

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELISANGELA ANDRADE ANGELO

Aplicações de enzimas em biotecnologia:  
Estudos funcionais e estruturais de catepsina de *BmNPV* e urease embrionária de soja

Maringá  
2021

ELISANGELA ANDRADE ANGELO

**Aplicações de enzimas em biotecnologia:**  
Estudos funcionais e estruturais de catepsina de *BmNPV* e urease embrionária de soja

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

Maringá  
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

A584a

Angelo, Elisangela Andrade

Aplicações de enzimas em biotecnologia : estudos funcionais e estruturais de cathepsina de *BmNPV* e urease embrionária de soja / Elisangela Andrade Angelo. -- Maringá, PR, 2021.

91 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2021.

1. Biologia molecular. 2. Bioquímica. 3. Proteínas. I. Seixas, Flavio Augusto Vicente, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 572

ELISANGELA ANDRADE ANGELO

Aplicações de enzimas em biotecnologia:  
Estudos funcionais e estruturais de catepsina de *BmNPV* e urease embrionária de soja

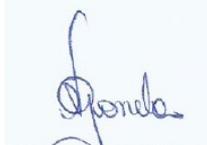
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas do Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Estadual de Maringá,  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Doutora em Ciências Biológicas pela Banca  
Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em: 26 de novembro de 2021.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



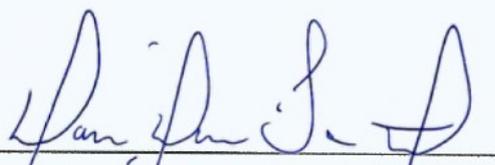
Prof. Dra. Adriana Gonela  
Universidade Estadual de Maringá



Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dra. Cristina Gatti Marques de Souza  
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos  
Universidade Estadual de Maringá (PBC/UEM)

## BIOGRAFIA

**Elisangela Andrade Angelo** nasceu em Sertanópolis, estado do Paraná, no dia 1 de maio de 1982. Iniciou sua graduação em 2001 no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Durante o período atuou em projetos de iniciação científica no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e no Departamento de Biologia Geral. Graduou-se na licenciatura em 2004 e no bacharel em 2005. Entre os anos de 2007 e 2009 cursou o mestrado em Ciência de Alimentos, pela UEL, tendo desenvolvido a dissertação intitulada “Otimização de meio de cultivo para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* empregando resíduos agroindustriais”. Atuou como bióloga da Companhia Paranaense de Energia (Copel) entre 2010 e 2015, onde participou de projetos de pesquisa, entre eles: “Desenvolvimento de tecnologias para produção de microalgas como fonte de óleo para produção de biocombustíveis e aproveitamento de coprodutos”. Desde 2015 atua como docente do Instituto Federal do Paraná (IFPR), campus Umuarama, onde leciona para cursos técnicos integrados ao Ensino Médio e para Licenciatura em Ciências Biológicas. Em seu trabalho no IFPR desenvolveu pesquisas sobre: “Caracterização do crescimento microbiano de cepas de microalgas em condições de cultivo fotoautotrófica, mixotrófica e heterotrófica”, “Avaliação do potencial antimicrobiano de óleo e extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e de moringa (*Moringa oleifera*)”, além de projetos na área de ensino de biologia. Atualmente é aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob orientação do professor Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas. O trabalho desenvolvido no doutorado versa sobre a urease embrionária de soja (*Glycyne max*) e a catepsina do nucleopoliedrovírus que afeta o bicho-da-seda (*Bombyx mori*).

## AGRADECIMENTOS

Dedico este livro aos amigos  
Aos que se tornaram familiares,  
Aos que nasceram familiares  
e aos que conheci antes de ontem.  
Dedico tanto aos que me deixam louco,  
Quanto aos que enlouqueço.  
Aos que me criticam em tudo,  
E a um ou outro que atura  
Minha “chatura”  
Aos amigos que correm,  
Aos amigos que contemplam.  
Aos que me consideram muito,  
E aos muitos que, com razão, fazem pouco.  
Aos que conhecem o que penso,  
E aos que só conhecem o que faço.  
Aos que passam o dia todo comigo  
e aos que estão todo o tempo em mim.  
Este livro é a soma de todos vocês.  
E se ele não é melhor,  
É por falta de memória,  
Mas não por falta de amigos.

(Efraim Rodrigues & Richard B. Primack, *Biologia da Conservação*, 2001)

Agradecimento especial ao meu orientador, Flavio Augusto Seixas, por estar presente em todos os momentos que precisei nessa caminhada. A minha família, que compreendeu minhas ausências e sempre me deu muito apoio. Ao meu esposo, por sonhar meus sonhos. Aos meus amigos e alunos do IFPR, por me incentivarem sempre. A todos que tive contato e que, de alguma forma, mesmo em um simples gesto, me incentivaram a não desistir.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Representação esquemática da estrutura tridimensional das ureases	21
Representação esquemática do sítio catalítico das ureases	23
Desenho esquemático do artigo “Purification and characterization of embryo-specific soy urease ( <i>Glycine max</i> ) and its antifungal potential against <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ”	40
Tabela - Summary of GmaxUrease purification steps from soybean seeds	44
Chromatograms of the GmaxUrease purification steps	45
Tabela - Results from mass spectrometry analysis of the band considered as GmaxUrease extracted from SDS-PAGE.	46
Effects of changes in the experimental conditions on the catalytic activity of GmaxUrease	47
Effect of the substrate (urea) concentration on the catalytic activity of GmaxUrease	47
The experimental values of MIC and MFC of GmaxUrease against Pb18 strain of <i>P. brasiliensis</i>	48
GmaxUrease as structure models and homologs alignment	49
Eletroforese do lisado de cepas de <i>E. coli</i> BL21 cultivadas em pequena escala para expressão de pre-BmNPV-Cath	70
Tabela - Resultados da espectrometria de massa das bandas superexpressas de pre-Bm-NPV-Cath	71
Eletroforese após amostra de pre-BmNPV-Cath ser submetida a cromatografia por afinidade ao níquel	73
Eletroforese e <i>Wester Blotting</i> da pre-BmNPV -Cath	75
Gráfico para determinação do peso molecular de pre-BmNPV-Cath a partir da eluição em coluna Superdex <sup>TM</sup>	76
Ensaio de espectroscopia de dicroísmo circular com a pre-BmNPV-Cath	78
Tabela - Porcentagens dos elementos de estrutura secundária obtidos a partir da estrutura modelada da BmNPV-Cath usada nas simulações de <i>docking</i> e a pre-BmNPV-Cath em solução por CD	79
Tabela - Média e desvio padrão dos scores dos melhores candidatos a inibidores de BmNPV-Cath, encontrados nas simulações de <i>docking</i>	80
Poses obtidas com o <i>docking</i> dos ligantes de BmNPV-Cath	81

## LISTA DE ABREVIações

BmNPV	Nucleopoliedrovírus de <i>Bombyx mori</i>
BmNPV-Cath	Catepsina de Nucleopoliedrovírus de <i>B. mori</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
C-	Negative Control
C+	Positive Control
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FDR	False Discovery Rate
GmaxUrease	Embryo-specific Soy Urease
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
$K_M$	Constante Aparente de Michaelis e Menten
LBA	Meio Luria Bertani com ampicilina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )
LC	Cromatografia Líquida
LC-MSE	Liquid Chromatography-mass Spectrometry
MFC	Minimum Fungicidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MSE	Mass Spectrometry
MW	Molecular Weight
MYP	4-Morpholin-4-Yl-Piperidine-1-Carboxylic Acid [1-(3-Benzenesulfonyl-1-Propyl-Allylcarbamoyl)-2-Phenylethyl]-Amide
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDB	Protein Data Bank
PLGS	ProteinLynx Global Server
PMC	Paracoccidiodomicose
PMF	Fingerprint de Peptídeos
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
pre-BmNPV-Cath	Pré catepsina de Nucleopoliedrovírus de <i>Bombyx mori</i>
RPM	Rotações por Minuto
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida (PAGE) com Dodecil- sulfato de Sódio (SDS)
TBS	Tampão Tris-salino
TOF	Time of Flight
U	Enzyme unit
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UPLC M-Class	Ultra-high Performance Liquid Chromatography
$V_c$	Geometric Column Volume.
$V_e$	Elution Volume
$V_{max}$	Velocidade máxima da reação
$V_o$	Column Void Volume
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	10
RESUMO GERAL.....	11
ABSTRACT .....	14
ARTIGO 1 - Ureases: caracterização funcional e potenciais aplicações biotecnológicas.....	17
ARTIGO 2 - Purification and characterization of embryo-specific soy urease ( <i>Glycine max</i> ) and its antifungal potential against <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	39
ARTIGO 3 - Expressão e purificação da catepsina do nucleopoliedrovírus de <i>Bombyx mori</i> .....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
ANEXO – Outras produções durante o período do doutorado (2017-2021).....	89

## APRESENTAÇÃO

Tendo em vista as normativas do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), essa tese é composta por um resumo geral, em português e inglês, seguido por 3 capítulos, sendo que um deles correspondente a um artigo de revisão bibliográfica e os outros dois versam sobre pesquisa laboratorial.

O primeiro capítulo corresponde ao artigo de revisão, intitulado “Ureases: caracterização funcional e potenciais aplicações biotecnológicas”, o qual foi submetido a Revista Mundi: Engenharia, Tecnologia e Gestão (ISSN: 2525-4782), do Instituto Federal do Paraná. Esse artigo contempla uma caracterização geral das ureases, incluindo suas atividades não enzimáticas, como ação entomotóxica e fungitóxica, além de apontar algumas aplicações biotecnológicas dessa proteína.

O segundo capítulo corresponde ao artigo intitulado “*Purification and characterization of embryo-specific soy urease (Glycine max) and its antifungal potential against Paracoccidioides brasiliensis*”, foi publicado no volume 46, da revista de acesso livre Eclética Química (ISSN: 1678-4618), em abril de 2021. Nesse artigo, a urease embrionária de soja foi extraída e purificada diretamente da semente e, posteriormente, foi estudado seu potencial antifúngico contra *P. brasiliensis*, fungo dimórfico causador da paracoccidioidomicose (PMC). Além disso, foram feitos estudos de caracterização da atividade enzimática da urease purificada e modelagem computacional da estrutura proteica.

Por fim, o terceiro capítulo corresponde ao artigo intitulado “Expressão e purificação da catepsina do nucleopoliedrovírus de *Bombyx mori*”, o qual se pretende submeter a revista Molecular Omics (ISSN: 2515-4184). Nesse estudo, foi desenvolvido um protocolo para expressão, purificação e renaturação da catepsina de nucleopoliedrovírus de *B. mori* (BmNPV-Cath). Além disso, foram feitos estudos preliminares de dicroísmo circular e modelagens *in silico* para prospecção de inibidores sintéticos utilizando a estrutura modelada da BmNPV-Cath como alvo, no intuito de identificar potenciais antivirais contra a doença amarelidão, a qual afeta o bicho-da-seda.

## RESUMO GERAL

Em bioquímica, a estrutura das moléculas tem forte relação com o papel biológico que essas desempenham no ser vivo. Por isso, conhecer a estrutura das proteínas é um caminho para compreender suas funções. Dessa maneira, estudos estruturais e funcionais são essenciais para o aproveitamento biotecnológico de determinadas proteínas, bem como para o desenvolvimento de fármacos. Os estudos estruturais podem ser feitos tanto por meio de análises computacionais, como por meio de testes laboratoriais, a exemplo da espectroscopia de dicroísmo circular, e estudos funcionais de atividade, sendo recomendada a aplicação conjunta dessas duas estratégias (*in silico* e *in vitro*).

Os estudos *in silico*, além de contribuírem para a modelagem de estruturas, permitem otimizar os testes de bancada, uma vez que podem ser utilizados para a seleção de compostos com maior potencial para os testes *in vitro* e *in vivo*. Estudos computacionais para modelagem foram utilizados no capítulo 2 desta tese, além disso, análises de varredura virtual para seleção de inibidores foram aplicadas no capítulo 3.

Paralelo aos estudos estruturais, é interessante pesquisar a funcionalidade das proteínas, procurando estabelecer uma conexão entre estrutura e atividade. Nessa tese, foram feitos testes de atividade enzimática, bem como testes de atividade antifúngica (capítulo 2). A seguir, são apresentados os principais resultados e discussão dos três capítulos da tese.

Capítulo 1 (Ureases: caracterização funcional e potenciais aplicações biotecnológicas). As ureases vegetais apresentam múltiplas atividades, destacando-se a enzimática, fungitóxica e inseticida. Em relação a sua atividade enzimática, as ureases são amidoidrolases dependentes de níquel, que catalisam a hidrólise da ureia, o que permite a utilização desse composto como fonte de nitrogênio. A ação entomotóxica das ureases independe de sua atividade catalítica, sendo que os insetos suscetíveis são aqueles que apresentam digestão por catepsina. A atividade fungitóxica já foi observada em diferentes ureases vegetais, tanto para fungos filamentosos quanto para leveduriformes e dimórficos onde, em geral, a

concentração fungitóxica ocorre em níveis micromolares. Entre as aplicações biotecnológicas das ureases destacam-se: tratamento e análise de águas residuais, remoção da ureia de bebidas, biomineralização, análises clínicas, desenvolvimento de fármacos contra fungos e no desenvolvimento de insumos agrícolas fungitóxicos e entomotóxicos. Tendo em vista sua atividade catalítica, bem como suas outras funções biológicas, as ureases apresentam múltiplas possibilidades de aplicação, sendo um campo fértil para estudos de base e aplicados.

Capítulo 2 (*Purification and characterization of embryo-specific soy urease (Glycine max) and its antifungal potential against Paracoccidioides brasiliensis*). Tendo em vista as potenciais aplicações das ureases, o trabalho teve por objetivo extrair, purificar, caracterizar a atividade enzimática e estudar a ação fungitóxica da urease embrionária de soja contra *Paracoccidioides brasiliensis*. Esse fungo é o principal agente causador da micose sistêmica denominada paracoccidioidomicose. Essa doença tem alta incidência na América Latina e, de acordo com Organização Mundial da Saúde, é uma enfermidade negligenciada. A fim de alcançar os objetivos propostos, foram realizadas a caracterização bioquímica, em termos de pH e temperatura ótimos, bem como foram determinadas a constante aparente de Michaelis e Menten ( $K_M$ ) e a  $V_{max}$ . Realizou-se ainda a identificação da urease por meio de espectrometria de massa e a modelagem computacional de sua estrutura. O pH e temperatura ótimos da enzima presente no extrato em processo de purificação foram de 6,5 e 65 °C, respectivamente,  $K_M$  de 3,01 mM de ureia e velocidade máxima de 5,93 mM.seg<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup>. Os testes preliminares de atividade antifúngica foram promissores, resultando em um MIC de 10 µg.mL<sup>-1</sup>. De acordo com as revisões realizadas nesse estudo, este trabalho foi o primeiro a demonstrar atividade fungitóxica de urease contra *P. brasiliensis*, podendo ser a base de estudos para o desenvolvimento de um creme para tratamento das manifestações cutâneas e orais da doença.

Capítulo 3 (Expressão e purificação da catepsina do nucleopoliedrovírus de *Bombyx mori*). Dentre os vírus que acometem *Bombyx mori*, um dos mais comuns é o nucleopoliedrovírus (BmNPV), causador da doença denominada amarelidão. Há várias proteínas de BmNPV que se relacionam ao ciclo infeccioso viral, entre elas se destaca a catepsina (BmNPV-Cath). Este estudo teve por objetivo desenvolver um

protocolo de expressão heteróloga e purificação de BmNPV-Cath em *Escherichia coli*, além de caracterização preliminar da enzima por dicroísmo circular e estudos *in silico* para seleção de candidatos a inibidores. Em termos quantitativos, a expressão da proteína foi satisfatória, sendo que a cobertura de identificação por espectroscopia de massa correspondeu a 92,57%. No entanto, a expressão ocorreu na forma de corpos de inclusão. Dessa maneira, foi desenvolvido um protocolo de extração e purificação, composto por: tampão de lavagem, tampão de solubilização, purificação em coluna de afinidade por níquel. O protocolo desenvolvido contou, ainda, com etapa de renaturação com compostos químicos. O rendimento do protocolo desenvolvido foi de 0,43 mg.L<sup>-1</sup>. Os estudos com dicroísmo circular revelaram uma porcentagem de 21% de alfa-hélice e 22% de beta-folha, compatível com as modelagens computacionais realizadas para a BmNPV-Cath. Por meio dos estudos *in silico*, foi possível identificar três possíveis inibidores (EUFD08, EUGE09 e EUGD36). Esses resultados embasarão estudos funcionais futuros, bem como testes de inibição. Espera-se que o trabalho contribua para diminuir as perdas na sericultura em decorrência do amarelidão.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Glycine max*, fungitoxicidade, *Paracoccidioides brasiliensis*, urease embrionária, catepsina viral, amarelidão, *Bombyx mori*.

## ABSTRACT

In the biochemistry field, the structure of macromolecules has a strong relationship with their biological role in the living beings. Therefore, knowing the structure of proteins is a way to understand their functions. Thus, structural and functional studies are essential for the biotechnological use of certain proteins, as well as for the development of drugs. Structural studies can be carried out either through computational analysis or through laboratory assays, such as circular dichroism spectroscopy, functional activity studies, where the joint application of these two strategies (*in silico* and *in vitro*) is recommended.

The *in silico* studies in addition to three dimensional modeling of structures, allow the optimization of bench tests, as they can be used to select compounds with greater potential for *in vitro* and *in vivo* evaluation. Computational studies for modeling were used in the chapter 2 of this thesis, in addition, virtual screening simulations for selection of inhibitors were applied in the chapter 3.

Parallel to structural studies, it is interesting to investigate the functionality of proteins, seeking to establish a connection between structure and activity. In this thesis, enzymatic activity assays were performed, as well as antifungal activity tests (chapter 2). In the next lines, the main results and discussion from the three chapters of this thesis are presented.

Chapter 1 (Ureases: functional characterization and potential biotechnological applications). Ureases play multiple roles in vegetables, they have enzymatic as well as fungitoxic and insecticidal activities. Regarding their enzymatic activity, ureases are nickel-dependent amidohydrolases, which catalyze the hydrolysis of urea, which allows the use of this compound as a source of nitrogen. The entomotoxic action of ureases does not depend on their catalytic activity, and susceptible insects are those that make digestion by means of cathepsins. The fungitoxic activity has already been observed in different plant ureases, both for filamentous fungi and for yeast and dimorphic ones where, in general, the fungitoxic concentration occurs at micromolar levels. Among the applications of ureases, the following stand out: treatment and analysis of wastewater, removal of urea from beverages, biomineralization, kits for clinical analysis, development of drugs against fungi and in the development of

fungitoxic and entomotoxic agricultural inputs. In view of their catalytic activity, as well as their other biological functions, ureases have multiple application possibilities, being a fertile field for basic and applied studies.

Chapter 2 (Purification and characterization of embryo-specific soy urease (*Glycine max*) and its antifungal potential against *Paracoccidioides brasiliensis*). In view of the potential applications of ureases, this work aimed to extract, purify, characterize and study the fungitoxic action of embryonic soybean urease against *Paracoccidioides brasiliensis*. This fungus is the main causative agent of systemic mycosis called paracoccidioidomycosis. This disease has a high incidence in Latin America and is considered neglected by the World Health Organization. For this purpose, biochemical characterization in terms of optimum pH and temperature was performed, as well as the Michaelis and Menten apparent constant ( $K_M$ ) and the maximum velocity ( $V_{max}$ ) were determined. Urease was also identified by means of mass spectrometry and by computational modeling of its structure. The optimum pH and temperature of the enzyme obtained from the extract at purification process were 6.5 and 65 °C,  $K_M$  of 3.01 mM of urea and maximum speed of 5.93 mM.sec<sup>-1</sup>mL<sup>-1</sup>, respectively. The preliminary tests of antifungal activity were promising, resulting in a MIC of 10 µg.mL<sup>-1</sup>. According our knowledge, this work was the first to demonstrate the fungitoxic activity of urease against *P. brasiliensis*, and could be the basis of studies for the development of a cream for the treatment of cutaneous and oral manifestations of the disease.

Chapter 3 (Expression and purification of cathepsin from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus). Among the viruses that affect *Bombyx mori*, one of the most common is the nucleopolyhedrovirus (BmNPV), which causes the disease called grasserie. There are several BmNPV proteins that are related to the viral infectious cycle, including cathepsin (BmNPV-Cath). This study aimed to develop a protocol for the heterology expression and purification of BmNPV-Cath in *Escherichia coli*, in addition to preliminary characterization of the enzyme by circular dichroism and *in silico* studies for selection of candidate inhibitors. In quantitative terms, the expression of the protein was satisfactory, and the identification coverage by mass spectroscopy corresponded to 92.57%. However, the expression took place in the form of inclusion bodies. Thus, an extraction and purification protocol was developed,

consisting of: wash buffer, solubilization buffer, nickel affinity column purification. The established protocol also had a chemical refolding step which protein yield was 0.43 mg.L<sup>-1</sup>. Circular dichroism studies revealed a percentage of 21% of alpha-helix and 22% of 22% of beta-leaf, compatible with the computational modeling performed for the BmNPV-Cath. The virtual screening simulations allows to identify three inhibitor candidates named EUFD08, EUGE09 and EUGD36 which will be used in future functional and inhibition assays for the recombinant protein produced. It is expected that the work will contribute to reduce losses in sericulture due to gresserie.

KEYWORDS: *Glycine max*, fungitoxicity, *Paracoccidioides brasiliensis*, embryonic urease, viral cathepsin, gresserie, *Bombyx mori*.

ARTIGO 1 - Ureases: caracterização funcional e potenciais aplicações  
biotecnológicas

(Submetido para publicação na Revista Mundi Engenharia, Tecnologia e Gestão

ISSN: 2525-4782)

# UREASES: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

## UREASES: FUNCTIONAL CHARACTERIZATION AND POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Elisangela Andrade Angelo<sup>1</sup> 

David Fernandes de Souza<sup>2</sup> 

Flavio Augusto Vicente Seixas<sup>3</sup> 

**Resumo:** A demanda por produtos naturais tem aumentado a cada ano, com especial interesse por substâncias vegetais como proteínas, fibras e metabólitos secundários. Certas proteínas vegetais podem apresentar atividades bioativas, como é o caso das ureases. As ureases estão presentes em bactérias, fungos e plantas, sendo especialmente abundantes em leguminosas, como a soja (*Glycine max*) atuando como amidoidrolases dependentes de níquel que catalisam a hidrólise da ureia. Além desta atividade enzimática, elas apresentam outras funções biológicas, como: quimiostática, fungitóxica e entomotóxica, que foram selecionadas ao longo da evolução, a fim de contribuir para o estabelecimento de relações ecológicas e na defesa dos vegetais. Considerando o mercado consumidor de produtos naturais, bem como as possibilidades de aplicações biotecnológicas das ureases, este trabalho teve por objetivo realizar uma revisão das funções dessas proteínas, com destaque para as ureases de soja, bem como discorrer sobre algumas de suas aplicações. Em relação à comunicação, a urease desempenha efeito quimiostático nas relações mutualísticas, simbióticas e até mesmo no parasitismo. A ação entomotóxica das ureases independe de sua atividade catalítica, sendo que os insetos suscetíveis são aqueles que apresentam digestão por catepsina. A atividade fungitóxica já foi observada para diferentes ureases vegetais, podendo ser inibitória aos fungos em concentrações submicromolares. A ação antifúngica das ureases é espécie-específica, já tendo sido demonstrada para fungos filamentosos, dimórficos e leveduriformes. A soja apresenta duas isoformas principais da urease: a ubíqua, presente em todos os tecidos da planta, e a embrionária, encontrada nas sementes. Dentre as aplicações biotecnológicas das ureases destacam-se: tratamento e análise de águas residuais, remoção da ureia de bebidas, biomineralização, desenvolvimento de fármacos contra fungos e no desenvolvimento de insumos agrícolas fungitóxicos e entomotóxicos. Em vista de sua função catalítica, bem como suas outras funções biológicas, as ureases apresentam grande potencial de aplicações. No entanto, é necessária a realização de estudos para viabilizar sua aplicação em escala comercial.

**Palavras-chave:** Entomotoxicidade, fungitoxicidade, *Glycine max*.

**Abstract** The demand for natural products has increased every year, with a special interest in plant substances such as proteins, fibers and secondary metabolites. In this sense, some plant proteins may have bioactive properties, such as ureases. Ureases are present in bacteria, fungi, and plants, being especially abundant in Leguminosae, such as soybean (*Glycine max*) acting as nickel-dependent amidohydrolases that catalyze the hydrolysis of urea into CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub>. In addition to this enzymatic activity, they have other biological functions, such as chemostatic, fungitoxic, and entomotoxic, which were selected throughout evolution, in order to contribute to the establishment of ecological relationships and the defense of plants. Considering the consumer market of natural products, as well as the possibilities of biotechnological applications of ureases, this work aimed to review the functions of these proteins, with emphasis on soybean ureases, as well as discuss some of

---

<sup>1</sup> Doutoranda em Biologia Celular e Molecular (Universidade Estadual de Maringá), docente do Instituto Federal do Paraná, elisangela.angelo@ifpr.edu.br

<sup>2</sup> Mestre em Biologia Celular e Molecular, docente do Instituto Federal do Paraná, david.souza@ifpr.edu.br

<sup>3</sup> Doutor em Biofísica Molecular, docente da Universidade Estadual de Maringá, favseixas@uem.br

their applications. Regarding communication properties, urease has a chemostatic effect on mutualistic and symbiotic relationships and even on parasitism. The entomotoxic activity of ureases is independent of their catalytic activity, and insects that make digestion through cathepsin are susceptible. The fungitoxic activity has already been observed from different plant ureases, which may be inhibitory to fungi in submicromolar concentrations. The antifungal activity of ureases is species-specific, having already been demonstrated for filamentous, dimorphic, and yeast-like fungi. Soy has two main urease isoforms: the ubiquitous, present in practically all plant tissues, and the embryonic, found in seeds. Among the biotechnological applications of ureases, stand out: the treatment and analysis of wastewater, removal of urea from beverages, biomineralization, development of drugs against fungi, as well as the development of fungitoxic and entomotoxic agricultural inputs. Given their catalytic activity, as well as their other biological functions, ureases have great potential for applications. However, it is necessary to carry out studies to enable its application on a commercial scale.

**Keywords:** Entomotoxicity, fungitoxicity, *Glycine max*.

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por uma vida mais saudável e com menos impacto ao meio ambiente vem impulsionando o mercado consumidor de produtos naturais (PACHECO *et al.*, 2019). Ainda que a expressão “produtos naturais” seja polissêmica, ela pode ser compreendida como “produtos com menor interferência humana, ou advindos de substâncias vegetais” (GOMES, 2009, p.4). Tais substâncias vegetais podem ser utilizadas por seu valor nutricional, mas também por seus princípios bioativos.

Embora sejam comuns as substâncias bioativas de plantas relacionarem-se a metabólitos secundários, existem proteínas e peptídeos que apresentam múltiplas funções. Essas proteínas e peptídeos têm grande potencial para serem utilizadas no enriquecimento nutricional de produtos alimentícios, bem como no desenvolvimento de fármacos, inseticidas naturais ou produtos para a área biotecnológica e agrícola (AJESH, SREEJITH, 2009; DANG, DAMME, 2015; SALAS, *et al.*, 2015).

Dentre as proteínas vegetais com múltiplas funções, destaca-se a urease, a qual apresenta ação enzimática, atividade fungitóxica, inseticida, além de papel na comunicação vegetal (KAPPAUN *et al.*, 2018). O estudo das múltiplas funções dessa proteína pode contribuir para a compreensão das funções vegetais, bem como possibilitar sua aplicação em diferentes setores, destacando-se a área da saúde e agroindustrial.

A descoberta das ureases em vegetais ocorreu em 1909 por Takeuchi, ao estudar a soja e, desde então, descobriu-se que estas enzimas estão presentes em todos os vegetais em seus mais diversos tecidos (KRAJEWSKA, 2009). Porém, tais

enzimas são especialmente abundantes em vegetais das famílias *Fabaceae* (leguminosas), *Cucurbitaceae*, *Asteraceae* e *Pinaceae* (POLACCO *et al.*, 2013; WIEBKE-STROHM *et al.*, 2016).

Entre as leguminosas, destaca-se a soja (*Glycine max*), a qual apresenta alto teor de proteínas (cerca de 40%), sendo que a urease corresponde entre 0,2 e 0,3% das proteínas solúveis extraíveis (POLLACO *et al.* 1982; VIEIRA; CABRAL; PAULA, 1999; BRACCO *et al.*, 2019). Além disso, essa leguminosa tem uma cadeia produtiva consolidada e vários de seus subprodutos podem ser fonte para obtenção da urease.

Considerando o mercado consumidor de produtos naturais, bem como as múltiplas possibilidades de aplicação das ureases, a presente revisão tem por objetivo realizar uma caracterização funcional dessas proteínas, com destaque para as ureases de soja, bem como explicar sobre algumas de suas aplicações.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 A estrutura das ureases

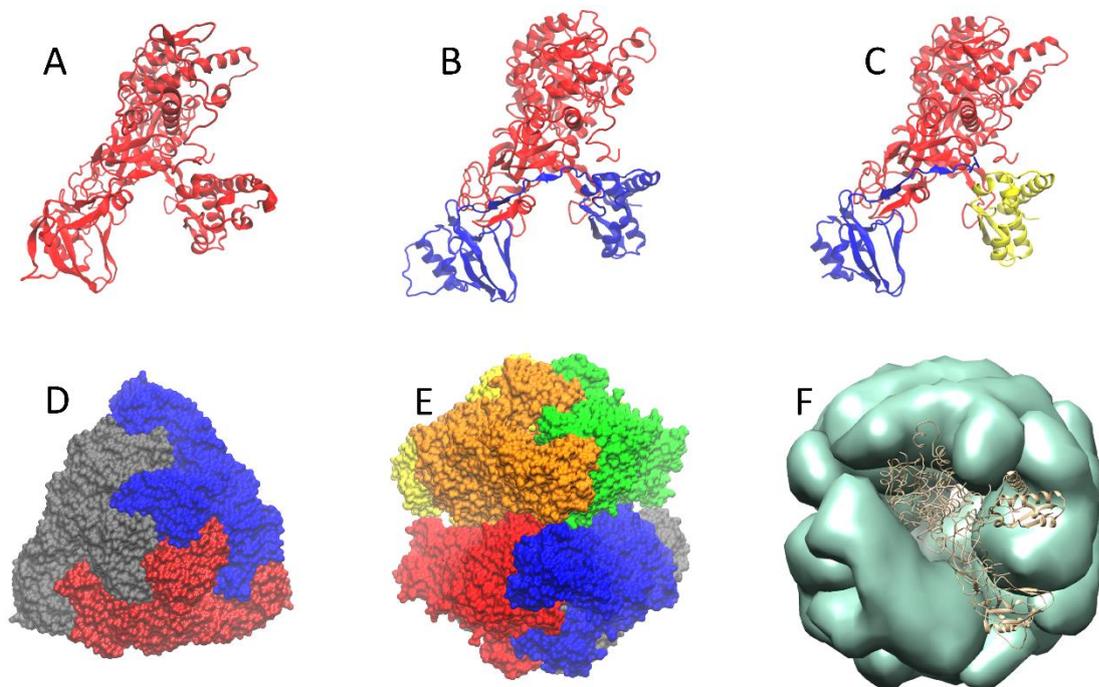
As ureases estão presentes em bactérias, fungos e vegetais, sendo que essa proteína apresenta similaridade de 55% entre as espécies, considerando as sequências primárias, o que indica ancestralidade genética comum e ação catalítica semelhante (KRAJEWSKA, 2009; KAPPAUN *et al.*, 2018).

Em bactérias, as ureases podem ser formadas por três diferentes subunidades: subunidade  $\alpha$ , com cerca de 60 a 76 kDa,  $\beta$ , 8 a 21 kDa e  $\gamma$ , com 6 a 14 kDa. As subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são codificadas pelos genes *ureC*, *ureB* e *ureA*, respectivamente. Em geral, estas subunidades formam complexos menores como dímeros ou trímeros (Figuras 1B, 1C). No entanto, em algumas poucas espécies, a forma ativa corresponde apenas à subunidade  $\alpha$  (Figura 1A) (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995; KRAJEWSKA, 2009; POSTAL, 2012; POLACCO *et al.*, 2013; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016; KAPPAUN *et al.*, 2018).

Os fungos e as plantas apresentam ureases formadas por um único tipo de cadeia com cerca de 90 kDa, a qual forma complexos hexâmeros ( $\alpha_6$ , Figura 1E) ou trímeros ( $\alpha_3$ , Figura 1D) e, mais raramente, dodecâmeros ( $\alpha_{12}$ , Figura 1F). Estas

enzimas localizam-se no citoplasma das células vegetais e fúngicas (KRAJEWSKA, 2009; POSTAL, 2012; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura tridimensional das ureases. As imagens superiores A, B e C representam as ureases bacterianas, que podem ser compostas por subunidades do tipo  $\alpha$  (vermelho, PDB id: 3la4. *Canavalia ensiformis*),  $\beta$  (azul, PDB id: 1e9z. *Helicobacter pylori*) e  $\gamma$  (amarela, PDB id: 2ubp. *Bacillus pasteurii*). As imagens inferiores representam as unidades biológicas das ureases vegetais como homotrímero (D, PDB id: 2ubp. *Bacillus pasteurii*), homo-hexâmero (E, PDB id: 3la4. *Canavalia ensiformis*) e homododecâmero (F, PDB id: 1e9z).



**Fonte:** os autores, adaptada do trabalho de CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016.

As ureases bacterianas necessitam de proteínas auxiliares para montar sua estrutura nativa, são elas UreD, UreE, UreF e UreG, as quais atuam principalmente como chaperones, GTPases, ligantes iniciais dos átomos de níquel, além de outras atividades (POLACCO *et al.*, 2013). O processo de ativação das ureases vegetais ainda necessita de estudos, no entanto, há vários trabalhos que indicam que proteínas acessórias também atuem na montagem da forma ativa (POLACCO *et al.*,

2013). Nota-se, portanto, que a estrutura tridimensional das ureases apresenta variação entre os organismos e muitas ainda carecem de elucidação (POSTAL *et al.*, 2012).

## 2.2 Atividade catalítica das ureases

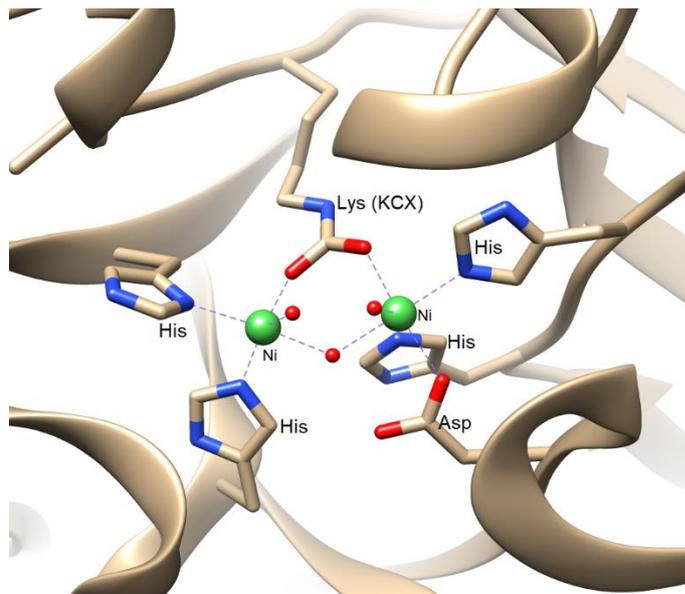
A função catalítica das ureases é conhecida há décadas, sendo que os estudos sobre essa atividade se relacionam a marcos da história da bioquímica. O aperfeiçoamento da cristalização proteica e a descoberta da natureza proteica das enzimas relacionam-se aos estudos com a urease de *Canavalia ensiformis*, o que rendeu a James B. Sumner o Prêmio Nobel de Química em 1946. Os estudos com as ureases foram essenciais para que Michaelis e Menten propusessem seus modelos matemáticos sobre a ação enzimática. A importância biológica do níquel também foi demonstrada com estudos com urease, uma vez que esse metal é essencial para a ligação do substrato e da água ao seu sítio ativo (KRAJEWSKA, 2009; REAL-GUERRA; STANISCUASKI; REGINA, 2013).

No que diz respeito a sua atividade catalítica, as ureases são amidoidrolases (EC.3.5.1.5) dependentes de níquel, pois catalisam a hidrólise do grupo amida da ureia em amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente em ambiente neutro em amônia e dióxido de carbono (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016). Em modelos computacionais teóricos, a urease é capaz de aumentar a hidrólise da ureia em até  $10^{32}$  vezes, quando comparada à degradação espontânea. No entanto, esse valor não é real, tendo em vista as limitações da difusão do substrato em meio aquoso. Os dados laboratoriais indicam que a urease aumenta a velocidade da reação por volta de  $10^{14}$ , quando comparada à decomposição espontânea da ureia (KRAJEWSKA, 2009; KAPPAUN *et al.*, 2018).

O sítio catalítico das ureases foi primeiro estudado em bactérias da espécie *Klebsiella aerogenes* (JABRI *et al.*, 1995), sendo que estudos posteriores com outras ureases demonstraram arquitetura semelhante. O sítio ativo é representado na Figura 2, ele é formado por dois átomos de níquel, os quais estabelecem ligações iônicas com quatro resíduos de histidina e um resíduo de lisina modificada. Entre os dois átomos de níquel há uma hidroxila, e a esses metais se ligam também

moléculas de água (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010; KAPPAUN *et al.*, 2018).

**Figura 2.** Representação esquemática do sítio catalítico das ureases (PDB id: 2ubp. *Bacillus pasteurii*), formados por dois átomos de níquel, os quais se ligam a quatro resíduos de histidina e uma lisina modificada.



**Fonte:** os autores.

Além do sítio ativo, outra região conservada nas ureases é uma pequena porção móvel com estrutura em hélice-volta-hélice, a qual contém resíduos de cisteína e histidina. Essa porção móvel relaciona-se a entrada do substrato, à liberação dos produtos, bem como ao processo catalítico, uma vez que seus resíduos de aminoácidos interagem com a ureia, principalmente por meio de ligações de hidrogênio, isso leva à estabilização momentânea do estado de transição (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010; KAPPAUN *et al.*, 2018).

O mecanismo catalítico mais aceito para a urease foi proposto por meio de estudos recentes (KAPPAUN *et al.*, 2018), principalmente envolvendo o uso de inibidores e modelos computacionais. De acordo com esse mecanismo, após a

interação com a região móvel, a ureia passa a ocupar o local das moléculas de água ligadas aos átomos de níquel no sítio ativo. A ligação da ureia com o primeiro átomo de níquel torna seu carbono mais suscetível ao ataque nucleofílico. O segundo átomo de níquel se liga a ureia por meio do nitrogênio que compõe seu grupamento amino, o que facilita a ação da água e resulta na formação de uma amônia e um carbamato. Ainda há controvérsias quanto aos detalhes de como ocorreria o ataque nucleofílico, bem como a transferência de prótons, que levam à formação dos produtos, os quais são liberados com a abertura da região móvel.

A função catalítica da urease permite que os organismos que apresentam essa enzima utilizem a ureia como fonte de nitrogênio. Além disso, em determinadas bactérias, a atividade catalítica da urease relaciona-se aos mecanismos de virulência e patogenicidade. Nas bactérias relacionadas à infecção urinária, por exemplo, a ação da urease torna o meio mais básico, o que favorece a precipitação de cristais de sais, além de resultar em amônia e outros derivados tóxicos aos tecidos (MORALES-CRUZ *et al.*, 2018). Estudos com mutantes de *Proteus mirabilis* mostraram que as cepas com urease ativa são mais virulentas do que aquelas com esse gene silenciado (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). Em *Helicobacter pylori*, a ação enzimática da urease leva a formação de amônia, que neutraliza parte da acidez do suco gástrico e contribui para que a bactéria resista ao baixo pH presente no estômago (BECKER-RITT *et al.*, 2007).

Em relação aos vegetais, a função catalítica das ureases tem importante papel nutricional no aproveitamento da ureia como fonte de nitrogênio para a planta. Esse substrato pode ter origem tanto do metabolismo interno vegetal, quanto ser utilizado como um fertilizante. Dessa maneira, quando a ureia é utilizada como fonte de nutrientes, a biodisponibilidade de nitrogênio depende da ação de ureases, tanto de origem vegetal, quanto originária da microbiota do solo (BECKER-RITT *et al.*, 2007; WESSÉN *et al.*, 2010; FISHER; YARWOOD; JAMES, 2017).

Estudos na área agrícola, tais como o de Fisher, Yarwood e James (2017), têm contribuído para compreender o papel catalítico da urease na biodisponibilidade dos adubos nitrogenados usados nas lavouras, o que pode ter alto impacto econômico. Tais estudos se concentram tanto na pesquisa das ureases vegetais, quanto nas de origem microbiana presentes no solo.

## **2.3 Ureases vegetais: atividades não catalíticas**

Estudos do início dos anos 2000 indicam uma nova faceta das ureases vegetais, relacionada ao seu papel quimiostático, atividade tóxica contra fungos, contra insetos e até mesmo contra células de mamíferos. Destaca-se que essas atividades tóxicas independem da atividade catalítica dessa enzima (FOLLMER *et al.*, 2001; KAPPAUN *et al.*, 2018).

### **2.3.1 Atividade quimiostática das ureases**

Em relação à comunicação entre os vegetais e outros seres vivos, a urease desempenha efeito quimiostático nas relações mutualísticas, simbióticas e até mesmo no parasitismo (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

De acordo com estudos sobre quimiotaxia realizados por Medeiros-Silva *et al.* (2014), a urease produzida pela soja serviu como fator de reconhecimento para a bactéria simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*, durante o processo de nodulação das raízes desta leguminosa.

Carlini e Polacco (2008) estudaram o efeito da urease de *Bacillus pasteurii* no solo, após a lise da célula bacteriana. Estes autores notaram que a urease de *B. pasteurii* permanecia ativa no solo e induzia as células das raízes a produzirem compostos que influenciavam toda a estrutura ecológica de microrganismos da rizosfera.

A compreensão da atividade quimiostática da urease pode contribuir para utilização racional de fertilizantes, bem como no manejo integrado agrícola, considerando-se a micro-rizosfera dos vegetais.

### **2.3.2 Atividade entomotóxica das ureases**

As plantas são alvos comuns de insetos herbívoros e fungos patogênicos. No decorrer de sua evolução, foram selecionadas várias substâncias derivadas do metabolismo vegetal que apresentam ação inseticida e fungitóxica, sendo, portanto, uma forma de defesa (NG, 2004; POSTAL *et al.*, 2012; DANG; VAN DAMME, 2015).

A atividade inseticida das ureases foi descrita pela primeira vez em 1997, para a isoforma denominada canatoxina, presente na leguminosa *C. ensiformis*

(CARLINI *et al.*, 1997). Posteriormente, a atividade entomotóxica foi descrita para ureases de soja e outras ureases de *C. ensiformis* (FOLLMER *et al.*, 2001).

A ação inseticida das ureases de planta independe de sua atividade enzimática, pois mesmo quando o sítio ativo é inativado com o uso de um inibidor, a proteína continua a exibir efeito entomotóxico. De acordo com os estudos já realizados, as ureases vegetais são tóxicas para insetos que apresentem a digestão que envolva enzimas do tipo catepsina, tais como as espécies *Callosobruchus maculatus* (caruncho-do-feijão), *Nezara viridula* (percevejo-da-soja); *Dysdercus peruvianus* (percevejo manchador do algodoeiro) e *Rhodnius prolixus* (barbeiro). Estes insetos foram vulneráveis à ação da urease na concentração de 0,01 a 0,2% (p/p). As enzimas catepsinas agem sobre as ureases vegetais resultando em polipeptídeos com cerca de 10 kDa, denominados pepcanatox. Em insetos que apresentam digestão baseada em enzimas do tipo trispsina, a região pepcanatox não permanece íntegra e, por isto, não ocorre a ação entomotóxica (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013).

De acordo com estudos de Carlini, Ligabue-Braun (2016), a ação entomotóxica da urease e de seus polipeptídeos derivados ocorre, principalmente, devido à formação de poros na membrana celular e ação neurotóxica. Grande parte do conhecimento sobre a ação dos polipeptídeos derivados da urease deve-se ao estudo com o polipeptídeo recombinante denominado Jaburetox-2Ec, o qual equivale a um pepcanatox de *C. ensiformis*.

A ação neurotóxica do Jaburetox-2Ec contra insetos foi também estudada por Santos *et al.* (2019). Essa pesquisa indicou que a aplicação desse peptídeo em doses subletais nas espécies *Nauphoeta cinerea* e *Locusta migratoria* alterou o comportamento locomotor dos insetos, por ter induzido bloqueio neuromuscular, relacionado ao funcionamento dos canais de sódio voltagem dependentes.

Destaca-se que, além da ação entomotóxica, a urease de *C. ensiformis* também é tóxica para mamíferos, quando administrada via intraperitoneal (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016). De acordo com estudos de Carlini e Guimarães (1981), a canatoxina é letal para camundongos e ratos, com uma  $DL_{50}$  de 2-5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . A atividade neurotóxica da urease de *C. ensiformis* também foi estudada por meio de sua aplicação direta no hipocampo de roedores (ALMEIDA *et al.*, 2021). No entanto,

esta atividade tóxica para mamíferos não é observada quando a administração é feita por via oral, devido à digestão da proteína.

### 2.3.3 Atividade fungitóxica das ureases

A atividade fungitóxica já foi observada em diferentes ureases vegetais. Nota-se que esta ação é espécie-específica, ocorrendo variação tanto relacionada à planta da qual se obtém a enzima (espécie, órgão e período do desenvolvimento), quanto da espécie de fungo (POSTAL, 2012). Há estudos comprovados de ação tóxica de ureases e seus polipeptídeos tanto para fungos filamentosos quanto para leveduriformes e dimórficos. Entre os filamentosos, *Ascomycota* e *Basidiomycota* têm-se mostrado mais sensíveis às ureases (BECKER-RITT *et al.*, 2007).

Em geral, a concentração fungitóxica das ureases ocorre em níveis micromolares, o que demonstra que estas enzimas são da ordem de duas a três vezes mais potentes do que outras proteínas fungitóxicas de origem vegetal (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

Oliveira *et al.* (1999) foram os primeiros a pesquisar a ação fungitóxica das ureases. Eles estudaram a urease canatoxina de *C. ensiformis*, e demonstraram que 1 mg desta enzima é capaz de inibir o crescimento de fungos fitopatógenos das espécies *Macrophamina phaseolina*, *Sclerotium rofstii* e *Colletotrichum gloesporioides*.

Becker-Ritt *et al.* (2007) demonstraram que a ação fungitóxica das ureases independe de sua atividade enzimática. Estes autores realizaram estudos com urease bacteriana (*H. pylori*) e com ureases vegetais provenientes *G. max* e de *C. ensiformis*. Para inativar a capacidade enzimática, eles utilizaram r-hidroxi-mercuribenzoato, o qual se liga irreversivelmente a resíduos do sítio ativo. Embora a urease bacteriana também tenha apresentado ação fungitóxica, as ureases vegetais apresentaram maior atividade ao inibirem o crescimento e/ou germinação dos esporos em concentrações submicromolares (0,57 µM). Neste estudo, as ureases vegetais foram tóxicas para as seguintes espécies de fungos filamentosos: *Curvularia lunata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium herquei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma pseudokoningii* e *Colletotrichum musae*.

Balasubramanian *et al.* (2013) estudaram a ação fungitóxica da urease inativada de *Cajanus cajan*. A inibição do crescimento das hifas foi comprovada para as espécies de *Colletotrichum* sp, *C. lunata*, *Fusarium moniliforme* e *Macrophomina phaseolina* em testes por disco difusão, com 40 µg da enzima. A germinação dos esporos foi inibida para *C. lunata*, *Fusarium moniliforme*, *Botrytis* sp e *F. oxysporum*.

Postal *et al.* (2012) estudaram o efeito tóxico de ureases inativadas de *C. ensiformis* contra leveduras. Estes pesquisadores observaram redução na contagem de unidades formadoras de colônias, após a exposição das leveduras por 24 horas à urease (0,36 mM). As espécies de leveduras inibidas foram *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens* e *Saccharomyces cerevisiae*.

O mecanismo de ação das ureases sobre as células fúngicas ainda carece de estudos. Até o momento, as ureases estudadas não apresentaram ação quitinase, o que poderia explicar os danos causados à parede dos fungos e, assim, explicar a toxicidade (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016). Provavelmente, tais danos relacionam-se a outros componentes da parede fúngica e não à quitina.

De acordo com micrografias eletrônicas dos estudos de Becker-Ritt *et al.* (2007), o tratamento com urease de *C. ensiformis* resultou em danos na parede celular e na membrana celular do fungo *P. herquei*, com consequente plasmólise. Este estudo foi o primeiro a demonstrar a ação das ureases sobre a membrana celular dos fungos.

Os trabalhos de Postal (2012) demonstraram que a permeabilidade celular em leveduras aumentava, quando estas eram tratadas com urease de *C. ensiformis*. Neste mesmo trabalho, observou-se que o tratamento com baixas concentrações de urease (0,09 µM) resultou em alterações no metabolismo energético, bem como a formação de pseudohifas, semelhante ao que ocorre em situações de estresse ambiental. Esse estudo sugere que a urease interfere no transporte de hidrogênio, o qual se acumularia no interior das células da levedura, levando à alteração fenotípica. Estudos anteriores de Ribeiro *et al.* (2007) também encontraram resultados semelhantes ao testar polipeptídeos de origem vegetal e sua ação sobre leveduras.

De acordo com os estudos de Postal *et al.* (2012), a atividade antifúngica da urease de *C. ensiformes* é 2 a 3 vezes mais potente do que o polipeptídeo recombinante Jaburetox-2Ec. Estes dados indicam que haveria um domínio fungitóxico nas ureases, além daquele entomotóxico presente em Jaburetox-2Ec.

A respeito da diferença de susceptibilidade fúngica às ureases, Becker-Ritt *et al.* (2007) levantam a hipótese de que a susceptibilidade estaria relacionada a composição de carboidratos da parede do fungo. Esta hipótese baseia-se em estudo anterior (ALMEIDA *et al.*, 2000) com proteínas do tipo defensina, as quais se ligam a alvos específicos da parede celular do fungo, sendo a maioria destes pontos de ligações regiões compostas por carboidratos.

## **2.4 Ureases de soja**

As atividades não-catalíticas das ureases vegetais apontam para a possibilidade de desenvolvimento de fármacos e inseticidas naturais com base nessa proteína. Entre as plantas que apresentam potencial para o desenvolvimento desses produtos, pode-se citar a soja, a qual apresenta cadeia produtiva já consolidada. Além disso, assim como outras leguminosas, a soja apresenta quantidade significativa dessa proteína, o que pode facilitar sua extração e aplicação.

A soja apresenta duas isoformas principais de ureases: a embrionária e a ubíqua. Estudos com o cDNA demonstraram alta similaridade (92%) e identidade (87%) entre as duas isoformas (REAL-GUERRA; STANISCUASKI; REGINA, 2013).

A urease embrionária é encontrada apenas nas sementes da soja e é sintetizada a partir do gene *Eu1*. Observa-se que as sementes de soja não crescem bem em presença de ureia externa, por questões de pH; além disto, há indícios de que as ureases embrionárias não são tão eficientes, em termos catalíticos, quanto a isoforma ubíqua. Tendo em vista estas características, muitos autores sugerem que a urease embrionária relaciona-se muito mais à defesa da planta do que ao aproveitamento da ureia. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que mudas com deficiência nesta enzima em específico são mais susceptíveis a infecção por fungos (TORISKI; POLACCO, 1990; REAL-GUERRA; STANISCUASKI; REGINA, 2013).

Becker-Ritt *et al.* (2007) pesquisaram a atividade fungitóxica da urease embrionária para várias espécies de fungos patogênicos a vegetais, a saber: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp.*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride*, *Penicillium sp.*, *Colletotrichum musae*, *Curvularia lunata*, *Penicillium herquei*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus glaucus*. Nessa pesquisa, a urease suprimiu o crescimento da micela e/ou inibiu o desenvolvimento dos esporos fúngicos, das seguintes espécies: *C. lunata*, *F. solani*, *P. herquei*, *T. pseudokoningii*, *Trichoderma sp* e *T. viride*. A proteção dada pela urease embrionária envolveria tanto a molécula inteira, como polipeptídeos tóxicos gerados a partir da mesma.

Em trabalho realizado com urease embrionário de soja contra *Paracoccidioides brasiliensis*, essa proteína apresentou-se promissora no controle desse fungo patogênico humano, sendo um apontamento importante de sua ação também contra fungos dimórficos (ANGELO *et al.*, 2021).

A urease ubíqua é encontrada em todos os tecidos da soja, inclusive na semente, porém no embrião ela representa apenas 0,001 a 0,01% da concentração de ureases, a qual corresponde a 0,012% (peso seco) (BECKER-RITT *et al.* 2007; KRAJEWSKA, 2009). A urease ubíqua da soja é transcrita a partir do gene *Eu4*; esta isoforma apresenta maior eficiência enzimática na conversão do substrato. Além disto, também há indícios de que essa enzima desempenhe atividade protetora contra fungos e insetos (REAL-GUERRA; STANISCUASKI; REGINA, 2013; TORISKI; POLACCO, 1990).

Martinelli *et al.* (2017) estudaram o efeito antibacteriano e antifúngico da urease ubíqua da soja, obtida por clonagem gênica. A enzima não apresentou efeito antibacteriano contra as espécies testadas (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). No entanto, a urease ubíqua afetou tanto o crescimento micelar quanto a viabilidade dos fungos das espécies *Curvularia lunata*, *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum*, *P. expansum*, *P. herquei* e *Trichoderma viride*, em uma concentração de 0,24 mg.mL<sup>-1</sup>. Essa mesma concentração foi capaz de inibir a contagem de Unidades Formadoras de Colônia das leveduras *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Nos fungos filamentosos, a urease provocou alterações no metabolismo secundário relacionado a produção de

pigmentos, os quais se relacionam a vários mecanismos fúngicos de defesa. Já nos fungos leveduriformes, a urease ubíqua levou à formação de pseudohifas, o que pode indicar possível estresse metabólico.

Kappaun (2014) clonou um peptídeo derivado da urease ubíqua de soja, denominado soyuretox, o qual apresenta 72% de identidade com o peptídeo Jaburetox-2Ec, de *C. ensiforme*. A atividade fungitóxica de soyuretox foi comprovada contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Sacharomyces*, as quais tiveram sua multiplicação inibida com concentrações de 9 e 18  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Assim como ocorre com Jaburetox-2Ec, soyuretox demonstrou dados variáveis de massa molecular e oligomerização o que, de acordo com o estudo, sugere que pelo menos parte desse peptídeo apresenta estrutura desordenada. No entanto, não foram feitos testes para comprovar sua conformação.

Com o sequenciamento do genoma da soja, descobriu-se uma terceira isoforma, denominada SBU-3, codificada pelo gene *Eu5*. Esta isoforma apresenta mutação no sítio ativo e pouca atividade enzimática, cerca de 2 a 10% da atividade da urease ubíqua (REAL-GUERRA; STANISCUASKI; REGINA, 2013).

De acordo com os trabalhos de Wiebke-Strohm *et al.* (2016) a urease SBU-3 apresenta maior similaridade com a isoforma embrionária e pode ser identificada em organismos específicos, em determinadas fases do desenvolvimento, tais como: sementes após um dia da quebra de dormência, raízes de plantas jovens e vagens em desenvolvimento com semente. Quando comparada a outras ureases de soja, SBU-3 é expressa em menor quantidade, o que explica sua não identificação durante tantos anos de estudo sobre a soja.

## **2.5 Potenciais aplicações das ureases**

Considerando suas múltiplas funções, as ureases apresentam grande potencial para aplicação biotecnológica no desenvolvimento de fármacos, na agroindústria e na construção civil.

Na área biotecnológica, vem se destacando os estudos de desenvolvimento de sensores com base na atividade da urease (PUNDIR *et al.*, 2019). Tais sensores podem ser utilizados para medir a ureia no tratamento de água residuais (RODRIGUEZ; BOLBOT; TOTHILL, 2004), nos estudos sobre a biodisponibilidade

de compostos nitrogenados no solo (RODRIGUEZ; BOLBOT; TOTHILL, 2004) e em exames laboratoriais (KUMAR; DWEVEDI; KAYASTHA, 2009).

Bzura e Koncki (2019) desenvolveram um sensor bioanalítico para ureia com base na urease, voltado para extratos aquosos vegetais, obtendo resultados com alta sensibilidade e com limites de detecção melhor do que os ensaios padrões de laboratório.

Remiszewska *et al.* (2019) desenvolveram um sistema de microanálise para a determinação de ureia, com base na imobilização da urease. Esse sistema foi testado com culturas de células, com vistas a desenvolver um sistema em miniatura, o que facilitaria a aplicação em análises clínicas e determinadas pesquisas laboratoriais. O trabalho conseguiu resultados compatíveis com exames comerciais, utilizando volumes de lisados de células de apenas 1  $\mu\text{L}$ .

Outra área biotecnológica com potencial aplicação da urease é a indústria de bebidas. A presença de ureia nas bebidas alcólicas é indesejável por ser um precursor do carbamato de etila, um potencial agente cancerígeno. A ureia presente nesses produtos deriva do metabolismo das leveduras, como um subproduto do catabolismo da arginina. A utilização de urease tem se mostrado como uma estratégia promissora para a eliminação da ureia dessas bebidas, sendo necessários estudos com diferentes ureases, pois cada bebida tem características organolépticas únicas, o que pode necessitar da ação catalítica de enzimas de diferentes fontes (LIU *et al.*, 2011; FIDALEO, TAVILLI, 2021).

Em relação ao desenvolvimento de fármacos, há duas abordagens que se destacam em relação às ureases: 1) o estudo dessas proteínas como alvo, no caso de bactérias patogênicas (SIKRI *et al.*, 2019), 2) utilização da urease e/ou de peptídeos derivados como possível princípio ativo de medicamento antifúngico para tratar doenças humanas e/ou de outros animais (POSTAL, 2012, MARTINELLI *et al.*, 2017; ANGELO *et al.*, 2021).

O potencial fungitóxico e entomotóxico das ureases vegetais também pode ser explorado na área agrícola, sendo que já existem vários estudos a esse respeito (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016; KAPPAUN *et al.*, 2018). Esses estudos têm demonstrado ação fungitóxica das ureases vegetais em concentrações micromolares e, em alguns casos, até mesmo submicromolares.

Outro campo de aplicação das ureases é na construção civil. A ação catalítica da urease na natureza contribui para aumento do pH, o que leva à biomineralização do carbonato de cálcio. A biomineralização pode ser utilizada na construção civil, o que facilita o processo de cimentação, reforço e consolidação de solo/areia e restauração de estruturas. Embora seja uma área recente, os estudos de aplicação da urease para biomineralização na construção civil tem-se mostrado promissores (KRAJEWSKA, 2018; NETHING *et al.*, 2020).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As ureases desempenharam importante papel na história da bioquímica, sendo que seu papel catalítico já é conhecido há décadas. Entretanto, apenas em meados dos anos 2000, foram descobertas outras atividades das ureases, com destaque para quimiotaxia, entomotoxicidade e fungitoxicidade. Nota-se, portanto, que as ureases apresentam múltiplas possibilidades de aplicação, sendo um campo fértil para estudos aplicados. No entanto, ainda existem lacunas sobre a forma de ação fungitóxica das ureases que necessitam ser esclarecidas para maximizar a sua ação e, com isso, possibilitar seu uso comercial.

Há que se considerar, ainda, que, estudos de base também são promissores para as ureases, pois embora sejam estudadas há décadas, alguns pontos específicos sobre sua estrutura e funcionamento catalítico ainda carecem de elucidação.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJESH, K.; SREEJITH, K. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. **Peptides**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 999-1006, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.026>.

ALMEIDA, M. S. *et al.* Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 278-286, 2000. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1824>Get rights and content.

ALMEIDA, C. G. M. *et al.* Neurotoxic and convulsant effects induced by jack bean ureases on the mammalian nervous system. **Toxicology**, [S.L.], v. 454, p. 152737, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2021.152737>.

ÂNGELO, E. A. *et al.* Purification and characterization of embryo-specific soy urease (*Glycine max*) and its antifungal potential against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eclética Química Journal**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 41-52, 29 abr. 2021. Eclética Química Journal. <http://dx.doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v46.1si.2021.p41-52>.

BALASUBRAMANIAN, A. *et al.* Structural and functional studies on urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*). **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 58, p.301-309, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.055>.

BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 400, n. 3, p.274-283, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.009>.

BECKER-RITT, A. B. *et al.* Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, [s.l.], v. 50, n. 7, p.971-983, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.008>.

BRACCO, L. F. *et al.* Covalent immobilization of soybean seed hull urease on chitosan mini-spheres and the impact on their properties. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 18, p.101093-1011104, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101093>.

BZURA, J.; KONCKI, R. A mechanized urease activity assay. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 123, p.1-7, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.01.001>.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin. **Toxicon**, S/l, v. 19, n. 15, p.667-675, 1981. <http://dx.doi.org/0041-0101/81/050667-08>

CARLINI, C. R; POLACCO, J. A. Toxic Properties of Urease. **Crop Science**, S/L, v. 48, p. 1665-1672, 2008. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.10.0576>

CARLINI, C.. R. *et al.* Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 2, p. 340-348, 1997. <https://doi.org/10.1093/jee/90.2.340>

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, [s.l.], v. 110, p.90-109, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.020>.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin. **Toxicon**, S/l, v. 19, n. 15, p.667-675, 1981. <http://dx.doi.org/0041-0101/81/050667-08>.

DANG, L.; VAN DAMME, E. J. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 117, p.51-64, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>.

FIDALEO, M.; TAVILLI, E. Urea removal in rosé and red wines by immobilised acid urease in a packed bed reactor. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 126, p. 42-50, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2020.12.008>.

FISHER, K. A.; YARWOOD, S. A.; JAMES, B. R.. Soil urease activity and bacterial ureC gene copy numbers: Effect of pH. **Geoderma**, [s.l.], v. 285, p.1-8, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.09.012>.

FOLLMER, C. *et al.* Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 360, n. 1, p.217-224, 15 nov. 2001. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3600217>.

GOMES, A. N. O novo consumidor de produtos naturais: consumindo conceitos muito mais do que produtos. In: ENCONTRO ESPM DE COMUNICAÇÃO E MARKETING, 3., 2009, São Paulo. **Central de Cases**. São Paulo: Espm, 2009. p. 1-11. Disponível em: [https://pesquisa.espm.br/wp-content/uploads/2020/08/o\\_novo\\_consumidor\\_de\\_produtos\\_naturais.pdf](https://pesquisa.espm.br/wp-content/uploads/2020/08/o_novo_consumidor_de_produtos_naturais.pdf). Acesso em: 10 out. 2021.

JABRI, E. *et al.* The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science**, [s.l.], v. 268, n. 5213, p.998-1004, 19 maio 1995. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.7754395>.

KAPPAUN, K. **Clonagem e expressão da urease da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* FP2 e do peptídeo soyuretox, derivado da urease ubíqua de soja (*Glycine max*)**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia da Ufrgs, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/117881>.

KAPPAUN, K. *et al.* Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. **Journal Of Advanced Research**, [s.l.], v. 13, p.3-17, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 59, n. 1-3, p.9-21, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>.

KRAJEWSKA, B. Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. **Journal Of Advanced Research**, [s.l.], v. 13, p.59-67, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.009>.

KUMAR, S.; DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 58, n. 1-4, p.138-145, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.006>.

LIU, J. *et al.* Optimization production of acid urease by *Enterobacter* sp. in an approach to reduce urea in Chinese rice wine. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.651-657, 6 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-011-0643-7>.

MARTINELLI, A. H. S. *et al.* Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 53, p.245-258, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.003>.

MEDEIROS-SILVA, M. *et al.* Soybean ureases, but not that of *Bradyrhizobium japonicum*, are involved in the process of soybean root nodulation. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 16, p.3517-3524, 9 abr. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf5000612>.

MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, Michael D.; HAUSINGER, Robert P.. Molecular Biology os Microbial Ureases. **Microbiological Reviews**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 451-480, set. 1995. <https://doi.org/10.1128/MR.59.3.451-480.1995>.

MORALES-CRUZ, M. *et al.* *Proteus vulgaris* - Pt electrode system for urea to nitrogen conversion in synthetic urine. **Bioelectrochemistry**, [s.l.], v. 122, p.206-212, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.03.017>.

NETHING, C. *et al.* A method for 3D printing bio-cemented spatial structures using sand and urease active calcium carbonate powder. **Materials & Design**, [S.L.], v. 195, p. 109032, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109032>.

NG, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1215-1222, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.012>.

OLIVEIRA, A. E. A. *et al.* The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L). DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 1, p. 59-62, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000100008>.

PACHECO, P. H. B. *et al.* As vertentes do consumo sustentável: um estudo comparativo entre consumidores com formação ambiental e consumidores em geral. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 177, 13 fev. 2019. Associação Pro-Ensino Superior em Novo Hamburgo. <http://dx.doi.org/10.25112/rgd.v16i1.1296>.

POLACCO, J. C. *et al.* Opinion – Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. **Plant Science**, [s.l.], v. 199-200, p.79-90, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.010>.

POLACCO, J. C. *et al.* A Soybean Seed Urease-Null Produces Urease in Cell Culture. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 69, n. 5, p. 1233-1240, 1 maio 1982. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.69.5.1233>.

POSTAL, M. **Propriedades antifúngicas da urease de *Canavalia ensiformis***. 2012. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/69697>.

POSTAL, M. *et al.* Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.22-32, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010>.

PUNDIR, C.S. *et al.* Determination of urea with special emphasis on biosensors: a review. **Biosensors And Bioelectronics**, [S.L.], v. 123, p. 36-50, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.067>.

REAL-GUERRA, R.; STANISCUASKI, F.; REGINA, C. Soybean Urease: Over a Hundred Years of Knowledge. **A Comprehensive Survey Of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy And Nitrogen Relationships**, [s.l.], p.317-339, 2 jan. 2013. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/52106>.

REMISZEWSKA, E. *et al.* Enzymatic method of urea determination in LTCC microfluidic system based on absorption photometry. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [S.L.], v. 285, p. 375-384, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.032>.

RIBEIRO, S. F. *et al.* Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.600-611, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.05.005>

RODRIGUEZ, B. B.; BOLBOT, J. A; TOTHILL, I. Urease glutamic dehydrogenase biosensor for screening heavy metals in water and soil samples. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 380, n. 2, p.284-292, 5 ago. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2704-0>.

SALAS, C. E. *et al.* Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2015, p. 1-11, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/102129>.

SANTOS, D. S. dos *et al.* Jaburetox, a natural insecticide derived from Jack Bean Urease, activates voltage-gated sodium channels to modulate insect behavior. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 153, p. 67-76, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.11.003>.

TORISKY, R. S.; POLACCO, J. C.. Soybean roots retain the seed urease isolyse synthesized during embryo development. **Plant Physiol**, S.L., v. 94, n. 1, p. 681-689, maio 1990. <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.681>

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**: Brasília, v. 34, n. 7, p. 1277-1283, jul. 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000700021>.

WESSÉN, E. *et al.* Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.193-200, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.003>.

WIEBKE-STROHM, B. *et al.* Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 101, p.96-104, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.023>.

ARTIGO 2 - Purification and characterization of embryo-specific soy urease (*Glycine max*) and its antifungal potential against *Paracoccidioides brasiliensis*.

(Publicado em: Eclética Química Journal, vol. 46, special issue 1, 2021, 41-52. ISSN: 1678-4618. DOI: 10.26850/1678-4618eqj.v46.1SI.2021.p41-52)

## Purification and characterization of embryo-specific soy urease (*Glycine max*) and its antifungal potential against *Paracoccidioides brasiliensis*

Elisângela Andrade Ângelo<sup>1</sup>, Tainá Michelle da Cruz<sup>2</sup>, José Renato Pattaro Júnior<sup>2</sup>, Daniele Maria Zanzarin<sup>3</sup>, Franciele Abigail Vilugron Rodrigues<sup>4</sup>, Eduardo Jorge Pilau<sup>3</sup>, Érika Seki Kioshima<sup>4</sup>, Maria Aparecida Fernandez<sup>5</sup>, Flavio Augusto Vicente Seixas<sup>2+</sup>

1. Federal Institute of Paraná, Biology laboratory, Umuarama, Brazil.
2. State University of Maringá, Department of Technology, Umuarama, Brazil.
3. State University of Maringá, Department of Chemistry, Maringá, Brazil.
4. State University of Maringá, Department of Clinical Analysis and Biotechnology, Maringá, Brazil.
5. State University of Maringá, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology, Maringá, Brazil.

**+Corresponding author:** Flavio Augusto Vicente Seixas, **Phone:** +55 44 3621-9300, **Email address:** favseixas@uem.br

### ARTICLE INFO

Article history:

**Received:** June 01, 2020

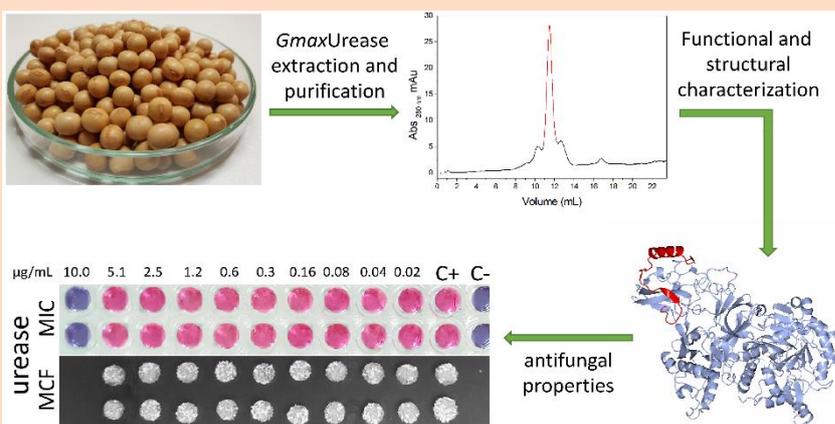
**Accepted:** October 26, 2020

**Published:** April xx, 2021

Keywords

1. urease
2. *Glycine max*
3. fungitoxic
4. *Paracoccidioides brasiliensis*

**ABSTRACT:** Ureases are amidohydrolases that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbamate. In addition to the enzymatic function, ureases have fungitoxic and insecticidal function, which are independent of their catalytic activity. Soy (*Glycine max*) has two main urease isoforms: ubiquitous and embryo-specific, the latter is present in beans. In view of the potential applications of ureases, this work aimed to extract, purify, characterize the structure, activity and fungitoxic activity of soy urease against *Paracoccidioides brasiliensis*. The biochemical characterization was performed, in terms of optimal pH and temperature, as well as the determination of the Michaelis–Menten constant ( $K_M$ ) and maximum velocity ( $V_{max}$ ). The protein sequence was identified by mass spectrometry and used in computational modeling of the biological structure. The optimum pH and temperature of the enzyme were 6.5 and 65 °C, respectively,  $K_M$  526 mmol L<sup>-1</sup> and  $V_{max}$  7.4 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>·μg<sub>urease</sub><sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> and biological unity as a trimer. The antifungal activity assays (*in vitro*) were promising, showing a fungicidal profile of the urease, with a minimum inhibitory concentration of 10 μg·mL<sup>-1</sup>. This work demonstrated, for the first time, the fungitoxic activity of embryo-specific soy urease against the Pb18 strain of *P. brasiliensis*.



After purification and structural-functional characterization, the embryo-specific soybean urease shows antifungal properties against *Paracoccidioides brasiliensis*.

## 1. Introduction

Ureases are nickel-dependent amidohydrolases (EC.3.5.1.5) that catalyze the breakdown of the urea amide group into ammonia and carbamate, which decomposes spontaneously in a neutral environment to ammonia and carbon dioxide<sup>1,2</sup>. Ureases are present in bacteria, fungi and vegetables, but are absent in animals<sup>3</sup>. Vegetable ureases play an important role in using urea as a source of nitrogen for the plant. This substrate can originate both from the internal plant metabolism and from an external source, when used as a fertilizer. This substrate can originate either from the internal plant metabolism or from external source when used as fertilizer. In the latter situation, urea is used as nitrogen source, and it can be directly absorbed by the plant or may be used in the form of ammonia or nitrate. When absorbed in the form of ammonia, urea is hydrolyzed outside the plant by ureases present in the soil, which can be of either from vegetable or microbial origin. When absorbed as nitrate, the ammonia hydrolyzed from urea is converted into nitrate by microorganisms present in the soil<sup>4-6</sup>.

The discovery of ureases in vegetables occurred in 1909 by Takeuchi, when studying soybeans, since then, it was discovered that these enzymes are present in all vegetables, in their most diverse tissues<sup>6</sup>. However, such enzymes are especially abundant in vegetables of the families Fabaceae (vegetables), Cucurbitaceae, Asteraceae and Pinaceae<sup>7,8</sup>. The soy (*Glycine max*) has three urease isoforms: ubiquitous, embryo-specific and SBU-3. Ubiquitous urease is found in the various tissues of soy, while embryo-specific urease is found only in the seed and SBU-3 is found in small amounts, at specific moments of plant development<sup>7</sup>.

More recent studies indicate a new property of plant ureases, related to its toxic role against fungi and insects. It is noteworthy that these toxic activities do not depend on the catalytic activity of this enzyme<sup>3,9</sup>. Due to this property, plant ureases have come to be considered multi proteins<sup>2</sup>, and studies have been carried out in order to explore their fungitoxic<sup>10,11</sup> and entomotoxic potential<sup>12</sup>. Regarding the fungitoxic potential, studies are mainly focused on phytopathogenic filamentous fungi, such as species from the genera *Fusarium* and *Penicillium*<sup>2,3</sup>. There are also some studies with pathogenic mammalian yeasts, such as those of the genus *Candida*<sup>10,13</sup>. However, there are no studies with dimorphic fungi pathogenic to humans, such as *Paracoccidioides brasiliensis*.

*Paracoccidioides brasiliensis* is one of those responsible for causing paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic systemic mycosis in Latin

America, frequent in Brazil, Argentina, Colombia and Venezuela. This dimorphic fungus is common at filamentous form in the environment, especially in the soil. Hyphae may contain propagating-infective structures (microconidia) that become yeast-like when inhaled. This form multiplies in the body, causing pathogenesis, which can compromise the functions of several systems, especially the respiratory system<sup>14,15</sup>. In the chronic form, lesions on the oral mucosa, lymph node involvement and, rarely, dermatological lesions may be observed<sup>16</sup>. It is estimated that 10 million people in Latin America are infected by *Paracoccidioides* spp., with 1–2% presenting clinical manifestations<sup>17</sup>. Brazil has a high incidence of PCM and annual estimates of its occurrence vary from 0.71 to 3.7 cases for every 100,000 inhabitants. However, there are Brazilian regions where the incidence of PCM is even higher, as in two municipalities in Rondônia, where the incidence rate is 40 cases for every 100,000 inhabitants<sup>18</sup>. Paracoccidioidomycosis is the main responsible for death due to systemic mycoses in Brazil, corresponding to 51.2% of deaths in this category, between the years 1996 to 2006<sup>19</sup>. Even so, it is considered by the World Health Organization (WHO) as a neglected disease<sup>17</sup>.

Regarding the treatments available for human fungal diseases, many antifungals promote adverse effects on the patient, which makes the treatment difficult to continue<sup>20</sup>. In the case of PCM, this situation is aggravated, as the treatments tend to be long, reaching up to 24 months<sup>15,18</sup>.

Thus, in view of the antifungal potential of ureases, as well as the need to develop new drugs against PCM, this work aims to extract and characterize embryo-specific soy urease (*Gmax*Urease), as well as to evaluate its activity (*in vitro*) against *P. brasiliensis*. Thus, this work can contribute to the development of future technologies based on urease (natural product), aimed at the treatment of topical manifestations of PCM.

## 2. Experimental

### 2.1 Extraction of embryo-specific soy urease

The protocol for enzyme extraction was guided by the method proposed by Bracco et al.<sup>21</sup> with modifications. The soy flour was obtained from the soybean seed Bayer 26B42 ground. Then, 25 g of the flour was defatted by double washing with chloroform in an ice bath under stirring for 30 min, followed by filtration on Whatman paper. The defatted extract was

used for protein extraction by means of constant agitation with 20% (w/v) of 20 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer with 1 mmol L<sup>-1</sup> β-mercaptoethanol, pH 7.5 at 4 °C for 12 h. The soluble protein fraction (supernatant) was separated by centrifugation at 30,000 g for 30 min. This fraction was considered the crude extract and 10 μL of the cocktail of a plant protease inhibitor was added to it (Sigma P9599, USA).

## 2.2 Purification of embryo-specific soy urease

Purification of *GmaxUrease* was done using chromatography and centrifugation techniques. Initially, a gel filtration chromatography column containing Sephadex G-25 resin (25.0 × 1.5 cm) and phosphate buffer (20 mmol L<sup>-1</sup>) with 100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl and pH 7.5 as mobile phase and elution flow of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> monitored by spectrophotometer at 280 nm. The fraction that showed ureolytic activity was concentrated by means of ultrafiltration using Amicon filter 30 kDa cutoff, at 1,000 g for 20 min. This fraction was called G25 and 10% glycerol (*q.s.*) was added to it.

The G-25 fraction was subjected to a new size exclusion chromatography in a column with Sephacryl HS-200 resin (60.0 × 1.5 cm), in a fast protein liquid chromatography (FPLC) system model Äkta Prime (GE Lifesciences, USA). The protein fractions were eluted using the phosphate buffer described in the previous step, with a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. The fraction that showed ureolytic activity was collected and concentrated by means of ultracentrifugation. At the end, 10% glycerol was added to the concentrate (*q.s.*), which was identified as the Sephacryl fraction.

Finally, the Sephacryl fraction was subjected to a third size exclusion chromatography, using a Superdex-200 10/300 column (GE Lifesciences, USA), using other FPLC filtration system model Äkta Pure M (GE Lifesciences, USA). The elution and concentration conditions were the same as in the previous steps. At the end, the concentrate received 10% glycerol (*q.s.*) again and was called Superdex fraction.

## 2.3 Verification of purity and molecular weight

The purity of the eluted fractions was verified using 12% SDS-PAGE electrophoresis, stained with Coomassie blue<sup>22</sup>. Electrophoresis was also used to estimate the molecular weight of the bands, using the marker Sigma-Marker ColorBurst (Sigma, C1992, USA) by means of ImageQuant-TL 8.1 program (GE-

lifescience, USA). This program was also used to estimate the percentage of urease in the sample.

The molecular weight (MW) of the biological unity of soybean urease, under nondenaturing conditions, was calculated using the gel filtration method by a Superdex-200 10/300 column (GE Lifesciences). The calibration curve was constructed with the low and high MW gel filtration calibration kit standards (GE Lifesciences), following the manufacturer's recommendations. The proteins were eluted in isocratic mode using 50 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer + 150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.2 at room temperature, in a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. The absorbances were monitored at 214 and 280 nm and elution volumes for each protein were measured and converted to  $K_{av}$  (Eq. 1) and plotted against the logarithm of the respective molecular weights (*log MW*).

$$K_{av} = \frac{v_e - v_o}{v_c - v_o} \quad (1)$$

where  $V_e$  = elution volume,  $V_o$  = column void volume and  $V_c$  = geometric column volume.

## 2.4 Determination of protein concentration and ureolytic activity

The protein concentration of the crude extract, as well as of the G-25, Sephacryl and Superdex fractions, was determined according to Bradford<sup>23</sup>, using bovine serum albumin as a standard. The assays were done in duplicate and triplicate if necessary. The measurement of ureolytic activity was performed by quantifying the ammonia (product) using Nessler's reagent<sup>24</sup>. An enzyme unit (U) was considered to be the amount of enzyme needed to produce 1 μmol L<sup>-1</sup> of ammonia per minute<sup>25</sup>.

## 2.5 Protein identification by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS<sup>E</sup>)

To determine whether the protein obtained was embryo-specific soy urease (*GmaxUrease*), peptide sequence identification was performed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS<sup>E</sup>) analysis. The protein band extracted from the SDS-PAGE, which had molecular mass corresponding to the estimated theoretical value for urease, was digested in the cropped gel band with trypsin, according to the Shevchenko protocols<sup>26,27</sup>.

The analysis was performed using Acquity UPLC M-Class System ultra-high performance liquid chromatography (Waters, Milford, MA) coupled a time-of-flight high resolution mass spectrometry (Xevo G2, Waters) equipped with an electrospray ionization source. Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC M-Class HSS T3 column, with particle size 1.8  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$  (Waters, UK), and flux of 6  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . The solvent gradient mixture: A ( $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$  formic acid; v:v) and B (acetonitrile/ $0.1\%$  formic acid; v:v) was: 3% B 0–1 min, 40% B 1–80 min, 97% B 80–90 min, holding 97% B for 90–97 min, 3% B for 97–100 min, and holding 3% B for 100–103 min at 40 °C. The capillary voltage was operated in the positive mode at 3.0 kV. In the cone, the voltage was adjusted to 40 V and the gas to 600  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  at 400 °C. Data were collected in the range between 50 to 2000  $m/z$  using  $\text{MS}^E$  acquisition mode, scan time 0.5 sec and collision energy ramp 15–45 V.

After analysis, the data (.raw) were processed/analyzed using the ProteinLynx Global ServerTM 3.0.3 software, and the revised soy database (*Glycine max*, Uniprot). The parameters used for searching the database were: cleavage specificity, trypsin with 1 missed cleavage allowed, min fragment ion matches per peptide = 2, min fragment ion matches per protein = 5, min peptide matches per protein = 1, fixed modifier reagent: carbamidomethyl C, variable modifier reagents: oxidation M.

## 2.6 Structural modeling of embryo-specific soy urease

The amino acid sequence of soy urease identified by LC- $\text{MS}^E$  deposited in Uniprot (id: i1k3k3) was used to search for template structures in the protein data bank (PDB), by BlastP program. The urease structure of *Canavalia ensiformis* (pdb id: 3la4)<sup>28</sup> was chosen and used as a template. The modeling was performed using the Modeller v9.24 software package<sup>29</sup>, where 2,100 models of urease were generated in the presence of the nickel cofactor and four residues with post-transcriptional modifications. Only one chain was modeled, and the homotrimer and homohexamer structures generated by symmetry operations. The final model was chosen based on the Modeller DOPE score and also by stereochemical quality using the Procheck program<sup>30</sup>.

## 2.7 Effect of pH and temperature on enzyme activity

The effect of pH on ureolytic activity was estimated using the Britton–Robinson 0.04  $\text{mol L}^{-1}$  buffer<sup>31</sup>, in the range of 5.0 to 9.0. Firstly, a single buffer was made in the presence of 3% urea and the pH adjusted according to the test. Subsequently, incubation was performed with 2.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of urease at 55 °C for 15 min.

The effect of temperature on the rate of urea production was determined at constant enzyme concentrations. An amount of 2.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  urease was incubated in 0.2  $\text{mol L}^{-1}$  phosphate buffer, 3% urea, pH 6.5, for 15 min. The incubation temperatures ranged between 25 to 85 °C, the experiments were carried out in duplicate, discounting the urea degradation due to temperature, using a negative control. The ammonia generated was quantified using the Nessler methodology, in a NanoDrop system (Thermo Scientific) in all activity assays.

## 2.8 Effect of different substrate concentrations

The assays were performed at urea concentrations ranging from 0 to 235  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 6.5, temperature of 65 °C and incubation time of 5 min, followed by the determination of ureolytic activity. The enzyme concentration used in these assays was 2.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The results were plotted as function of substrate concentration (Michaelis–Menten plot) and double-reciprocal (Lineweaver–Burk plot), through which was possible to calculate the Michaelis–Menten apparent constant ( $K_M$ ) and  $V_{\text{max}}$ .

## 2.9 Antifungal activity against *P. brasiliensis*

The fungitoxic activity of urease was evaluated against *P. brasiliensis*, Pb18 strain, by means of serial broth microdilution assay, according to the methodology of Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>32,33</sup>, with modifications as described by Rodrigues–Vendramini<sup>34</sup>. The urease concentration ranged between 0.02 to 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The antifungal agent itraconazole was used as a negative control at a concentration of 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . An assay containing only the microorganism and the culture medium was used as positive control, in order to verify the viability of the strain. In addition, bovine serum albumin (BSA) was evaluated at concentrations between 0.2 to 104.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , to assess whether any inhibitory activity could be due to osmotic origin. The inoculum

for the assays were grown in RPMI 1640 medium, prepared with a concentration of  $105 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ , standardized by counting in a Neubauer chamber and diluted 1:2 in the wells of a 96-well microplate. After inoculation, the microplates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 7 days, and on the sixth day  $20 \mu\text{L}$  of 0.02% resazurin was added to each well, as an indicator of metabolic activity. Then, the plates were again incubated for 24 h.

To identify the minimum inhibitory concentration (MIC), a visual reading of the color change of the wells was performed. To identify the minimum fungicidal concentration (MFC), growth was evaluated in solid medium. For this purpose,  $20 \mu\text{L}$  aliquots of the wells were transferred to plates containing brain heart infusion agar, followed by superficial inoculation (spread plate). The plates were kept at  $35^\circ\text{C}$  for 48 h and, after this period, the possible formation of colonies was observed. The MFC was considered the lowest concentration in which there was no growth in the plate<sup>35</sup>.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Protein purification

The extraction of proteins from defatted soy flour resulted in a sample containing  $18.79 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of total proteins. The purification carried out using centrifugation and chromatographic methods of gel filtration resulted in a yield of 18.23% and a purification factor of 5.92, for which steps are summarized in Tab. 1. Although the yield was lower than reported by other authors<sup>25</sup>, the specific activity was about 5 times higher. This is because the soy used probably had a high initial urease content. Enzyme unit values are compatible with other study with embryo-specific soy urease, which showed values between 24,630 and 141,350 of enzyme units<sup>36</sup>. It is interesting to note that even in studies with heterologous expression of urease, the concentration in the culture medium is around  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  after purification and concentration respectively<sup>13</sup>. Thus, the results presented here are promising.

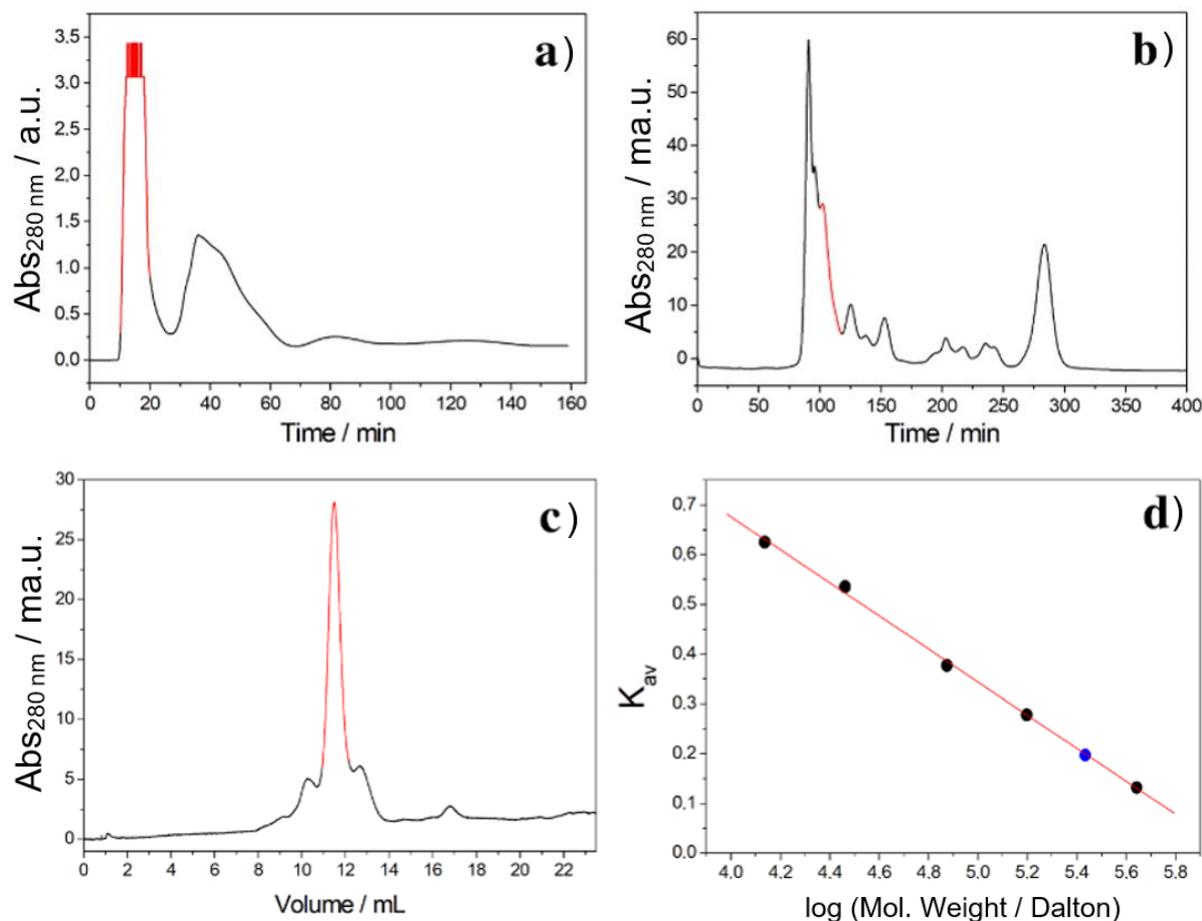
**Table 1.** Summary of *Gmax*Urease purification steps from soybean seeds.

Step	Proteins / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Enzyme unity / U	Specific activity / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	Yield / %	Purification factor
Crude extract	18.79	96,764.72	5,149.80	100.00	1.00
G25	3.96	36,130.19	9,123.79	37.34	1.77
Sephacryl	1.69	25,150.22	14,881.78	25.99	2.89
Superdex	0.58	17,638.42	30,411.07	18.23	5.90

The urease purification chromatograms in the Sephadex G25, Sephacryl HS-200 and Superdex S-200 columns, pointing the peaks that showed ureolytic activity, are shown in Fig. 1a–c. It is noteworthy that, in the step performed using Superdex S-200 column, which has analytical grade, only the maximum point of the eluted peak was collected in the process, in order to ensure better purification. However, this fact may have contributed to the lower yield, when compared to another urease purification studies<sup>25</sup>.

The SDS-PAGE showed a band with approximately 90 kDa. According to data in the literature, ureases

correspond to 0.2 to 0.3% of soluble proteins that can be extracted<sup>37</sup>. Additional attempts to purify urease in a Q-Sepharose anion exchange column (GE Lifesciences) resulted in almost total loss of ureolytic activity, even after supplementation of the eluted fraction with nickel. Thus, the purification process was all carried out using different gel filtration columns. The calculated MW for the protein in solution using the elution volume of the Superdex S-200 column was 272.2 kDa, compatible as a trimer in solution (Fig. 1d).



**Figure 1.** Chromatograms of the *GmaxUrease* purification steps. The red lines indicate the peaks that showed ureolytic activity and were collected. (a) Sephadex G25, (b) Sephacryl HS-200, (c) Superdex S-200. The volume referring to the peak of the Superdex S-200 column was used to estimate the molecular weight of *GmaxUrease* in figure (d). In this assay, 500  $\mu\text{L}$  of the protein mix with known molecular weights (black dots) was applied: Ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), canalbumin (75 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) and ribonuclease (13.7 kDa), in the Superdex-200 10/300 column. To estimate the MW of *GmaxUrease*, 500  $\mu\text{L}$  of protein was applied at a concentration of  $1 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$ , and its elution volume converted to  $K_{av}$  (blue dot). The elution flow was  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$  at room temperature of  $\sim 23 \text{ }^\circ\text{C}$ . The estimated MW was  $\sim 272.2 \text{ kDa}$ , compatible with a trimer in solution. The linear regression ( $y = a + bx$ ) parameters are:  $a = 2.00381$ ,  $b = -0.33196$  and  $R = -0.99912$ . The  $K_{av}$  for *GmaxUrease* is ( $y = 0.19961$ ).

### 3.2 Protein identification using data-independent analysis (MSE)

Mass spectrometry was performed using an electrospray ionization source and time of flight (TOF) analyzer, which allow proteomic analysis, since it is possible to form fragments with various charges and there is no molecular weight limitation for the analyzer. Thus, the protein on the electrophoresis gel band was digested by trypsin to obtain peptides for injection into the mass spectrometer, followed by comparative analysis using Uniprot database. The processing results data showed different levels of

coverage of urease sequences (several Uniprot ids) without occurrence of false positives. In view of the high molecular weight of this protein, the percentage found is suitable for its identification, considering that in other study the percentage of 20% was sufficient for this identification<sup>13</sup>. Table 2 summarizes the results of the mass spectrometry analysis and shows that all ranked proteins resulting from processing refer to soy urease. The alignment of the resulting sequences, let to the identification of the protein with Uniprot id: i1k3k3 with theoretical molecular mass of 90,338 Da being the most conserved, therefore, being used for modeling the protein structure.

**Table 2.** Results from mass spectrometry analysis of the band considered as *Gmax*Urease extracted from SDS-PAGE.

Protein description (Uniprot)	Uniprot id	Score	Aligned peptides / %	Theoretical molecular weight / Da
Urease OS= <i>Glycine soja</i>	a0a0b2rjr9	1211	28.11	90,046
Urease OS= <i>Glycine max</i>	i1k3k3	1209	26.22	90,338
Urease OS= <i>Glycine soja</i>	a0a445kny1	1209	26.22	90,360
Urease OS= <i>Glycine max</i>	q7xac5	1026	18.62	90,157
Urease (Fragment) OS= <i>Glycine max</i>	q41214	726	21.37	14,091
<b>Protein</b>	Urease OS= <i>Glycine soja</i> ; Uniprot ID i1k3k3			
<b>Species</b>	<i>Glycine max</i> (Soybean) ( <i>Glycine hispida</i> )			
<b>Peptide numbers</b>	17			
<b>Peptide sequences</b>	LGDTDLFAK			
	LNIAAGTAVR			
	GPLQGESDNDNFR			
	GGVVAWADMGDPNASIPTPEPVK			
	NYFLF			
	GSSSKPDELHDIK			
	DGLIVSIGK			
	EGTIAAEDILDIGAISSSDSQAMGR			
	GGNGIADGQVNETNLR			
	NAVILK			
	YGPTTGDK			
	ADIGIK			
	ATTCTPAPSQMK			
	VEAVGNVR			
	EEEDASEGITGDPDSPFTTIIPREEYANK			
	EDNRIPGEIYGDGSLVLNPGK			
	RVEAVGNVR			
<b>Protein mass (MW)</b>	90,338			
<b>Sequence coverage*</b>	26.22%			
MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGLRLNYTEAVALIATQIMEFARDGEKTVQALMCIGKHLGRRQVLPEVQHLLNAVQV EATFPDGTGLVTVHDPISCEHGDGQALFGSFLPVPVSLDKFAENK <b>EDNRIPGEIYGDGSLVLNPGKNAVILK</b> VVSNNGDRPIQ VGSHYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMR <b>LNIAAGTAVR</b> FEPGDSKSVKLVIRIGGNKIVIR <b>GGNGIADGQVNETNLR</b> EAMEAVCKRGF GH <b>KEEEDASEGITGDPDSPFTTIIPREEYANKYGPTTGDKIRLGDTDLFAK</b> IEKDFALYGDECVFGGGKVLDRDGMGQSCGHPP AISLDTVITNAVIDYSGI <b>IKADIGIKDGLIVSIGK</b> AGNPDIMDDVFFNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLV DEAISSGITTLVGGGTGPTAGTR <b>ATTCTPAPSQMK</b> LMLQSTDDLPLNFGFTG <b>GSSSKPDELHDIK</b> AGAMGLKLHEDWGSTP AAIDSCLTVADQYDIQINIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKGRITHTYHSEGAGGGHAPDIIKVCGMKNVLPSSSTNPTPLTLNTI DEHLDMVMVCHHLNREIPEDLAFACSRIR <b>EGTIAAEDILDIGAISSSDSQAMGR</b> VGEVISRWTQANKMKVQR <b>GPLQGESDNDNFR</b> <b>SDNDNFR</b> IKRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLDLVMWKPSFFGAKPEMVIK <b>GGVVAWADMGDPNASIPTPEPVK</b> MRP MFGTLGKAGGALSIAFAAVDQRVHALYGLNKR <b>RVEAVGNVR</b> KLTKLDMKLNDSLPQITVDPDNYTVTADGEVLTSEATTFVPLS <b>RNYFLF</b>				

\*functional protein without N-terminal signal peptide.

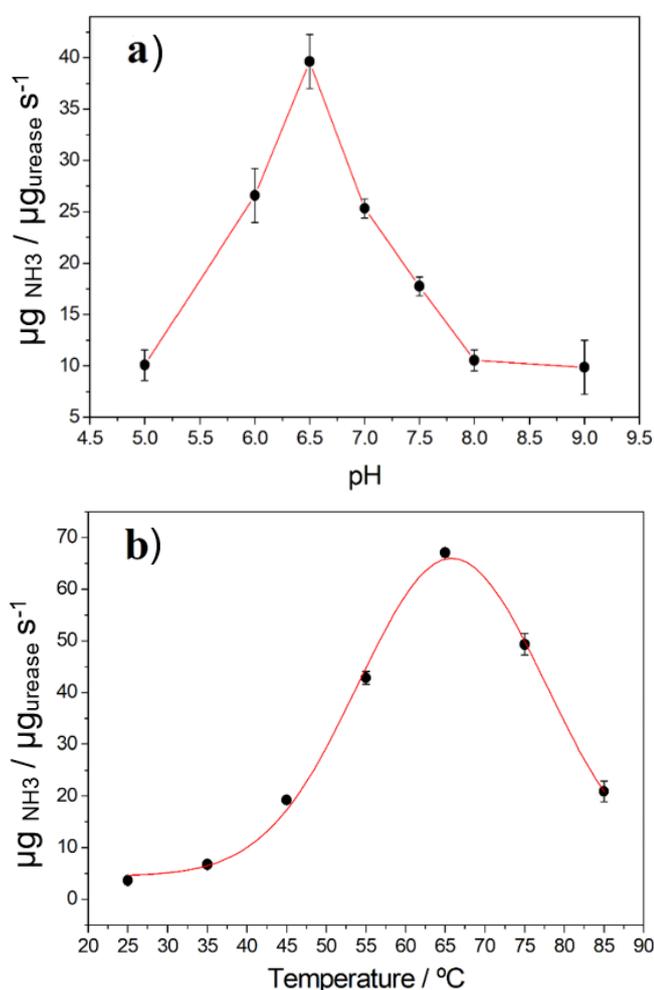
### 3.3 Analysis of enzyme activity

Different enzyme batches were extracted from different soy samples, which guaranteed biological reproducibility. Then, in order to characterize the functional parameters of the protein, activity assays were carried out under different pH and temperature conditions (Fig. 2). The enzyme showed better activity at pH 6.5 and temperature close to 65 °C. Literature reports that the optimal pH for ureases, in general,

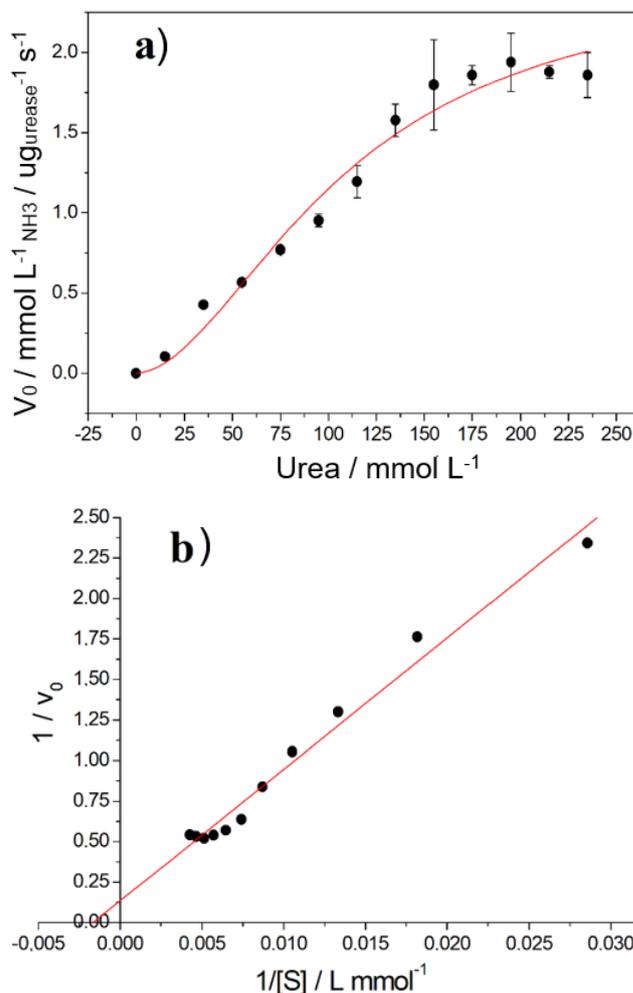
ranges between 5.0 and 8.0, depending on the species and even the isoform<sup>4</sup>. However, for ubiquitous soy urease, there are two peaks of activity, one around 5.5 and the other at 9.0<sup>21,38</sup>; however, there is a study that reports optimal activity for embryo-specific soy urease at pH 6.1<sup>39</sup>. Regarding the temperature, literature also reports variation, however, it is usually around 0 °C<sup>38</sup>.

The substrate concentration at maximum urease activity was close to 190 mmol L<sup>-1</sup> (Fig. 3a). Beyond this concentration, activity begins to decrease

gradually, a fact that can be explained by a mechanism of substrate inhibition<sup>40</sup>. Thus, the Michaelis–Menten equation was adjusted to the experimental points and provided  $K_M$  of  $109 \pm 23 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $V_{\max}$  of  $2.5 \pm 0.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_3 \cdot \mu\text{g}_{\text{urease}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Fig. 3a). Values quite different from those obtained by the double-reciprocal plot (Fig. 3b), which presented  $K_M$  of  $\sim 526 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $V_{\max}$  of  $7.4 \text{ mM NH}_3 \cdot \mu\text{g}_{\text{urease}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . However, *Pisum sativum* urease showed the same substrate inhibitory effect, and its  $K_M$  found by adjusting the Michaelis–Menten equation to data points was close to  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  but was  $500 \text{ mmol L}^{-1}$  when calculated by the double-reciprocal plot at pH 7.5<sup>25</sup>. These values are very similar to those found in this work.



**Figure 2.** Effects of changes in the experimental conditions on the catalytic activity of *GmaxUrease*. (a) Effect of pH using  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$  Britton–Robinson buffer, with 3% urea and a temperature of  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . (b) Effect of temperature using  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer, 3% urea, pH 6.5. In both assays, the enzyme concentration was  $2.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Each point on the graph represents the average of two repetitions.

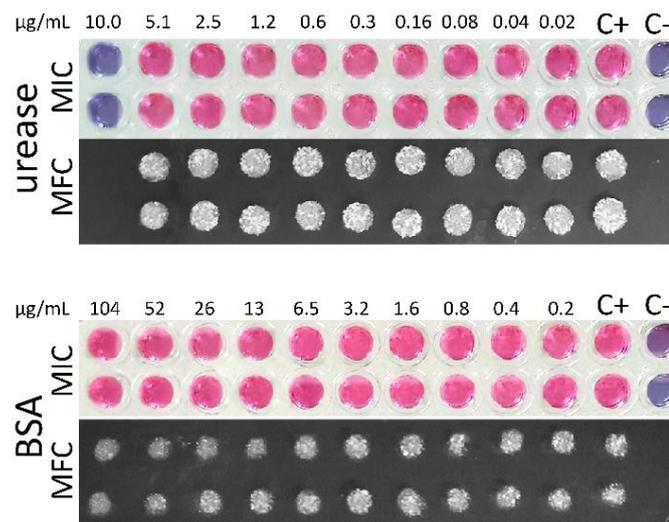


**Figure 3.** Effect of the substrate (urea) concentration on the catalytic activity of *GmaxUrease*, using  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer, pH of 6.5 at  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  temperature. (a) Michaelis–Menten plot showing a tendency of decrease in velocity at urea concentrations higher than  $195 \text{ mmol L}^{-1}$ . The red line represents the best fit of Michaelis–Menten equation to the experimental data points. (b) Double-reciprocal plot for estimating  $K_M$  and  $V_{\max}$  values. Each point on the graphs represents the average of two repetitions.

### 3.4 Evaluation of antifungal activity

We carried out microbiological assays aiming to evaluate the antifungal property of *GmaxUrease* against the human pathogenic fungus *P. brasiliensis*. Until then, this property of urease was never evaluated against this fungal. The MIC and MFC values obtained were  $\sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of urease. Bovine serum albumin was used as negative control in order to verify a possible inhibitory osmotic effect due to protein concentration; however, such influence did not occur

(Fig. 4). The MIC/MFC values found are promising, because, although this is the first study that demonstrates the urease antifungal activity against *P. brasiliensis*, when comparing this result to similar ones that used other fungi, such as the yeast *Candida albicans*, the MIC values ranged between 240 to 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of urease<sup>11,13</sup>.



**Figure 4.** The experimental values of MIC and MFC of *GmaxUrease* against Pb18 strain of *P. brasiliensis*. The inoculum concentration was  $10^5$  CFU and *GmaxUrease* concentration ranged between  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  to  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The concentration of BSA ranged between  $0.2$  to  $104.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Minimal inhibitory concentration is displayed in color and MFC in black/white. Negative control (C-) and positive control (C+).

### 3.5 Modeled structure

The final model of *GmaxUrease* shares 92.3% identity with template from *Canavalia ensiformis* and presents excellent stereochemical quality with 91.9% of the residues in the most favored, 7.8% in the additional allowed and only 0.3% of the residues in the generously allowed regions of Ramachandran plot, a much better quality than template (88.3%, 11.1% and 0.6% respectively). The Fig. 5a and b shows the embryo-specific soy urease modeled in this study. The pdb file is provided as supplementary material. Ureases have high homology between different organisms, which indicates common genetic ancestry and similar catalytic action<sup>3,6</sup>. This may justify all residues of catalytic site conserved in *GmaxUrease* regarding *Canavalia ensiformis*. However, the three-dimensional structure of ureases varies between organisms and many still need to be clarified<sup>10</sup>. Plants have ureases

formed by a single kind of chain with ~90 kDa, which form complex trimers ( $\alpha_3$ ), hexamers ( $\alpha_6$ ) and, more rarely, dodecamers ( $\alpha_{12}$ ), located in the cytosol of plant and fungal cells<sup>2,6,10</sup>. There are studies indicating that fungitoxic activity of ureases is independent of the catalytic activity<sup>1,11</sup>, being related to the release of peptides with antimicrobial activity when hydrolyzed. It is noteworthy that *P. brasiliensis* has close to 30 to 35 extracellular proteases<sup>41</sup>, which could act on urease, resulting in polypeptides that could be toxic to the fungus. The Fig. 5c shows the alignment of part of the amino acid sequences of plant and microorganisms ureases, plus the recombinant jaburetox peptide identified in the urease of *Canavalia ensiformis*, considered responsible for the antifungal effect<sup>12</sup>. In *GmaxUrease*, the homologous sequence corresponds to residues 229 to 269. It is noteworthy that microorganisms do not have this sequence in their ureases. There are several hypotheses to explain the antifungal mechanism of these peptides, the most likely being due to the reorganization of membrane lipids<sup>12</sup>; however, for *GmaxUrease*, this mechanism still needs validation assays.

Regardless of the action mechanism, the antifungal property of *GmaxUrease* against Pb18, the most virulent strain of *P. brasiliensis*, was clearly demonstrated in this work. Due to the low yield of the protein obtained, it was not possible to perform additional tests in this work. However, the results presented here demonstrate the feasibility for carrying out future studies, aiming at the expression of recombinant *GmaxUrease*. The soybean is a feedstock widely used in human and animal nutrition and there are no reports of toxic effects in humans regarding the ingestion of urease present in soy. The possibilities for biotechnological use of ureases are wide and can be explored in topical creams formulations for antifungal medicines, especially for oral manifestations of PCM, dermatophytes, as well as a natural preservative in industrialized foods, replacing possible antimicrobial products. This work allows to envision a wide range of research possibilities for the biotechnological applications of soy urease. In addition, despite being an organism of economic and agricultural interest, the notation of soy proteins in the proteomic databases is still very incipient. Many proteins do not have status (sequence of amino acids) confirmed by means of sequencing studies, which include urease. This work helps to improve this notation.



- [6] Krajewska, B., Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59 (2009) 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>.
- [7] Wiebke-Strohm, B., Ligabue-Braun, R., Rechenmacher, C., De Oliveira-Busatto, L. A., Carlini, C. R., Bodanese-Zanettini, M. H., Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family, *Plant Physiology and Biochemistry* 101 (2016) 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.023>.
- [8] Polacco, J. C., Mazzafera, P., Tezotto, T., Opinion – Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps, *Plant Science* 199–200 (2013) 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.010>.
- [9] Follmer, C., Barcellos, G. B. S., Zingali, R. B., Machado, O. L. T., Alves, E. W., Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J. A., Carlini, C. R., Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity, *Biochemical Journal* 360 (2001) 217–224. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600217>.
- [10] Postal, M., Martinelli, A. H. S., Becker-Ritt, A. B., Ligabue-Braun, R., Demartini, D. R., Ribeiro, S. F. F., Pasquali, G., Gomes, V. M., Carlini, C. R., Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides, *Peptides* 38 (2012) 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010>.
- [11] Becker-Ritt, A. B., Martinelli, A. H. S., Mitidieri, S., Feder, V., Wassermann, G.E., Santi, L., Vainstein, M. H., Oliveira, J. T. A., Fiuza, L. M., Pasquali, G., Carlini, C. R., Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicon* 50 (2007) 971–983. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.008>.
- [12] Martinelli, A. H. S., Kappaun, K., Ligabue-Braun, R., Defferrari, M. S., Piovesan, A. R., Stanisçuaski, F., Demartini, D. R., Dal Belo, C. A., Almeida, C. G. M., Follmer, C., Verli, H., Carlini, C. R., Pasquali, G., Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (2014) 935–944. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.010>.
- [13] Martinelli, A. H. S., Lopes, F. C., Broll, V., Defferrari, M. S., Ligabue-Braun, R., Kappaun, K., Tichota, D. M., Fruttero, L. L., Moyetta, N. R., Demartini, D. R., Postal, M., Medeiros-Silva, M., Becker-Ritt, A. B., Pasquali, G., Carlini, C. R., Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox, *Process Biochemistry* 53 (2017) 245–258. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.003>.
- [14] Wanke, B., Aidê, M.A., Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose, *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 35 (2009) 1245–1249. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001200013>.
- [15] Ferreira, M. S., Paracoccidioidomycosis, *Paediatric Respiratory Reviews* 10 (2009) 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2009.08.001>.
- [16] Ricci, C.D., Evangelista, C., Tomaz, B.C.A., da Silva, M.V., Barbo, M.L.P., Paracoccidioidomicose: forma crônica cutânea, *Revista da Faculdade Ciências Médicas Sorocaba* 20 (2018) 51. <https://doi.org/10.23925/1984-4840.2018v20i1a12>.
- [17] Queiroz-Telles, F., Fahal, A. H., Falci, D. R., Caceres, D. H., Chiller, T., Pasqualotto, A. C., Neglected endemic mycoses, *The Lancet Infectious Disease* 17 (2017) e367–e377. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7).
- [18] Shikanai-Yasuda, M. A., Mendes, R. P., Colombo, A. L., Telles, F. de Q., Kono, A., Paniago, A. M. M., Nathan, A., do Valle, A. C. F., Bagagli, E., Benard, G., Ferreira, M.S., Teixeira, M. de M., Vergara, M. L. S., Pereira, R. M., Cavalcante, R. de S., Hahn, R., Durlacher, R.R., Khoury, Z., de Camargo, Z.P., Moretti, M. L., Martinez, R., II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017, *Epidemiologia e Serviços Saúde*. 27 (2018). <https://doi.org/10.5123/S1679-49742018000500001>.
- [19] Borba, J. V. V. B., Tauhata, S. B. F., de Oliveira, C. M. A., Marques, M. F., Bailão, A. M., Soares, C. M. de A., Pereira, M., Chemoproteomic identification of molecular targets of antifungal prototypes, thiosemicarbazide and a camphene derivative of thiosemicarbazide, in *Paracoccidioides brasiliensis*, *PLoS One*. 13 (2018) e0201948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201948>.
- [20] Nicola, A. M., Albuquerque, P., Paes, H. C., Fernandes, L., Costa, F. F., Kioshima, E. S., Abadio, A. K. R., Bocca, A. L., Felipe, M. S., Antifungal drugs: New insights in research & development, *Pharmacology & Therapeutics* 195 (2019) 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.008>.
- [21] Bracco, L. F., Levin, G. J., Urtasun, N., del Cañizo, A. A. N., Wolman, F. J., Miranda, M. V., Cascone, O., Covalent immobilization of soybean seed hull urease on chitosan mini-spheres and the impact on their properties, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18 (2019) 101093. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101093>.
- [22] Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [23] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

[24] Bzura, J., Koncki, R., A mechanized urease activity assay, *Enzyme and Microbial Technology* 123 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.01.001>.

[25] El-Hefnawy M. E., Sakran, M., Ismail, A. I., Aboelfetoh, E., Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating *Pisum Sativum* L. seeds, *BMC Biochemistry* 15 (2014) 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-15-15>.

[26] Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., Mann, M., Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996) 14440–14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>.

[27] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>.

[28] Balasubramanian, A., Ponnuraj, K., Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure, *Journal of Molecular Biology* 400 (2010) 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.009>.

[29] Webb, B., Sali, A., Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER, *Current Protocols in Bioinformatics* 54 (2016). <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.

[30] Collaborative Computational Project Number 4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* 50 (1994) 760–763. <https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>.

[31] Britton, H. T. S., Robinson, R. A., CXC VIII—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, *Journal of the Chemical Society* (1931) 1456–1462. <https://doi.org/10.1039/JR9310001456>.

[32] CLSI, Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras, 22 (2002) 1–50.

[33] Wayne, P. A., CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

[34] Rodrigues-Vendramini, F. A. V., Faria, D. R., Arita, G. S., Capoci, I. R. G., Sakita, K. M., Caparroz-Assef, S. M., Becker, T. C. A., Bonfim-Mendonça, P. S., Felipe, M. S.,

Svidzinski, T. I. E., Maigret, B., Kioshima, É. S., Antifungal activity of two oxadiazole compounds for the paracoccidioidomycosis treatment, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13 (2019) e0007441. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007441>.

[35] Rodrigues-Vendramini, F. A. V., Marschalk, C., Toplak, M., Macheroux, P., Bonfim-Mendonça, P. S., Svidzinski, P. T. I. E., Seixas, F. A. V., Kioshima, E. S., Promising New Antifungal Treatment Targeting Chorismate Synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (2018) e01097-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01097-18>.

[36] Polacco, J. C., Havir, E. A., Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture., *Journal of Biological Chemistry*, 254 (1979) 1707-1715.

[37] Polacco, J. C., Thomas, A. L., Bledsoe, P. J., A Soybean Seed Urease-Null Produces Urease in Cell Culture, *Plant Physiology* 69 (1982) 1233-1240. <https://doi.org/10.1104/pp.69.5.1233>.

[38] Torisky, R. S., Polacco, J. C., Soybean Roots Retain the Seed Urease Isozyme Synthesized during Embryo Development, *Plant Physiology* 94 (1990) 681-689. <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.681>.

[39] Polacco, J. C., Winkler, R. G., Soybean Leaf Urease: A Seed Enzyme?, *Plant Physiology* 74 (1984) 800-803. <https://doi.org/10.1104/pp.74.4.800>.

[40] Yoo, Y. J., Feng, Y., Kim, Y.-H., Yagonia, C. F. J., *Fundamentals of Enzyme Engineering*, New York, Springer, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1026-6>.

[41] Desjardins, C. A., Champion, M. D., Holder, J. W., Muszewska, A., Goldberg, J., Bailão, A. M., Brigido M. M., Ferreira, M. E. S., Garcia, A. M., Grynberg, M., Gujja, S., Heiman, D. I., Henn, M. R., Kodira, C. D., León-Narváez, H., Longo, L. V. G., Ma, L.-J., Malavazi, I., Matsuo, A. L., Morais, F. V., Pereira, M., Rodríguez-Brito, S., Sakthikumar, S., Salem-Izacc, S. M., Sykes, S. M., Teixeira, M. M., Vallejo, M. C., Walter, M. E. M. T., Yandava, C., Young, S., Zeng, Q., Zucker, J., Felipe, M. S., Goldman, G. H., Haas, B. J., McEwan, J. G., Nino-Vega, G., Puccia, R., San-Blas, G., Soares, C. M. A., Birres, B. W., Cuomo, C. A., Comparative Genomic Analysis of Human Fungal Pathogens Causing Paracoccidioidomycosis, *PLoS Genetics* 7 (2011) e1002345. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002345>.

ARTIGO 3 - Expressão e purificação da catepsina do nucleopoliedrovírus de  
*Bombyx mori*

(Será submetido a revista Molecular Omics -ISSN: 2515-4184).

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA CATEPSINA DO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS  
DE *Bombyx mori***

Elisangela Andrade Angelo<sup>1,2</sup>, José Renato Pattaro Júnior<sup>2</sup>, Rogério Marchiosi<sup>2</sup>,  
Ícaro Putinhon Caruso<sup>3</sup>, Maria Aparecida Fernandez<sup>4</sup>, Flavio Augusto Vicente  
Seixas<sup>5\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná, Umuarama – PR.

<sup>2</sup> Depto. de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR

<sup>3</sup>. Depto. de Física, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita filho, São José do Rio Preto – SP.

<sup>4</sup> Depto. de Biologia, Genética e Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR.

<sup>5</sup> Depto. de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama – PR.

\*Autor de correspondência

favseixas@uem.br

**Resumo:** As viroses se destacam como uma das principais causas de perdas na sericultura, dentre os vírus que acometem *Bombyx mori*, um dos mais comuns é o nucleopoliedrovírus (BmNPV), causador da doença denominada amarelidão. Há várias proteínas de BmNPV que contribuem para o ciclo viral, dentre elas se destaca a catepsina (BmNPV-Cath). A compreensão da estrutura de BmNPV-Cath, bem como o uso de inibidores para essa enzima, pode contribuir para diminuir as perdas decorrentes do amarelidão. Dessa maneira, este estudo teve por objetivo desenvolver um protocolo de expressão heteróloga de BmNPV-Cath em *Escherichia coli*, purificação e renovelamento, além de realizar uma caracterização biofísica preliminar, com base em dicroísmo circular. Realizou-se, ainda estudos *in silico*, para seleção de candidatos a inibidores da BmNPV-Cath. Para tanto, foi feita a construção do plasmídeo no sistema pET15b, seguida da expressão em cepas BL21 e BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, a identificação das proteínas foi feita por espectroscopia de massa e *Western Blotting*. A expressão ocorreu de forma satisfatória, sendo que a banda correspondente a pre-BmNPV-Cath correspondeu a 49,16% das proteínas presentes no precipitado da cultura expressa. Em relação à identificação por espectrometria de massa, essa metodologia resultou em uma cobertura de 92,57%, o que permitiu identificar a proteína expressa como sendo a pre-BmNPV-Cath. No entanto, devido às características da proteína, rica em cisteína, a expressão ocorreu na forma de corpos de inclusão. Dessa maneira, foi desenvolvido um protocolo de extração usando tampão de lavagem rico em ureia, seguido por tampão de solubilização rico em ureia e ditiotreitol, a fim de solubilizar a pre-BmNPV-Cath. A purificação ocorreu em coluna de afinidade por níquel, Histrap Sepharose. O protocolo desenvolvido contou, ainda, com etapa de renaturação, composto com agentes redutores e oxidantes. Após a purificação e renaturação da pre-BmNPV-Cath, foi feita a quantificação proteica, que correspondeu a 0,16 mg.mL<sup>-1</sup>, o equivalente a 0,86 mg de proteína total e rendimento de 0,43 mg.L<sup>-1</sup>. Os estudos com dicroísmo circular revelaram uma porcentagem de 21% de alfa-hélice e 22% de beta-folha, compatível com as modelagens computacionais realizadas para a BmNPV-Cath. Por meio dos estudos *in silico*, foi possível identificar três possíveis inibidores (EUFD08, EUGE09 e EUGD36). Neste estudo, foi possível desenvolver um protocolo de expressão, extração, purificação e renaturação da pre-BmNPV-Cath, a qual poderá ser utilizada em estudos funcionais futuros, bem como em testes de inibição. Além disso, foi possível realizar a caracterização da estrutura secundária da pre-BmNPV-Cath, bem como selecionar candidatos a inibidores.

**Palavras-chave:** Catepsina viral, sericultura, amarelidão, expressão heteróloga.

## 1. Introdução

A sericultura consiste na criação do bicho-da-seda, a fim de obter-se principalmente casulos, os quais são destinados à produção de seda. Essa atividade agroindustrial é milenar, sendo que há relatos de sua prática na China, em 2600 a. C (CHOPAIDE *et al.*, 2021). Desde então, a China vem se destacando na sericultura e, juntamente com a Índia, são responsáveis por mais de 50% da produção mundial (ZAMBRANO-GONZALEZ, 2017). O Brasil é o maior produtor de seda da América Latina, ocupa a 5ª posição da produção mundial, o que corresponde a 0,34% dessa produção. Além disso, a seda brasileira é considerada a de melhor qualidade no mundo (SILVA *et al.*, 2021). A sericultura brasileira se concentra no estado do Paraná, o qual corresponde a aproximadamente 85% da produção nacional (PARANÁ, 2021).

Existem oito espécies popularmente conhecidas como bicho-da-seda, sete delas pertencem a família *Saturniidae* e uma à família *Bombycidae*. Embora exista uma variedade de espécies, para a sericultura, a espécie mais importante é *Bombyx mori* (L., 1758; Lepidoptera: *Bombycidae*) que corresponde a mais de 95% da produção mundial (SANTOS *et al.*, 2016).

*B. mori* foi completamente domesticado e tem sido selecionado para a atividade da sericultura há séculos, o que resultou em alta produtividade. Esse inseto é holometábolo, seu desenvolvimento completo leva de 30 a 40 dias, partindo da fase de ovo, 5 estágios larvais, seguido por formação da pupa e, enfim, o indivíduo adulto. *B. mori* alimenta-se apenas na fase larval, quando consome folhas de amoreira (*Morus* sp) (SANTOS *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2021).

As principais perdas na sericultura ocorrem devido a prejuízos causados por patógenos de *B. mori*, dentre os quais se destacam as viroses, que correspondem a 70% das perdas desse setor (BRANCALHÃO, 2002a, 2002b). Entre as viroses, uma das mais preocupantes é a que causa a doença chamada de amarelidão, que se espalha com facilidade entre os indivíduos, o que obriga os produtores a eliminarem todas as larvas de sua produção (KHURAD et.al., 2004). O sintoma mais característico dessa doença é a mudança na coloração do tegumento do inseto, o qual se torna amarelo, devido ao rompimento de células gordurosas infectadas (ORO, 2017). A sintomatologia evolui para perda de apetite, alterações comportamentais, seguida por desintegração e liquefação dos tecidos internos do inseto (CHIARELLO, 2015).

A amarelidão é causada pelo nucleopoliedrovírus de *B. mori* (BmNPV). Esse vírus pertence à família *Baculoviridae*, que se caracteriza por formar corpos de oclusão, estruturas formadas por vírions imersos em uma matriz proteica, o que confere alta estabilidade ao vírus, mesmo fora das células. Os BmNPVs são constituídos por DNA dupla fita, o qual se associa a proteínas, formando um nucleocapsídeo, circundado por um envelope. O BmNPV pode se apresentar na forma “*single*”, quando está presente apenas um vírion no interior do envelope, ou múltiplo, quando vários vírions estão presentes no interior do mesmo envelope (BRANCALHÃO, 2009; LU et al., 2018).

A infecção por BmNPV ocorre quando a larva se alimenta de folhas de amoreira contaminadas com corpos de oclusão, por meio de contaminação horizontal (inseto-inseto) ou vertical (progenitores-ovos). No caso da infecção quando da alimentação, os corpos de oclusão são dissolvidos no intestino do inseto,

liberando os vírions, os quais invadem as células epiteliais. Nas células epiteliais do inseto, BmNPV se multiplica no núcleo, porém, sem formar corpos de oclusão, essa fase é chamada de infecção primária. Na sequência, BmNPV alcança a hemolinfa, o que leva a uma infecção sistêmica, com a formação de muitos nucleopoliedrovírus e corpos de oclusão, essa fase é chamada de infecção secundária (SAEZ, 2012).

BmNPV apresenta várias proteínas que auxiliam em seu ciclo infeccioso. A proteína GP64, por exemplo, relaciona-se a fase inicial da infecção (LU *et al.*, 2018). Já nas fases tardias, destacam-se quitinases e catepsinas virais (BmNPV-Cath) (OKAWA *et al.*, 1994; ISHIMWE *et al.*, 2015).

A produção da BmNPV-Cath inicia-se cerca de 9 a 12 horas após a infecção, sendo que o papel dessa enzima se relaciona principalmente com a liquefação do cadáver, o que facilita o espalhamento do vírus para outros insetos (ISHIMWE *et al.*, 2015). Estudos relacionados ao silenciamento do gene para catepsinas virais, ou com inibidores para essa enzima, demonstram que elas não se relacionam a a entrada no vírus nas células, no entanto, têm forte impacto na transmissão horizontal de baculovírus, além de contribuírem para disponibilidade de aminoácidos, que podem ser utilizados no ciclo viral (OHKAWA *et al.*, 1994; SLACK *et al.*, 1995, HAWTIN *et al.*, 1997).

A BmNPV-Cath é uma endopeptidase, em termos evolutivos, ela é similar a catepsina L, comum no lisossomo de células eucariontes (ISHIMWE *et al.*, 2015; YASSUDA, *et al.*, 2004). Essas proteínas caracterizam-se por apresentar resíduo de cisteína em seu sítio catalítico, o qual atua na hidrólise do grupo carboxílico da ligação peptídica. Além da cisteína, é característico dessas proteases a presença de

um resíduo de histidina, que atua como doador/acceptor de prótons (SOMOZA, *et al.*, 2000; BARRET, RAWLINGS, 2001).

Tendo em vista o papel da BmNPV-Cath no processo de transmissão horizontal, a inibição dessa enzima poderia contribuir para o controle de insetos infectados e, portanto, facilitar o manejo da produção, diminuindo as perdas. Dessa maneira, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de expressão e purificação de BmNPV-Cath em *Escherichia coli*, bem como realizar uma caracterização inicial por dicroísmo circular dessa enzima, além de estudos *in silico* para seleção de inibidores.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Construção do plasmídeo e cepa de expressão**

A construção do plasmídeo foi feita pela empresa GenScript, utilizando o vetor de expressão pET15b (Merck, USA), com a sequência para a BmNPV-Cath (211 resíduos de aminoácidos), com peptídeo de inibição (96 resíduos de aminoácidos) e com cauda de 6 histidinas na extremidade amino-terminal. As sequências de aminoácidos foram obtidas a partir do Uniprot (p41721).

Foram testadas duas cepas de *E. coli* para expressão, a BL21 (DE3) e a BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. A transformação das cepas foi feita por meio de choque térmico (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A verificação da transformação foi feita por meio de seleção de colônias em meio Luria Bertani (LBA) com 50µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina.

As cepas utilizadas apresentam o gene para T7 RNA polimerase, o qual é controlado pelo promotor *lacUV5*, que pode ser induzível por IPTG, um análogo da galactose. Além disso, essas cepas caracterizam-se por ter mutações, entre as quais se destacam: bloqueio na utilização da galactose, inativação de metilação, alterações em proteases externas à membrana, o que leva a um aumento da produtividade de algumas proteínas recombinantes (CASALI, 2010; ROSANO, CECCARELLI, 2014).

As características da cepa BL21 diretamente relacionadas a expressão são representadas pelo genótipo: *fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*. O genótipo *fhuA2 [lon]* indica resistência ao bacteriófago T1. Já o genótipo *ompT* refere-se a uma mutação em uma protease externa a membrana, com vistas a maior expressão das proteínas de interesse. A inativação do metabolismo da galactose é indicada por *gal*, isso é importante porque a expressão está sob controle da indução por um sistema operon-lactose. O genótipo *dcm* indica que há um bloqueio da metilação da citosina em sequências específicas, o que torna o DNA suscetível a determinadas enzimas de restrição, o que é importante para certas técnicas da biologia molecular que verificam a clonagem do gene. Em relação à regulação da expressão gênica, o genótipo *hsdS* indica que há uma inativação da metilação de determinados sítios (CASALI, 2010; BIOLABS, 2021).

No caso da cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, além das características já citadas, há uma melhoria da expressão, uma vez que ela apresenta cópias extras de determinados RNA transportadores (tRNA). Essas cópias extras de tRNA melhoram o processo de tradução. O genótipo da cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, em termos das características de interesse que impactam na expressão, é representado por: F-

*ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU proLCam<sup>r</sup>] [argU ileY leuW Strep/Spec<sup>r</sup>]. A indicação *F*<sup>-</sup> indica que a cepa não apresenta o plasmídeo de conjugação *F*, o que a torna mais estável em termos de manutenção da característica, após a transformação. O genótipo *Tet<sup>r</sup>* refere-se à resistência ao antibiótico tetraciclina. As cepas da família λ(*DE3*) apresentam o profago λ como carregador do gene para a T7 RNA polimerase, esse profago é usado para promover a expressão dessa polimerase. O genótipo *endA* relaciona-se a atividade de endonucleases e, no caso de expressão e clonagem, aumenta a qualidade quando do isolamento do DNA plasmidial. A fim de facilitar a clonagem de grandes plasmídeos, é feita uma modificação na cepa indicada pelo genótipo *Hte*. A melhoria na expressão de tRNA é indicada pelos genótipos *argU* (AGA/AGG), *proL* (CCC), *ileY* (AUA), *leuW* (CUA). A análise do genótipo dessa cepa permite identificar a resistência a dois antibióticos: clofanfenicol (*Cam<sup>r</sup>*) e estreptomicina *Strep/Spec<sup>r</sup>* (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016, 2017; CASALI, 2010; INVITROGEN, 2010).*

## 2.2 Expressão da proteína em pequena escala

A cepa BL21 foi utilizada para estudos em menor escala. Para tanto, transferiu-se uma colônia do meio LBA sólido para 5 mL de meio líquido, ambos com 50 ug.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Essa cultura foi mantida a 37 °C sob agitação (75 RPM), durante 12 horas e foi utilizada como pré-inóculo. A fim de testar as condições de produção e extração, foram feitos cultivos em 10 mL de meio LBA, utilizando-se 1% de inóculo. Esses cultivos foram mantidos a 37 °C até atingir cerca de 0,8 de absorbância (DO 600 nm), quando foi feita a indução da expressão utilizando Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Diferentes concentrações de IPTG

(0,25; 0,5 e 1,0 mM) foram testadas, além disso, testou-se indução com absorbância a 0,5 e 0,8. Após a indução da expressão, testou-se cultivo mantido por 4 horas a 37 °C e crescido a noite toda a 20 °C.

Após o cultivo da cepa BL-21, as culturas bacterianas foram centrifugadas por 10 minutos a 8.000 xg, o sobrenadante foi descartado e o precipitado armazenado a -20 °C até o momento da extração das proteínas. Em relação a extração nos experimentos em pequena escala, foram testados tampões de lise (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl e 10 mM Imidazol), com pH 8,0 e 9,0; bem como com glicerol (10%) e Tween-20 (2%). O rompimento das células foi feito por meio de sonicação utilizando-se ultrassom, com amplitude de 60%, pulsos de 20 segundos e intervalo de igual tempo, sendo 4 minutos efetivos, com as amostras imersas em banho de gelo. Após o rompimento das células, foi feita uma centrifugação nas mesmas condições descritas acima. Tanto o precipitado como o sobrenadante foram analisados por eletroforese SDS-PAGE, 12%, corada com azul-de comassie (LAEMMLI, 1970), e as bandas proteicas foram analisadas utilizando-se o programa ImageQuant-TL 8.1 (GE Lifescience, EUA). As bandas com peso molecular compatível com pré-BmNPV-Cath (30 a 37 kDa) foram analisadas via espectrometria de massa (item 2.6).

### **2.3 Expressão da proteína em grande escala**

A cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL foi utilizada para produção em grande escala. Para tanto, uma colônia foi transferida do meio LBA sólido para 5 mL de meio LBA líquido. Esse pré-cultivo foi mantido a 37 °C sob agitação (250 RPM) por doze horas. O aumento de escala foi feito transferindo-se 2 mL do pré-inóculo para

um volume de 2 L de meio LBA. Esse cultivo foi feito sob agitação (250 RPM) a 37 °C, até que cultura atingisse a DO (600 nm) de 0,8. Nesse momento foi feita a indução com 1 mM de IPTG, a temperatura foi reduzida para 27 °C e mantida por 18 horas. Após a indução, a cultura foi centrifugada por 20 minutos (8000 xg) em temperatura de 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado armazenado a -20 °C.

O precipitado produzido em grande escala foi descongelado em gelo, lavado em tampão fosfato salino (PBS) e ressuspendido em tampão de lise (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 1% glicerol, 20 mM imidazol), contendo 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de lisozima e 2 mM do fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). O rompimento das células foi feito utilizando-se ultrassom, com 10 minutos efetivos de pulsos a 20 segundos de pausa, com 30% de amplitude.

Os tratamentos posteriores do lisado foram feitos com base no protocolo da GE Healthcare (2009), com adaptações conforme segue. O lisado foi centrifugado por 1 hora a 20.000 xg, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo os corpos de inclusão, foi lavado quatro vezes com tampão de lavagem (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 M ureia, 1 % triton X-100). Subsequentemente o precipitado foi resuspendido em 50 mL de tampão de solubilização (0,1 M Tris pH 8; 8 M ureia, 40 mM DTT) por 15 horas a 4 °C, sob agitação (50 RPM). Após a solubilização, a solução foi centrifugada por 20 minutos a 20.000 xg, a 4 °C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado nas etapas seguintes.

## **2.4 Purificação**

A purificação foi feita a partir do sobrenadante em tampão de solubilização, o qual foi filtrado utilizando filtros comerciais para seringa, com retenção maior que 0,45  $\mu\text{M}$ . A amostra filtrada foi aplicada em uma coluna pré-empacotada Níquel-Sepharose (His-Trap) de 5 mL. Para tanto, foram injetados 100 mL de amostra, o fluxo de eluição utilizado foi de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e um gradiente de 50 a 400 mM Imidazol, sendo utilizado os seguintes tampões: A (0,1 M Tris-HCl pH 8; 6 M ureia, 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 mM imidazol) e B (0,1 M Tris-HCl pH 8, 6 M ureia; 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 400 mM imidazol). As frações foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE, 12%, corada com azul-de comassie (LAEMMLI, 1970).

## **2.5 Renaturação**

As frações eluídas na etapa de purificação com peso próximo ao esperado para a pré-catepsina foram combinadas e concentradas até um volume de 2 mL, por ultracentrifugação em filtros Amicon Ultra-15 de 10 kDa.

A renaturação foi feita com base nos protocolos da GE Healthcare (2009) e Hwang, Chung (2002), com adaptações. Para tanto, a fração concentrada foi diluída em 120 mL de tampão de renaturação (20 mM fosfato de sódio pH 7,4, 200 mM NaCl, 400 mM L-arginina, 0,05 % tween-20, 5 mM EDTA, 5 mM glutatona oxidada e 5 mM glutatona reduzida). A fração foi mantida sob agitação (120 RPM), refrigerada ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 12 horas. Após esse período, a fração foi novamente concentrada por ultracentrifugação até o volume de 1 mL.

A fração renaturada foi aplicada em uma coluna de gel filtração Superdex-200 (XK 26/40), com fluxo de  $1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com tampão de armazenamento (20 mM HEPES pH 7,4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA), conforme indicado no trabalho de

Novinec *et al.* (2012). A fração eluída foi concentrada, retirou-se uma amostra para análise em eletroforese (LAEMMLI, 1970), *Western blotting* (item 2.7) e quantificação espectrofotométrica, usando o Kit BCA (Sigma). Em seguida, adicionou-se 10% de glicerol e as frações foram armazenadas em -80 °C.

## 2.6 Identificação da proteína por espectrometria de massa

A fim de verificar a identidade da proteína expressa, ainda na etapa em pequena escala, realizou-se o *fingerprint* de peptídeos (PMF) por meio de espectrometria de massa (LC-MS<sup>E</sup>), a partir da banda de proteína extraída do gel de eletroforese que possuía peso molecular correspondente ao valor teórico estimado para a pré-BmNPV-Cath. Para tanto, realizou-se a extração e digestão com tripsina das proteínas constantes na referida banda recortada do gel, de acordo com os protocolos de Shevchenko *et al.* (1996a, 1996b).

A separação dos peptídeos trípticos em nanoescala foi realizada usando um sistema nanoACQUITY<sup>TM</sup> (Waters Corporation, EUA) equipado com uma coluna de fase reversa M-Class HSS T3 1,8 µm × 300 µm × 100 mm e uma pré-coluna compatível. As amostras de proteínas digeridas foram transferidas para a pré-coluna usando uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% sob um fluxo de 6 µL.min<sup>-1</sup> durante 2 minutos. Posteriormente, os peptídeos foram separados usando um gradiente de 0–40% da fase B (acetonitrila) em relação a fase A (ácido fórmico 0,1%) por 103 minutos sob um fluxo de 6 µL.min<sup>-1</sup>, seguido por um enxágue de 10 minutos com 85% da fase B. A coluna foi reequilibrada com as condições iniciais durante 20 minutos, sendo a temperatura da coluna mantida a 35 °C durante a corrida. Foram injetados na coluna 4 µL de amostra digerida, cuja concentração é

estimada entre 2 a 4  $\mu\text{g}$ . Todas as análises foram realizadas usando nano-ionização eletrospray no modo positivo e uma fonte de ionização NanoLockSpray (Waters, EUA). A calibração inicial do espectrômetro de massa foi realizada com uma solução de leucina encefalina 200  $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  fornecida pelo fabricante para a fonte de ionização NanoLockSpray, enquanto a calibração final foi realizada com formiato de sódio 100  $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  fornecido através do sistema da fluídica. O spray de referência foi amostrado a cada 30 segundo durante as corridas. Os dados de tempo exato de retenção de massa nanoLC-MS<sup>E</sup> foram coletados em um modo alternado de aquisição de baixa energia e elevada energia. O tempo de aquisição de espectros contínuos em cada modo foi de 1,5 segundos com um atraso interscan de 0,1 segundo. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados com energia de colisão constante de 3 eV. No modo MS de energia elevada, a energia de colisão foi aumentada de 12 para 45 eV durante cada espectro de 1,5 segundos. A radiofrequência aplicada ao analisador de massa quadrupolo foi ajustado de modo que os íons de 50 a 2000  $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$  fossem transmitidos de forma eficiente, o que garantiu que quaisquer íons menores que 50  $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$  observados nos dados de LC/MS fossem apenas derivados de dissociações na TRAP T-wave collision cell (MURAD, RECH, 2012).

Para o processamento dos espectros foram utilizados os programas ProteinLynx Global Server (PLGS) v.3.0.3, com IdentityE e ExpressionE v.3.0.3 (Waters). O banco de dados utilizado foi o de nucleopoliedrovírus de *Bombyx mori* (BmNPV) manualmente revisado (UP000204315), disponível na Uniprot. Esses dados pré-disponíveis foram usados para identificação das proteínas, após a sua randomização com PLGS 3.0.3 para gerar um banco de dados concatenado. O

máximo de clivagens perdidas pela tripsina foi de até uma e as tolerâncias de erro para íons precursores e fragmentos foram determinadas automaticamente. Os critérios de identificação da proteína também incluíram a detecção de, pelo menos, dois íons de fragmento por peptídeo, cinco fragmentos por proteína e a determinação de, pelo menos, um peptídeo por proteína. A identificação da proteína foi permitida com uma FDR (False Discovery Rate) de 4% em, pelo menos, três réplicas de injeções técnicas. Foi especificada como modificação fixa a carbamidometilação de Cys e como modificação variável a oxidação de Met (MURAD, RECH 2012; SILVA *et al.*, 2017).

## **2.7 Western blotting anti-His-tag**

Como forma de identificação da proteína expressa na etapa em grande escala, utilizou-se a técnica de *Western blotting* anti-His-tag, conforme metodologia de montagem e transferência descrita por Kurien e Scofield (2006).

A incubação foi realizada com o anticorpo monoclonal anti-HIS-tag conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:4.000. Após isso, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos com TBS e incubadas com tampão Tris-HCl 100 mM pH 9,5 contendo 100 mM de NaCl e 5 mM de MgCl<sub>2</sub> por 20 minutos. Adicionou-se, em seguida, 10 mL de NBT-BCIP solution (Sigma). A membrana foi incubada até que as bandas pudessem ser visualizadas.

## **2.8 Determinação da massa molecular da proteína em solução**

A verificação da unidade biológica da pré-BmNPV-Cath purificada foi realizada a partir da massa da proteína eluída em cromatografia de gel filtração,

utilizando coluna Superdex™ Increase 200 10/300 GL (Cytiva, USA). A curva de calibração foi construída usando os kits de calibração para filtração em gel LMW e HMW (Cytiva, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A análise foi realizada em modo isocrático utilizando o tampão Tris-HCl (50 mM) com NaCl (150 mM pH 8,0) à temperatura ambiente e fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, com volume injetado de amostra de 100 uL e o acompanhamento da corrida foi realizado a partir das absorvâncias em 214 e 280 nm. Os volumes de eluição para a proteína e os padrões foram medidos e convertidos em  $K_{av}$  (Equação 1) e graficados em função do logaritmo dos respectivos pesos moleculares ( $\log MW$ ),

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o} \quad (1)$$

Sendo:

$V_e$  = volume de eluição

$V_o$  = volume vazio da coluna

$V_c$  = volume geométrico da coluna.

As análises foram realizadas em duplicata.

## 2.9 Análise da proteína expressa por dicroísmo circular

Para as análises de dicroísmo circular, foi necessário trocar o tampão da solução de proteína por tampão fosfato de potássio 20 mM, NaF 50 mM, pH 8,0 por

meio de concentradores de centrifuga amicon de 10 kDa. Em seguida, a amostra na concentração de 1,7  $\mu\text{M}$  foi adicionada em uma cubeta de 1 mm de caminho óptico, em um espectropolarímetro Jasco J-815. Os espectros nas temperaturas de 25 e 95  $^{\circ}\text{C}$  representam a média de dez acumulações. Nos experimentos de desnaturação térmica, a temperatura foi aumentada a cada dois graus e um novo espectro coletado. A variação da elipsidade em 222 nm foi utilizada para monitorar a desnaturação.

O método de deconvolução do espectro, compara o espectro obtido com um banco de dados de espectros de CD de proteínas cujas estruturas cristalográficas já foram resolvidas por métodos experimentais. Assim, cada elemento é estimado separadamente e, dessa maneira, a soma das porcentagens não é normalizada para 100%. As alças e voltas (*loops* e *turns*) na estrutura de uma proteína, são elementos difíceis de se distinguir, assim, é difícil estimar a diferença entre eles e, por isso, suas porcentagens variam tanto dependendo do método de análise. Porém, os elementos mais estruturados de alfa-hélice e beta-folha são mais constantes e, por isso sua estimativa é bem mais precisa.

## **2.10 Estudos *in silico***

As simulações de *docking* foram realizadas no sítio ativo da estrutura da BmNPV-Cath, tendo como ligante de referência o inibidor MYP (4-Morpholin-4-Yl-Piperidine-1-Carboxylic Acid [1-(3-Benzenesulfonyl-1-Propyl-Allylcarbamoil)-2-Phenylethyl]-Amide) (BUENO *et al.*, 2019). Foi utilizado o programa Autodock Vina

na interface gráfica Pyrx. A caixa de busca teve proporções<sup>4</sup> de 15, 20 e 20 centrada nas coordenadas 34, 39 e 19 nos eixos x, y e z respectivamente. Os demais parâmetros foram utilizados na forma *default*. As simulações foram realizadas em cinco repetições, tendo o escore do inibidor modelado MYP como nota de corte.

As bibliotecas analisadas foram as de compostos derivados do eugenol com núcleos triazólicos contendo 49 moléculas (GAZOLLA *et al.*, 2018) e as derivadas da 2-arylidene Indan-1,3-diones, contendo 16 moléculas (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Tais bibliotecas foram sintetizadas pela equipe do prof. Dr. Róbson Ricardo Teixeira da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais). Os compostos derivados de eugenol foram originalmente sintetizados com o intuito de testar a citotoxicidade desses compostos, visto que há indícios de que eles teriam atividade anticancerígena (GAZOLLA *et al.*, 2018). Já os derivados de 2-arylidene Indan-1,3-diones foram originalmente sintetizados a fim de testar sua atividade inibitória sobre a protease NS2B-NS3 (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

### **3. Resultados e discussão**

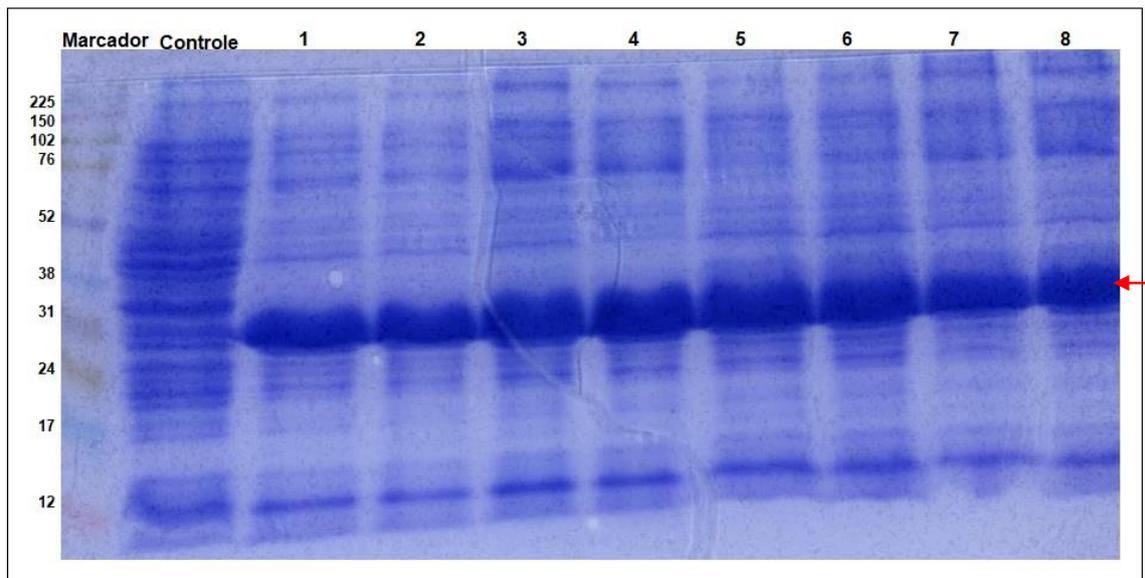
#### **3.1 Expressão e purificação de pre-BmNPV-Cath**

De acordo com estudos de Bueno *et al.* (2019), em sua estrutura terciária, pre-BmNPV-Cath formaria três pontes dissulfeto. Tendo em vista essa característica, bem como o fato dessa proteína apresentar melhor atividade e, portanto, solubilidade, em pH ácido, a expressão da pré-proteína na forma solúvel foi um desafio.

---

<sup>4</sup> Tendo em vista que é um estudo *in silico*, tais dimensões são valores arbitrários dados pelo programa e, por isso, não há uma unidade.

A produção de pre-BmNPV-Cath feita em cepas de *E. coli* da família BL21 resultou em alta expressão. Na Figura 1 é apresentado o gel de eletroforese das culturas lisadas de cepas de *E. coli* BL21, cultivadas em pequena escala, estimuladas com 1 mM de IPTG, mantidas a 37 °C por 4 horas.



**Figura 1.** Eletroforese do lisado de cepas de *E. coli* BL21 cultivadas em pequena escala para expressão de pre-BmNPV-Cath. A numeração 1 a 8 refere-se ao precipitado de cultivos em pequena escala, estimuladas com 1 mM de IPTG, mantidas a 37 °C por 4 horas. O controle refere-se a mesma cepa, porém, sem indução com IPTG. A seta vermelha indica a banda investigada como sendo pre-BmNPV-Cath.

Ao todo, foram analisadas 8 amostras expressas, além do controle. Nas cepas onde a proteína foi expressa, foi evidente uma grande banda, a qual correspondia, em média, a 49,16% (+/- 4,40) da área da amostra. Essa banda superexpressa tinha peso molecular médio de 30,75k Da (+/- 1,44).

Tendo em vista que o peso molecular teórico estimado para a pre-BmNPV-Cath com cauda de histidina era 37,6 kDa (ProtParam), foi feita a extração das bandas com superexpressão do gel de eletroforese, as quais foram tratadas,

digeridas e enviadas para análise por espectrometria de massa. A Tabela 1 resume o resultado da espectrometria de massa, o qual confirmou a identidade da pre-BmNPV-Cath, com uma cobertura de 92,57%. Destaca-se que essa cobertura refere-se a todo o expresso, incluindo os 96 resíduos do peptídeo de inibição e os 211 da proteína ativa, além da cauda de histidina (TAG).

**Tabela 1.** Resultados da espectrometria de massa das bandas superexpressas de pre-Bm-NPV-Cath, extraídas da eletroforese SDS-PAGE. A sequência coberta está sublinhada e em negrito. A sequência não grifada corresponde a cauda de histidinas. A marcação em cinza indica o peptídeo de inibição e em verde, os resíduos da proteína ativa.

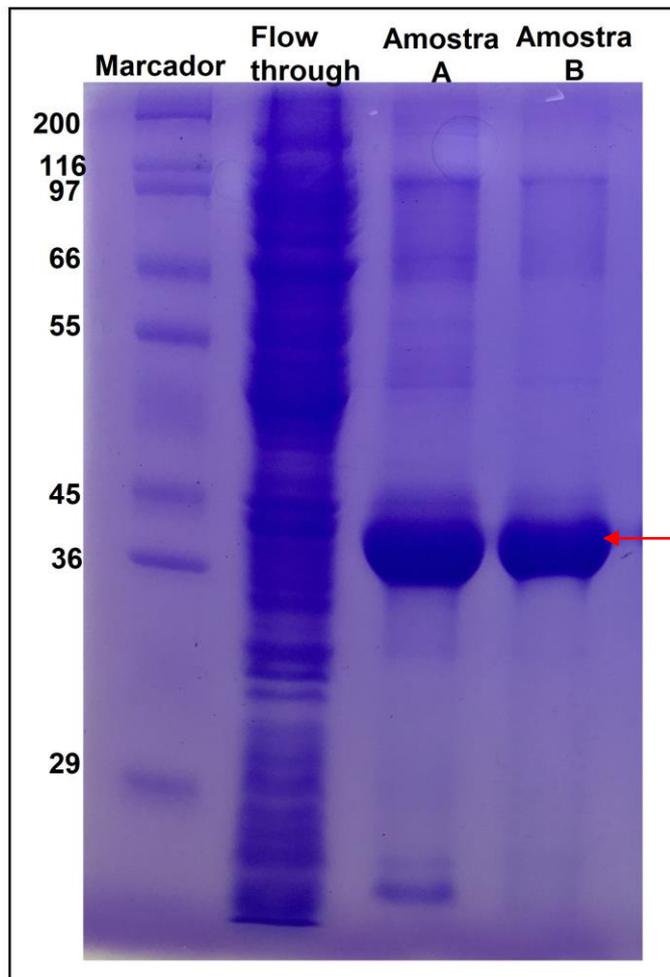
Descrição da proteína (Uniprot)	Uniprot id	Escore	Cobertura (%)	Peso molecular teórico (Da)
Viral cathepsin OS=Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus	P41721	25230,12	92,57	37.435,4595
Número de peptídeos: 92				
<p>MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAAYDPLK<b>APNYFEFVHRFNKNYSSEVEKLRRFKIFQHNLNEIINKN</b>  <b>QNSAKYEINKFSDLKDETI AKYTGLSLPTQTQNFCKVILLDQPPGKGPLEFDWRRLNKVTSVKNOG</b>  <b>MCGACWAFATLGSLESQFAIKHNELINLSEQQMIDCDFVDGACNGLLHTAFEAI IKMGGVQLES DYP</b>  <b>YEADNNCRMNSNKFLVQVKDCYRI I VYEEKLKDLLPLVGP I PMAIDAAD I VNYKQGI IKYCFDSGL</b>  <b>NHAVLLVGYGVENNI PYWTFKNTWGTDWGEDGFVRVQONINACGMRNELASTAVIY</b></p>				

Em teoria, a BmNPV-Cath deve apresentar atividade ótima em pH ácido (por volta de 5,0), no entanto, preserva atividade em ambiente neutro. As catepsinas virais são produzidas na forma de zimogênio, sendo que sua ativação ocorre por meio de clivagem proteolítica ou autoclivagem, em ambiente ácido, com remoção de peptídeo com cerca de 100 resíduos de aminoácidos (ISHIMWE *et al.*, 2015; LIMA, 2013; HODGSON *et al.*, 2013; HODGSON *et al.*, 2021; SLACK, 1995).

A alta expressão da pre-BmNPV-Cath foi possível porque ela estava na forma de zimogênio e, portanto, não era prejudicial à célula da bactéria. No entanto, o desafio para a produção foi a solubilidade da pré-proteína. Tendo em vista que o

aumento de etapas tende a diminuir o rendimento dos processos, foram testadas algumas condições, a fim de produzir pre-BmNPV-Cath na forma solúvel e, com isso, evitar etapas de lavagem, solubilização e renaturação. As variáveis testadas (conforme descrito na metodologia) não surtiram efeito em relação a solubilidade da pre-BmNPV-Cath, sendo que a concentração de 1 mM de IPTG foi a melhor para a expressão, mas não teve efeitos para a solubilidade. As demais variáveis não influenciaram na expressão.

Considerando a insolubilidade da pre-BmNPV-Cath produzida, foi necessária a extração a partir dos corpos de inclusão. Para isso, foram feitos os cultivos em grande escala a fim de ter um melhor rendimento, visto que etapas adicionais precisaram ser realizadas. Após os tratamentos de lavagem e solubilização dos corpos de inclusão, a amostra filtrada foi eluída em coluna HIS-Trap (afinidade por níquel). O resultado da eletroforese das frações eluídas nessa etapa é apresentado na Figura 2, onde é possível observar uma banda com peso molecular compatível com pre-BmNPV-Cath, no entanto, a amostra estava parcialmente purificada. A eluição foi feita em gradiente, sendo que a fração parcialmente purificada eluiu com cerca de 320 mM de imidazol.



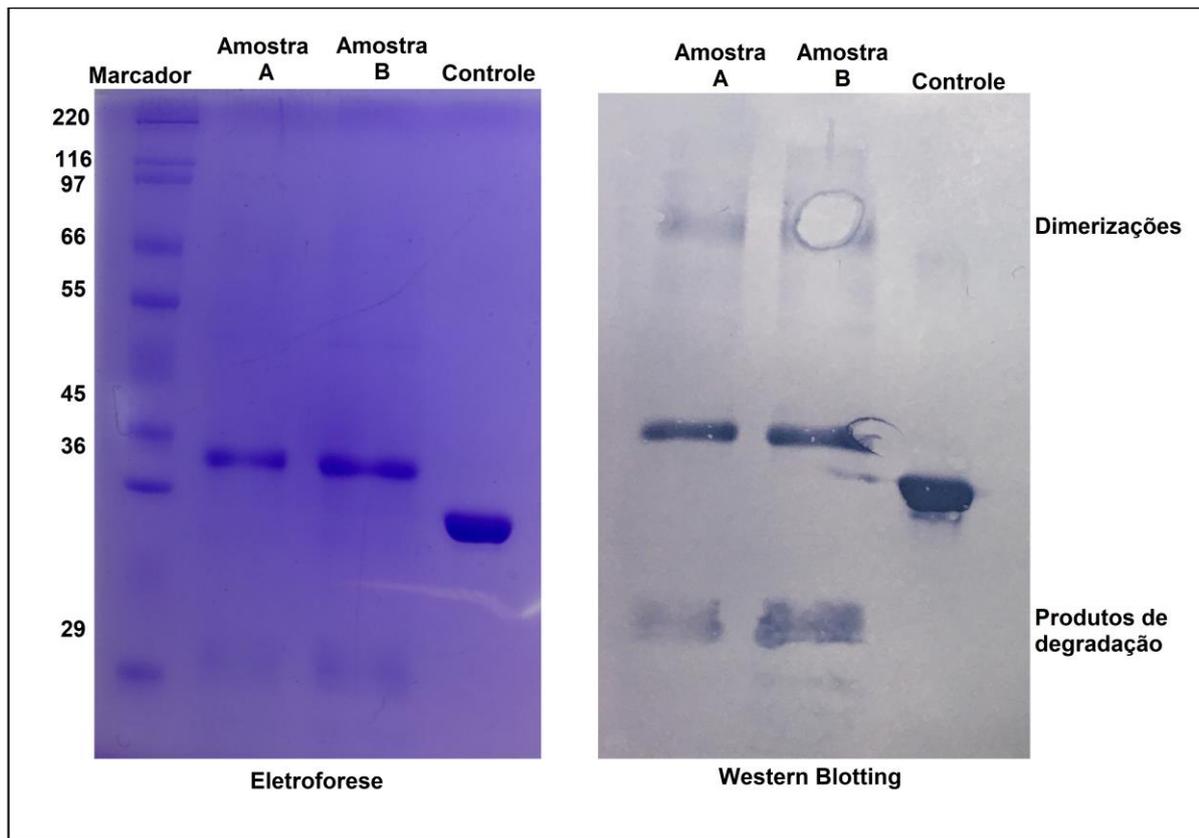
**Figura 2.** Eletroforese após amostra de pre-BmNPV-Cath ser submetida a cromatografia por afinidade ao níquel. As amostras referem-se à fração dos corpos de inclusão lavados, solubilizados e filtrados. *Flow through* são as proteínas que não se ligaram a coluna. A seta indica as bandas compatíveis com pre-BmNPV-Cath.

As condições necessárias para a solubilização dos corpos de inclusão desdobram pre-BmNPV-Cath. Dessa maneira, foi feita uma etapa de renaturação, utilizando-se substâncias como agente redutor e agente oxidante, a fim de que pre-BmNPV-Cath pudesse restabelecer suas pontes dissulfeto intracadeia, bem como outras interações necessárias à estrutura terciária. Após essa etapa, a amostra renaturada foi submetida a uma coluna de gel filtração de alta definição, o

que contribuiu para a purificação adicional e troca para um tampão de armazenamento (NOVINEC *et al.*, 2012).

Os resultados da amostra após a renaturação, a filtração em cromatografia de alta definição e concentração são apresentados na Figura 3, onde é possível observar a imagem da eletroforese, bem como o *Western blotting*, a fim de confirmar a identidade da proteína. Analisando-se a eletroforese, é possível observar que a amostra se encontra purificada, pois não há outras bandas significativas presentes. Em relação a identificação, foi utilizado anticorpo anti-His-tag, sendo possível confirmar que se trata de proteína com cauda de histidina e, portanto, trata-se da pre-BmNPV-Cath purificada.

Após a purificação e identificação da pre-BmNPV-Cath, foi feita a quantificação proteica, que correspondeu a  $0,16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , o equivalente a 0,86 mg de proteína total. Embora o rendimento da produção tenha sido de 0,43 mg de proteínas por litro de cultura, o que é inferior ao encontrado em outros trabalhos (NOVINEC *et al.*, 2012; D'ALESSIO *et al.*, 1999), ele é suficiente para os objetivos desse estudo.

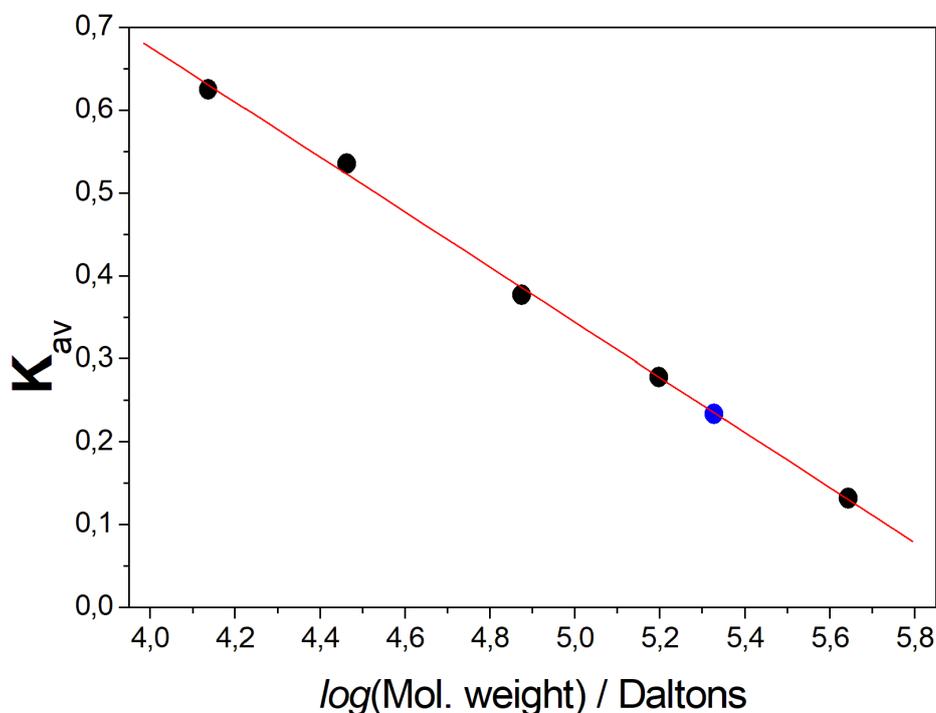


**Figura 3.** Eletroforese e *Western Blotting* da pre-BmNPV-Cath. A esquerda a eletroforese da amostra após renaturação, filtração em cromatografia de afinidade (Superdex-200) e concentração. A direita, *Western blotting*. Amostras A e B correspondem respectivamente a utilização de 2 e 4  $\mu$ L da fração concentrada. No *Western blotting* é possível ver alguns artefatos da técnica (dimerização e produtos de degradação), no entanto, é possível identificar claramente a banda correspondente a pre-BmNPV-Cath.

### 3.2 Análise da massa molecular da proteína expressa em solução.

Os dados para o cálculo da massa molecular da pre-BmNPV-Cath foram plotados em um gráfico, que é apresentado na Figura 4. De acordo com essa análise, a proteína em solução apresenta uma massa de 213 kDa. Considerando as massas moleculares obtidas com a análise da sequência por LC-MS<sup>E</sup>, que foram em torno de 37,5 kDa (Tabela 1), a razão entre as massas da proteína em solução para a unidade monomérica foi de 5,7, indicando que provavelmente a estrutura em solução representa um hexâmero. Este resultado é bastante incomum, pois as

unidades biológicas das catepsinas (*Papain-like cysteine peptidase superfamily*) geralmente são monômeros (InterPro id: IPR038765). Tendo em vista que as catepsinas são ricas em cisteína, a provável explicação para esse resultado é a ocorrência de pontes dissulfeto intracadeia, o que resulta em agregados. Dessa maneira, em uma etapa posterior, de ativação da enzima, em estudos posteriores, será necessário considerar essa possibilidade, a fim de tornar a enzima ativa. Para tanto, é recomendável o uso de agentes redutores, tais como Ditiotreitól.

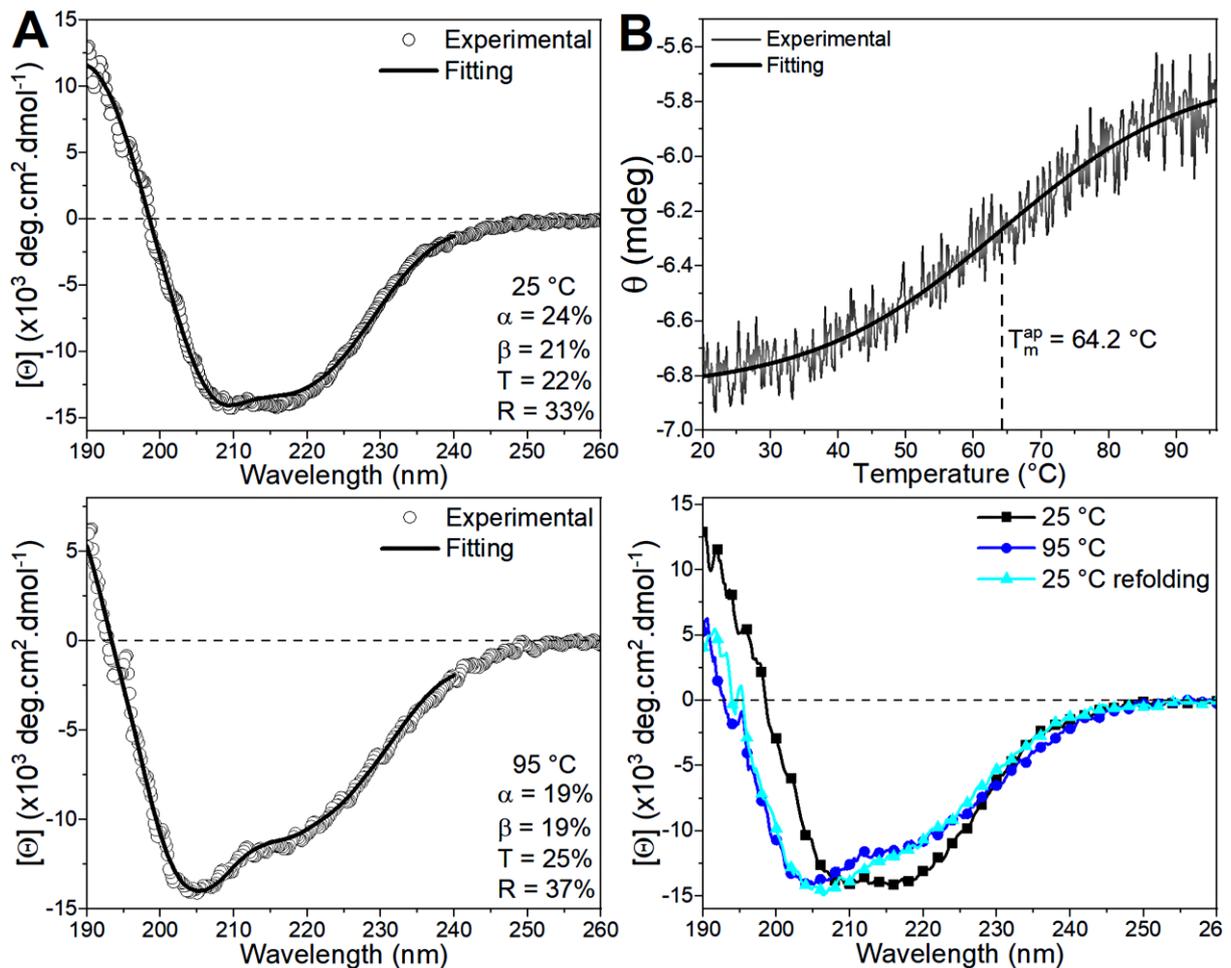


**Figura 4.** Gráfico para determinação do peso molecular de pre-BmNPV-Cath a partir da eluição em coluna Superdex™ Increase 200 10/300, por meio do kit de calibração de filtração em gel LMW e HMW (Cytiva, USA) onde foi aplicado: Ferritina (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Canalbumina (75 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa). O  $K_{av}$  dos padrões e da pre-BmNPV-Cath foram representados graficamente em relação ao logaritmo de seus pesos moleculares (pontos pretos no gráfico). A massa molecular (MW) da pre-BmNPV-Cath foi calculado por ajuste linear a partir do  $K_{av}$  de 0,2335 (ponto azul do gráfico). As corridas realizadas em modo isocrático com tampão Tris-HCl 50 mM com NaCl 150 mM, pH 8,0 e à temperatura ambiente em fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. O peso molecular estimado para a pre-BmNPV-Cath em solução foi de 213 kDa. Variáveis de equação linear:  $a = 2,00381$ ;  $b = -0,33196$ ;  $K_{av}(y) = 0,41538$ ;  $R^2 = 0,99912$ .

### 3.3. Análise da estrutura por espectroscopia de dicroísmo circular

A proteína pre-BmNPV-Cath expressa foi analisada por espectroscopia de dicroísmo circular. Esta técnica utiliza o desvio da luz polarizada gerado pelos elementos de estrutura secundária da proteína (alfa-hélices, beta-folha, voltas e segmentos aleatórios) para avaliar o grau de enovelamento da proteína em determinadas condições experimentais. Uma vez que os elementos ordenados de estrutura secundária tendem a se desenovelar com o aumento da temperatura (desnaturação), é possível acompanhar a variação espectral da proteína em função do aumento da temperatura e, com isso estimar alguns parâmetros biofísicos como temperatura de desenovelamento ( $T_m$ ), que representa a temperatura média aparente necessária para desnaturar 50% da proteína.

O perfil do espectro de dicroísmo circular da pre-BmNPV-Cath a 25 °C e 95 °C é apresentado na Figura 5A. Nota-se que esse perfil foi característico para uma proteína enovelada. O comportamento da proteína em diferentes temperaturas foi acompanhado a 222 nm, tal resultado é apresentado na Figura 5B, nessa mesma figura é possível comparar o espectro da proteína a 25 °C, 95 °C e uma amostra de renaturação (identificada como refoigind). A amostra renaturada corresponde aquela tratada a 95 °C, mantida a 25 °C por 30 minutos, após esse período procedeu-se sua análise a 25 °C.



**Figura 5.** Ensaios de espectroscopia de dicroísmo circular com a pre-BmNPV-Cath. **(A)** perfil espectral da proteína à 25 °C (superior) e 95 °C (inferior). Os círculos brancos são os dados experimentais e a linha preta o ajuste do programa CDpro com o algoritmo CONTILL com o conjunto de referência SMP56. **(B)** Superior: variação da elipsdade em 222 nm em função da temperatura. A linha escura representa um ajuste sigmoidal aos dados experimentais indicando a  $T_m$  aparente na metade da transição. Inferior: comparação do perfil espectral a 25 °C, 95 °C e a 25 °C após renaturação (refolding).

Os dados experimentais obtidos com a proteína em solução estão de acordo com o observado na estrutura tridimensional da BmNPV-Cath utilizada nas simulações de *docking* (BUENO *et al.*, 2019), conforme estatística da proteína feita pelo servidor Vadar (Tabela 2).

Este resultado valida o modelo experimental de Bueno *et al.* (2019), indicando que a estrutura modelada utilizada nas simulações de *docking* se assemelha aquela

observada em solução, o que fornece maior confiabilidade aos resultados de *docking*.

**Tabela 2.** Porcentagens dos elementos de estrutura secundária obtidos a partir da estrutura modelada da BmNPV-Cath usada nas simulações de *docking* e a pre-BmNPV-Cath em solução.

	Dados de CD da pre-BmNPV-Cath	Modelo pre-BmNPV-Cath (com peptídeo inibição)	Modelo BmNPV-Cath (sem peptídeo inibição)
<b>Alfa-hélice</b>	21	17	24
<b>Beta-folha</b>	22	22	32
<b>Voltas (<i>turns</i>)</b>	23	17	24
<b>Aleatório (<i>random coil</i>)</b>	34	60	42

O perfil de desnaturação da pre-BmNPV-Cath indica uma transição entre dois estados (nativo e desnaturado) com uma  $T_m$  aparente de 64,2 °C (Figura 5B). A transição lenta entre os dois estados indica um processo não cooperativo com uma baixa variação da elipsidade, de -6,8 a 25 °C para -5,8 a 95 °C. Não se observa diferença significativa entre os espectros de CD da proteína a 25 °C e a 95 °C. O espectro de CD a 25 °C obtido com a renaturação da proteína praticamente não se diferenciou do espectro da proteína a 95 °C. Existem duas interpretações possíveis para este resultado. A primeira, e menos provável, é que a proteína não se desnaturou a 95 °C, o que ocorre para a maioria das proteínas. A segunda hipótese, se baseia na provável formação de pontes dissulfeto entre as cadeias da proteína. A evidência que reforça esta hipótese é o alto peso molecular da proteína em solução estimado por filtração em coluna.

### 3.4 Estudos *in silico*

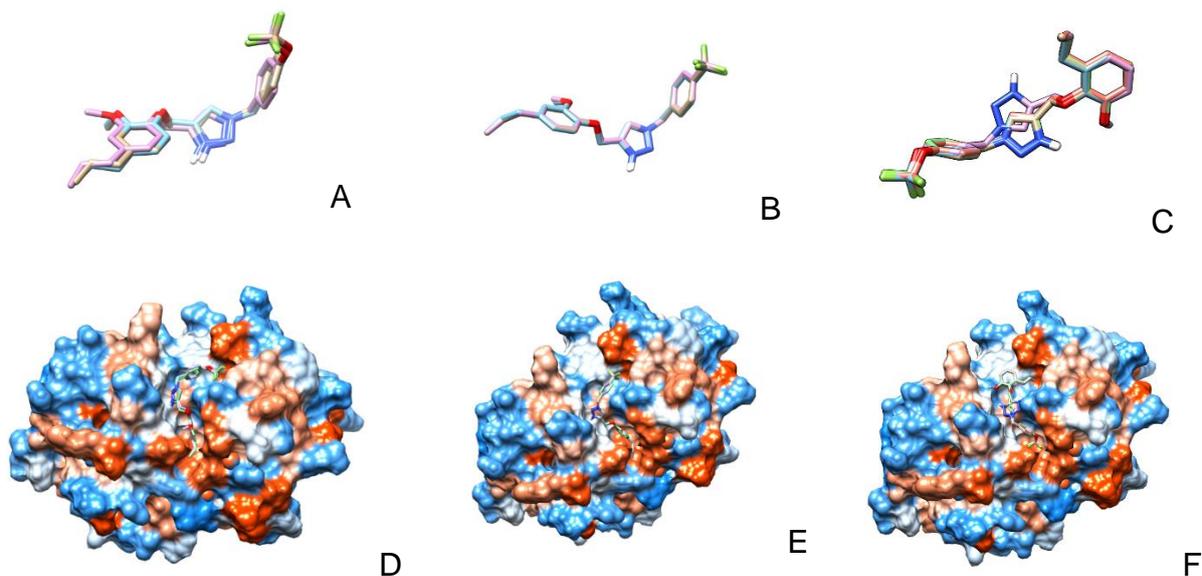
Na primeira biblioteca analisada por *docking*, foram avaliadas 49 moléculas, sendo que os ligantes EUGD09 e EUGD08 foram os mais bem ranqueados com scores próximos ao do ligante de referência (MYP), porém, o ligante EUGD09 teve um desempenho ligeiramente melhor em relação ao EUGE08. O ligante EUGD36 teve um escore menor em relação aos outros dois, porém ainda assim, significativo. O ligante mais bem ranqueado da segunda biblioteca apresentou escore de -7,32, ou seja, menor que o dos ligantes da primeira biblioteca, por isso nenhum ligante da segunda biblioteca foi considerado para testes *in vitro*.

Em todas as cinco repetições, nenhum dos ligantes das bibliotecas apresentou melhor resultado (escore) em relação ao ligante de referência MYP. Assim, somente os três compostos sumarizados na Tabela 3, os quais apresentaram uma variação de escore menor que 5% em relação ao escore do ligante de referência MYP, serão considerados para os futuros estudos *in vitro*.

**Tabela 3.** Média e desvio padrão dos scores dos melhores candidatos a inibidores de BmNPV-Cath, encontrados nas simulações de *docking*.

	<b>MYP</b>	<b>EUGD08</b>	<b>EUGE09</b>	<b>EUGD36</b>
<b>Score (sd)</b>	7,90 ± 0,00	7,76 ± 0,06	7,80 ± 0,10	7,62 ± 0,05

A melhor pose dos três ligantes selecionados (EUGD08, EUGD09 e EUGD36) sempre foi recuperada (se repetiram) em todas as simulações, o que sugere um modo de ligação consistente (Figura 6). Nenhum dos outros ligantes avaliados nas séries repetiu a pose ou o escore nas simulações, o que sugere pouca afinidade com a enzima alvo. Destaca-se ainda o ligante EUGE09 que, por ter apresentado melhor sobreposição em suas poses, o qualifica como melhor candidato para testes de bancada.



**Figura 6.** Poses obtidas com o *docking* dos ligantes de BmNPV-Cath. As imagens A, B e C representam as poses dos ligantes EUGD08, EUGED09 e EUGD36, respectivamente, nas simulações. As imagens D, E e F representam, respectivamente, a interação dos ligantes EUGD08, EUGED09 e EUGD36 com BmNPV-Cath. A melhor sobreposição das poses do ligante EUGD09 sugere que este possa ser mais estável que os outros dois.

#### 4. Conclusões

Devido a dificuldades metodológicas na obtenção da forma solúvel da BmNPV-Cath, problemas orçamentários e logísticos por conta das restrições de acesso ao laboratório decorrentes da pandemia de Covid-19, não foi possível realizar os ensaios de atividade da BmNPV-Cath na ausência e presença dos inibidores EUGD08, EUGD09 e EUGD36. Contudo, tais estudos de atividade estão em andamento onde, protocolos de ativação estão sendo testados. Os resultados destas análises serão discutidos e devem ser incluídos na versão do artigo a ser submetido a revista.

Embora não se relacione com o processo de entrada do vírus nas células infectadas, a catepsina do nucleopoliedrovírus de *Bombyx mori* (BmNPV-Cath)

desempenha papel essencial na dispersão viral. Dessa maneira, compreender a ação dessa enzima, bem como estudar possíveis inibidores contribui para diminuir as perdas na sericultura.

Nesse trabalho, foi possível desenvolver um protocolo para produção heteróloga da BmNPV-Cath, que resultou em rendimento satisfatório de 0,43 mg.L<sup>-1</sup>, considerando os desafios relacionados a solubilidade das catepsinas. Os resultados de dicroísmo circular validaram o modelo descrito para essa proteína. Por meio de estudos *in silico* foi possível selecionar candidatos a inibidores para BmNPV-Cath com baixo custo, os quais poderão ser testados para o controle da doença amarelidão do bicho-da-seda.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro. A Biolinker/USP pelo apoio na produção em grande escala. A empresa BRATAC pelo apoio na execução dos testes com lagartas e ao CENAPAD-SP pelos recursos computacionais. Ao IFPR pelo afastamento parcial para a realização do projeto.

## **5. Referências bibliográficas**

ADACHI, Wakako *et al.* Isolation and Characterization of Human Cathepsin V: a major proteinase in corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, S.L., v. 39, n. 10, p. 1789-1796, set. 1998.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Competent Cells**: how do you choose the right competent cell?. San Diego: Stratagene, 2016. 22 p. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5989-8281ENUS.pdf>. Acesso em: 23 out. 2021.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Molecular and Synthetic Biology Solutions**. San Diego: Stratagene, 2017. 20 p. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Synthetic%20Bio%20Brochure%205991-9163EN%20POD.pdf>. Acesso em: 24 out. 2021.

AKPINAR, Ozlem; PENNER, Michael H.. Peptidase Activity Assays Using Protein Substrates. **Current Protocols In Food Analytical Chemistry**, Oregon, v. 2, n. 2, p. 1-10, jan. 2002. Supplement 3.

BARRETT, Alan J.; RAWLINGS, Neil D.. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biol. Chem**, New York, v. 328, n. 1, p. 727-733, maio 2001.

BIOLABS. **NEBExpress Cell-free E. coli Protein Synthesis System**. 2021. Disponível em: <https://www.neb.us.com/products/neb-catalogue/protein-analysis,-exp-purification/nebexpress-lt;sup-gt;-amp;reg;-lt;-sup-gt;-cell-free-lt;em-gt;e-coli-lt;-em-gt;-protein-synthesis-system>. Acesso em: 02 dez. 2021.

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa. Vírus entomopatogênicos no bicho da seda: taxonomia e citopatologia causada por nucleopolyhedrovirus em células de *Bombyx mori*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, S.L., v. 1, n. 24, p. 54-58, fev. 2002a.

BRANCALHÃO, R.M.C. *et al.* Infecção causada por nucleopolyhedrovirus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 57-63, jun. 2002b.

BRANCALHÃO, R.M.C. *et al.* Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics And Molecular Research**, S.L., v. 1, n. 8, p. 162-172, 17 fev. 2009.

BUENO, Paulo Sérgio Alves *et al.* The structure of viral cathepsin from *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a target against grasserie: docking and molecular dynamics simulations. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], v. 37, n. 14, p. 3607-3615, 18 jan. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2018.1521344>.

CASALI, Nicola. *Escherichia coli* host strains. In: CASALI, Nicola *et al.* (ed.). **E. coli Plasmid Vectors: methods and applications**. Totowa: Humana, 2010. Cap. 3. p. 27-48.

CHIARELLO, Alex Sandro Gularte. **Análise do perfil proteômico do tecido gorduroso de lagartas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) inoculadas com nucleopolyhedrovirus (BmNPV)**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

CHOPADE, Puneet *et al.* Assessment of diseases in *Bombyx mori* silkworm – A survey. **Global Transitions Proceedings**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 133-136, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gltp.2021.01.019>.

D'ALESSIO, Karla J. *et al.* Expression in *Escherichia coli*, refolding, and purification of human Procathepsin K, an osteoclast-specific protease. **Protein Expression And Purification**, S.L., v. 1, n. 15, p. 213-220, jan. 1999.

FILIPPOVA, Irina Y. *et al.* New Glutamine-Containing Substrates for the Assay of Cysteine Peptidases From the C1 Papain Family. **Frontiers In Molecular Biosciences**, [S.L.], v. 7, p. 1-9, 22 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2020.578758>.

GAZOLLA, Poliana *et al.* Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. **Química Nova**, [S.L.], p. 497-506, 2018. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170206>.

GE HEALTHCARE. **Recombinant protein purification handbook**: principles and methods. Björkgatan: Ge Healthcare Bio-Sciences Ab, 2009. 303 p.

HAWTIN, Rachael E. *et al.* Liquefaction of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus-Infected Insects Is Dependent on the Integrity of Virus-Encoded Chitinase and Cathepsin Genes. **Virology**, S.L., v. 238, n. 1, p. 243-253, set. 1997.

HODGSON, Jeffrey J. *et al.* Role of Interactions between *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Procathepsin and Chitinase Chitin-Binding or Active-Site Domains in Viral Cathepsin Processing. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 3471-3483, 15 mar. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01937->

HODGSON, Jeffrey J. *et al.* Mature viral cathepsin is required for release of viral occlusion bodies from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus-infected cells. **Virology**, [S.L.], v. 556, p. 23-32, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.001>.

HWANG, Hyo-Sung; CHUNG, Hye-Shin. Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. **Protein Expression And Purification**, S.L., v. 1, n. 25, p. 541-546, mar. 2002.

ISHIMWE, Egide *et al.* Reaching the melting point: degradative enzymes and protease inhibitors involved in baculovirus infection and dissemination. **Virology**, [S.L.], v. 479-480, p. 637-649, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.027>.

INVITROGEN. **One Shot BL21(DE3)**: catalog nos. c6000-03, c6565-03, c6060-10, and c6060-03. Carlsbad: Invitrogen, 2010. 20 p.

KHURAD, A.M. *et al.* Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [S.L.], v. 87, n. 1, p. 8-15, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2004.05.008>.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H.. Western blotting. **Methods**, San Diego, v. 38, n. 4, p. 283-293, abr. 2006.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [S.L.], v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

LIMA, Anabele Azevedo. **O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral de baculovírus**. 2013. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LÜ, Peng *et al.* Discovery of anti-viral molecules and their vital functions in *Bombyx mori*. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [S.L.], v. 154, p. 12-18, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.012>.

MURAD, Andre M; RECH, Elibio L. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **Bmc Biotechnology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-17, 5 nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-12-82>.

NOVINEC, Marko *et al.* A simple and efficient protocol for the production of recombinant cathepsin V and other cysteine cathepsins in soluble form in *Escherichia coli*. **Protein Expression And Purification**, [S.L.], v. 82, n. 1, p. 1-5, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.11.002>.

OHKAWA, Taro *et al.* A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* Nuclear Polyedrosis virus. **Journal Of Virology**, S.L., v. 68, n. 10, p. 6619-6625, out. 1994.

OLIVEIRA, Ana Flávia C. da S. *et al.* Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1,3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 149, p. 98-109, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.037>.

ORO, A. L. *et al.* Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) larva integument infected by *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Genetics And Molecular Research**, S.L., v. 2, n. 20, p. 1-10, abr. 2021.

PARANÁ, Instituto de Desenvolvimento do. **Sericultura**. Curitiba: Idr-Pr, 2021. Disponível em: [www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Sericultura](http://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Sericultura). Acesso em: 23 set. 2021.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A.. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-17, 17 abr. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.

SAEZ, Cláudia Regina das Neves *et al.* Detection of Contamination and Analysis of Vertical Transmission of BmNPV in Eggs and Moths of *Bombyx mori*. **Open Journal**

**Of Genetics**, [S.L.], v. 04, n. 05, p. 370-377, 2014. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2014.45034>.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. (ed.). **Molecular cloning: a laboratory manual**. S.L: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.

SANTOS, Vanessa da Costa *et al.* Sericultura: colhendo os frutos da criação do bicho-da-seda. **Informativo Técnico do Semiárido**, Pombal, v. 10, n. 2, p. 62-68, dez. 2016.

SHEVCHENKO, A. *et al.* Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 93, n. 25, p. 14440-14445, 10 dez. 1996. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>.

SHEVCHENKO, Andrej *et al.* Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 850-858, 1 mar. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac950914h>.

SILVA, Wanderson M. *et al.* Label-free quantitative proteomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates reveals differences between Biovars ovis and equi strains. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-14, 8 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3835-y>.

SILVA, A. P. *et al.* Productive and qualitative characteristics of sericulture in Brazil in Domestic and Non- Domestic rearing systems. **Archivos de Zootecnia**, S.L., v. 270, n. 70, p. 146-151, abr. 2021.

SLACK, Jeffrey M. *et al.* Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. **Journal Of General Virology**, Ithaca, v. 76, n. 1, p. 1091-1098, jan. 1995.

SOMOZA, John R. *et al.* Crystal Structure of Human Cathepsin V,. **Biochemistry**, [S.L.], v. 39, n. 41, p. 12543-12551, 21 set. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi000951p>.

YASUDA, Yoshiyuki *et al.* Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. **The Journal Of Biological Chemistry**, S.L., v. 279, n. 35, p. 36761-36770, ago. 2004.

ZAMBRANO-GONZALEZ, Giselle *et al.* The evolution of knowledge in sericultural research as observed through a science mapping approach. **F1000Research**, [S.L.], v. 6, p. 2075, 30 nov. 2017. F1000 Research Ltd. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.12649.1>.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nessa tese foram apresentados estudos estruturais e funcionais desenvolvidos em paralelo, para duas diferentes proteínas: urease embrionária de soja e catepsina de nucleopoliedrovírus de *Bombyx mori* (BmNPV-Cath). O estudo em conjunto da estrutura e função permite uma compreensão mais precisa da proteína, o que facilita sua aplicação como possível fármaco, no caso da urease, ou como alvo de inibidores, no caso da BmNPV-Cath.

Embora a atividade fungitóxica de urease de soja fosse conhecida, os estudos focavam principalmente em fungos de interesse agrícola e algumas leveduras patogênicas de animais. O artigo resultante dessa tese foi o primeiro estudo publicado de conhecimento da autora sobre os efeitos tóxicos da urease de soja contra *Paracoccidioides brasiliensis*. A urease embrionária de soja pode ser uma candidata ao desenvolvimento de fármacos, em especial contra as manifestações tóxicas de mucosa provocadas pela paracoccidioidomicose. Para tanto, são necessários estudos sobre sua toxicidade celular, além de testes *in vivo* com modelos animais e pesquisas de farmacocinética e farmacodinâmica.

Em relação a BmNPV-Cath, foi possível desenvolver um protocolo de extração, purificação e renaturação dessa enzima, o que permite realizar estudos sobre sua estrutura, além de testes sobre sua atividade. Os ensaios preliminares de dicroísmo circular são compatíveis com os modelos computacionais anteriormente realizados pelo grupo de pesquisa. A seleção de inibidores por meio de estudos *in silico* contribuíram para otimizar o processo, identificando as moléculas com maior potencial de inibição, o que contribui para a realização de um menor número de ensaios de bancada, o que economiza tempo e recursos.

Tendo em vista que foi possível obter uma catepsina, é possível indicar, para estudos futuros, a realização da digestão da urease de soja com essa enzima. Com isso, pode-se obter pepcanatox e, dessa maneira, aprofundar os estudos sobre a atividade entomotóxica das ureases. Pode-se ainda verificar se outras regiões da urease, digeridas pela catepsina, apresentaria atividade fungitóxica.

## **ANEXO – Outras produções durante o período do doutorado (2017-2021)**

ALEIXO, S. B.; GARCIA, K. C. S.; ANGELO, E. A.; SEIXAS, F. A. V. Estudo da interação entre a enzima recombinante homoserina desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* com o inibidor aspartato In: IV Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2019, Umuarama. **Anais do IV Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação**. Umuarama - PR: Unipar, 2019. p.1 – 1.

ANGELO, E. A.; SEIXAS, F. A. V. Obtenção de urease de soja para avaliação de seu potencial antifúngico In: II Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2017, Umuarama. **Anais do Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, Encontro Anual de Iniciação Científica da UNIPAR**. 2017.

ANGELO, E. A.; ANDRICH, F. Antimicrobial activity in vitro of extracts of *Moringa oleifera* and *Schinus terebinthifolius* In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. **Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2017.

ANGELO, E. A.; PIMENTEL, A. L.; SEIXAS, F. A. V. Extração e purificação da enzima urease de soja para aplicações antimicrobianas In: II Simpósio de Produção Sustentável e Saúde Animal, 2017, Umuarama. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**. Maringá: UEM, 2017. v.4. p.17 – 17.

ARAUJO, E. C. V.; ANGELO, E. A. Metodologias Alternativas Para o Ensino Prático de Microbiologia no Ensino Fundamental e Médio In: VI Seminário de Extensão, Ensino, Pesquisa e Inovação do IFPR, 2017, Pinhais. **Anais do VI Seminário de Extensão, Ensino, Pesquisa e Inovação do IFPR – SE<sup>2</sup>PIN**. Curitiba: IFPR, 2017. p.258 – 258.

CARVALHO, J. V. C.; DELAI, V. M.; SILVA, C.; ANGELO, E. A.; ROCHA, S. A.; SILVA, L. K. Construção de biodigestor de resíduos sólidos alimentares e correção de seu pH empregando bicarbonato de sódio In: II Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2017, Umuarama. **Anais do Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, Encontro Anual de Iniciação Científica da UNIPAR**. 2017.

CORDOBA, V. H. S.; MOURA, N. F.; BISPO, T. A.; ANGELO, E. A. A utilização do jogo “Dominate game”, como ferramenta didática no processo de ensino aprendizagem de Genética In: VI Seminário de Estudos Técnicos e Tecnológicos (SETEC), 2018, Umuarama. **Anais do VI SETEC Instituto Federal do Paraná**

**(IFPR) Campus Umuarama** - 2018. Umuarama - PR: IFPR - Umuarama, 2018. p.116 – 117.

DELAI, V. M.; ANGELO, E. A.; CARVALHO, J. V. C.; JEREMIAS, N. V. A.; SILVA, C.; ANDRICH, F.; ROCHA, S. A.; SILVA, L. K. Caracterização microbiológica de biofertilizante para verificação da aplicabilidade na produção de alface In: V SeTec - Seminário de Estudos Técnicos e Tecnológicos do Instituto Federal do Paraná - Campus Umuarama, 2017, Umuarama. **Anais do V SeTec - Seminário de Estudos Técnicos e Tecnológicos do Instituto Federal do Paraná - Campus Umuarama.** Umuarama: IFPR, 2017. p.24 – 24.

DELAI, V. M.; CARVALHO, J. V. C.; SILVA, C.; JEREMIAS, N. V. A.; SILVA, L. K.; ANGELO, E. A. Avaliação da influência da porcentagem do inóculo na qualidade sanitário do biofertilizante In: II Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2017, Umuarama. **Anais do Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, Encontro Anual de Iniciação Científica da UNIPAR.** 2017.

GARCIA, K. C. S.; ALEIXO, S. B.; ANGELO, E. A.; SEIXAS, F. A. V. Estudo da interação entre a enzima recombinante homoserina desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis* com o inibidor treonina In: IV Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2019, Umuarama. **Anais do IV Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Inovação.** Umuarama - PR: Unipar, 2019. p.1 – 1.

OLIVEIRA, L. F.; PAOEAGUA, T. C.; RICO, V.; ANGELO, E. A. DNA RASTROS: Alunos detetives decifram casos com base em pistas genéticas. In: III Encontro Nacional de Jogos e Atividades Lúdicas no ensino de Química, Física e Biologia – level III, 2018, Foz do Iguaçu. **Anais do 3º Encontro Nacional de Jogos e Atividades Lúdicas no Ensino de Química, Física e Biologia** (Jalequim - Level III). 2018.

OLIVEIRA, L. F.; ANGELO, E. A.; BARBOSA, D. S. Percepções sobre a Genética no Ensino Médio: o que pensam os estudantes? In: I Congresso online Nacional de Ensino de Química, Física, Biologia e Matemática, 2020. **Anais do I Congresso online Nacional de Ensino de Química, Física, Biologia e Matemática,** 2020.

OLIVEIRA, L. F.; ANGELO, E. A.; BARBOSA, D. S. Unidade de Ensino Potencialmente Significativas, com elementos lúdicos, como estratégia de ensino de Genética. **Revista Ciências & Idéias.** v.12, p.159 - 175, 2021.

ROCHA, J. A. P.; ANGELO, E. A. Análise textual discursiva sobre transgênicos em sites educativos de Biologia. **Revista de Ensino de Biologia da Associação Brasileira de Ensino de Biologia (SBEnBio).** v.13, p.346 - 360, 2020.

ROCHA, J. A. P.; SILVA, J. V. N.; SOARES, L. C.; ANGELO, E. A. Jogo Geneticsy e a identificação genética de pessoas: eu também posso ser um CSI! **Revista Eletrônica Ludus Scientiae**. 2022 (aceito).

SIMPLICIO, M. E. S.; ANGELO, E. A. Microrganismos por toda parte: uma estratégia de ensino In: IX CONCCEPAR - Congresso Científico da Região Centro-ocidental do Paraná, 2018, Campo Mourão. **Anais do IX CONCCEPAR**. Campo Mourão: Centro Universitário Integrado de Campo Mourão, 2018.