.

Bacteriófago (gene)	Coordenada genômica	Tamanho (pb)
CP2_07	4030..4632	603
CP2_29	19371..21563	2193

Tabela 8 - Ciclos para amplificação do gene CP2_07.

Ciclos		Temperatura	Tempo (min)
1X	Desnaturação Inicial	95 °C	2:30
	Desnaturação	95 °C	0:30
10X	Hibridização	50 °C (+2 °C/ciclo)	0:30
	Extensão	72 °C	1:30
1X	Desnaturação	95 °C	0:30
	Hibridização	54 °C	0:30
25X	Extensão	72 °C	1:30
	Extensão Final	72 °C	5:00

Para amplificação do gene CP2_29 (tabela 7) foi feita primeiramente uma reação de PCR gradiente para definir a melhor temperatura de anelamento, conforme tabela 9.

Tabela 9 - Ciclos para amplificação do gene CP2_29.

Ciclos		Temperatura	Tempo (min)
1X	Desnaturação Inicial	95 °C	2:30
	Desnaturação	95 °C	0:30
35X	Hibridização	55 °C – 67 °C	0:30
	Extensão	72 °C	2:30
1X	Extensão final	72 °C	5:00

A reação final utilizada para amplificação do gene CP2_29 está contida na tabela 10.

Tabela 10 - Ciclos para amplificação do gene CP2_29.

Ciclos		Temperatura	Tempo (min)
1X	Desnaturação Inicial	95 °C	2:30
35X	Desnaturação	95 °C	0:30
	Hibridização	67 °C	0:30
	Extensão	72 °C	2:30
1X	Extensão final	72 °C	5:00

4.9 Condições de expressão da endolisina His-CP2_07 e CP2_29-His

As construções em pET28a para expressão heteróloga de endolisinas foram transformadas em células de *E. coli* T7 express para testes de expressão. Células foram inicialmente cultivadas em 10 mL de LB com adição de 20 µg/mL de canamicina a 37 °C por 12 h sob agitação de 200 rpm. A seguir, cultivos foram diluídos em 50 mL de meio LB também contendo canamicina (20µg/mL) para D.O_{600nm} ~ 0,1 e mantidos a 37 °C até que atingissem a D.O_{600nm} ~ 0,5, quando foi adicionado isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) para 1mM. O cultivo foi então transferido para 20 °C ou 30 °C por mais 4 horas. Alíquotas de 1mL foram retiradas a cada 60 minutos para verificarmos a indução das proteínas de interesse. A avaliação da expressão foi feita em gel SDS-PAGE corado com Coomassie blue (SAMBROOK, 1989).

4.10 Condições de purificação da endolisina

A expressão das proteínas foi realizada da mesma maneira como descrito no tópico anterior, para a melhor condição de expressão avaliada. Após a indução, células relativas a cultivos de 500 mL foram resgatadas por centrifugação a 6000 xg por 30 minutos. Para lise celular usamos o tampão A: 30 mM Tris-HCl pH 8; 60 mM NaCl; 10% glicerol para volume final de 5 mL. As amostras foram mantidas em tubos de 50 mL no gelo, sendo submetidas a 20 ciclos de ultrassom, sendo 10 segundos ligado e 30 segundos de intervalo entre pulsos (utilizamos o equipamento VibraCell VCX-130). Para a clarificação das amostras, foi feita uma etapa de centrifugação a 15000 xg por 10 min a 4

°C. As amostras foram então colocadas em contato com resina sepharose *fast flow* (GE) carregada com Ni²⁺. A ligação foi feita no gelo por 1 hora. A mistura foi então transferida para uma coluna descartável de cromatografia (vol. ~ 15 mL) onde deixamos a resina decantar. Para a eluição das amostras, utilizamos 5 mL de tampão B, com o seguinte gradiente de imidazol (*step*): 20 mM, 40 mM, 80 mM e 200 mM. Para análise dessa etapa, 40 µL de cada passo da purificação foram misturadas com 20 µL de tampão de amostra SDS para análise em gel de SDS-PAGE (diluição 1:3). Coletamos também amostras do *flow through* bem como do clarificado antes de passar pela coluna. Após purificação, as amostras contendo as frações de interesse foram dialisadas contra tampão A para remoção do imidazol e quantificadas.

4.11 Quantificação proteica

Para quantificar nossas amostras utilizamos o método descrito por Noble, 2014. Para tal, calculamos o coeficiente de extinção molar a 280 nm segundo Batabyal et al., 2021, e a absorbância da amostra a 280 nm foi obtida com auxílio do leitor de placa H1 (BioTek, Winooski, EUA).

4.12 Avaliação da atividade das endolisinas

Para avaliar o potencial de degradação do peptidoglicano, seguimos a metodologia descrita por Schmitz (2010), com modificações. Os cultivos de *X. citri* foram preparados em meio NYG até D.O_{600nm} ~ 1,0. Os cultivos foram centrifugados e ressuspensos em água destilada autoclavada em metade do volume inicial. As amostras foram submetidas a 20 ciclos de ultrassom, sendo 10 segundos ligado e 30 segundos de intervalo entre pulsos (utilizamos o equipamento VibraCell VCX-130). A essa solução, foi adicionado ágar para concentração final de 1,5%. Esse meio foi então vertido em placas de Petri médias (15 cm de diâmetro). Cinco µL de enzima (40 µg) foi adicionado a cada placa. A atividade enzimática foi avaliada através da formação de halo de degradação. Alternativamente realizamos o mesmo processo para a linhagem de *P. aeruginosa* sendo que seu crescimento foi feito em meio LB por 16 h a 30 °C até atingir D.O_{600nm} de ~ 1,0.

4.13 Dicroísmo Circular (CD) e estabilidade térmica

Para avaliar a estabilidade estrutural das enzimas virais purificadas frente a diferentes temperaturas utilizamos a técnica de dicroísmo circular. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Dr. Carlos Ramos, UNICAMP, Campinas, SP. Brevemente, para os ensaios de CD, todas as amostras foram centrifugadas a 10000 xg por 10 min a 4 °C e o tampão foi filtrado, com o auxílio de uma seringa descartável, em filtro 0,22 µm. Os experimentos foram realizados usando um espectropolarímetro JASCO J-700 acoplado a Peltier para o controle de temperatura e cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm. Todos os espectros foram obtidos a 20 °C e correspondem a média de 32 acumulações feitas com velocidade de escaneamento de 50 nm/min e resposta de 2 segundos. Os ensaios de desenovelamento térmico foram realizados no intervalo de 20 °C a 90 °C com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. O tratamento dos dados foi realizado usando os *softwares* Origin® 8.1 e GraphPad Prism 8, subtraindo o sinal do tampão em todos os experimentos e convertendo os valores de CD (originalmente obtidos em mdeg) em elipticidade molar residual média $[\theta]$, cuja unidade é dada em deg cm² dmol⁻¹, utilizando a equação abaixo (1), onde MM é a massa molar da proteína, n é o número de resíduo por monômero de proteína, C é a sua concentração em mg/mL e l o caminho óptico da cubeta utilizada.

$$[\theta] = \frac{\theta 100MM}{Cln} \quad (1)$$

O valor de $[\theta]$ da transição em 208 nm foi utilizado para estimar o conteúdo de alfa-hélice da proteína por meio da equação abaixo: (CORRÊA & RAMOS, 2009).

$$fH = \frac{([\theta]_{208nm} - 4000)}{(-33000 - 4000)}$$

4.14 Purificação e coloração do extrato bruto de peptidoglicano de *X. citri*

A purificação do extrato bruto de peptidoglicano de *X. citri* foi realizada conforme Santin & Cascales (2017) com modificações. Em resumo, preparamos cultivos de *X. citri*

até uma $D.O_{600nm}$ de aproximadamente 1,0, com volume final de 1 litro. As células foram coletadas por centrifugação a 6000 xg por 30 minutos e ressuspensas em água destilada autoclavada, para volume final de 10 mL. Em seguida, realizamos a lise celular por ultrassom: 10 ciclos de lise, alternando entre 10 segundos (ON) e 30 segundos (OFF). A amostra foi dividida em tubos de 1,5 mL, sendo 200 μ L da suspensão adicionados a cada tubo. Na sequência, adicionamos NaOH para concentração final de 200 mM. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, o corante Ramazol Brilhante Blue R (RBBr) foi adicionado à solução, para concentração final de 25 mM. A solução foi incubada a 37 °C por 16 horas. Em seguida, adicionamos HCl a solução, para uma concentração final de 500 mM. A amostra foi então vortexada e centrifugada a 6000 xg por 10 minutos. O passo de adição de HCl e a subsequente centrifugação foi repetido mais uma vez. Após essa etapa, a amostra foi lavada com tampão A para remoção do excesso de RBBr. O extrato bruto de peptidoglicano corado foi armazenado a 12 °C.

4.15 Avaliação da ação do NaCl e pH na atividade enzimática

Para os ensaios de estabilidade em NaCl, utilizamos as seguintes concentrações de NaCl 1 M; 0,5 M; 0,25 M; 0,125 M, 60 mM e sem NaCl com adição de 30 mM de tris-HCl e pH 8,0 e o extrato bruto de peptidoglicano obtido na etapa anterior. A avaliação da atividade enzimática ocorreu após 2 horas de tratamento com a endolisina (100 μ g/mL). Ao término do tratamento, adicionamos 1 volume de etanol para interromper a reação. Os tratamentos foram submetidos a uma centrifugação a 13000 xg por 5 minutos, e 100 μ L do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços para avaliar a degradação do extrato bruto de peptidoglicano e a consequente liberação do corante RBBr. As leituras foram realizadas com o auxílio do leitor de placa H1 (BioTek, Winooski, EUA), com a leitura feita a 595 nm.

Da mesma forma, investigamos o efeito do pH na atividade enzimática. Avaliamos os seguintes valores de pH: 3,0, 4,0, 5,0, 8,0, 9,0 e 10,0. Para os pHs 3, 4 e 5, utilizamos um tampão de citrato de sódio com uma concentração final de 60 mM. Para o pH 8,0, utilizamos o tampão fosfato de potássio, também com concentração final de 60 mM, e para os pHs 9,0 e 10, utilizamos o tampão de carbonato de cálcio, com concentração final de 60 mM. A concentração de endolisina final testada foi de 100 μ g/mL. A avaliação também foi realizada após um tratamento de 2 horas, com o auxílio do leitor de placa H1 (BioTek, Winooski, EUA) a 595 nm.

4.16 Purificação do peptidoglicano de *B. subtilis* e avaliação da atividade enzimática

Afim de quantificar a degradação enzimática das endolisinas utilizamos peptidoglicano purificado de células de *B. subtilis*. A purificação do peptidoglicano foi realizada conforme descrito por Chateau, 2019 com modificações. Brevemente, *B. subtilis* foi cultivado até a D.O_{600nm} de ~ 1,0. A partir desse cultivo realizamos uma diluição para um novo cultivo com D.O_{600nm} de 0,1 em volume final de 500 mL. Após 8 horas, as células foram coletadas a 6000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de água destilada autoclavada. Dois mL dessa cultura foram aliquotados em tubos de 2 mL para lise mecânica por perola de vidro (~100 mg). Após a lise, deixamos as pérolas de decantarem e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 50 mL. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 6000 xg e ao *pellet*, adicionamos 25 mL de Tris-HCl pH 7,5 juntamente com DNaseI para concentração final de 1 µg/mL e RNase para concentração final de 10 µg/mL. Adicionamos também 100 mM de MgSO₄. A amostra foi incubada por 4 horas a 37 °C. Após as 4 horas, foi adicionado proteinase K para a concentração final de 10 µg/ml e CaCl₂ para concentração final de 100 mM. A amostra foi incubada por 16 horas a 37 °C. Após incubação, o *pellet* foi coletado (6000 xg por 15 minutos) e lavado com água destilada autoclavada. O passo anterior foi repetido por mais duas vezes. Em seguida adicionamos SDS para concentração final de 4% e volume final de 25 mL. O tubo foi levemente fechado e mantido em água fervendo por 30 minutos. A amostra foi então centrifugada a 6000 xg por 15 minutos. O sobrenadante descartado e o *pellet* foi lavado com água destilada autoclavada. O passo anterior foi repetido por mais duas vezes. A amostra foi lavada com 25 mL de Tris-HCl pH 8,0. A amostra foi centrifugada a 6000 xg por 10 minutos. Esse passo foi repetido mais uma vez. A amostra foi lavada com 25 mL de EDTA 100 mM, sendo então centrifugada a 6000 xg por 15 minutos. A amostra foi então lavada com água destilada e centrifugada a 6000 xg por 15 minutos. A amostra foi lavada com acetona (25 mL) e centrifugada a 4 °C 3000 xg por 10 minutos. A amostra foi finalmente lavada por mais duas vezes com água. O *pellet* de peptidoglicano purificado foi seco e mantido a 4 °C.

Para avaliação da degradação, 30 µL do peptidoglicano purificado no passo anterior foi adicionado a 60 µL de tampão A (30 mM Tris-HCl pH 8; 60 mM NaCl; 10% glicerol) com e sem a presença da endolisina. As amostras foram incubadas a 37 °C por

até 200 minutos. O teste foi feito em uma placa de 96 poços em 100 µL de volume total. A absorbância de cada amostra a D.O_{600nm} foi avaliada em intervalos de 5 minutos com auxílio do leitor de placas Synergy H1 (BioTek, Winooski, EUA).

4.17 Avaliação do efeito bactericida da endolisina

A avaliação da ação bactericida da endolisina foi feita em placas de 96 poços que permite a diluição seriada dos tratamentos. As células foram tratadas com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 3 mM e endolisina a concentração inicial de 400 µg/mL. Para preparo dessas soluções, cada tratamento foi feito em meio de cultivo apropriado (NYG ou LB). A cada poço da placa foi adicionado 90 µL de meio de cultura NYG ou LB contendo ou não endolisina e 10 µL de inóculo bacteriano para concentração final de 10⁵ CFU/poço. Para o controle positivo foi adicionado 90 µL de solução contendo antibiótico apropriado: para *X. citri*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* – Canamicina para concentração final de 50 µg/mL; para *E. coli* – Ampicilina 100 µg/mL e, por fim para *S. aureus* – Vancomicina 20 µg/mL, e 10 µL de cada inóculo bacteriano totalizando 100 µL de volume por poço. Para controle negativo, foi adicionado somente 10 µL de inóculo bacteriano aos 90 µL de meio de cultura sem qualquer tratamento. Após a preparação das placas, elas foram incubadas a 29 °C por um período de 16 horas no caso das placas contendo *X. citri*; as demais foram incubadas a 36 °C por 8 horas. Para a avaliação da ação bactericida da endolisina, utilizamos a técnica de *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Para isso, com auxílio de um replicador de placas, transferimos uma fração do conteúdo de cada poço da placa de 96 poços para uma placa de Petri de 15 cm contendo meio NYG ou LB sólido. Em seguida, incubamos a placa a 29 °C por 72 horas no caso das placas contendo *X. citri*, e a 36 °C por 24 horas no caso das demais.

4.18 Curva de crescimento com endolisina e EDTA

Realizamos uma curva de crescimento bacteriano na presença da endolisina para avaliar o potencial de lise da nossa endolisina sobre células de *X. citri*. O crescimento bacteriano foi feito em placas de 24 poços com volume final de cultivo de 1 mL (utilizando meio NYG). O ensaio foi feito em leitor de placas Synergy H1 (BioTek, Winooski, EUA), com monitoramento de D.O_{600nm} em intervalos de 5 min. Preparamos os seguintes 4 tratamentos: CN – células não tratadas; EDTA – células tratadas com 0,375 mM de EDTA; Endolisina 100 µg/mL - células tratadas com 100 µg/mL de endolisina;

Endolisina 100 $\mu\text{g/ml}$ + EDTA 0,375 mM. Ao atingirem $D.O_{600\text{nm}} \sim 0,2$, adicionamos a endolisina para concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$ aos tratamentos. Após a adição da endolisina o padrão de lise e crescimento bacteriano foi avaliado através da redução/aumento da $D.O_{600\text{nm}}$ em intervalos de 5 minutos.

4.19 Análise estatística e construção dos gráficos

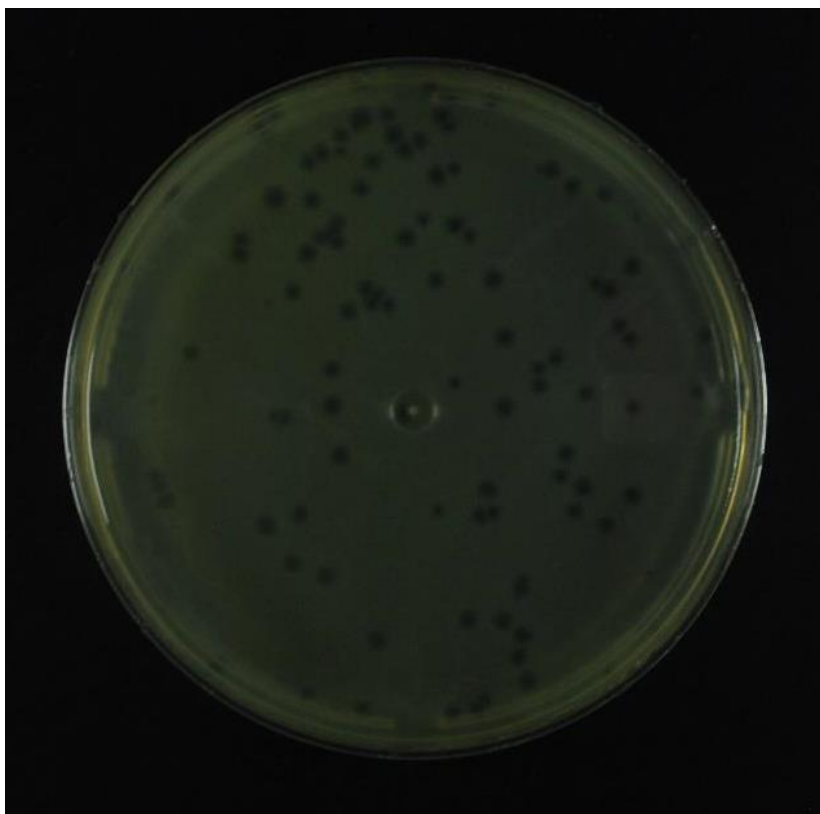
Para construção dos gráficos e análise de nossos dados utilizamos o *software* GraphPad Prism 6,0. Para análise estatística realizamos ANOVA (e *Tukey's* para avaliar diferenças entre as medias dos grupos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Propagação dos bacteriófagos

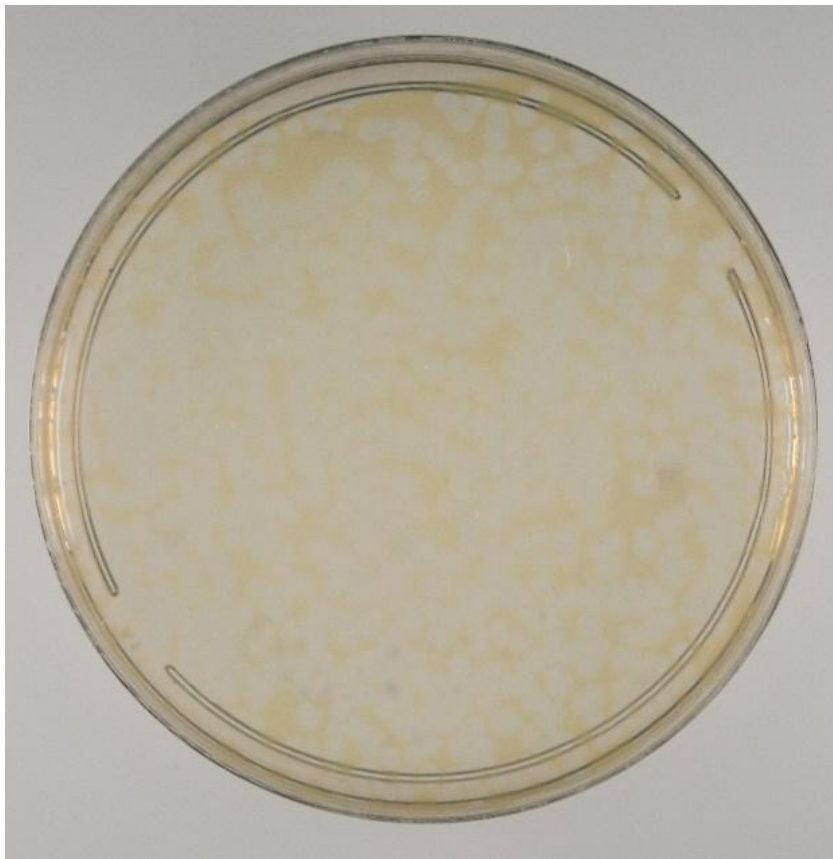
A manutenção e propagação dos estoques de ambos os bacteriófagos CP1 e CP2 foi realizada para manter a viabilidade dos bacteriófagos. Obtivemos como concentração final do bacteriófago CP2 aproximadamente 10^8 PFU/mL. Já para o bacteriófago CP1 obtivemos a concentração de aproximadamente 10^7 PFU/mL. A quantificação foi feita a partir de uma diluição seriada e a contagem dos halos de lise (figura 4 e 5).

Figura 4 – Placa de lise: Crescimento do bacteriófago CP2 com a formação de halos de lise. A concentração final obtida foi de $\sim 10^8$ PFU/mL. Cada halo representa o crescimento de uma unidade formadora de placa. Utilizamos a linhagem de *X. citri* FDC 02 para propagação do bacteriófago.



Fonte: dados do trabalho.

Figura 5 – Placa de lise: Crescimento do bacteriófago CP1 com a formação de halos de lise. A concentração final obtida foi de $\sim 10^7$ PFU/mL. Cada halo representa o crescimento de uma unidade formadora de placa. Utilizamos a linhagem de *X. citri* FDC 02 para propagação do bacteriófago.



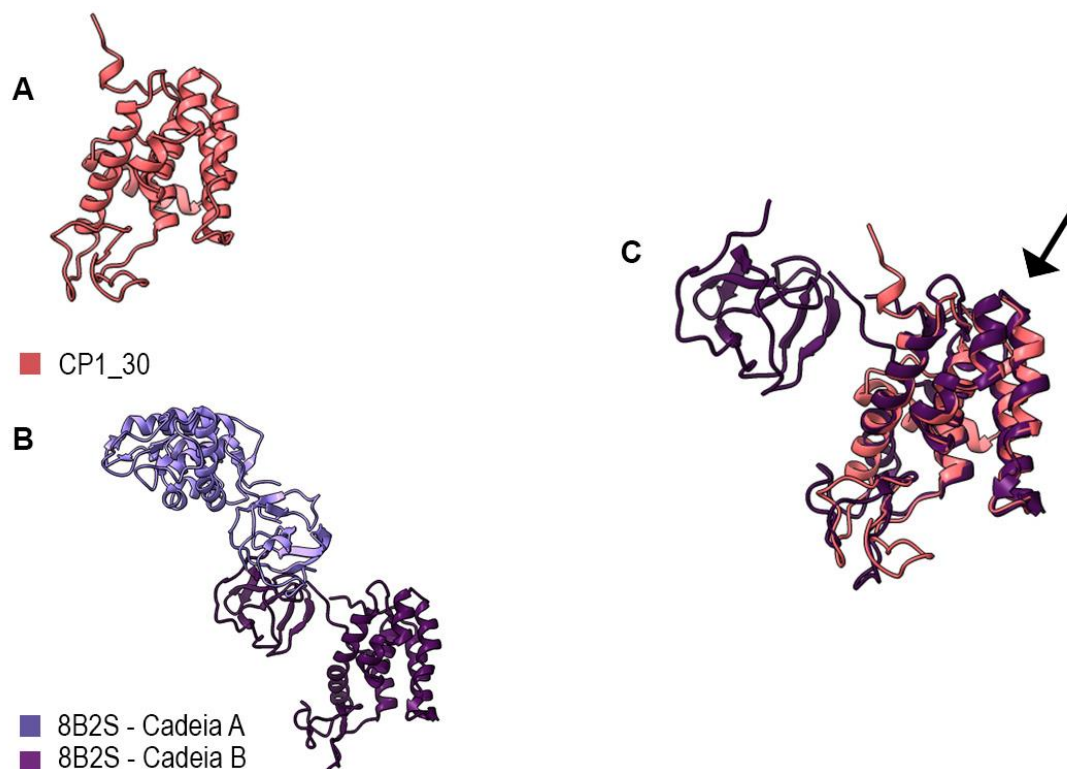
Fonte: dados do trabalho.

5.2 Avaliação da estrutura e classificação das endolisinas

5.2.1 Gene CP1_30

Realizamos inicialmente a modelagem das proteínas selecionadas utilizando o Colab Fold (material suplementar). Na figura 6 (A) observamos o modelo gerado. Realizamos também a busca por homologia com auxílio do HHpred (SÖDING et al.,2005) e selecionamos a proteína 8B2S (Protein Data Bank), uma muramidase de *Trichophaea saccata* (figura 6 B). No ChimeraX realizamos o alinhamento estrutural das duas proteínas e observamos então um alinhamento na região do domínio enzimático de ambas as proteínas (InterPro - Paysan-Lafosse et al.,2022), indicando que a proteína CP1_30 provavelmente apresenta domínio de muramidase (figura 6 C).

Figura 6 - Predição do domínio enzimático da endolisina CP1_30. A - modelagem da endolisina CP1_30. B - Estrutura da proteína 8B2S com duas cadeias (cadeia A e B). C- Alinhamento entre CP1_30 e a cadeia B da proteína 8B2S feito no ChimeraX. Seta indica região do domínio de ambas as proteínas.

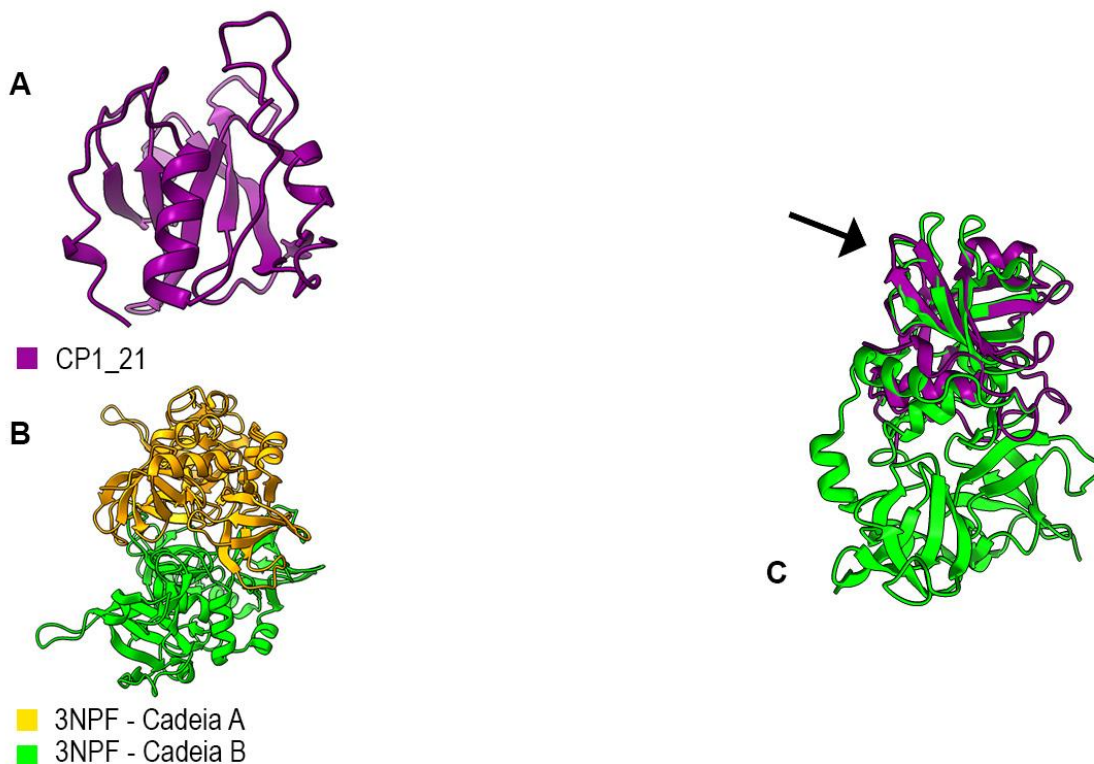


Fonte: dados do trabalho.

5.2.2 Gene CP1_21

Com relação ao gene CP1_21, na figura 7 (A) observamos o modelo gerado pelo Colab Fold. Realizamos também a busca por homologia com auxílio do HHpred (Söding et al.,2005) e selecionamos a proteína 3NPF (Protein Data Bank), uma peptidase de *Bacteroides ovatus* (figura 7 B) que apresenta domínio de uma peptidase. No ChimeraX realizamos o mesmo alinhamento estrutural e semelhantemente observamos maior alinhamento na região do domínio enzimático de ambas as proteínas (InterPro - Paysan-Lafosse et al.,2022), indicando que a endolisina CP1_21 apresenta possível atividade de peptidase (figura 7 C).

Figura 7 - Predição do domínio enzimático da endolisina CP1_21. A - modelagem da endolisina CP1_21. B - Estrutura da proteína 3NPF com duas cadeias (cadeia A e B). C - Alinhamento entre CP1_21 e a cadeia B da proteína 3NPF feito no ChimeraX. Seta indica região do domínio de ambas as proteínas.

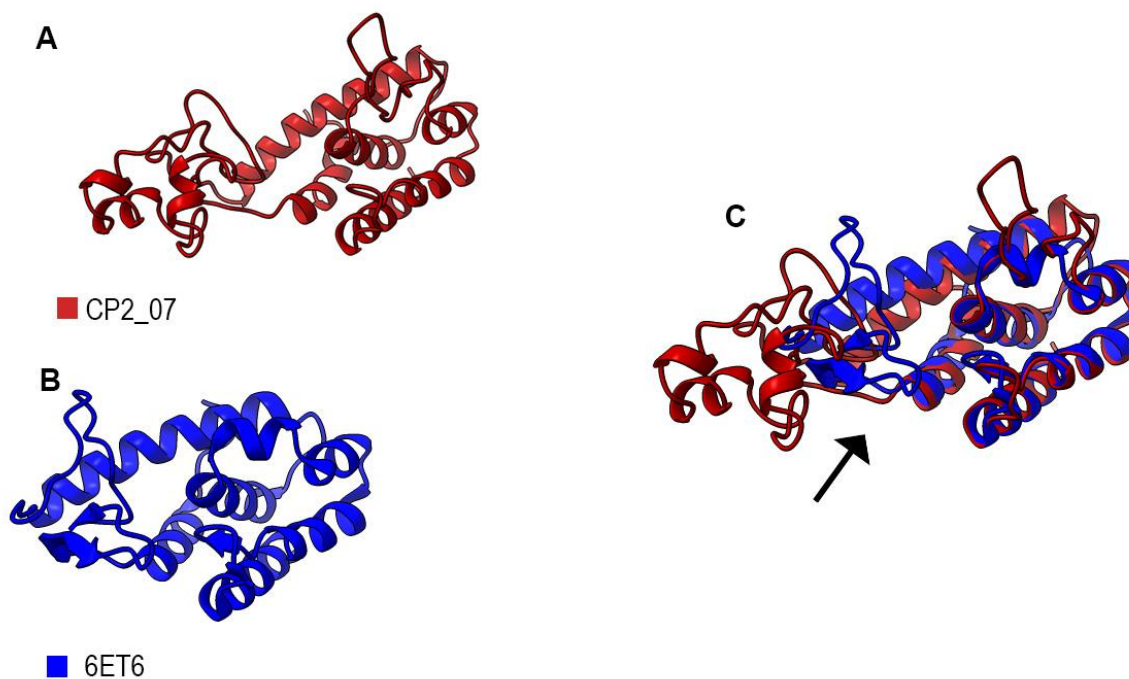


Fonte: dados do trabalho.

5.2.3 Gene CP2_07

Para o gene CP2_07 na figura 8 (A) observamos o modelo gerado pelo Colab Fold. Após modelagem, no HHpred (Söding et al.,2005) buscamos por proteínas com homologia estrutural com a endolisina CP2_07. Selecionamos a proteína com estrutura resolvida 6ET6 (PDB), uma muramidase de *Acinetobacter baumannii* que apresenta domínio enzimático e classificação de muramidase (figura 8 B). Assim após alinhamento estrutural no ChimeraX também observamos alinhamento na região do domínio enzimática das proteínas indicando então possível atividade de muramidase de nossa endolisina CP2_07 (figura 8 C) (InterPro - Paysan-Lafosse et al.,2022).

Figura 8 - Predição do domínio enzimático da endolisina CP2_07. A - Modelagem da endolisina CP2_07. B - Estrutura da proteína 6ET6. C - Alinhamento entre CP2_07 e a proteína 6ET6 feito no ChimeraX. Setas indicam região do domínio de ambas as proteínas.

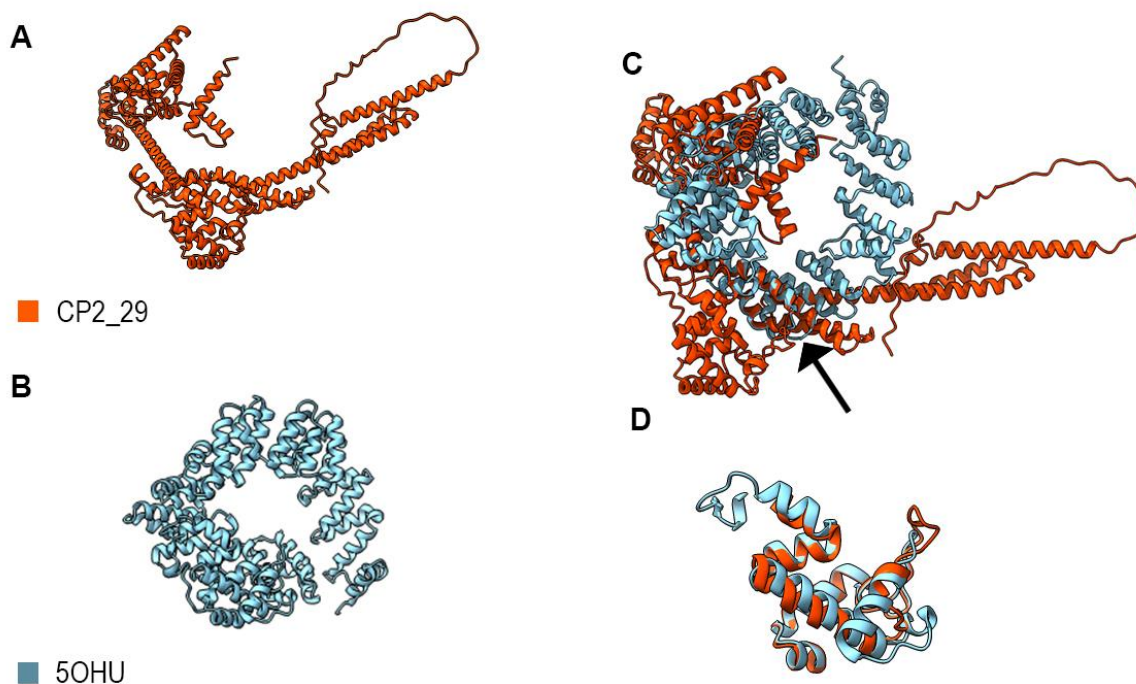


Fonte: dados do trabalho.

5.2.4 Gene CP2_29

Com relação ao gene CP2_29, na figura 9 (A) observamos o modelo gerado. Com a busca no HHpred (Söding et al.,2005), selecionamos a proteína 5OHU (PDB), uma transglicosilase de *Pseudomonas aeruginosa* classificada como transglicosilase (figura 9 B). Em seguida, após o alinhamento estrutural realizado no ChimeraX, notamos um alinhamento na região do domínio enzimático de ambas as proteínas, sugerindo uma possível atividade de transglicosilase para nossa enzima (figura 9 C) (InterPro - Paysan-Lafosse et al.,2022). Na figura 9 D observamos em aumento o domínio de ambas as proteínas. No caso das outras três endolisinas selecionadas, elas apresentam um pequeno tamanho, sendo compostas apenas pelo seu domínio enzimático. No entanto, em contraste, a endolisina CP2_29 é uma enzima maior, e apenas uma porção de sua estrutura é representada pelo domínio enzimático.

Figura 9 - Predição do domínio enzimático da endolisina CP2_29. A - Modelagem da endolisina CP2_29. B - Estrutura da proteína 5OHU. C - Alinhamento entre CP2_29 e a proteína 5OHU feito no ChimeraX. D – Destaque do domínio das proteínas. Sete indica região do domínio de ambas as proteínas.



Fonte: dados do trabalho.

5.3 Clonagem das endolisinas

5.3.1 Amplificação dos genes do bacteriófago CP1

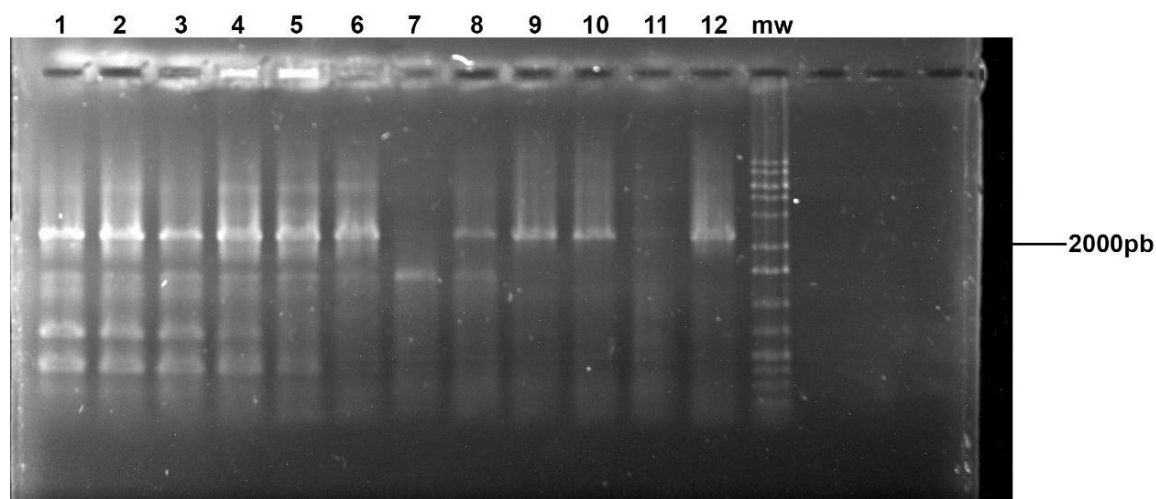
Com relação ao bacteriófago CP1 havíamos selecionado dois genes candidatos. Entretanto, após diversas tentativas de amplificação com diferentes tipos de ciclo de PCR (PCR *touchdown* e PCR gradiente), usando diferentes polimerases (Pfu, Platinum e Taq), e diferentes aditivos (DMSO e formamida), não obtivemos sucesso e não fomos capazes de amplificar nenhum dos dois genes selecionados.

5.3.2 Amplificação e clonagem dos genes do bacteriófago CP2

A amplificação do gene CP2_29 foi bem sucedida com os primers CP2_29_F e CP2_29_R e utilizando ciclo de PCR gradiente (figura 10). Observamos presença de bandas inespecíficas nas canaletas (1), (2), (3), (4), (5), (6), (8), (9), (10) e (12). Mas

observamos uma menor intensidade de bandas inespecíficas na canaleta (12) que foi a reação de PCR realizada com temperatura de anelamento de 67 °C. Assim passamos a realizar a amplificação do gene CP2_29 com essa temperatura de anelamento.

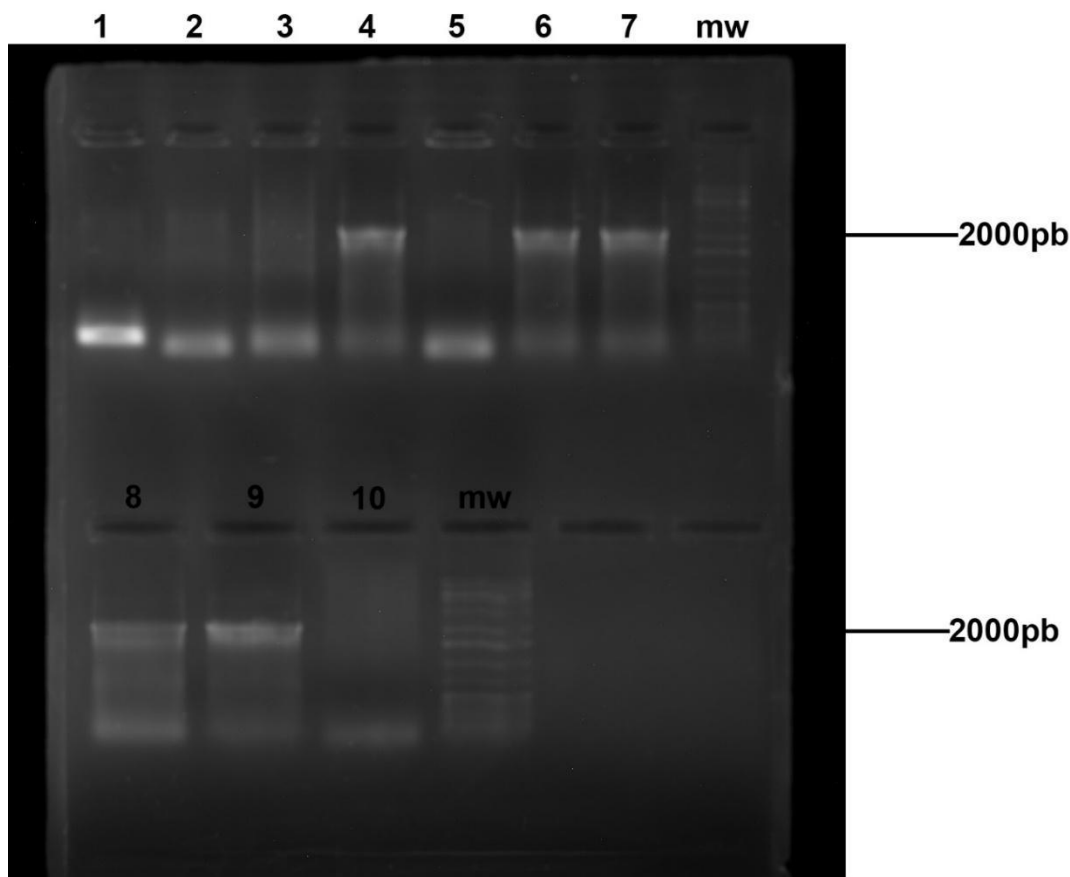
Figura 10 – Gel de agarose contendo os produtos de PCR referentes à amplificação do gene CP2_29 de 2193pb com os primers CP2_29_F e CP2_29_R. Nas canaletas (1), (2), (3), (4), (5), (6), (8), (9), (10) e (12) amplificação do gene CP2_29. Marcador de peso molecular (mw) 1 kb ladder (Cellco).



Fonte: Dados do trabalho.

As bandas referentes ao gene CP2_29 foram isoladas do gel e purificadas. Em seguida foi feita a ligação do fragmento ao vetor pJET dando origem ao vetor pJET_CP2_29. Após ligação, o vetor foi transformado em células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B. A confirmação da transformação foi feita por PCR com os primers apropriados (figura 11; canaletas (4), (6), (7), (8)). Esses clones positivos foram selecionados e preservados.

Figura 11 - Gel de agarose contendo os produtos de PCR referentes à amplificação do gene CP2_29 com 2193pb com os primers CP2_29_F e CP2_29_R para confirmação da transformação no vetor pJET_CP2_29. (4), (6), (7), (8) são clones positivos para a transformação. (9) Amplificação a partir do genoma viral do gene CP2_29. (10) Branco. Marcador de peso molecular (mw) 1 kb ladder (Cellco).



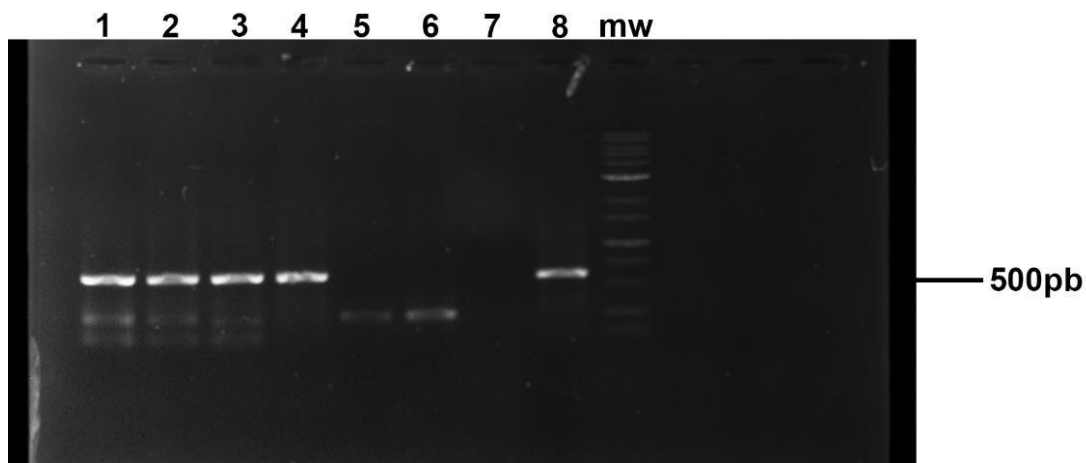
Fonte: Dados do trabalho.

Com a confirmação da amplificação, as bandas de interesse foram cortadas do gel, digeridas com as respectivas enzimas de restrição e ligadas ao vetor linearizado pET28a. Após ligação, o vetor pET28a_CP2_29-His, com cauda de histidina (His-6) na região C-terminal, foi transformado em células competentes de DH10B. A confirmação da transformação foi feita por PCR com os primers apropriados. Após confirmação, o plasmídeo pET28a_CP2_29-His foi extraído e transformado em células competentes de *E. coli* T7 express. A confirmação da transformação foi feita por PCR com primers apropriados. Após confirmação, clones positivos foram selecionados e mantidos a - 80 °C para próximos ensaios.

Para o gene CP2_07 de 607pb, a amplificação foi feita com os primers CP2_07_F e CP2_07_R e por PCR *touchdown*. Nas canaletas (1), (2), (3), (4) e (8) da figura 12,

observamos uma banda de 603 pb referente ao gene CP2_07 além da presença de bandas inespecíficas. Desta maneira, as bandas de interesse foram cortadas do gel e purificadas para os próximos passos de clonagem.

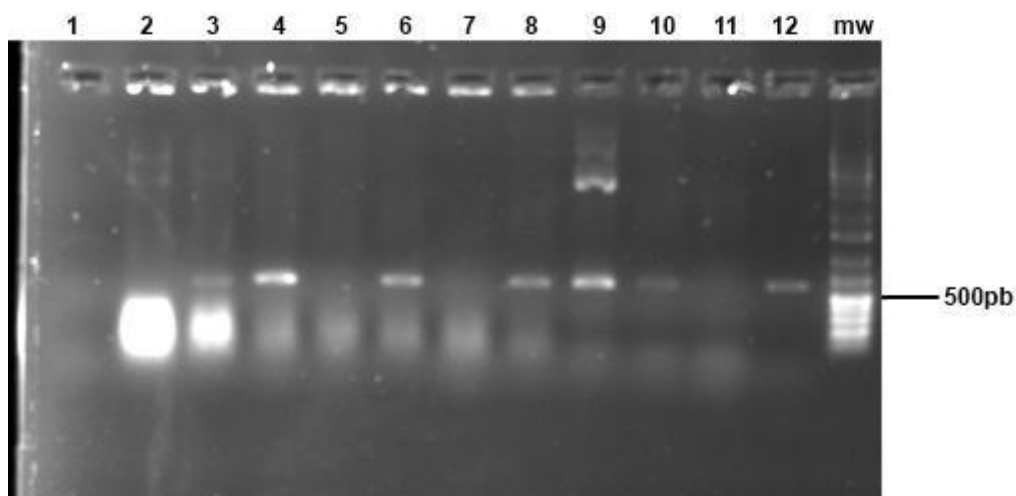
Figura 12 – Gel de agarose contendo os produtos de PCR referentes à amplificação do gene CP2_07 de 603pb com os primers CP2_07_F e CP2_07_R. Nas canaletas (1), (2), (3), (4), (5), e (8), amplificação do gene CP2_07. Marcador de peso molecular (mw) 1 kb ladder (Kasvi).



Fonte: dados do trabalho.

Após ligação dos produtos de PCR no vetor pJET, dando origem ao vetor pJET_CP2_07, os produtos foram transformados em células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B. Os clones positivos foram selecionados por PCR com os primers utilizados no isolamento gênico por PCR. Observamos clones positivos nas canaletas (3), (4), (6), (8) e (10) (figura 13).

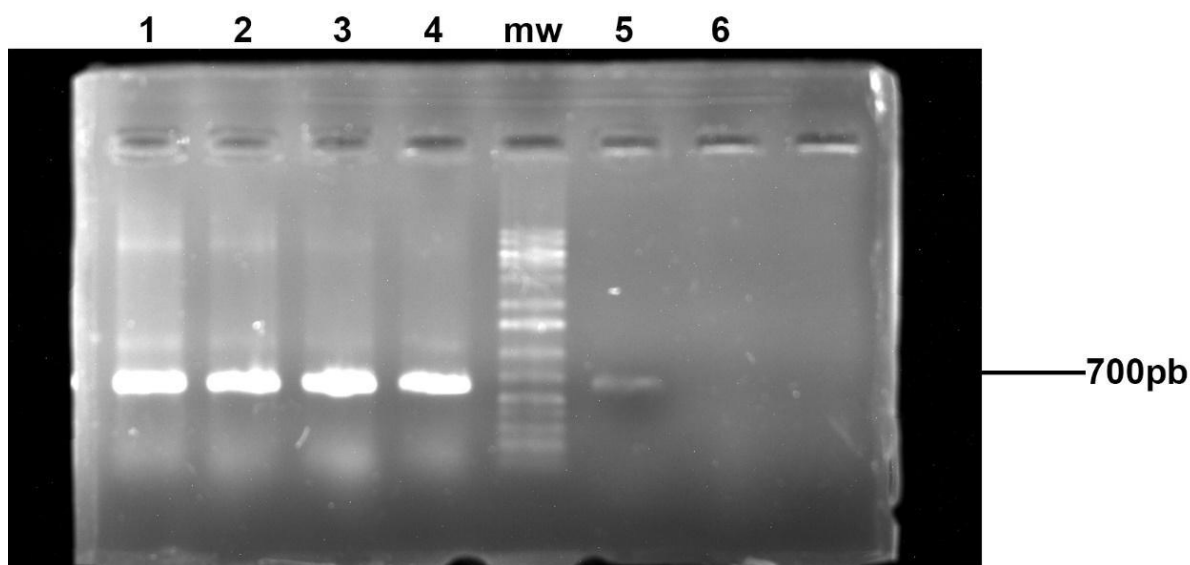
Figura 13 - Gel de agarose contendo os produtos de PCR referentes à amplificação do gene CP2_07 de 603pb com os primers CP2_07_F e CP2_07_R para confirmação da transformação no vetor pJET_CP2_07. (3), (4), (6), (8) e (10) são clones positivos para a transformação. (11) – Branco e (12) – Amplificação a partir do DNA genômico do gene CP2_07. Marcador de peso molecular (mw) 1 kb ladder (Cellco).



Fonte: dados do trabalho.

Após sequenciamento de 3 clones positivos e confirmação da construção dos clones acima, o vetor pJET_CP2_07 foi digerido com suas respectivas enzimas e o gene CP2_07 foi ligado em pET28a e transformado em *E.coli* DH10B. Nossa construção final foi designada pET28a_His-CP2_07 (figura 14) com cauda de histidina (His6) na região N-terminal. A construção de expressão pET28a_His-CP2_07 foi transformada na linhagem de expressão de *E. coli* T7 *express* para testes posteriores.

Figura 14 - Gel de agarose contendo os produtos de PCR referentes à amplificação do gene CP2_07 de 603pb com os primers CP2_07_F e CP2_07_R para confirmação da transformação no vetor pET28a. (1), (2), (3), (4) são clones positivos para a transformação. (5) Amplificação a partir do genoma viral do gene CP2_07. (6) branco. Marcador de peso molecular (mw) 1 kb ladder (Cellco).



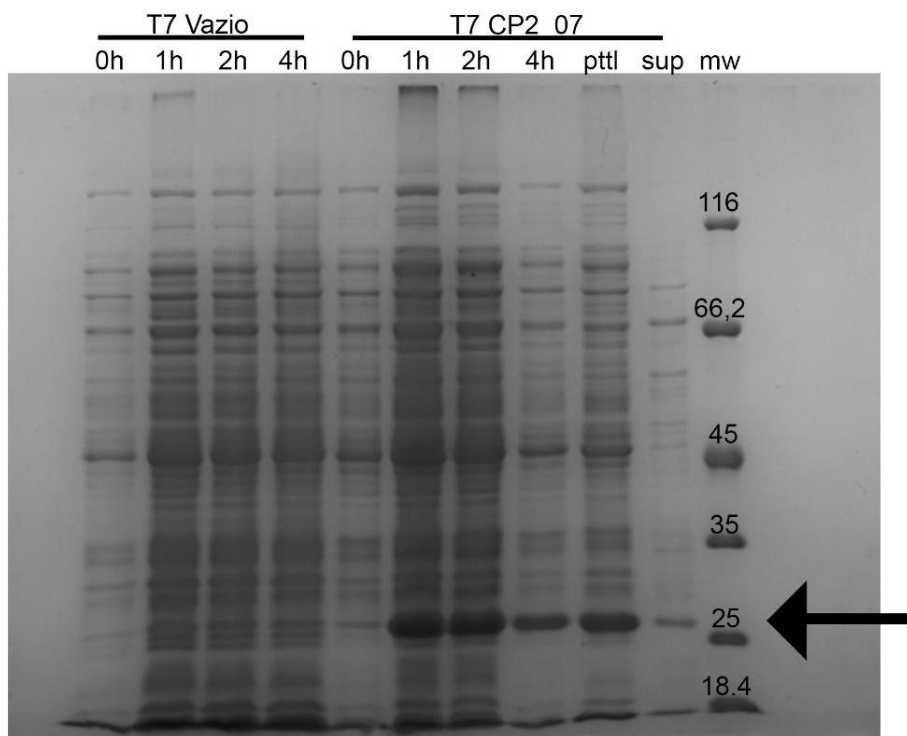
Fonte: dados do trabalho.

5.4 Expressão das endolisinas

5.4.1 Expressão da endolisina His-CP2_07

Nosso primeiro ensaio para avaliar a expressão da proteína His-CP2_07 foi feito na linhagem de *E. coli* T7 express. A indução foi feita por até 4 horas a temperaturas 30 °C com 1mM de IPTG em todos os testes. Observamos expressão da proteína de interesse a partir da primeira hora de indução (figura 15) com manutenção dos níveis de produção da proteína até 4 horas. Desta forma, definimos o tempo de expressão de 4 horas com padrão. Para a temperatura de expressão a 30 °C (figura 15), observamos precipitação das células da linhagem hospedeira, que pode indicar que a endolisina estaria causando a lise da bactéria. Assim, para tentar minimizar este problema, reduzimos a temperatura de indução para 20 °C. Na figura 15 também observamos a comparação de expressão entre a linhagem de *E. coli* T7 vazia (sem a construção, com somente o pET28a) e a linhagem de *E. coli* T7/ pET28a_His-CP2_07. Na figura 15 observamos a presença da proteína His-CP2_07 tanto na fração insolúvel (*pttl*) quanto na fração solúvel (*sup*). Essa análise demonstrou que a proteína His-CP2_07 é parcialmente solúvel.

Figura 15 – Gel de SDS mostrando o perfil proteico da expressão de His-CP2_07. A indução foi feita em *E. coli* T7 express por 4 horas a 30 °C com 1 mM de IPTG. Canaletas: 0h - mostram o perfil proteico total antes da indução; 1h – mostram o perfil proteico total após 1h de indução; 2h – mostram o perfil proteico total após 2h de indução; 4h - mostram o perfil proteico total após 4h de indução; pilt – mostra a fração insolúvel; sup – mostra a fração solúvel. CP2_07 com ~ 23,0 kDa. mw - Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo fisher).



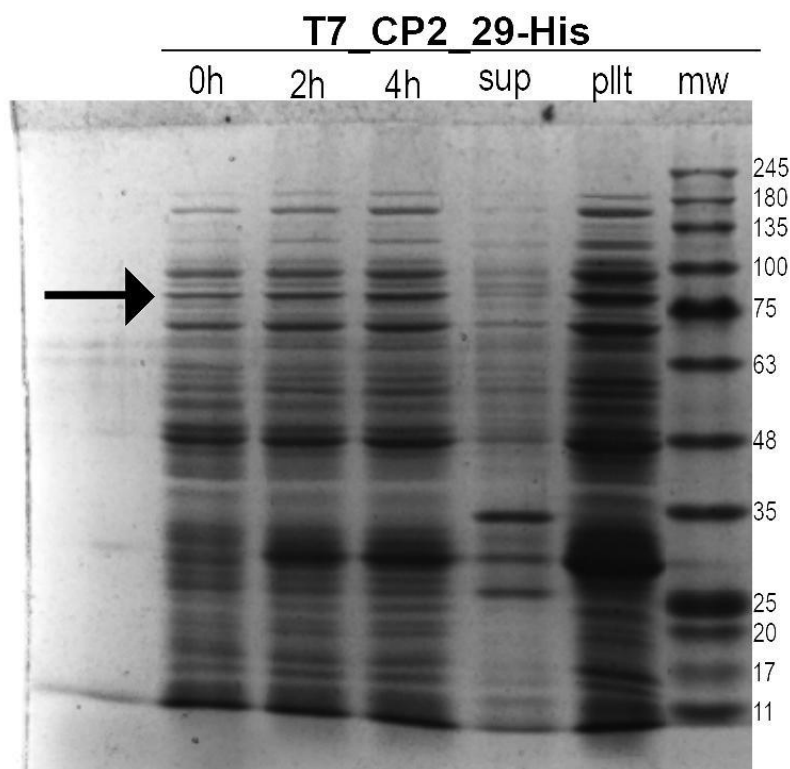
Fonte: dados do trabalho.

Assim, observamos a melhor expressão endolisina His-CP2_07 nas seguintes condições: 20 °C, 1mM de IPTG por 4 horas (figura 17). Em nossos ensaios, notamos que a temperatura foi uma variável que influenciou bastante a expressão. Observamos uma melhor expressão em temperaturas mais baixas (20 °C) comparado com a expressão realizada a 30 °C. Provavelmente o fato de a linhagem crescer de forma mais lenta, permitiu um melhor dobramento da proteína His-CP2_07 (LI, et al., 2022). Outra possibilidade seria em relação a temperatura ótima de atividade da endolisina, que em vários casos é maior em temperaturas mais elevadas (acima de 25 °C) (DONG et al., 2015). Finalmente, lembramos que endolisinas são proteínas destinadas a quebrar a parede celular bacteriana durante a lise celular (SCHMELCHER et al., 2012; STONE et al., 2019). Sendo assim, é esperado alguma toxicidade (morte celular do hospedeiro) em condições de expressão muito fortes e que podem ser, muitas das vezes, contornadas em temperaturas de expressão mais baixas.

5.4.2 Expressão da endolisina CP2_29-His

O ensaio de expressão com a endolisina CP2_29-His foi feito na linhagem de expressão *E. coli* T7 express de maneira semelhante a His-CP2_07. A expressão foi feita com 1 mM de IPTG a 20 °C por 4 horas, sendo as frações da expressão coletadas em intervalos de 1 hora para verificar os padrões de expressão. No gel (figura 16) observamos as diferentes frações coletadas: 0 h - antes da indução; 2h - após 2 horas de indução, 4h – após 4 horas de indução. Não observamos expressão clara da nossa endolisina CP2_29-His. Quando sequenciamos o vetor pET28a_CP2_29-His, não fomos capazes de confirmar por completo a construção. Desta forma, a região que não foi observada pelo sequenciamento poderia conter erros, o que se relaciona a falta de expressão aparente observada no gel SDS-PAGE. Dessa maneira optamos por perseguir e aprofundar mais os estudos com relação a proteína His-CP2_07 que apresentou alta taxa de expressão, ser solúvel e apresentar atividade enzimática

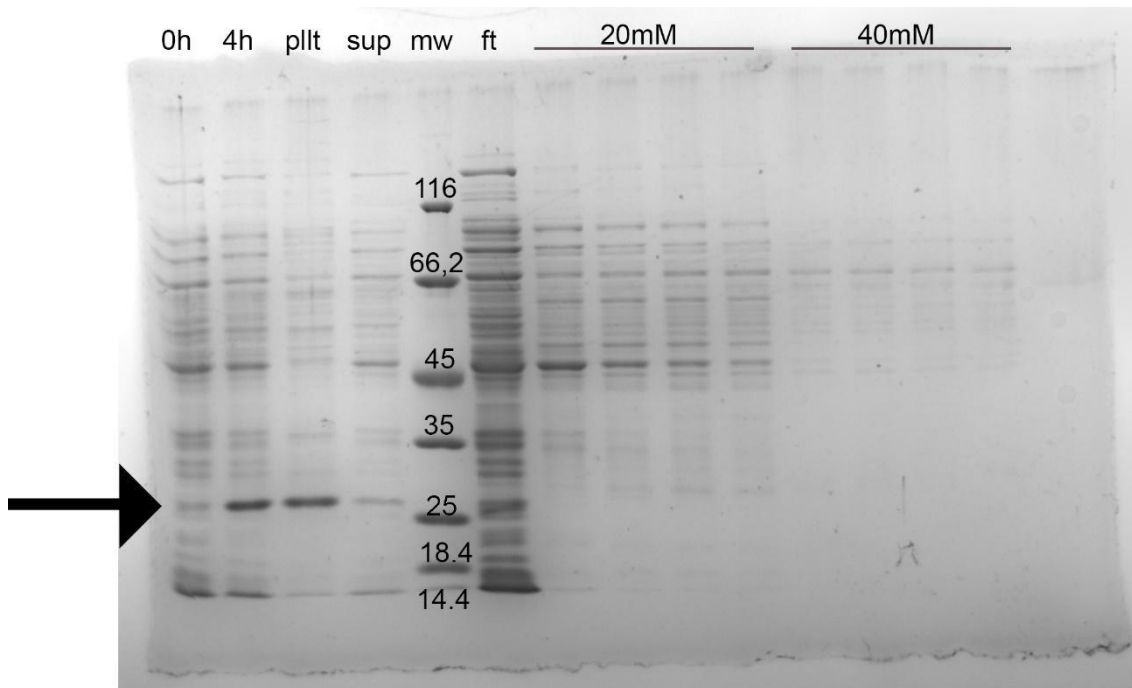
Figura 16 - Gel de SDS mostrando o perfil proteico da expressão de CP2_29-His. A indução foi feita em *E. coli* T7 express por 4 horas a 20 °C com 1 mM de IPTG. Canaletas: 0h - mostram o perfil proteico total antes da indução; 2h – mostra o perfil proteico total após 2h de indução; 4h – mostra o perfil proteico total após 4h de indução pllt – mostra a fração insolúvel; sup – mostra a fração solúvel. CP2_29-His com ~ 79,0 kDa. (Seta) - não observamos expressão aparente da proteína CP2_29-His. mw - Protein Molecular Weight Marker (Thermo fisher).



5.5 Purificação da proteína His-CP2_07

Tendo em vista a solubilidade da proteína His-CP2_07, partimos para a purificação em pequena escala. A expressão foi feita por 4 horas a 20 °C e um volume final de 500 mL. No gel (figura 17) observamos o perfil de expressão antes da indução com 1mM de IPTG (0h) e após 4 horas de indução (4h), momento em que foi feita a coleta final da expressão. Após a lise, observamos a presença da proteína His-CP2_07 tanto na fração solúvel (sup) quanto insolúvel (pllt). Após ligação na coluna carregada com Ni²⁺, observamos também uma perda da proteína His-CP2_07 no *flow through* (ft). Já na eluição com o gradiente de imidazol (20 e 40 mM), não observamos a eluição da proteína His-CP2_07, mas sim de proteínas contaminantes com menor afinidade pela resina (figura 17).

Figura 17 – Gel de SDS mostrando o perfil proteico da expressão de His-CP2_07. A indução foi feita em *E. coli* T7 express por 4 horas a 20 °C com 1mM de IPTG. Canaletas: 0h – mostra o perfil proteico antes da indução; 4h - mostra o perfil proteico total após 4h de indução; pllt – mostra a fração insolúvel; sup – mostra a fração solúvel. Ft – fração eluída após ligação com coluna de Ni²⁺. 20 mM – Frações eluídas com 20 mM de imidazol. 40 mM – Frações eluídas com 40 mM de imidazol. His-CP2_07 com ~ 23,0 kDa. mw - Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo fisher).

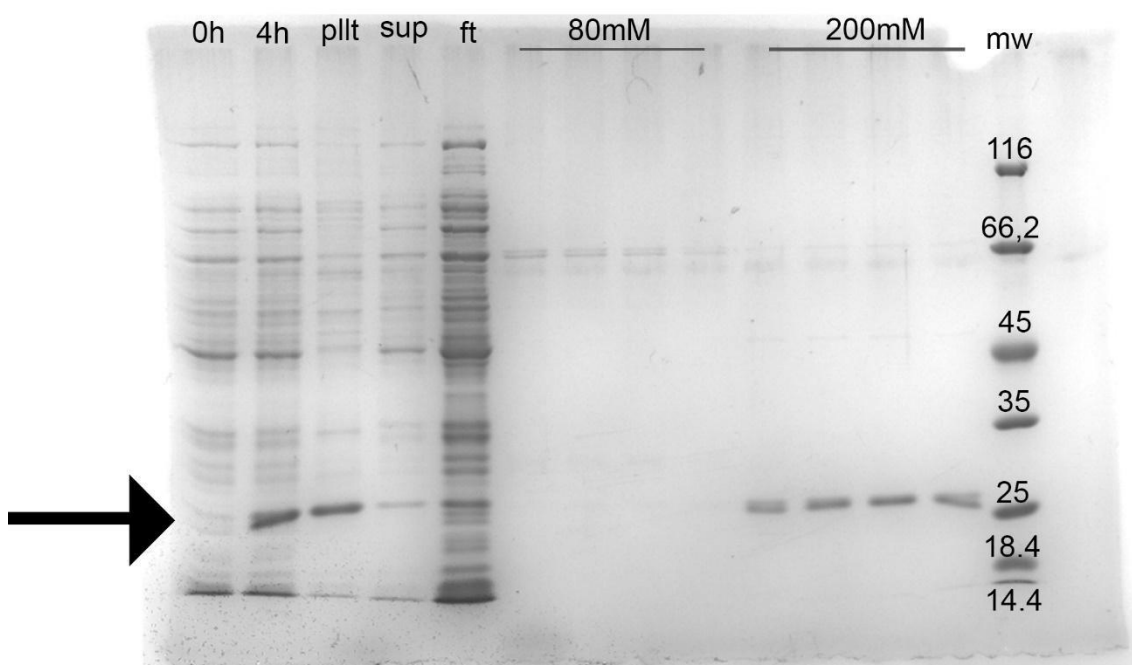


Fonte: dados do trabalho.

Na eluição com as concentrações de 80 mM também não observamos a presença da proteína His-CP2_07 em gel de SDS-PAGE (figura 18). Somente quando eluímos na concentração de 200 mM observamos remoção total da proteína His-CP2_07 (figura 18).

As frações coletadas na eluição foram unidas, dialisadas contra o tampão A para remoção do imidazol e então quantificadas.

Figura 18 – Gel de SDS mostrando o perfil proteico da expressão de His-CP2_07. A indução foi feita em *E. coli* T7 por 4 horas a 20 °C com 1 mM de IPTG. Canaletas: 0h - mostra o perfil proteico total antes da indução; 4h - mostra o perfil proteico total após 4h de indução; pllt - mostra a fração insolúvel; sup - mostra a fração solúvel. Ft - fração eluída após ligação com coluna de Ni²⁺. 80 mM - Frações eluídas com 80 mM de imidazol. 200 mM - Frações eluídas com 200 mM de imidazol. His-CP2_07 com ~ 23,0 kDa. mw - Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo fisher).

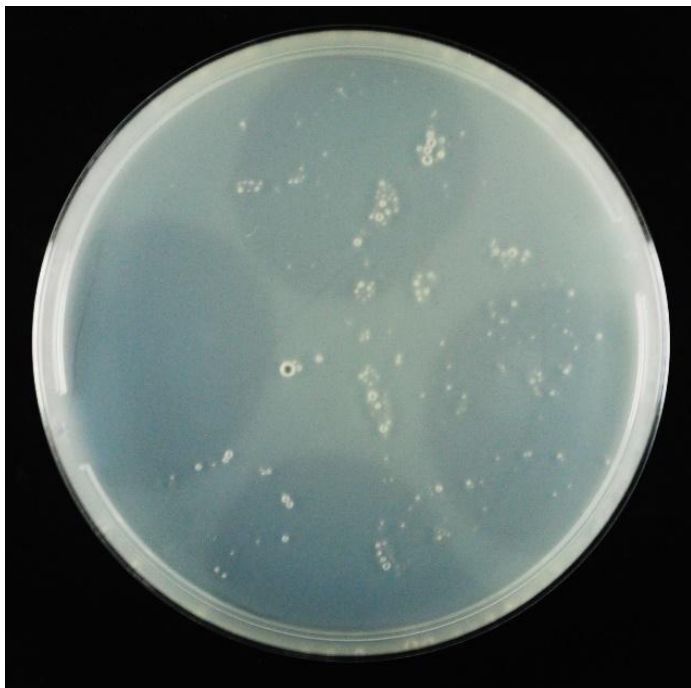


Fonte: dados do trabalho.

5.6 Potencial de degradação do peptidoglicano de *P. aeruginosa* pela endolisina His-CP2_07

O potencial de degradação da endolisina His-CP2_07 purificada foi avaliado em ensaio de degradação de fragmentos de parede celular extraídos de *P. aeruginosa* em placa de Petri. Sob este meio pingamos frações da enzima purificada (40 µg), e então observamos formação de halos de lise na placa indicado pela diminuição de turbidez do meio onde foi pingado a endolisina (figura 19). Como controle, adicionamos tampão A, sem endolisina, no centro da placa, onde não observamos formação de nenhum halo de degradação (figura 19).

Figura 19 – Placa de lise contendo fragmentos de parede celular bacteriana (*P. aeruginosa*). Halos representam a área em que houve lise dos fragmentos celulares.



Fonte: dados do trabalho.

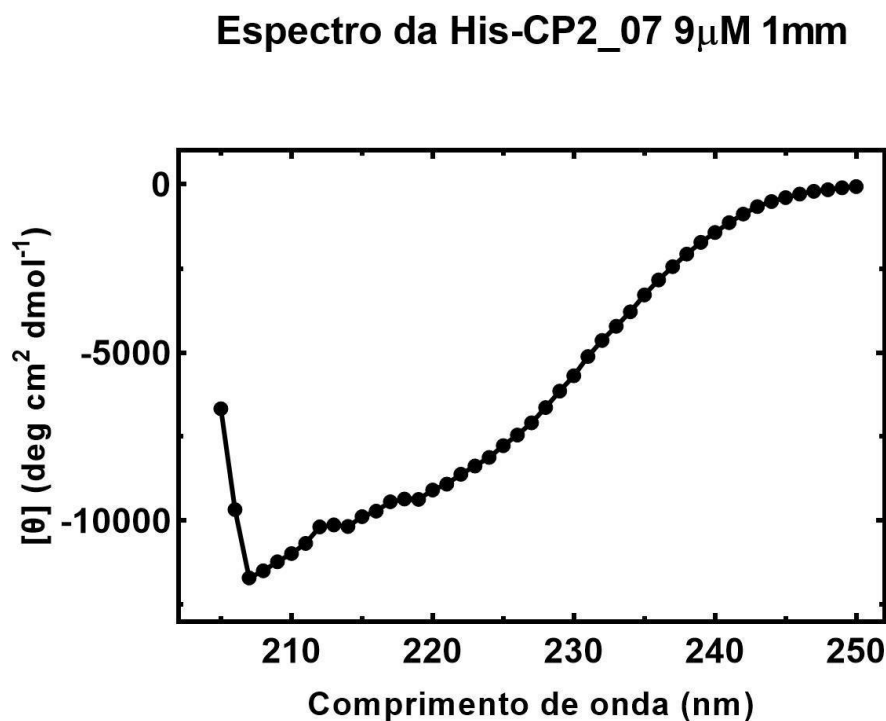
Tentamos replicar o mesmo ensaio utilizando fragmentos de células de *X. citri* com o propósito de avaliar o potencial de degradação do peptidoglicano específico de *X. citri*. No entanto, não observamos formação de halos de lise aparentes, (dados não apresentados). Conforme Schmitz (2010), que investigou o potencial de degradação de uma endolisina em relação a diversas linhagens celulares, foi observado que a melhor maneira de detectar essa degradação era através da utilização de extratos celulares obtidos de *P. aeruginosa*. Assim, ao realizarmos o ensaio com *P. aeruginosa* conseguimos com sucesso demonstrar a atividade da nossa endolisina por meio da redução da turbidez do meio em placa, resultando na clara formação de halos de lise (figura 19).

5.7 Avaliação da estrutura da His-CP2_07 por dicroísmo circular (CD)

A presença de estrutura da proteína His-CP2_07 foi investigada por espectroscopia de dicroísmo circular. O espectro de CD da proteína His-CP2_07 mostrou a presença de alfa-hélices em cerca de 40,8% da proteína (figura 20 e 23). A presença de alfa-hélices corrobora nossos resultados de predição de estrutura realizados *in silico* utilizando a ferramenta Colab Fold. O gráfico de CD da endolisina His-CP2_07 se assemelha bastante com alguns espectros já publicados de lisozimas e endolisinas

(OLIVEIRA et al., 2014; KAUR et al., 2020; KUTYSHENKO et al., 2021; ABDELRAHMAN et al., 2023).

Figura 20 – Espectro de Dicroísmo circular da proteína His-CP2_07. O espectro de dicroísmo foi feito no intervalo de 205 e 250 nm, em cubeta de 1 mm a concentração de 9 μ M. Foram feitas 32 acumulações para a formação do espectro. O valor de EMR foi calculado a partir dos valores de mdeg.

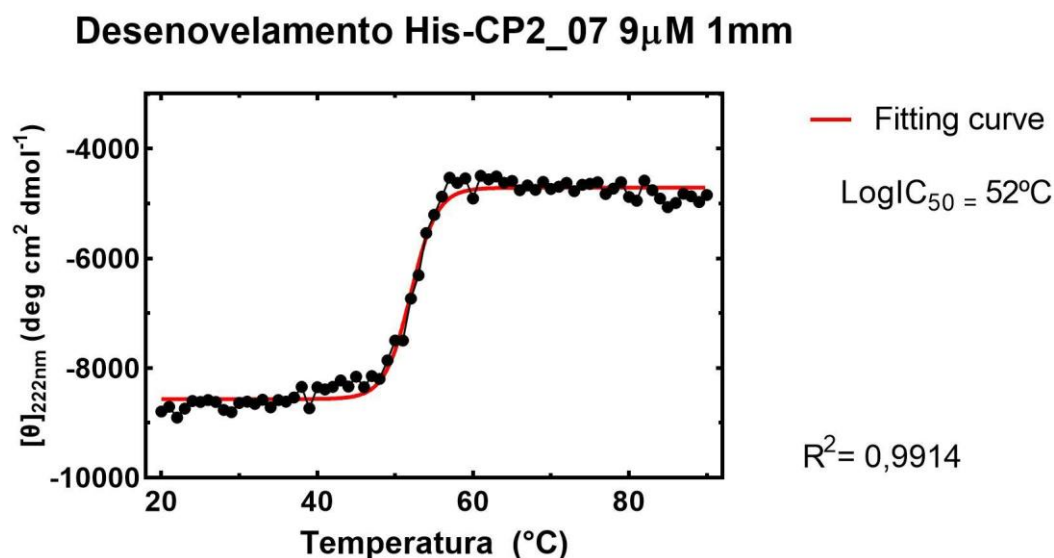


Fonte: dados do trabalho.

5.8 Avaliação da estabilidade térmica da endolisina His-CP2_07

Realizamos o monitoramento de estrutura em espectroscopia de CD a 222 nm para estudos de estabilidade térmica da proteína His-CP2_07. Nessa avaliação, a proteína foi submetida a um crescente de temperatura variando de 20 °C a 90 °C (figura 21). Nesse ensaio, observamos perda de estrutura a partir dos 50 °C, com 50% das proteínas sem estrutura na temperatura de 52 °C. A partir de aproximadamente 57 °C já não observamos nenhum tipo de estrutura na amostra.

Figura 21 – Avaliação da estabilidade térmica da proteína His-CP2_07. A avaliação foi feita no comprimento de onda de 222 nm, em cubeta de 1 mm a concentração de 9 μ M. O valor de Log IC₅₀ (valor em que 50% das proteínas ainda apresentam estrutura) é 52 °C. O intervalo de temperatura avaliado foi de 20 °C a 90 °C. $R^2 = 0,9914$. Em vermelho a *fitting curve*.

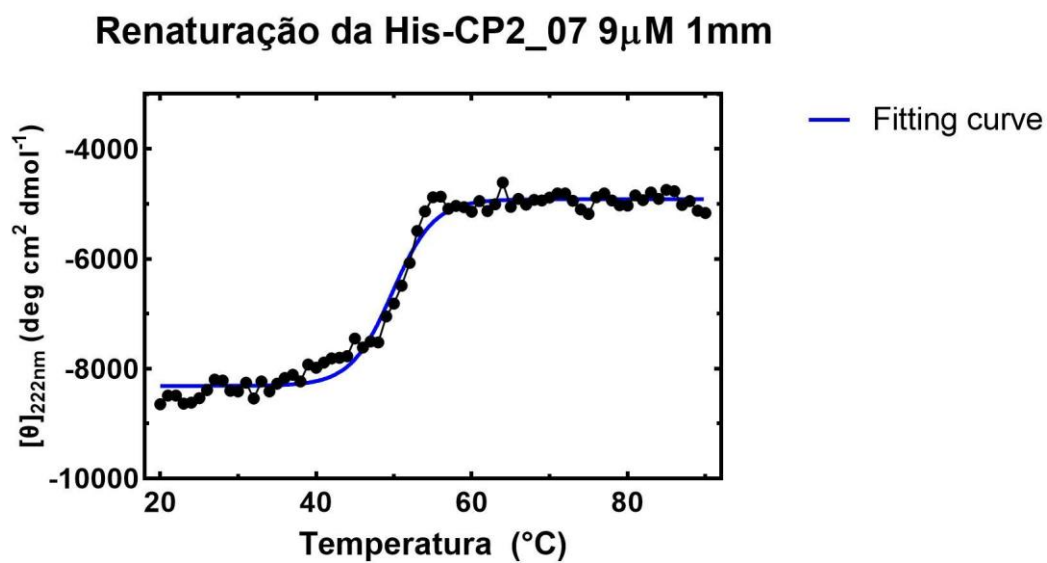


Fonte: dados do trabalho.

Avaliamos em seguida a capacidade da proteína His-CP2_07 em recobrar a estrutura (redobramento). Semelhantemente ao ensaio anterior, a estrutura da proteína foi monitorada por CD no comprimento de onda de 222 nm. O espectro obtido no gradiente com temperatura inicial de 90 °C e final de 20 °C mostrou que na mesma temperatura de aproximadamente 52 °C, 50% das proteínas contidas na amostra ganharam novamente a sua estrutura (figura 22).

Adicionalmente, a partir de 40 °C, quase 100% das proteínas contidas na amostra ganharam novamente a sua estrutura. Tal resultado demonstra que a proteína His-CP2_07 provavelmente é capaz de recuperar praticamente 100% de sua estrutura após um evento de desnaturação térmica. Após aquecimento também não observamos formação de precipitado, demonstrando a solubilidade da endolisina His-CP2_07.

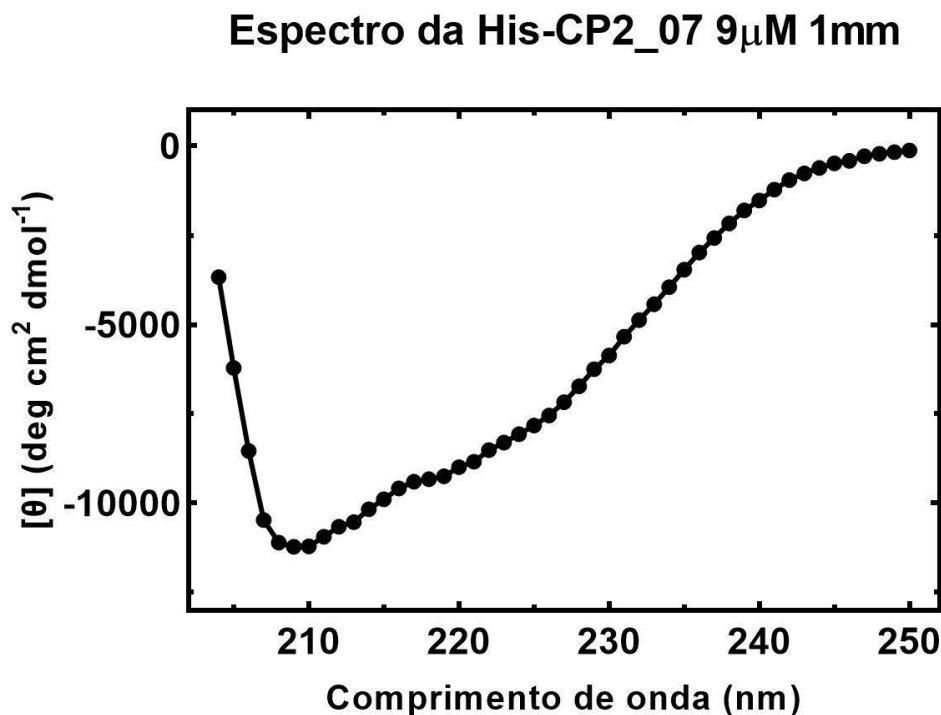
Figura 22 – Avaliação da estabilidade térmica da proteína His-CP2_07. A avaliação foi feita no comprimento de onda de 222 nm, em cubeta de 1 mm a concentração de 9 μM . O intervalo de temperatura avaliado foi de 90 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C}$. Em azul, *fitting curve*.



Fonte: dados do trabalho.

Após aquecimento, realizamos um novo espectro de dicroísmo no intervalo de 205 e 250 nm para avaliar se o aquecimento alteraria permanentemente a estrutura secundária da proteína. Observamos um espectro semelhante ao anterior, indicando provável estabilidade térmica da proteína (figura 23).

Figura 23 – Espectro de Dicroísmo circular da proteína His-CP2_07 após aquecimento a 90 °C. O espectro de dicroísmo foi feito no intervalo de 205 e 250 nm, em cubeta de 1 mm a concentração de 9 μM. Foram feitas 32 acumulações para a formação do espectro. O valor de EMR foi calculado a partir dos valores de mdeg.



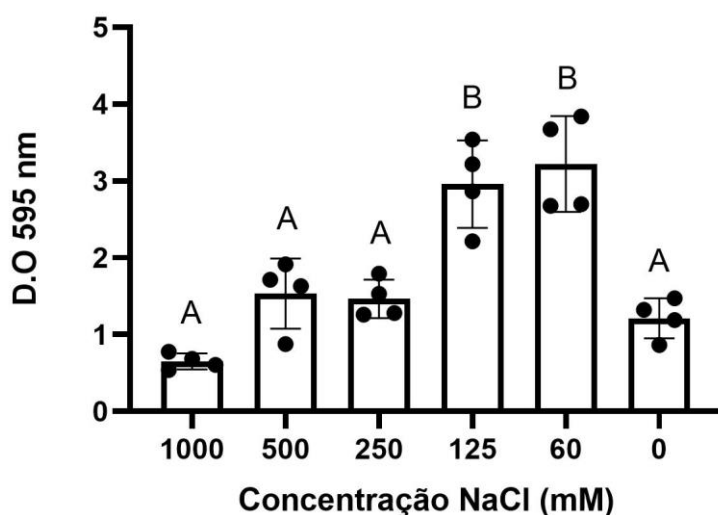
Fonte: dados do trabalho.

A alta estabilidade térmica das endolisinas virais tem sido observada em diversos estudos (OLIVEIRA et al., 2014; PENG & YUAN, 2018;). Jeong et al, (2023), observou estabilidade da endolisina na faixa de 4 °C a 65 °C, em que não houve alteração na atividade enzimática após tratamento. Esta característica é de grande interesse em processos em indústrias alimentícias (RAMOS-VIVAS et al., 2021), dado o potencial risco de contaminações por diversas linhagens bacterianas nesses processos (CARRASCOSA et al., 2021). A capacidade das endolisinas de manter sua atividade enzimática sob diferentes condições térmicas também é de grande importância na prevenção e controle de contaminações microbianas, em produtos alimentícios, se mostrando uma ferramenta promissora para a indústria alimentícia e de conservação ou para aplicações em campo como protetivos, ao passo que as temperaturas no campo são bastante altas.

5.9 Estabilidade da endolisina em diferentes concentrações de NaCl

A estabilidade da nossa endolisina em diferentes salinidades é um fator bastante importante para o desenvolvimento de formulações para uso no campo. Dessa forma, realizamos ensaios com extrato bruto de peptidoglicano corado de *X. citri*. Na figura 24 observamos a atividade enzimática da endolisina His-CP2_07 em diferentes concentrações de NaCl. Observamos uma maior atividade enzimática em concentrações de 60 e 125 mM de NaCl, já em concentrações mais elevadas, passamos a observar uma redução significativa ($p < 0,05$) da atividade enzimática, indicando que formulações com concentrações superiores a 125 mM iriam impactar negativamente a atividade enzimática. Ao mesmo tempo, observamos também que a ausência de NaCl prejudicou a atividade enzimática ($p < 0,05$) em relação a 60 mM e 125 mM. Desta forma, definimos que a faixa de maior atividade enzimática testada seria em torno de 60 mM de NaCl.

Figura 24 - Avaliação da atividade enzimática da endolisina His-CP2_07 na presença de diferentes concentrações de NaCl. Barras verticais representam o desvio padrão. Observamos diferença estatística entre 1000, 500, 250 mM e 0 mM em relação a 125 mM e 60 mM ($p < 0,05$).



Fonte: Dados do trabalho

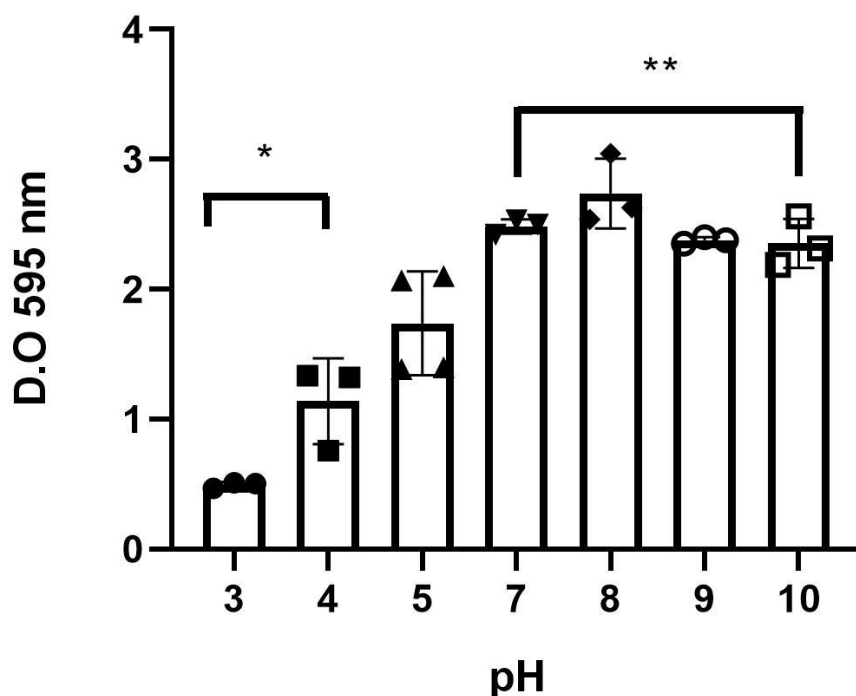
Lim et al, 2022 observou que a endolisina DS-PA90 a partir da concentração de 50 mM de NaCl já apresentou uma redução na atividade enzimática e a partir de 150 mM houve uma redução de 40% na atividade enzimática. Em nosso caso, observamos uma maior atividade enzimática em concentrações a baixo de 250 mM, e a maior atividade foi observada em concentração de 60 mM. Em contrapartida, segundo Yan et al., 2021 a endolisina LysGH15 apresentou maior atividade na faixa de 450 mM de NaCl. Com isso,

evidenciamos que já foram isoladas e caracterizadas endolisinas com alta estabilidade na presença de NaCl e endolisinas com uma maior sensibilidade, como é o caso da nossa endolisina His-CP2_07.

5.10 Estabilidade da endolisina em diferentes pHs

A estabilidade da endolisina em diferentes pHs também é uma característica importante para o desenvolvimento de formulações para aplicação na agricultura. Desta forma, avaliamos a estabilidade da endolisina His-CP2_07 em diferentes pHs. Na figura 25 observamos que nossa endolisina apresentou maior atividade em pH neutro e pH levemente alcalinos. Já em pHs ácidos, observamos uma redução significativa na sua atividade ($p < 0,05$).

Figura 25 - Avaliação da atividade enzimática da endolisina His-CP2_07 na presença de diferentes pHs. Barras verticais representam o desvio padrão. Observamos diferença estatística entre os pHs 3,0 e 4,0 em relação aos pHs 7,0; 8,0; 9,0 e 10 ($p < 0,05$). pH 5,0 se mostrou diferente dos outros tratamentos.



Fonte: Dados do trabalho

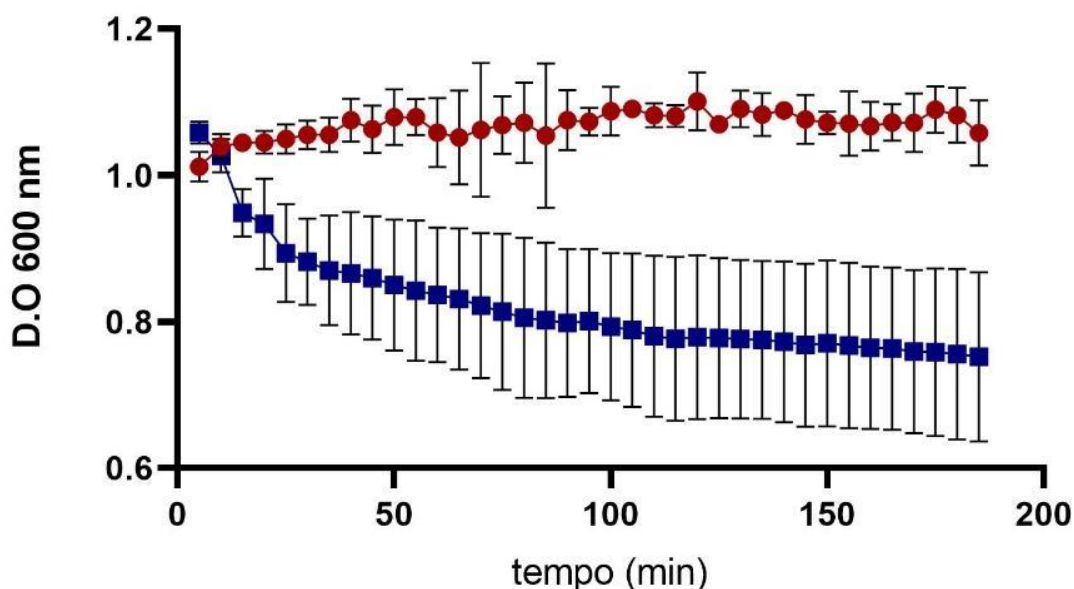
Na literatura, as endolisinas geralmente apresentam maior atividade em uma faixa de pH entre 6 e 8 (YU et al., 2021) mas em alguns casos apresentam uma faixa mais ampla de atividade (pH 5,0 a 10,0) (JEONG et al., 2023). Oh et al, 2023, avaliou duas endolisinas

de *E. coli*: LysPECP14 e LysPECP20 e observou uma maior atividade enzimática em pHs na faixa de 7,5 e 8,5 para a endolisina LysPECP14 e para a endolisina LysPECP20, foi observada uma maior atividade mais próxima ao pH 10. Em ambos os casos, de maneira geral, da mesma maneira que nossa endolisina, há uma maior atividade enzimática em pHs próximos ao neutro. O que é esperado, ao passo que o pH intracelular é próximo ao neutro (PANDEY et al.,2016).

5.11 Avaliação da atividade enzimática da endolisina His-CP2_07 em peptidoglicano purificado de *B. subtilis*

Para avaliar o potencial de degradação de peptidoglicano purificado pela endolisina His-CP2_07 realizamos um ensaio de degradação em placa de 96 poços. Avaliamos o potencial de degradação da enzima em concentração de 78 µg/mL em pH 8,0. A taxa de degradação foi avaliada a 600 nm ($D.O_{600nm}$) por 185 minutos. Nesse intervalo observamos degradação do peptidoglicano extraído de *B. subtilis* (figura 26) em relação ao controle negativo - CN que foi feito somente com o peptidoglicano purificado ressuspendido no próprio tampão A (60 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl e 10% de glicerol).

Figura 26 – Avaliação da degradação do peptidoglicano purificado de *B. subtilis*. Em azul – curva de degradação do peptidoglicano na presença da proteína His-CP2_07 (78 $\mu\text{g/mL}$). Em vermelho – controle negativo (CN). Somente a presença do peptidoglicano e o tampão utilizado na purificação da proteína. Barras verticais mostram o desvio padrão. Os valores de absorbância foram avaliados a 600 nm por 185 minutos. A avaliação foi feita em pH 8,0 e tampão contendo 60 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl e 10% de glicerol.



Fonte: dados do trabalho.

Ressaltamos que, embora *B. subtilis* seja uma bactéria Gram-positiva, seu peptidoglicano se assemelha com o peptidoglicano de outras bactérias Gram-negativas, incluindo *X. citri*, como demonstrado por Nelson et al, (2012). Endolisinas em alguns casos apresentam atividade enzimática com maiores tempos de incubação, em nosso caso, observamos ação após 15 minutos de tratamento. Lim et al, (2014) observou que a endolisina SPN9CC apresentou atividade enzimática após uma hora de incubação.

5.12 Avaliação da atividade bactericida da endolisina His-CP2_07

As endolisinas são enzimas produzidas pelos bacteriófagos durante a fase de liberação da progênie viral. Para avaliar o potencial dessas endolisinas é necessário utilizar substâncias que causem alterações na permeabilidade da membrana plasmática bacteriana, como o caso do EDTA ou ácidos fracos, para permitir ação dessa enzima no peptidoglicano bacteriano como demonstrado por Lim et al, (2014).

Oliveira et al, (2014) observou que ao utilizar ácidos orgânicos como: (0,5 mM de EDTA, 2 mM de ácido cítrico ou 5 mM de ácido málico), foi observada ação bactericida da endolisina Lys68, codificada pelo bacteriófago *Salmonella phi68*. Foi vista também maior eficiência ao utilizar ácido málico contra *Salmonella Typhimurium*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella sonnei*, *E. coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella bongori*. Um estudo também demonstrou que células de *E. coli* previamente tratadas com EDTA (0,50 mM), ácido cítrico (0,36 mM), ácido málico (0,60 mM), ácido láctico (1,20 mM), ácido benzoico (1,20 mM) ou ácido acético (1,20 mM) também aumenta a atividade da endolisina ABgp46, do bacteriófago Acinetobacter vb_AbaP_CEB1 (OLIVEIRA et al., 2016).

No nosso estudo, escolhemos 5 linhagens de bactérias, sendo 3 Gram-negativas e 2 Gram-positivas (tabela 11). Ao avaliarmos o EDTA em concentração máxima inicial de 3 mM de EDTA para *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* e 1,5 mM para *X. citri* não observamos inibição no crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações de EDTA testadas (tabela 11).

Tabela 11 – Avaliação da inibição do crescimento em placa de diferentes linhagens em contato com diferentes concentrações de EDTA. (-) Não houve inibição de crescimento.

Inibição de Crescimento

EDTA	<i>X. citri</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
3 mM		-	-	-	-
1,5 mM	-	-	-	-	-
0,75 mM	-	-	-	-	-
0,375mM	-	-	-	-	-

Realizamos inicialmente testes de inibição de crescimento usando EDTA em concentração máxima de 3 mM para todos os isolados menos *X. citri*, que utilizamos 1,5 mM e realizamos uma diluição seriada da endolisina His-CP2_07 a partir de uma concentração inicial de 400 µg/mL. Ao analisarmos as linhagens de *B. subtilis* e *S. aureus*, não observamos qualquer inibição de crescimento em todas as concentrações de endolisina testadas (figura 27). No entanto, para as linhagens de *E. coli* e *P. aeruginosa*,

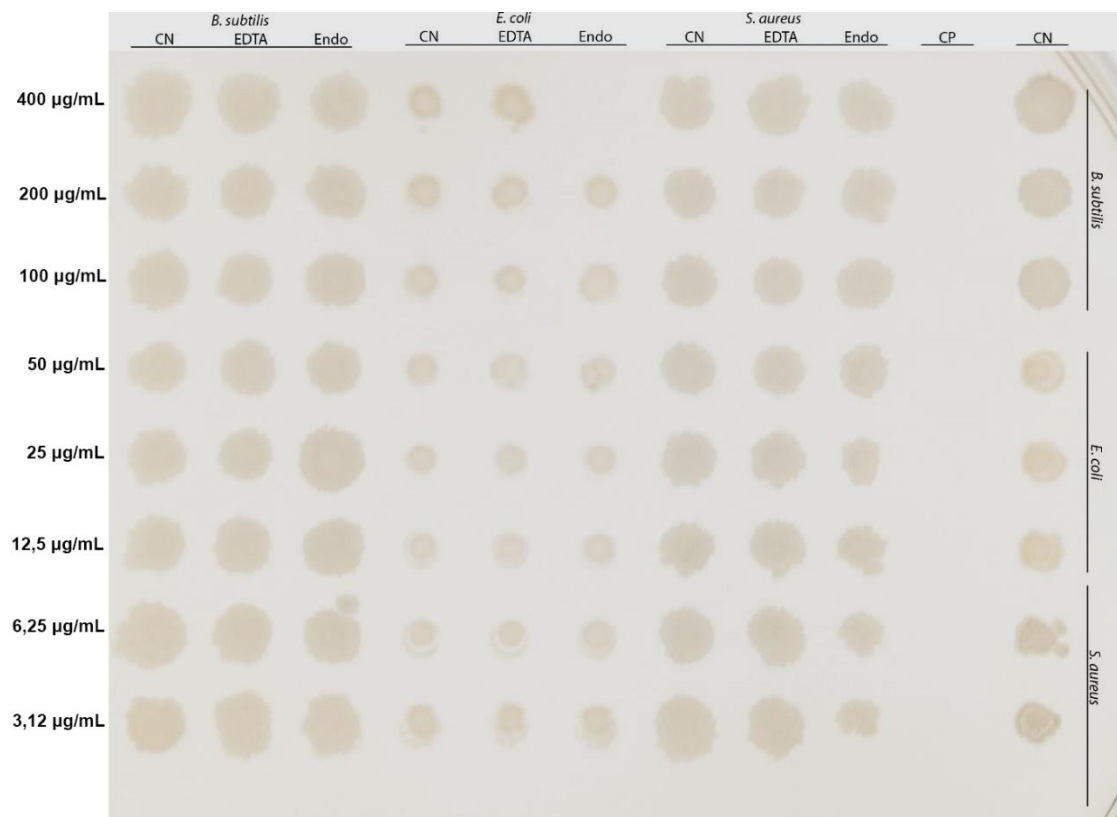
notamos uma ação bactericida da endolisina na concentração de 400 µg/mL (figura 27 e 28).

Lim et al, (2014) observou atividade lítica da endolisina SPN9CC, produzida pelo bacteriófago *Salmonella* SPN9CC, contra *E. coli* em concentração de 300 µg/mL, o que é semelhante aos nossos resultados. Kim et al, (2020) realizou testes com linhagens de bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, e observou que a endolisina LySS apresentou atividade bactericida em concentração de 750 µg/mL. Assim, o fato de não observarmos ação bactericida pode estar relacionada a concentração testada, visto que a concentração máxima que testamos foi de 400 µg/mL.

Em relação a *P. aeruginosa*, tanto o estudo de Kim et al, (2020) quanto o nosso observou ação bactericida da endolisina contra esse isolado, embora em concentrações ligeiramente diferentes (500 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente) (figura 28). Da mesma forma, Guo et al, (2017) observou que a endolisina recombinante LysPA26, do bacteriófago *Pseudomonas* JD010, apresentou atividade bactericida contra *P. aeruginosa* em uma concentração de 500 µg/mL.

Para *E. coli*, Kim et al, (2020) também observou ação bactericida em concentração de 500 µg/mL, já em nossos resultados, observamos a inibição do crescimento de *E. coli* em concentração de 400 µg/mL. Apesar de caracterizada a ação bactericida em ambos os trabalhos, o mecanismo de ação das endolisinas, caracterizadas por Kim et al, (2020) quanto por Guo et al, (2017), ainda não foi completamente compreendido.

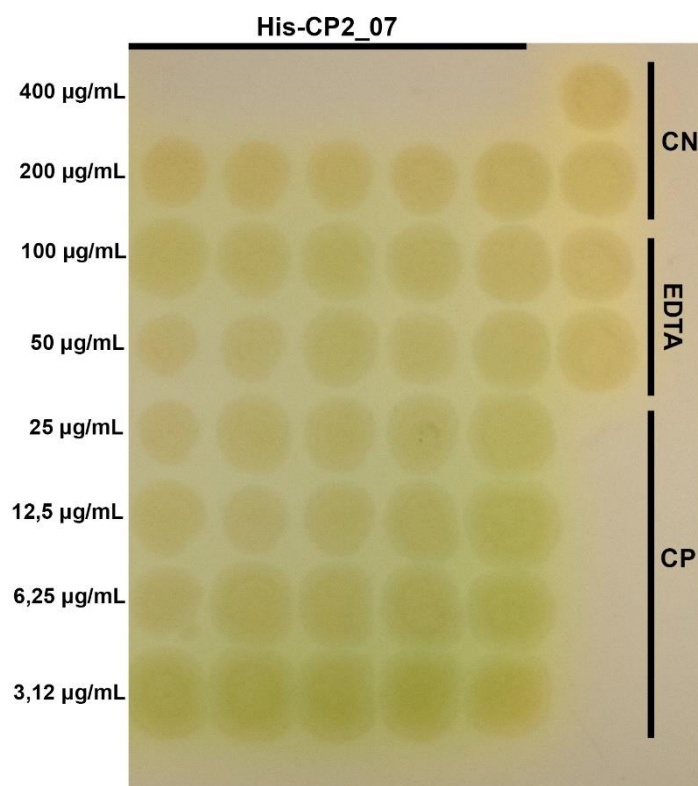
Figura 27 – Avaliação da atividade bactericida da endolisina His-CP2_07 com adição de EDTA (3 mM) contra diferentes linhagens de bactérias: *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*. (CN) – sem qualquer tratamento; (EDTA) – células tratadas com 3 mM de EDTA. (ENDO) – Células tratadas com 3 mM de EDTA e concentração inicial de 400 µg/mL da endolisina His-CP2_07. (CP) – controle positivo feito com Canamicina 50 µg/mL para *B. subtilis*; Ampicilina 100 µg/mL para *E. coli* e vancomicina 20 µg/mL para *S. aureus*. Não observamos inibição de crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações de EDTA testadas.



Fonte: dados do trabalho.

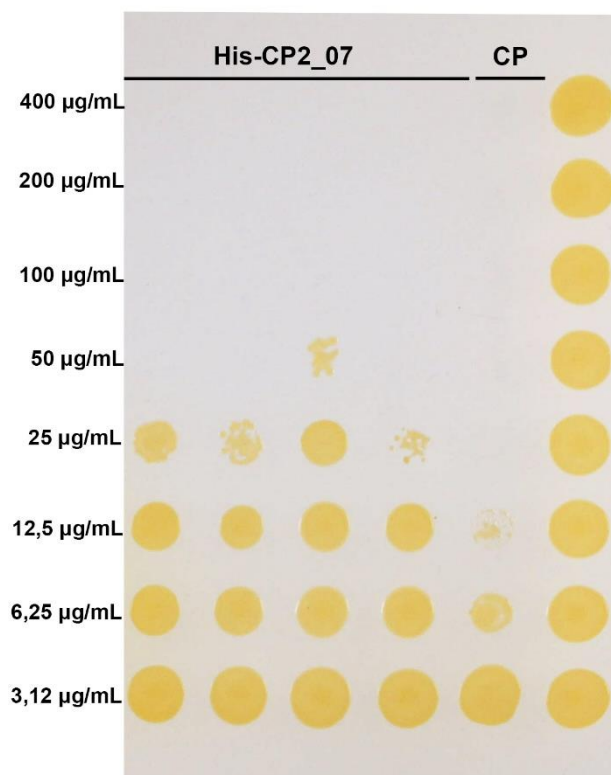
Para a linhagem de *X. citri*, também realizamos ensaios de inibição de crescimento com concentração inicial de endolisina de 400 µg/mL. Observamos ação bactericida em concentração de 100 µg/mL de His-CP2_07 com adição de 0,375 mM de EDTA (figura 29).

Figura 28 – Avaliação da atividade bactericida da endolisina His-CP2_07 contra *P. aeruginosa* com adição de EDTA. (CN) – sem qualquer tratamento; (EDTA) – Células tratadas com 3 mM de EDTA. His-CP2_07 – Células tratadas com 3 mM de EDTA e concentração inicial de 400 µg/mL da endolisina His-CP2_07. (CP) – Controle positivo feito com Canamicina 50 µg/mL. Observamos ação bactericida da endolisina em concentração de 400 µg/mL, com adição de 3 mM de EDTA.



Fonte: dados do trabalho.

Figura 29 – Avaliação da atividade bactericida da endolisina His-CP2_07 contra *X. citri* com adição de EDTA. (CN) – sem qualquer tratamento; His-CP2_07 – Células tratadas com 0,375 mM de EDTA e concentração inicial de 400 µg/mL da endolisina His-CP2_07. (CP) – Controle positivo feito com Canamicina 50 µg/mL. Observamos ação bactericida da endolisina em concentração de 100 µg/mL, com adição de 0,375 mM de EDTA.



Fonte: dados do trabalho.

A resistência a antibióticos ocorre porque bactérias, por pressão seletiva, encontram vias alternativas para superar a exposição a agentes antimicrobianos (GERSTMANS et al., 2016). Uma vez que as endolisinas atuam em uma estrutura conservada, o peptidoglicano, é difícil haver o desenvolvimento de meios de resistência a essas enzimas sem prejudicar a integridade celular (FISCHETTI et al., 2006; FISCHETTI et al., 2010).

As despolimerases são enzimas derivadas de bacteriófagos que degradam polissacarídeos capsulares, substâncias poliméricas extracelulares, sendo então uma ferramenta promissora para o controle de bactérias multirresistentes a antibióticos (KNECHT et al., 2020). Wang et al, (2020), que observou ação bactericida da despolimerase purificada Dp49 em concentração de 250 µg/mL em camundongos infectados com *A. baumannii* e Pan et al, (2015) que avaliou a atividade de

despolimerases contra cepas de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos. Esses estudos demonstram o potencial dessas enzimas como forma alternativas de controle desses isolados. Entretanto, estudos que avaliam a ação combinada de despolimerases e endolisinas de bacteriófagos em bactérias Gram-negativas ainda estão ausentes.

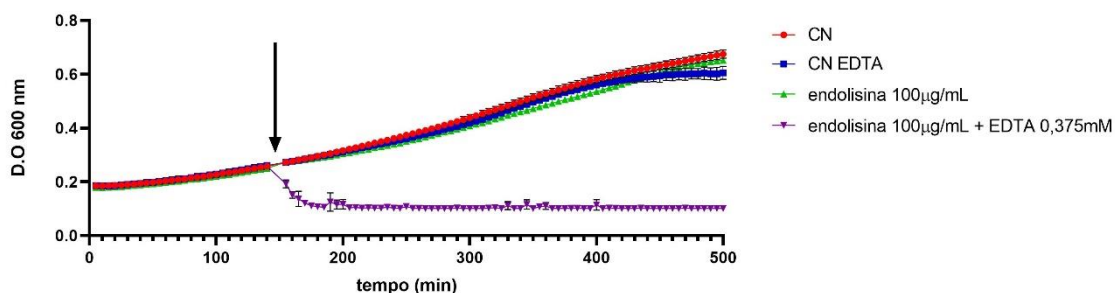
5.13 Curva de crescimento com *X. citri*

Em seguida, realizamos curvas de crescimento para avaliar o potencial de lise da endolisina His-CP2_07. Na figura 30, os tratamentos estão representados da seguinte forma: o controle negativo (CN), sem tratamento, em vermelho; as células tratadas com 0,375 mM de EDTA em azul; as células de *X. citri* tratadas com a endolisina (100 µg/mL) estão em verde; e, por fim, as células tratadas com a endolisina (100 µg/mL) e 0,375 mM de EDTA estão em roxo.

Ao analisar os padrões de crescimento, não identificamos diferenças entre o controle negativo (CN), o controle com EDTA e as células tratadas apenas com a endolisina a 100 µg/mL. Isso indica que as células tratadas exclusivamente com a endolisina não sofreram lise, sugerindo que a endolisina não foi capaz de acessar a parede celular bacteriana (peptidoglicano). Ao passo que *X. citri* é uma bactéria Gram-negativa, a membrana externa passa a ser uma barreira para a endolisina.

No entanto, quando as células foram tratadas com a endolisina e EDTA, um agente que facilita o acesso da endolisina à parede celular bacteriana (LIM et al., 2014), observamos a lise celular. Essa lise é indicada pela redução na absorbância a 600 nm (figura 30), o que confirma a eficácia da endolisina na lise bacteriana quando combinada com o EDTA. Portanto, conseguimos avaliar o padrão de lise das células de *X. citri* na presença da endolisina e do EDTA. Notamos lise celular após 35 minutos de contato, conforme evidenciado pela redução na absorbância a 600 nm (figura 30).

Figura 30 - Curva de crescimento (*X. citri*) com adição de EDTA e endolisina His-CP2_07. CN (vermelho) - Controle Negativo sem qualquer tratamento; CN EDTA (Azul) - Controle com adição de 0,375 mM de EDTA; Endolisina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Verde) - *X. citri* tratada com endolisina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Endolisina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EDTA 0,375 mM (Roxo) - *X. citri* tratada com endolisina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EDTA 0,375 mM; Seta indica momento em que a endolisina foi adicionada. Barras verticais indicam o desvio padrão. Leituras de D.O_{600nm} foram feitas em intervalos de 5 minutos por 500 minutos.



Fonte: dados do trabalho.

Assim, nossa endolisina foi capaz de degradar a parede celular bacteriana de *P. aeruginosa*, bem como o peptidoglicano de *B. subtilis*, apresentou ação bactericida contra *X. citri* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *P. aeruginosa* (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *E. coli* (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O que demonstra assim o potencial dessa endolisina contra *X. citri*, bem como também contra outros isolados de interesse que são responsáveis por diversas contaminações tanto industriais como também hospitalares (YANG et al., 2017; GHANEN e HADDADIN, 2018; MARTIN et al., 2021; PETITJEAN et al., 2021). Desta forma, com possíveis formulações e futuras pesquisas podemos elucidar e demonstrar o potencial dessa endolisina como uma alternativa a aplicação de cobre.

6.0 CONCLUSÃO

Foi possível identificar a partir do sequenciamento e anotação do genoma dos bacteriófagos CP1 e CP2 quatro prováveis endolisinas. A estrutura teórica dessas endolisinas foi avaliada por modelagem *in silico*. Contudo apenas as endolisinas do bacteriófago CP2 puderam ser amplificadas por PCR e isoladas para ensaios posteriores. As endolisinas do bacteriófago CP1 não foram amplificadas, provavelmente por erros de sequenciamento/anotação. A endolisina His-CP2_07 foi expressa em *E. coli* T7 *express* e purificada por cromatografia de afinidade. Já em relação à expressão da CP2_29-His não observamos expressão aparente. Quanto à caracterização da endolisina His-CP2_07 ela aparenta ser termoestável com maior conteúdo de alfa-hélice e estruturas não definidas. Avaliamos a estabilidade da endolisina em diferentes pHs e salinidades. Nos ensaios de atividade realizados, a endolisina His-CP2_07 apresentou atividade contra peptidoglicano de *P. aeruginosa* e *B. subtilis*. Observamos ação bactericida da endolisina na presença de EDTA contra *X. citri*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Observamos lise celular de *X. citri* na presença da endolisina e EDTA, indicando então o potencial dessa endolisina para controle desse fitopatógeno.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHMAN, Fatma et al. Pseudomonas Phage ZCPS1 Endolysin as a Potential Therapeutic Agent. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 520, 2023.
- ABEBE, Gedif Meseret. The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. **International journal of microbiology**, v. 2020, 2020.
- ACKERMANN, Hans-W. Phage classification and characterization. **Bacteriophages: Methods and protocols, volume 1: Isolation, characterization, and interactions**, p. 127-140, 2009.
- AHMAD, Abdelmonim Ali et al. Characterization of bacteriophages Cp1 and Cp2, the strain-typing agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 77-85, 2014.
- ALISKY, J. et al. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. **Journal of Infection**, v. 36, n. 1, p. 5-15, 1998.
- ALVES, Diana R. et al. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 61-74, 2016.
- BARBER, Mary et al. Infection by Penicillin-Resistant *Staphylococci*. **Lancet**, p. 641-4, 1948.
- BEETON, M. L. et al. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. **International journal of antimicrobial agents**, v. 46, n. 2, p. 196-200, 2015.
- BEHLAU, Franklin et al. Copper resistance genes from different *Xanthomonas* and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, p. 949-963, 2012.
- BEHLAU, Franklin et al. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 409-418, 2013.
- BOCANOVA, Lucia et al. A novel phage-encoded endolysin EN534-C active against clinical strain *Streptococcus agalactiae* GBS. **Journal of Biotechnology**, v. 359, p. 48-58, 2022.
- BRICKNER, Steven J. et al. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 3, p. 673-679, 1996.
- BRUNETTO, Gustavo et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016.
- CARRASCOSA, Conrado et al. Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 04, p. 2014, 2021.
- CARRATALÁ, Jose Vicente et al. Design strategies for positively charged endolysins: Insights into Artilysin development. **Biotechnology Advances**, p. 108250, 2023.
- CARVER, Tim et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of highthroughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.
- CHAGAS, Marcone et al. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 55-59, 2001.

CHANISHVILI, Nina. Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. **Advances in virus research**, v. 83, p. 3-40, 2012.

CHATEAU, Alice; SCHNEEWIND, Olaf; MISSIAKAS, Dominique. Extraction and purification of wall-bound polymers of Gram-positive bacteria. **Bacterial Polysaccharides: Methods and Protocols**, p. 47-57, 2019.

CHEGINI, Zahra et al. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, p. 1-17, 2020.

CHIBEU, Andrew et al. Efficacy of bacteriophage LISTEX™ P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 2, p. 208-214, 2013.

CORNU, Jean-Yves et al. Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-9, 2017.

CORRÊA, Daniel HA; RAMOS, Carlos HI. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.

D'ANDREA, Marco Maria et al. The lytic bacteriophage vB_EfaH_EF1TV, a new member of the Herelleviridae family, disrupts biofilm produced by *Enterococcus faecalis* clinical strains. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 21, p. 68-75, 2020.

D'HERELLE, F. H. Comptes Rendu. **Acad. Sci. Paris**, v. 165, p. 373-375, 1917.

DA SILVA, A. C. et al. Trindade dos. **SM, Truffi, D., Tsai, SM, White, FF, Setubal, JC and Kitajima, JP**, p. 459-463, 2002.

DANIS-WLODARCZYK, Katarzyna M.; WOZNIAK, Daniel J.; ABEDON, Stephen T. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: *in vitro*, *in vivo* and clinical application. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1497, 2021.

DAS, A. K. Citrus canker-A review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

DONG, Hongling et al. Antibacterial Activity of *Stenotrophomonas maltophilia* Endolysin P28 against both Gram-positive and Gram-negative Bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1299, 2015.

DUCIC, Tanja; POLLE, Andrea. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 103-112, 2005.

DÜRING, Klaus et al. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. **The Plant Journal**, v. 3, n. 4, p. 587-598, 1993.

ELHALAG, Kamel et al. Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*. **Journal of basic microbiology**, v. 58, n. 8, p. 658-669, 2018.

ENDERSEN, Lorraine et al. Characterisation of the antibacterial properties of a bacterial derived peptidoglycan hydrolase (LysCs4), active against *C. sakazakii* and other Gram-negative food-related pathogens. **International journal of food microbiology**, v. 215, p. 79-85, 2015.

EREZ, Z.; STEINBERGER-LEVY, I.; SHAMIR, M. Doron S1, Stokar-Avihail A, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, Amitai G y Sorek R (2017) Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. **Nature**, v. 541, p. 488-493.

FONES H.; PRESTON GM. (2013) The impact of transition metals on bacterial plant disease. **FEMS Microbiol Rev** 37(4):495-519 doi:10.1111/1574-6976.12004

FUNDECITRUS, “Safr de Laranja 2023/24 Do Cinturão Citricola de SP e MG é Estimada em 309,34 milhoes de Caixas” Fundecitrus, www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-de-laranja-202324-do-cinturao-citricola-de-sp-e-mg-e-estimada-em-30934-milhoes-de-caixas/1317. Acesso 16 Janeiro. 2024.

GHANEM, Bothyna; HADDADIN, Randa Nayef. Multiple drug resistance and biocide resistance in *Escherichia coli* environmental isolates from hospital and household settings. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

GONDIL, Vijay Singh; HARJAI, Kusum; CHHIBBER, Sanjay. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 2, p. 105844, 2020.

GOTTWALD, Tim R.; GRAHAM, James H.; SCHUBERT, Tim S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant health progress**, v. 3, n. 1, p. 15, 2002.

GOUVÊA, Delaine Meireles et al. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 85-91, 2015.

HAUSBECK, M. K. et al. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. **Phytopathology**, v. 90, n. 1, p. 38-44, 2000.

HANLON, Geoffrey William. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30, n. 2, p. 118-128, 2007.

HESELPOTH, Ryan D.; EULER, Chad W.; FISCHETTI, Vincent A. PaP1, a broad-spectrum lysin-derived cationic peptide to treat polymicrobial skin infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 817228, 2022.

HOLTAPPELS, Dominique et al. Protection of phage applications in crop production: A patent landscape. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 277, 2019.

IBGE IBdGE (2016) Produção Agrícola Municipal. Publisher. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf

JAMAL, Muhsin et al. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. **Journal of basic microbiology**, v. 59, n. 2, p. 123-133, 2019.

JEONG, Tae-Hwan et al. Characterization of Three Different Endolysins Effective against Gram-Negative Bacteria. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 679, 2023.

JUN, Soo Youn et al. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1. **International journal of antimicrobial agents**, v. 41, n. 2, p. 156-161, 2013.

KAUR, Jasjeet et al. A potent enzymatic against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Virus genes**, v. 56, p. 480-497, 2020.

KHALIFA, Leron et al. Defeating antibiotic-and phage-resistant *Enterococcus faecalis* using a phage cocktail in vitro and in a clot model. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 326, 2018.

KHALIFA, Leron et al. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2696-2705, 2015.

KIM, Shukho et al. LysSAP26, a new recombinant phage endolysin with a broad spectrum antibacterial activity. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1340, 2020.

- KIMMELSHUE, Chad; GOGGI, A. Susana; CADEMARTIRI, Rebecca. The use of biological seed coatings based on bacteriophages and polymers against *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in maize seeds. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 17950, 2019.
- KIRBY, William MM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. **Science**, v. 99, n. 2579, p. 452-453, 1944.
- KUSRADZE, Ia et al. Characterization and testing the efficiency of *Acinetobacter baumannii* phage vB-GEC_Ab-M-G7 as an antibacterial agent. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1590, 2016.
- KUTYSHENKO, Victor P. et al. Comparative analysis of the active sites of orthologous endolysins of the *Escherichia* lytic bacteriophages T5, RB43, and RB49. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1096-1105, 2021.
- LEACH KL et al. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. **Mol Cell** 26(3):393-402 doi:10.1016/j.molcel.2007.04.005
- LEE, Mijoon et al. Exolytic and endolytic turnover of peptidoglycan by lytic transglycosylase Slr of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 17, p. 4393-4398, 2018.
- LI, Lele et al. Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2022.
- LI, Na et al. A novel *Bacillus cereus* bacteriophage DLn1 and its endolysin as biocontrol agents against *Bacillus cereus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 369, p. 109615, 2022.
- LIM, Jeong-A. et al. Characterization of endolysin from a *Salmonella Typhimurium*-infecting bacteriophage SPN1S. **Research in microbiology**, v. 163, n. 3, p. 233-241, 2012.
- LIM, Jeong-A. et al. Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against gram-negative bacteria. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 803-811, 2014.
- LIU, Aiping et al. Characterization of endolysins from bacteriophage LPST10 and evaluation of their potential for controlling *Salmonella Typhimurium* on lettuce. **LWT**, v. 114, p. 108372, 2019.
- LOEFFLER, Jutta M.; NELSON, Daniel; FISCHETTI, Vincent A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. **Science**, v. 294, n. 5549, p. 2170-2172, 2001.
- LU, Biao et al. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* phage vB_KpnS_MK54 and pathological Assessment of Endolysin in the treatment of Pneumonia mice Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 854908, 2022.
- LU, Rui et al. A broad-spectrum phage endolysin (LysCP28) able to remove biofilms and inactivate *Clostridium perfringens* strains. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 411, 2023.
- MALLMANN, W. L.; HEMSTREET, C. A. R. L. Isolation of an inhibitory substance from plants. **Agric. Res**, v. 28, p. 599-602, 1924.
- MANOHAR, Prasanth; NACHIMUTHU, Ramesh; LOPES, Bruno S. The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using *Galleria mellonella* infection model. **BMC microbiology**, v. 18, p. 1-11, 2018.
- MARTIN, N. H.; TORRES-FRENZEL, P.; WIEDMANN, M. Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1251-1261, 2021.

- MAYER, Melinda J. et al. Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage Φ CTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 16, p. 5415-5422, 2010.
- MELO, Luís DR et al. Efficacy and safety assessment of two enterococci phages in an in vitro biofilm wound model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6643, 2019.
- MERABISHVILI, Maya et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4944, 2009.
- MIRDITA, Milot et al. Fast and sensitive taxonomic assignment to metagenomic contigs. **Bioinformatics**, v. 37, n. 18, p. 3029-3031, 2021.
- MISIOU, Ourania et al. The preservation of Listeria-critical foods by a combination of endolysin and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 355-362, 2018.
- MOYE, Zachary D.; WOOLSTON, Joelle; SULAKVELIDZE, Alexander. Bacteriophage applications for food production and processing. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 205, 2018.
- MULANI, Mansura S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 539, 2019.
- NAKAYINGA, Ritah et al. Xanthomonas bacteriophages: A review of their biology and biocontrol applications in agriculture. **BMC microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1-20, 2021.
- NAZIR, Amina et al. Structural Genomics of repA, repB1-Carrying IncFIB Family pA1705-qnrS, P911021-tetA, and P1642-tetA, multidrug-resistant plasmids from klebsiella pneumoniae. **Infection and Drug Resistance**, p. 1889-1903, 2020.
- NELSON, Daniel C. et al. Endolysins as antimicrobials. **Advances in virus research**, v. 83, p. 299-365, 2012.
- Neves MFT, V. G.; Milan, P.; Lopes, F. F.; Cressoni, F.; Kalaki, R. (2010) O retrato da citricultura brasileira. 138
- NILSSON, Anders S. Phage therapy—constraints and possibilities. **Uppsala journal of medical sciences**, v. 119, n. 2, p. 192-198, 2014.
- NOBREGA, Franklin L. et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 760-773, 2018.
- NORTH, Olesia I.; DAVIDSON, Alan R. Phage proteins required for tail fiber assembly also bind specifically to the surface of host bacterial strains. **Journal of Bacteriology**, v. 203, n. 3, p. e00406-20, 2021.
- OBESO, José María et al. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage Φ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. **International journal of food microbiology**, v. 128, n. 2, p. 212-218, 2008.
- OLIVEIRA, Hugo et al. A thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e108376, 2014.
- OOI, Mian Li et al. Safety and tolerability of bacteriophage therapy for chronic rhinosinusitis due to *Staphylococcus aureus*. **JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 145, n. 8, p. 723-729, 2019.
- O'Sullivan L, Bolton D, McAuliffe O, Coffey A (2019) Bacteriophages in Food Applications: From Foe to Friend. **Annu Rev Food Sci Technol** 10:151-172 doi:10.1146/annurev-food-032818-121747

ÖZAL, Dilara; ARNDT, Andreas; THOMÉ, Marcus. Bacteriophages and related endolysins for reduction of microorganisms in the human body—a systematic review. **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 17, 2022.

PALLESEN, Emil MH et al. Endolysin Inhibits Skin Colonization by Patient-Derived Staphylococcus Aureus and Malignant T-Cell Activation in Cutaneous T-Cell Lymphoma. **Journal of Investigative Dermatology**, 2023.

PAYSAN-LAFOSSE, Typhaine et al. InterPro in 2022. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D418-D427, 2023.

PAZOS, Manuel; PETERS, Katharina. Peptidoglycan. **Bacterial cell walls and membranes**, p. 127-168, 2019.

PENG, Qin; YUAN, Yihui. Characterization of a novel phage infecting the pathogenic multidrug-resistant *Bacillus cereus* and functional analysis of its endolysin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, p. 7901-7912, 2018.

PETITJEAN, Marie et al. The rise and the fall of a *Pseudomonas aeruginosa* endemic lineage in a hospital. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 9, 2021.

PLOTKA, Magdalena et al. Biochemical characterization and validation of a catalytic site of a highly thermostable Ts2631 endolysin from the *Thermus scotoductus* phage vB_Tsc2631. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137374, 2015.

POŁASKA, Marzena; SOKOŁOWSKA, Barbara. Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. **AIMS microbiology**, v. 5, n. 4, p. 324, 2019.

RAMOS-VIVAS, José et al. Phages and enzybiotics in food biopreservation. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5138, 2021.

RAVET, Karl; PILON, Marinus. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 9, p. 919-932, 2013.

SAMBROOK JF, E. F.; MANIATIS, T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2 edn, Cold Spring Harbor

SANTAJIT, Sirijan; INDRAWATTANA, Nitaya. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

SANTIN, Yoann G.; CASCALES, Eric. Measure of peptidoglycan hydrolase activity. **Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols**, p. 151-158, 2017.

SASS, Peter; BIERBAUM, Gabriele. Lytic activity of recombinant bacteriophage ϕ 11 and ϕ 12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 1, p. 347-352, 2007.

SCHAAD, Norman W. et al. Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus. **Papers in Plant Pathology**, p. 96, 2006.

SCHMELCHER M, Waldherr F, Loessner MJ (2012) *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. **Appl Microbiol Biotechnol** 93(2):633-43 doi:10.1007/s00253-011-3372-6

SCHMELCHER, Mathias; DONOVAN, David M.; LOESSNER, Martin J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. **Future microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1147-1171, 2012.

SCHMELCHER, Mathias et al; Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 8475-8486, 2015.

- SCHMELCHER, Mathias; LOESSNER, Martin J. Bacteriophage endolysins: applications for food safety. **Current opinion in biotechnology**, v. 37, p. 76-87, 2016.
- SCHMITZ, Jonathan E.; SCHUCH, Raymond; FISCHETTI, Vincent A. Identifying active phage lysins through functional viral metagenomics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7181-7187, 2010.
- SCHOOLEY, Robert T. et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. e00954-17, 2017.
- SEEMANN, Torsten. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.
- SHANNON, Rachel; RADFORD, Devon R.; BALAMURUGAN, Sampathkumar. Impacts of food matrix on bacteriophage and endolysin antimicrobial efficacy and performance. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1631-1640, 2020.
- SHARMA, Meenakshi; KUMAR, Dinesh; POLURI, Krishna Mohan. Elucidating the pH-dependent structural transition of T7 bacteriophage endolysin. **Biochemistry**, v. 55, n. 33, p. 4614-4625, 2016.
- SHARMA, Sonika et al. Bacteriophages and its applications: an overview. **Folia microbiologica**, v. 62, p. 17-55, 2017.
- SLOPEK, Stefan et al. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 35, n. 5, p. 569-583, 1987.
- SÖDING, Johannes; BIEGERT, Andreas; LUPAS, Andrei N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl_2, p. W244-W248, 2005.
- SON, Jee-Soo et al. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1439-1449, 2010.
- SON, Bokyung et al. Simultaneous control of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* using a hybrid endolysin LysB4EAD-LysSA11. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 906, 2020.
- STONE, Edel et al. Understanding and exploiting phage–host interactions. **Viruses**, v. 11, n. 6, p. 567, 2019.
- SUTTLE, Curtis A. Marine viruses—major players in the global ecosystem. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 10, p. 801-812, 2007.
- SYKILINDA, Nina N. et al. Structure of an *Acinetobacter* broad-range prophage endolysin reveals a C-terminal α -helix with the proposed role in activity against live bacterial cells. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 309, 2018.
- TABASSUM, Rabia et al. Complete genome analysis of a Siphoviridae phage TSK1 showing biofilm removal potential against *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 17904, 2018.
- TARAKANOV, Rashit I. et al. Bacteriophage Control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in Soybean. **Plants**, v. 11, n. 7, p. 938, 2022.
- TWORT, Frederick W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. **Acta Kravsi**, 1915.

- VASINA, Daria V. et al. Discovering the potentials of four phage endolysins to combat Gram-negative infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 748718, 2021.
- WANG, Jiun-Ling et al. Efficacy of ϕ km18p phage therapy in a murine model of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **Infection and drug resistance**, p. 2301-2310, 2018.
- WANG, Yong et al. Intranasal treatment with bacteriophage rescues mice from *Acinetobacter baumannii*-mediated pneumonia. **Future microbiology**, v. 11, n. 5, p. 631-641, 2016.
- WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.
- WILKS, Jessica C.; SLONCZEWSKI, Joan L. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 15, p. 5601-5607, 2007.
- WITTEBOLE, Xavier; DE ROOCK, Sophie; OPAL, Steven M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 226-235, 2014.
- WONG, Jaslyn EMM et al. An intermolecular binding mechanism involving multiple LysM domains mediates carbohydrate recognition by an endopeptidase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, n. 3, p. 592-605, 2015.
- WRIGHT, A1 et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical otolaryngology**, v. 34, n. 4, p. 349-357, 2009.
- XU, Min et al. Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. **Science**, v. 307, n. 5706, p. 113-117, 2005.
- YANG, Shih-Chun et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Archives of microbiology**, v. 199, p. 811-825, 2017.
- YOUNG, R. Y. Bacteriophage holins: deadly diversity. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 21-36, 2002.
- YRUELA, Inmaculada. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009.
- YU, Jun-Hyeok et al. Characterization of Staphylococcal endolysin LysSAP33 possessing untypical domain composition. **Journal of Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 840-847, 2021.

APÊNDICE A - Sequência das endolisinas utilizadas

Bacteriófago CP2 (NCBI Ascension code: NC_020205.1)

CP2_07

MSDQAAKLALPIVAEFEGFRPHPYPDPASPLAKATRKEPWGHVPARSILNRLPA
ATAALSGAPWTIGYGQTGKYITPDTAPWSDAVARANLEEELQLRVDAVRARA
KKDGGVLQDAQVAATASFLFNVGEGRKASGSDPGKDGLFMLKSGRPSTLWRK
AMEGCHTCAADQFLAWNKAGGQVMAGLTRRRNAERSLYLRAG

CP2_29

MATIIPRVTA PQVEVQQGPQVRNTARADDSGAQALAGAIGSFARPALEYA QRE
QERNDDTTAVMAARKQLSDWEANTFNPGNPDGIGKYKGKNALGADEVLLPDL
KTVGSISAGLTPKQRQQFEGVAMNFRDSVAGRLNGYMDREHSGYITAEQKAA
VDNLGADAVSAGVSGDFSRQDRVANELLAMNRRAREADGMGEELIKAERGL
VSSVRSQTIEGMATAHPFEAQAYFERYADQMT PEDRAKVDRLLYPVVSDAAA
QDDADAILAGAQPQAYRDPGPRGRGSPAMAKILDEEADAAGVPREYLALAE
QESGFNPNAVNPEVLDDGDNATGLFQYRATSAQGFDRKDARASARAAAREFA
QRAKTGGVEFAVA AHFAGEGGAAV VQRGRRAENPKTARYVEEVMGRASRW
RGDAPVQQVGR TAPPSEADAIERAQAIPDPRRRAAVVGKIRERFQLSDLRRQEE
DRAASEGAYTAINQASNP NAPLREILGAQVYAWAERK GHLPTLENLRKNK VAG
TFTQDDAVLVESLEREA VLSPTFAHRDIHALADRISTETLGDLLGKQKQANDP
SKRADWASQSQRIESGLRILGLDEAGDNRNAE GEFVAKPPKKLDERKVQRAQ
FAQVYREAERA FIRQNGKDPTPAEADSILRAVVRNVATDIPGKLRRAGAIEGFG
AALPAADRAEII SDFRASAGRDPTEAEIVRIGARYRMQSNSAGSN

Bacteriófago CP1 (NCBI Ascension code: NC_019933.2)

CP1_21

MDINKYVGLSYNRDSFDCADFAILIQREMF GREVNLP AARPRINSGGQRHLQRI
SAQYAERTDSPKDGDLVLMAQLGKTRATH TGVYFWRDHAAWVLHCTEAVGY
SVFQRVSDLGDSCVWVEGYKLLDRPSYE

CP1_30

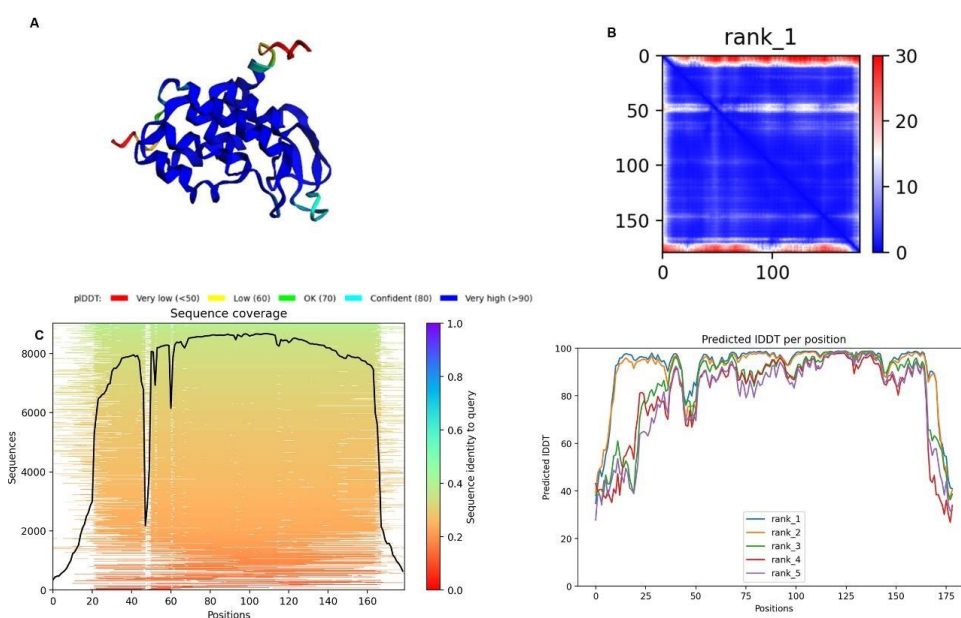
MPTKNESEKTPWARGIIALGGLALS AAGVIAVADHEGKRYAAYPDPATGGAPW
TICYGHTGPEVKPGMVVKQDQCDKWLAQDLRKAQDVV FSTVKVPIQQGELDA
YASFVYNVGSGNWRSS TMLRLLNQGRKEACDQFPRWVYANKIKLQGLATTR
YEERAMCLQGGHYVTPSNFIRP

Material Suplementar

Modelagem das endolisinas Gene CP1_30

Realizamos inicialmente a modelagem das proteínas selecionadas utilizando o *software* Colab Fold. Na figura 1 (A) observamos o modelo gerado com os valores de confiança, onde em azul, temos as regiões com alta confiança (>90%), e, em amarelo e vermelho, as regiões com baixa confiança (de 60% e menor que 60%). No modelo gerado observamos uma alta confiança média sendo que nas regiões C-terminal e N-terminal essa confiança é menor (menor que 60%). Na figura 1 (B) observamos o *Predicted Align Error* entre cada par de resíduos. Sendo que em azul é mostrado uma alta confiança na ligação e em vermelho é mostrada uma baixa confiança. Desta forma, da mesma maneira que no modelo observamos um maior erro no alinhamento nas regiões C-terminal e N-terminal da proteína. Na figura 1 (C) está representado respectivamente o alinhamento com a cobertura observada, bem como a identidade com essas sequências. Observamos uma identidade de aproximadamente 40% com as sequências utilizadas. E por fim temos o valor previsto de IDDT em cada posição, sendo que quanto maior o valor, melhor o modelo. Sendo assim, selecionamos o modelo 1 como tendo a melhor previsão da estrutura.

Figura 1 – Modelagem da proteína CP1_30. (A) predição estrutural gerada com o Colab Fold. (B) *Predicted Align Error* (PAE). (C) cobertura da sequência e o valor previsto de IDDT em cada posição.

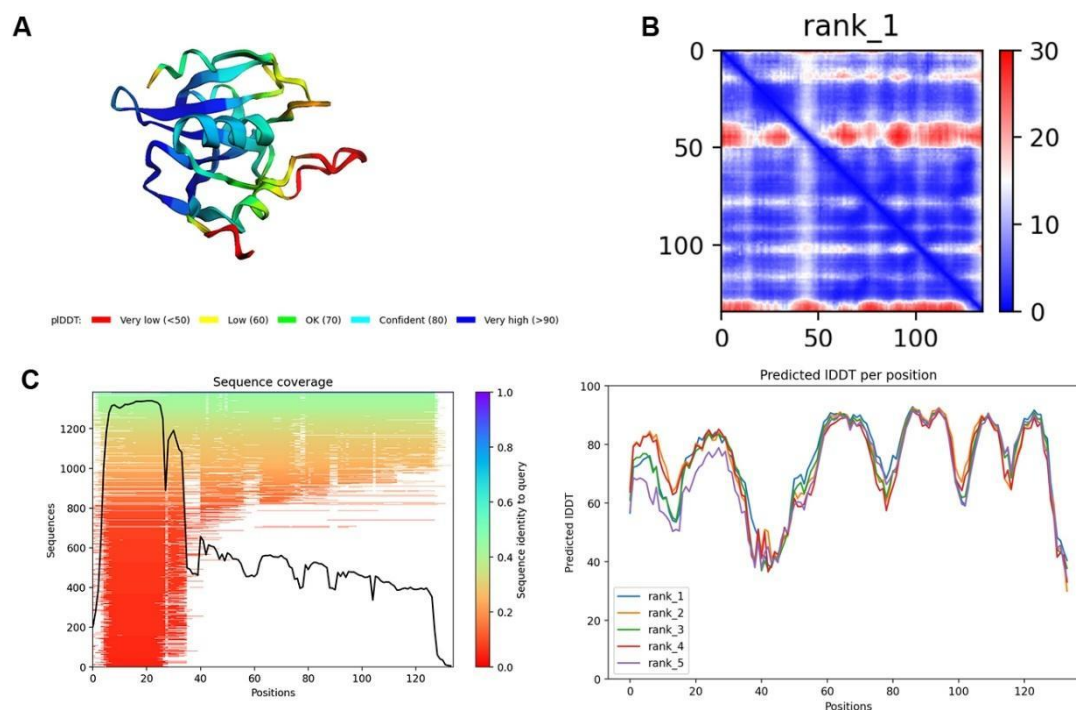


Fonte: dados do trabalho.

Gene CP1_21

Com relação ao gene CP1_21, na figura 2 (A) observamos o modelo gerado pelo Colab Fold. Observamos alta confiança no modelo nas regiões centrais da molécula, entretanto essa confiança passa a ser menor nas regiões N-terminal e C-terminal da molécula (>60%). Na figura 2 (B) observamos o *Predicted Align Error* entre cada ligação de par de resíduos (em azul é mostrado uma alta confiança na ligação e em vermelho é mostrada uma baixa confiança). Na figura 2 (C) temos o alinhamento das sequências com a cobertura observada, bem como a identidade com essas sequências. Observamos uma cobertura maior na região N-terminal, mas essa cobertura diminui ao longo da molécula até a região C-terminal. Por fim temos o valor previsto de IDDT em cada posição, sendo que quanto maior o valor, melhor o modelo. Não observamos grandes diferenças entre os modelos, sendo assim selecionamos o modelo 1 como tendo a melhor previsão da estrutura.

Figura 2 – Modelagem da proteína CP1_21. (A) predição estrutural gerada com o Colab Fold. (B) *Predicted Align Error* (PAE). (C) cobertura da sequência e o valor previsto de IDDT em cada posição.

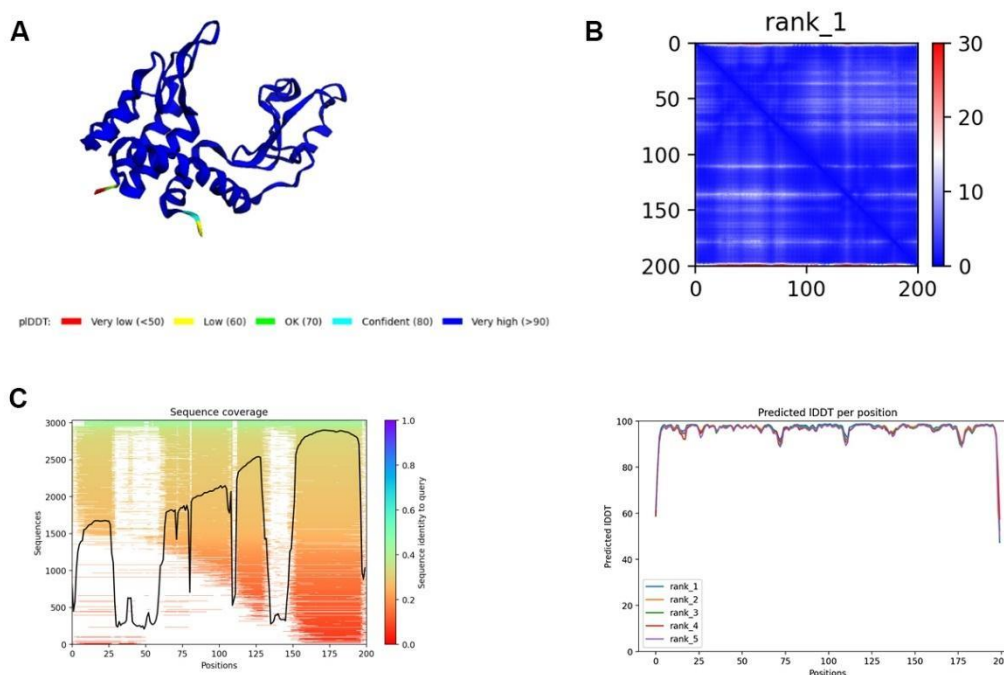


Fonte: dados do trabalho.

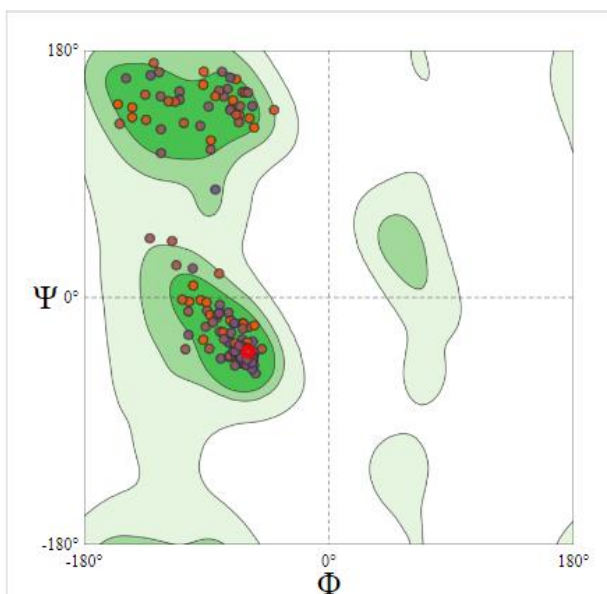
Bacteriófago CP2 Gene CP2_07

Para o gene CP2_07 na figura 3 (A) observamos o modelo gerado pela plataforma. Observamos uma alta confiança no modelo >90%. Somente nas regiões C e N terminal da proteína que essa confiança foi menor, cerca de 70% e 50%. Na figura 3 (B) observamos o *Predicted Align Error* para cada par de resíduos, que para esse modelo se mostrou bastante baixo, demonstrando uma alta confiança no modelo gerado. Na figura 3 (C) observamos o alinhamento com a cobertura observada bem como a identidade com essas sequências. Observamos uma cobertura média de aproximadamente 30%. Sendo que existem regiões com baixa cobertura, entre a posição 25 e 50, bem como entre as posições 130 e 140. Na figura 3 (D), observamos o gráfico de Ramachandran em que observamos 98,48% dos aminoácidos em posições favoráveis e 0,51% como *outlier*, assim, o modelo apresenta uma boa qualidade. Por fim temos o valor previsto de IDDT em cada posição, sendo que quanto maior o valor, melhor o modelo. Não observamos grandes diferenças entre os modelos, sendo assim selecionamos o modelo 1 como tendo a melhor previsão da estrutura.

Figura 3 – Modelagem da proteína CP2_07. (A) predição estrutural gerada com o Colab Fold. (B) *Predicted Align Error* (PAE). (C) cobertura da sequência e o valor previsto de IDDT em cada posição (D) Gráfico de Ramachandran com os ângulos de torção Psi (Ψ) e Phi (Φ) em graus mostrando a qualidade do modelo.



D

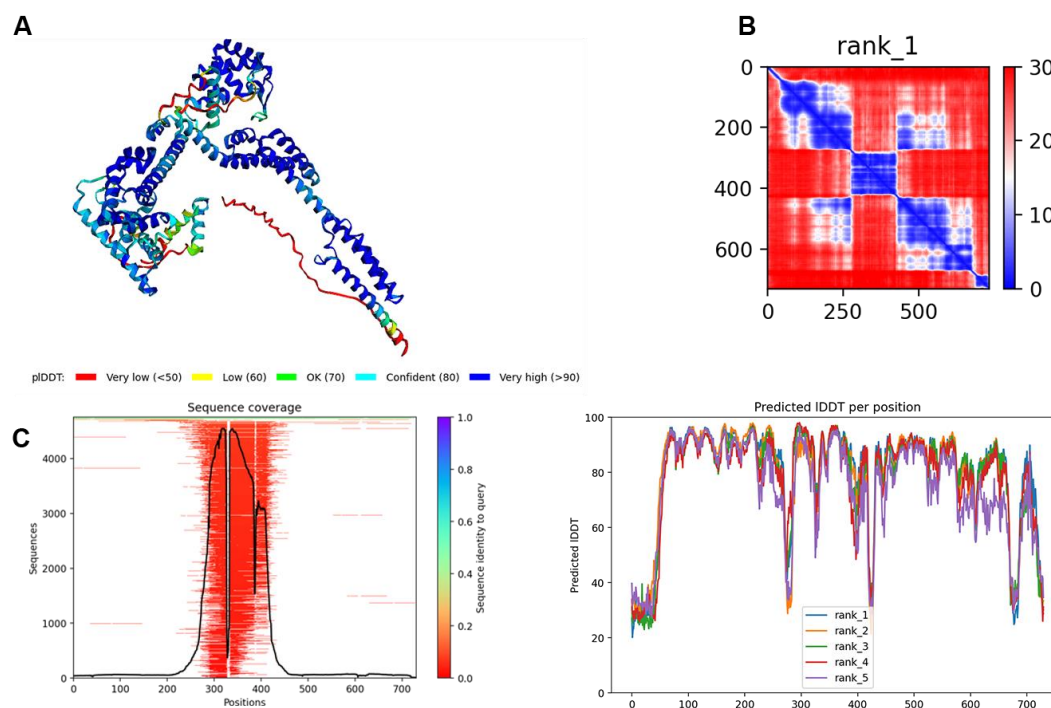


Fonte: dados do trabalho.

Gene CP2_29

Com relação ao gene CP2_29, na figura 4 (A), no modelo gerado observamos tanto regiões com alta confiança (>90% - regiões em azul marinho) ao mesmo tempo, temos regiões com menor confiança (80% - azul claro); e principalmente nas regiões N e C terminal observamos uma menor confiança (<50% - vermelho). Na figura 4 (B) observamos o *Predicted Align Error* para cada par de resíduos, que para esse modelo se mostrou alto, em que as regiões em vermelho representam uma baixa confiança na ligação e em azul e representado alta confiança na ligação. Na figura 4 (C) observamos uma baixa cobertura e identidade com as sequências usadas (<20%). Somente observamos cobertura nas posições de 250 e 450. Por fim observamos o valor previsto de IDDT em cada posição, sendo que quanto maior o valor, melhor o modelo. Não observamos grandes diferenças entre os modelos, sendo assim selecionamos o modelo 1 como tendo a melhor previsão da estrutura.

Figura 4 – Modelagem da proteína CP2_29. (A) predição estrutural gerada com o Colab Fold. (B) *Predicted Align Error* (PAE). (C) cobertura da sequência e o valor previsto de IDDT em cada posição.



Fonte: dados do trabalho.