

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AMANDA CRISTINA ESTEVES LEITE

**Estudo e caracterização de enzima superóxido dismutase com potencial aplicação  
biotecnológica**

São Paulo

2021

AMANDA CRISTINA ESTEVES LEITE

**Estudo e caracterização de enzima superóxido dismutase com potencial aplicação  
biotecnológica**

Versão corrigida

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo Curso de Graduação Bacharelado em Biotecnologia.

Área da Biotecnologia:

Desenvolvimento e Pesquisa

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde

São Paulo

2021

Nome: LEITE, Amanda Cristina Esteves

Título: Estudo e caracterização de enzima superóxido dismutase com potencial aplicação biotecnológica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo Curso de Graduação Bacharelado em Biotecnologia.

Área da Biotecnologia:

Desenvolvimento e Pesquisa

Aprovado em: 04/01/2022

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr.	Felipe Santiago Chambergo Alcalde	Instituição:	Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo
Prof. Dr.	Daniela Ramos Truzzi	Instituição:	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
Prof. Dr.	Eutímio Gustavo Fernández Núñez	Instituição:	Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo



Esta obra é de acesso aberto. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e autoria e respeitando a Licença Creative Commons indicada.

Universidade de São Paulo - Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Biblioteca.  
Ficha automatizada com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Esteves Leite, Amanda Cristina  
Estudo e caracterização de enzima superóxido  
dismutase com potencial aplicação biotecnológica /  
Amanda Cristina Esteves Leite ; orientador, Felipe  
Santiago Chambergo Alcalde. 2023.  
41 f: il.

Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) -  
Escola de Artes, Ciências e Humanidades,  
Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

1. Superóxido dismutase. 2. Antioxidantes. 3.  
Enzimas oxirredutoras. I. Chambergo Alcalde, Felipe  
Santiago , orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, prof. Dr. Felipe Chambergo, pela orientação e ensinamentos ao longo de todo o trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, por todo apoio e auxílio, especialmente à Patrícia e ao Gustavo.

À FAPESP, pelo apoio financeiro através dos processos n° 2019/05227-0 e 2017/25705-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À minha família, pelo suporte ao longo de minha vida e meus estudos.

## RESUMO

LEITE, Amanda Cristina Esteves. **Estudo e caracterização de enzima superóxido dismutase com potencial aplicação biotecnológica**. 2021. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Versão corrigida.

Enzimas são catalisadores biológicos atrativos para a indústria, apresentando importância em uma série de atividades econômicas, haja vista seu uso na otimização de processos, redução da produção de resíduos ou em substituição a catalisadores químicos tóxicos, por exemplo. As enzimas antioxidantes representam o mecanismo de defesa mais importante contra o dano celular induzido pelo estresse oxidativo e possuem importante papel em casos de aterosclerose, hipertensão, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. Superóxido dismutases (SODs) são enzimas antioxidantes as quais catalisam a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), originado principalmente no processo de respiração celular. SODs desempenham um papel fundamental no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, sendo de grande interesse biotecnológico, podendo ser utilizadas nas áreas biofarmacêutica, veterinária e alimentícia, por exemplo. Este trabalho visa o estudo e caracterização da enzima recombinante superóxido dismutase cujo gene é proveniente de estudos do Mar Vermelho (SOD-MV, Egito). Enzimas provenientes desse local apresentam características cinético-enzimáticas úteis para sua utilização em bioprocessos industriais, como tolerância a metais pesados, halofilia, termoestabilidade e termofilia, demonstrando um ambiente interessante para prospecção de enzimas. A enzima SOD-MV foi analisada por bioinformática, predizendo-se que o material genético em estudo pertence ao organismo *Phyllobacterium calauticae*, que os aminoácidos envolvidos no sítio ativo da enzima SOD-MV são His57, His108, Asp189, His193, Ala103, Gln104, Tyr111, Ala174 e Gly175 e que a estrutura da enzima é homodimérica. A enzima foi clonada no vetor de expressão pTrc-HisA e superexpressa no hospedeiro *E. coli* em sua conformação ativa. Foram utilizadas três técnicas cromatográficas diferentes para tentativa de purificação, sendo cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica, entretanto, não foi possível obter a proteína pura. Assim, serão necessárias novas abordagens para purificação e determinação das características e propriedades bioquímicas desta enzima.

Palavras-chave: Superóxido dismutase. Antioxidantes. Enzimas oxirredutoras.

## ABSTRACT

LEITE, Amanda Cristina Esteves. **Study and characterization of a superoxide dismutase enzyme with potential biotechnological application**. 2021. 41 p. Final paper. (Bachelor of Biotechnology) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2021. Corrected version.

Enzymes are biological catalysts attractive to industry, presenting importance in a range of economic activities, due to their use in process optimization, reduction of waste generation or in replacement of toxic chemical catalysts, for instance. Antioxidant enzymes represent the most important defense mechanism against oxidative stress induced cellular damage and have important role in cases of atherosclerosis, hypertension, diabetes mellitus and cardiovascular diseases. Superoxide dismutases (SODs) are antioxidant enzymes that catalyze the dismutation of superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), which is originated mainly in the cellular respiration process. SODs play a fundamental role in the defense mechanism against oxidative stress, thus being of great biotechnological interest, such as in biopharmaceutical, veterinary and food areas. This work aims the study and characterization of the superoxide dismutase recombinant enzyme whose gene comes from Red Sea studies (SOD-MV, Egypt). Enzymes from this location present useful kinetic-enzymatic characteristics for their use in industrial bioprocesses, such as heavy metal tolerance, halophily, thermostability and thermophily, evidencing an interesting environment for enzyme prospection. The SOD-MV enzyme was analyzed through bioinformatics, predicting that the genetic material in study belongs to the organism *Phyllobacterium calauticae*, also that the amino acids involved in the active site of the SOD-MV enzyme are His57, His108, Asp189, His193, Ala103, Gln104, Tyr111, Ala174 and Gly175 and that the enzyme structure is a homo-dimer. The enzyme was cloned into pTrc-HisA expression vector and overexpressed in its active conformation using *E. coli* as host. Three different chromatographic techniques were applied as an attempt of purification: immobilized metal-affinity chromatography, ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. Nevertheless, pure protein was not obtained. Therefore, new approaches will be necessary for the purification and determination of biochemical properties and characteristics of this enzyme.

Keywords: Superoxide dismutase. Antioxidants. Oxi-reductive enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aplicações da enzima superóxido dismutase	12
Figura 2 - Localização do Mar Vermelho	13
Figura 3 - CDSs presentes nas proximidades do gene SOD-MV	24
Figura 4 - Alinhamento múltiplo de sequências de proteínas superóxido dismutases	25
Figura 5 - Estrutura predita computacionalmente para a proteína SOD-MV	26
Figura 6 - Mapa esquemático do plasmídeo SOD-MV/pTrcHisA	26
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose da PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo SOD-MV/pTrcHisA	27
Figura 8 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da indução da proteína recombinante SOD-MV por diferentes tempos	28
Figura 9 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da lise da proteína recombinante SOD-MV após diferentes tempos de indução	29
Figura 10 - Cromatograma da purificação por afinidade a níquel da proteína recombinante SOD-MV	30
Figura 11 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da purificação por afinidade a níquel da proteína recombinante SOD-MV	30
Figura 12 - Gel de atividade enzimática das frações da purificação por afinidade a níquel da proteína recombinante SOD-MV	31
Figura 13 - Cromatograma da purificação por troca iônica da proteína recombinante SOD-MV	32
Figura 14 - Gel de atividade enzimática das frações da purificação por troca iônica da proteína recombinante SOD-MV	32
Figura 15 - Cromatograma da purificação por hidrofobicidade da proteína recombinante SOD-MV	33
Figura 16 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da purificação por hidrofobicidade da proteína recombinante SOD-MV	34
Figura 17 - Gel de atividade enzimática das frações da purificação por hidrofobicidade da proteína recombinante SOD-MV	34



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1	Superóxido dismutase	10
1.2	Mar Vermelho	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1	Análise computacional	16
3.2	Cepas e condições de cultura	17
3.3	Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular	17
3.4	Clonagem do gene	17
3.5	Expressão da proteína recombinante	18
3.6	Purificação da proteína recombinante	19
3.6.1	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados	19
3.6.2	Cromatografia de troca iônica	20
3.6.3	Cromatografia de interação hidrofóbica	20
3.7	Avaliação da atividade enzimática	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
4.1	Análise computacional	22
4.2	Clonagem da proteína recombinante	26
4.3	Expressão da proteína recombinante	27
4.4	Purificação e análise de atividade enzimática	29
4.4.1	Purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados	29
4.4.2	Purificação por cromatografia de troca iônica	31
4.4.3	Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica	32
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos altamente seletivos e eficientes na bioconversão de substrato a produto, além de catalisarem reações régio-, quimio- e estéreo- específicas que não poderiam ser realizadas por química convencional. Por esses motivos, são catalisadores altamente atrativos para a indústria, apresentando importância em uma série de atividades econômicas, como nas áreas médica, farmacêutica e diagnóstica; alimentícia e agropecuária; química; têxtil; energética e em muitas outras indústrias (SARROUH et al., 2012).

Tais aplicações explicam o crescimento do mercado global de enzimas, o qual deve apresentar uma taxa de crescimento anual composta (*Compound Annual Growth Rate - CAGR*) de 6,5 % entre 2020 e 2027, estimando-se que a pandemia de COVID-19 tenha um impacto geral positivo nesse mercado. Assim, espera-se que ele atinja um valor de cerca de US\$ 14,5 bilhões em 2027 (MANJKREKAR; WADEKAR; SUMANT, 2021).

As enzimas utilizadas industrialmente podem vir de fontes microbianas, animais ou vegetais, contudo, as enzimas microbianas possuem como vantagem uma maior atividade e estabilidade, além de serem mais facilmente modificadas e otimizadas (LIU; KOKARE, 2017). Dessa forma, o estudo de enzimas microbianas permite a descoberta de catalisadores biológicos úteis industrialmente, seja a fim de otimizar processos, reduzir a produção de resíduos ou em substituição a catalisadores químicos tóxicos, por exemplo. Assim, a fim de se obterem enzimas com a atividade desejada, sob condições industriais, pode-se otimizar o processo de produção ou a própria molécula através da engenharia de proteínas (SARROUH et al., 2012).

Ademais, as enzimas são divididas em 7 classes: Oxirredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerasas, Ligases e Translocases (MCDONALD; BOYCE; TIPTON, 2008). Ao longo das décadas, a classe de enzimas oxirredutases vem se mostrando altamente importante para a biotecnologia, graças à sua vasta aplicação nos mais diversos processos, especialmente os ambientais, clínicos e industriais, sendo estes nas áreas química, alimentícia e farmacêutica (MAY; PADGETTE, 1983; MAY, 1999; TIKHONOV *et al.*, 2019; XU, 2005).

Na classe das oxirredutases, encontram-se, entre outras, enzimas antioxidantes, as quais representam o mecanismo de defesa mais importante contra o dano celular induzido pelo estresse oxidativo, dado que catalisam a transformação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em moléculas estáveis e atóxicas (SÁEZ; ESTÁN-CAPELL, 2017).

Ao contrário do que o nome pode sugerir, as ERO são um grupo de moléculas com reatividades bastante distintas, dado que abrangem não somente radicais de oxigênio, mas também derivados do oxigênio que não são radicais. Enquanto as espécies radicais participam

de reações de um elétron e, portanto, possuem poder oxidante equivalente ao potencial de redução, as espécies não radicais são oxidantes de dois elétrons, com reatividade dependente da energia de ativação (AUGUSTO; MIYAMOTO, 2011). Entre as espécies radicais estão o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) e o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), já entre as não radicais estão o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )<sup>2</sup> (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

As ERO estão envolvidas em diversos processos fisiológicos ou patológicos em todos os seres vivos, os quais utilizam um sistema de defesa antioxidante para neutralização dessas moléculas. Este sistema é composto por moléculas não enzimáticas, como as vitaminas C e E, a glutatona e a ubiquinona, e também por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase e catalase (ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Sabe-se que enzimas antioxidantes possuem importante papel, por exemplo, em casos de aterosclerose, hipertensão, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (MAKSIMENKO; VAVAEV, 2012). Nesse sentido, a produção e administração de enzimas do sistema de defesa antioxidante como a superóxido dismutase e a catalase trouxe resultados interessantes que sugerem a possibilidade de utilização dessas enzimas na área biofarmacêutica (MAKSIMENKO; VAVAEV, 2012). Outro importante ramo de aplicação biotecnológica dessas enzimas é o da indústria alimentícia, pois são capazes de prolongar o tempo de prateleira dos alimentos, aumentando, assim, sua conservação (MEYER; ISAKSEN, 1995).

## 1.1 Superóxido dismutase

Superóxido dismutases (EC 1.15.1.1) catalisam a dismutação do ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), originado principalmente no processo de respiração celular, e desempenham um papel fundamental no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (SASAKI; AKAMATSU; HORIO, 2000). Os produtos da dismutação são o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o qual, por sua vez, é neutralizado em seguida através de diversos mecanismos, como o ciclo da glutatona, a ação de enzimas catalases, peroxirredoxinas ou proteínas tiorredoxinas (OTER *et al.*, 2012).

As SODs são metaloenzimas, ou seja, utilizam um metal como cofator para sua ativação, sendo classificadas em quatro tipos, dependendo do metal ligado ao seu sítio ativo: manganês (Mn-SOD); cobre e zinco (Cu/Zn-SOD); ferro (Fe-SOD); ou níquel (Ni-SOD) (CHAMBERGO *et al.*, 2012). A Cu/Zn-SOD possui estrutura bastante distinta das demais, enquanto a Mn-SOD e a Fe-SOD possuem estruturas bastante similares, com a diferença que a Mn-SOD é encontrada

em mitocôndrias, mas a Fe-SOD não (PARKER; BLAKE, 1988). Já a presença de Ni-SOD foi correlacionada a uma possível substituição da Fe-SOD em ambientes com pouco ferro biodisponível, sugerindo-se que foi adquirida por transferência horizontal de genes em diversos organismos (DUPONT *et al.*, 2008).

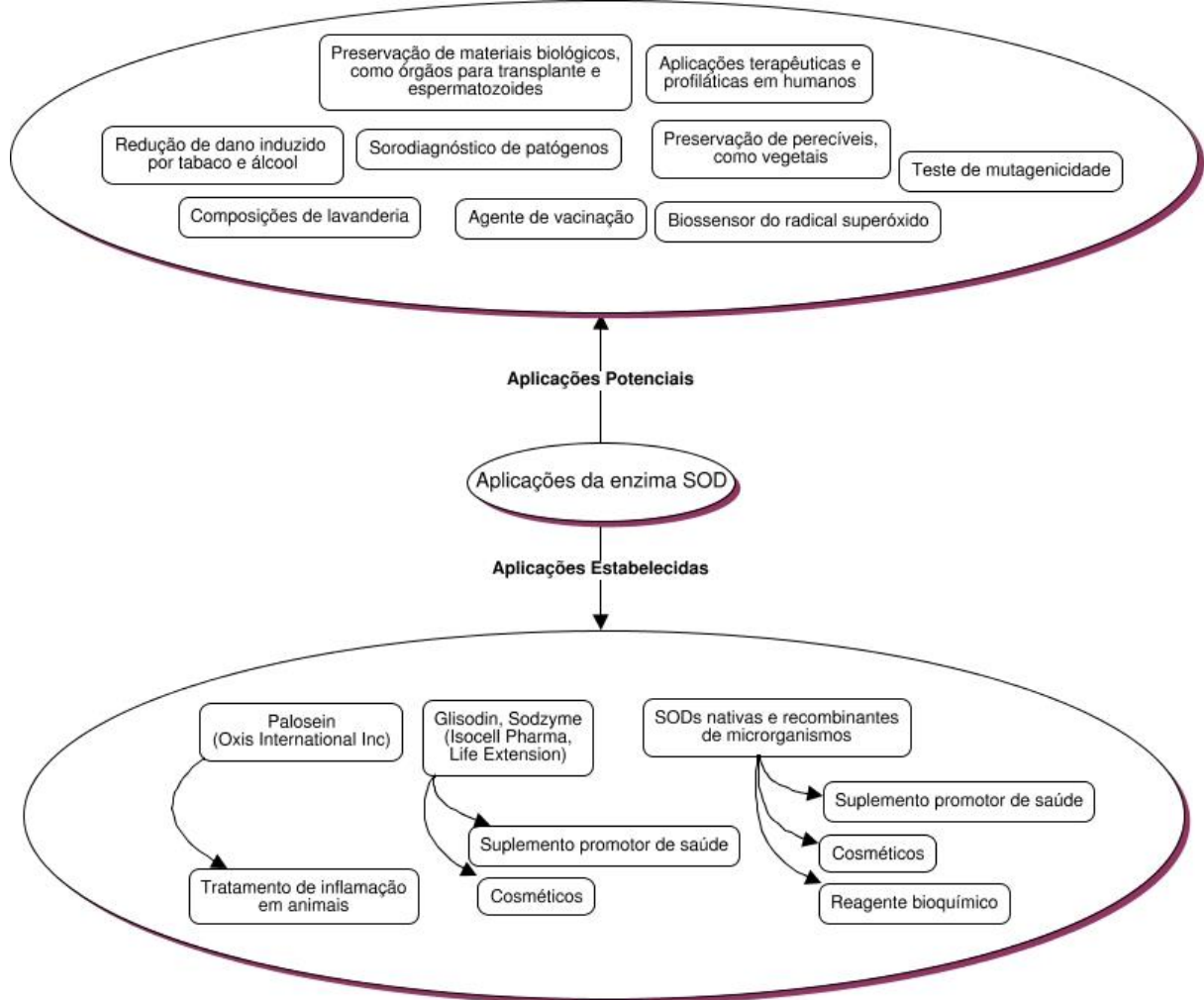
A enzima SOD possui grande importância fisiológica, dado que desequilíbrios em sua presença foram correlacionados a diversos quadros fisiopatológicos, como arteriosclerose, diabetes mellitus e síndrome de Down, devido à alteração da concentração celular do ânion radical superóxido (CULOTTA; YANG; O'HALLORAN, 2006).

Além disso, a enzima superóxido dismutase apresenta diversas aplicações biotecnológicas, podendo ser aplicada para:

- biossensores do radical superóxido (BEISSENHIRTZ *et al.*, 2006; LIU; TIAN; XIA, 2008);
- tratamento de lesões, queimaduras e danos por radiação UVB na pele (CHEN *et al.*, 2016);
- tratamento de inflamação ocular (KOST *et al.*, 2016);
- conservação de órgãos para transplante (KOO *et al.*, 2001; LAND *et al.*, 1994);
- conservação de sêmen equino (COCCHIA *et al.*, 2011);
- como suplemento alimentar (BAFANA *et al.*, 2011), entre outros.

Um resumo das principais utilizações da SOD pode ser visto na figura 1.

Figura 1: Aplicações da enzima superóxido dismutase.



Adaptado de BAFANA *et al.*, 2011.

Graças às suas vastas aplicações e importância fisiológica, o estudo de SODs é de grande interesse biotecnológico e, por conseguinte, foi a enzima selecionada para utilização neste trabalho. A origem da enzima utilizada é um estudo de metagenoma do Mar Vermelho (FERREIRA *et al.*, 2014) e, por isso, será referida como SOD-MV.

## 1.2 Mar Vermelho

O Mar Vermelho é um corpo d'água que separa o nordeste da África e a Península Arábica, sendo formado com a divergência entre as placas tectônicas africana e arábica. Sua localização geográfica, bem como os principais países no entorno, está indicada na figura 2.

Figura 2: Localização do Mar Vermelho.



Fonte: Google Maps. Imagens ©2021 TerraMetrics, Dados do mapa ©2021 Google, Mapa GISrael.

O Mar Vermelho é um dos corpos de água mais salgados do planeta, graças a diversos fatores, principalmente relacionados a baixa precipitação, alta taxa de evaporação e isolamento geográfico de outros corpos d'água. Assim, ele apresenta salinidade média de 40 ‰, variando entre os valores de 36 a 41 ‰, além de sofrer alta irradiação ultravioleta independentemente da estação do ano (BEHZAD *et al.*, 2016).

Ademais, o Mar Vermelho é um ambiente oligotrófico, apresentando escassez de nutrientes e altas temperaturas ao longo de todo o ano, com temperaturas superficiais que podem chegar a 34 °C no verão, com pouca variação no inverno. Dessa forma, os microrganismos existentes nesse local são de interesse biotecnológico à medida que possuem alta resistência salina, além de que se espera que sejam mais resistentes ao aumento de temperatura do que outros microrganismos marinhos (BEHZAD *et al.*, 2016).

Outra característica do Mar Vermelho é possuir diversos lagos de salmoura, ou *brine pools*, que são lagos submarinos profundos, hipersalinos, anóxicos e geotermiais, encontrados em depressões, chegando a mais de 2000 metros de profundidade. O maior deles é o *Atlantis II Deep*, localizado próximo à fenda central do mar, entre a Arábia Saudita e o Sudão, com profundidade máxima de 2194 metros e área de aproximadamente 60 km<sup>2</sup> (SONBOL; FERREIRA; SIAM, 2016).

O Atlantis II é estruturado verticalmente em quatro camadas convectivas, sendo que uma quinta camada está em processo de formação, além de uma fina interface de até 8 metros

entre cada camada, na qual a temperatura e sais são transportados por difusão. Cada camada convectiva é verticalmente homogênea, em termos de temperatura, salinidade e condutividade, sendo que a mais superficial se inicia a 2002 metros de profundidade e possui temperatura de 43,53 °C e salinidade de 87 ‰, enquanto a mais profunda tem início a 2048 metros de profundidade, com temperatura de 68,28 °C e salinidade de 252 ‰ (SWIFT; BOWER; SCHMITT, 2012).

Assim, devido às suas características físico-químicas, os lagos de salmoura são considerados um dos ambientes mais extremos na Terra, sendo, portanto, de grande interesse para prospecção biotecnológica. Além disso, há vários nichos propícios ao crescimento microbiano nas regiões de interface, devido aos gradientes físico-químicos, especialmente o gradiente de densidade, responsável por captar partículas orgânicas e inorgânicas, fornecendo nutrientes para o desenvolvimento de organismos (ANTUNES; NGUGI; STINGL, 2011). Dessa forma, os lagos de salmoura demonstram importante potencial para bioprospecção.

Como exemplo desse potencial, foram reportadas, a partir de estudos de metagenoma do Atlantis II, atividades antimicrobianas e anticancerígenas (ZIKO *et al.*, 2019) e enzimas de resistência a antibióticos (ELBEHERY; LEAK; SIAM, 2017). Também foram descritas citotoxicidade e atividade apoptótica contra câncer cervical, de mamas e de próstata de bactérias isoladas da interface entre o Atlantis II e a água do mar (SAGAR *et al.*, 2013).

Ademais, a partir de estudos do Atlantis II foram reportadas diversas enzimas, como tiorredoxina redutase (BADIEA *et al.*, 2019), mercúrio redutase (SAYED *et al.*, 2014), esterase (MOHAMED, *et al.*, 2013) e nitrilase (SONBOL; FERREIRA; SIAM, 2016). Essas enzimas possuem em comum importantes características cinético-enzimáticas, tais quais tolerância a metais pesados, halofilia, termoestabilidade e termofilia, demonstrando, mais uma vez, um ambiente de interesse biotecnológico para prospecção de enzimas, dado que tais características são úteis para a utilização dessas proteínas em bioprocessos industriais.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho objetiva expressar e caracterizar a enzima recombinante superóxido dismutase cujo gene é proveniente de estudos do Mar Vermelho (SOD-MV, Egito).

A fim de alcançar o objetivo, foram adotados os seguintes objetivos específicos:

1. Analisar computacionalmente o gene da enzima;
2. Clonar o gene no vetor de expressão pTrc-HisA;
3. Purificar a proteína recombinante SOD-MV, expressa no hospedeiro *Escherichia coli*;
4. Analisar a atividade enzimática da enzima obtida.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Análise computacional

No trabalho de Ferreira *et al.* (2014), foi identificado um gene anotado como superóxido dismutase, presente no metagenoma “Red Sea: Atlantis II brine pool interface” depositado no *GenBank Sequence Read Archive* (Accession SRX352356). A partir desses dados, foi analisada uma sequência de DNA de 20.682 pb, contendo o gene anotado como SOD e os 10 kpb antecedentes e subsequentes a ele.

A sequência foi analisada utilizando o programa BLASTN (2.12.0+; *National Center for Biotechnology Information* – NCBI; Bethesda, EUA; ALTSCHUL *et al.*, 1997), utilizando-se os parâmetros padrão contra o banco de dados *Nucleotide Collection* (nr/nt) do NCBI. Em seguida, foi realizada nova análise BLASTN, contra o banco de dados *Whole-genome shotgun contigs* (wgs), utilizando os parâmetros padrão e limitando a busca ao taxid: 28100 (*Phyllobacterium*) e excluindo-se o taxid: 253813 (uncultured *Phyllobacterium* sp.).

Em seguida, analisaram-se as *Open Reading Frames* (ORFs) com no mínimo 300 aminoácidos de comprimento presentes na sequência, utilizando-se o programa ORFFinder (NCBI; Bethesda, EUA) com os demais parâmetros padrão. As ORFs foram, então, analisadas com o programa BLASTP (2.12.0+; NCBI; Bethesda, EUA; ALTSCHUL *et al.*, 1997; 2005), utilizando-se os parâmetros padrão, contra o banco de dados não redundante (nr).

Posteriormente, a sequência com suas ORFs foi visualizada utilizando o software Artemis (18.1.0; *Wellcome Sanger Institute*; Hinxton, Reino Unido; CARVER *et al.*, 2011) e comparada com o genoma do melhor *hit* encontrado no banco de dados wgs, através da observação dos genes ao redor da sequência das SODs.

Enfim, foi realizada uma busca no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) por enzimas superóxido dismutases bacterianas com estrutura já caracterizada e depositada. A partir desse resultado, foi realizado alinhamento múltiplo entre os aminoácidos da proteína SOD-MV e os aminoácidos das sequências encontradas, utilizando-se o programa Clustal Omega (1.2.4; EMBL-EBI; Hinxton, Reino Unido; MADEIRA *et al.*, 2019). Adicionalmente, utilizou-se o programa ProtParam (*Swiss Institute of Bioinformatics*; Lausanne, Suíça; GASTEIGER *et al.*, 2005) com vistas a computar parâmetros físico-químicos da proteína.

Por fim, utilizou-se o programa SWISS-MODEL (*Swiss Institute of Bioinformatics* e *Biozentrum of the University of Basel*; Lausanne e Basel, Suíça WATERHOUSE *et al.*, 2018) em sua configuração padrão a fim de realizar a modelagem da estrutura tridimensional da SOD-

MV. Com os *templates* obtidos por essa busca, filtraram-se apenas aqueles cujos ligantes condiziam com a predição realizada a partir do alinhamento múltiplo, gerando-se os modelos tridimensionais para esses *templates*. Então, selecionaram-se os modelos com melhores pontuações, da seguinte maneira: seguindo-se a recomendação do programa, excluíram-se os modelos com QSQE (*Quaternary Structure Quality Estimate*; BERTONI *et al.*, 2017) menor que 0,7; escolheram-se os modelos com melhores índices GMQE (*Global Model Quality Estimate*; WATERHOUSE *et al.*, 2018) e QMEANDisCo Global (STUDER *et al.*, 2019); e selecionaram-se os modelos com maior identidade com a sequência da SOD-MV. Finalmente, avaliou-se o diagrama de Ramachandran dos dez melhores modelos.

### 3.2 Cepas e condições de cultura

Para a preparação de DNA plasmidial e produção da proteína recombinante, foi utilizada a cepa *Escherichia coli* BL21 (*GE Life Science*, EUA). A cultura bacteriana foi realizada em meio líquido *Lysogeny Broth* (LB, triptona 1%; NaCl 1%; extrato de levedura 0,75%; *MP Biomedicals*, EUA) ou *Circlegrow* (*MP Biomedicals*, EUA) a 37 °C sob agitação constante (150 rpm) e em placas com meio LB ágar (LB + ágar 2%) em estufa a 37 °C. Quando necessário, o meio LB foi suplementado com ampicilina (150 µg/mL) (*Sigma-aldrich*, EUA) ou kanamicina (50 µL/mL) (*AMRESCO*, EUA). Para a indução da expressão da proteína recombinante, foi utilizado isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) 0,5 mM (*Sigma-aldrich*, EUA).

### 3.3 Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular

Manipulação de DNA, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), preparação e transformação de bactérias competentes e outras técnicas empregadas em biologia molecular foram feitas segundo descrito por Sambrook *et al.* (1998), ou de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes dos kits utilizados.

### 3.4 Clonagem do gene

A sequência de DNA do gene foi sintetizada e clonada no vetor de clonagem pMK, utilizando os sítios de clonagem *KpnI* e *SacI* (*Life Technologies*, EUA). Em seguida, 1 µg da construção plasmidial foi transformada por eletroporação em bactérias eletrocompetentes *E. coli* BL21, conforme procedimento descrito pelo fabricante do Electroporador 2510

(Eppendorf, Alemanha). Então, as células transformadas foram cultivadas em meio LB durante 1 hora a 150 rpm e 37 °C, plaqueadas em meio LB ágar/kanamicina e incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas. Os clones resistentes à kanamicina foram utilizados na preparação de DNA plasmidial, de acordo com o protocolo do fabricante do *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Alemanha).

Em seguida, o DNA plasmidial foi utilizado para amplificação do gene da proteína através da técnica de PCR, com kit *pfu* DNA polimerase (Life Technologies, EUA), empregando-se oligonucleotídeos específicos os quais contém sítios de clivagem das enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* (SodRSea-F: CTAGCTAGCATGGATCTGAA TCGTCGTGATATG; SodRSea-R: CCGCTCGAGTTAGGCATCAAAACGATCACTCAC). Posteriormente, o fragmento amplificado foi purificado conforme instruções do *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Alemanha).

A seguir, tanto o fragmento do gene quanto o vetor de expressão pTrc-HisA (ThermoFisher, EUA) foram digeridos com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* utilizando o *Anza Restriction Enzyme Cloning System* (ThermoFisher, EUA). Os fragmentos obtidos foram novamente purificados e, em seguida, ligados utilizando o *LigaFast™ Rapid DNA Ligation System* (Promega, EUA), conforme protocolo fornecido pela empresa.

A construção plasmidial foi, então, transformada em bactérias *E. coli* BL21, que posteriormente foram selecionadas com ampicilina. As colônias resistentes foram avaliadas por PCR, a fim de determinar a clonagem do gene, e, por fim, as colônias apresentando o gene da enzima SOD-MV foram utilizadas para produção da proteína recombinante.

### 3.5 Expressão da proteína recombinante

A expressão foi realizada através de inóculo em meio *Circlegrow*/ampicilina a 37 °C e 150 rpm, o qual foi acompanhado até atingir absorvância em 600 nm entre 0,8 e 1,2. Então, o meio foi suplementado com solução de metais para bactérias ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  82,3 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  4,7 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  20,1 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  3,4 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4,7 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  4,7 g.L<sup>-1</sup>) e foi realizada a indução da expressão da proteína recombinante, através da adição de IPTG (0,5 mM), inicialmente por 18 horas a 37 °C e 150 rpm.

Em seguida, avaliou-se o tempo mais adequado para a indução da expressão, entre os tempos de 30 minutos, 1 hora, 4 horas, 5 horas, 6 horas e 18 horas, através de análise em SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) 12,5 %. Na sequência, foram realizados inóculos de 100 mL induzidos pelos tempos de 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4

horas. Para cada um deles, a massa bacteriana foi coletada por centrifugação e rompida por sonicação em 5 mL de tampão de lise ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.2), utilizando Desruptor de Célula Q 550 W (*Ultronique*, Brasil), em intervalos de 30 s pulso / 30 s pausa, durante 4 minutos, com intervalo de 10 minutos na metade do tempo. Enfim, o lisado bacteriano foi centrifugado a  $9,8 \times 10^3$  g durante 40 minutos a 4 °C e, novamente, as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE.

### 3.6 Purificação da proteína recombinante

Após a indução da expressão da enzima pelo tempo mais adequado, a massa bacteriana foi coletada e rompida por sonicação em tampão de lise, realizando-se ciclos de 10 s pulso / 50 s pausa. Por fim, o lisado bacteriano foi centrifugado e a fração solúvel foi coletada, clarificada por filtração em filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  e utilizada na etapa de purificação, realizada no aparelho *AKTA purifier FPLC* com monitor *UPC-900* (*GE Life Science*, EUA) a 280 nm. Foram utilizadas três técnicas cromatográficas diferentes para tentativa de purificação, conforme procedimento a seguir. Após cada uma das etapas, as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e a atividade enzimática foi avaliada conforme descrito no **item 3.7**.

#### 3.6.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

A primeira técnica empregada foi a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, utilizando-se coluna cromatográfica de 10 mL de volume de coluna (VC), contendo a resina *Chelating Sepharose Fast Flow* (*GE Life Science*, EUA), carregada com sulfato de níquel (0,1 M).

Para essa purificação, foram utilizados 500 mL de cultura bacteriana, a qual foi coletada e, em seguida, lisada durante dois ciclos de 3 minutos em 20 mL de tampão de lise e, por fim, o sobrenadante do lisado foi ajustado para uma concentração de 500 mM de NaCl.

Previamente ao processo cromatográfico, a coluna foi equilibrada com 3 VC de tampão de equilíbrio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; NaCl 500 mM, pH 7.2). Em seguida, o sobrenadante do lisado bacteriano foi aplicado e a coluna foi lavada com 3 VC de tampão de equilíbrio. Logo após, foi realizada a etapa de eluição em um gradiente de extensão de 4 VC, indo de 0 a 100 % do tampão de eluição ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 500 mM, pH 7.2). Durante toda a etapa de eluição foram coletadas frações de 5 mL.

### 3.6.2 Cromatografia de troca iônica

A segunda técnica empregada foi a cromatografia de troca iônica, utilizada em combinação com a técnica anterior. Dessa forma, seguido ao processo de cromatografia de afinidade, as frações de injeção foram coletadas, unidas e dialisadas duas vezes em 500 mL de tampão de equilíbrio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.2) por 30 minutos. Então, foram novamente clarificadas por filtração em filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  e utilizadas na cromatografia de troca iônica.

Para essa purificação, foi utilizada coluna cromatográfica de 5 mL de VC, contendo a resina *Q Sepharose Fast Flow* (GE Life Science, EUA), equilibrada previamente com 3 VC de tampão de equilíbrio. A amostra dialisada foi aplicada na coluna e eluída em um gradiente de extensão de 6 VC, indo de 0 a 100 % do tampão de eluição ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; NaCl 1 M, pH 7.2), seguindo-se de lavagem da coluna com 1 VC de tampão de eluição. Durante toda a etapa de eluição foram coletadas frações de 5 mL.

### 3.6.3 Cromatografia de interação hidrofóbica

A última técnica cromatográfica empregada foi a cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando-se coluna cromatográfica de 3 mL de VC, contendo a resina *Phenyl Sepharose Fast Flow* (GE Life Science, EUA).

Para essa purificação, foram utilizados 200 mL de cultura bacteriana, a qual foi coletada e, em seguida, lisada durante dois ciclos de 2 minutos em 10 mL de tampão de lise e, então, o sobrenadante do lisado bacteriano foi ajustado para uma concentração de 500 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Previamente ao processo cromatográfico, a coluna foi equilibrada com 5 VC de tampão de equilíbrio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  500 mM, pH 7.5). Em seguida, o sobrenadante do lisado bacteriano foi aplicado e a coluna foi lavada com 2 VC de tampão de equilíbrio. Logo após, foi realizada a etapa de eluição em um gradiente de extensão de 3 VC, indo de 0 a 100 % do tampão de eluição ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5), seguida de uma lavagem com 3 VC do tampão de eluição. Durante toda a etapa de eluição foram coletadas frações de 3 mL.

### 3.7 Avaliação da atividade enzimática

Após cada uma das etapas da produção da proteína recombinante (indução, lise e purificação), as amostras foram avaliadas quanto à atividade enzimática da proteína SOD-MV. Esse processo foi realizado conforme o procedimento descrito por Beauchamp e Fridovich (1971).

Para isso, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes à 4 °C, com voltagem constante de 40 V *overnight*, ou com voltagem de 60 V durante 30 a 50 minutos (até que as amostras ingressem no gel de corrida), seguido por aumento de voltagem para 200 V por mais 2 a 3 horas. Então, o gel foi submergido em solução de nitroazul de tetrazólio (NBT) 25 % e mantido no escuro sob agitação constante por 30 minutos, sendo em seguida submergido em solução de riboflavina 10 % e tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,1 % e exposto à luz intensa até observação das bandas de atividade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No trabalho de Ferreira *et al.* (2014), foi identificado um gene anotado como superóxido dismutase (SOD-MV) de 696 pb. SOD-MV é uma enzima constituída por 232 aminoácidos e possui massa molecular de aproximadamente 25,3 kD.

### 4.1 Análise computacional

Inicialmente, analisou-se a sequência de DNA contra a base de dados *Nucleotide Collection* (nr/nt) do NCBI, a fim de identificar o microrganismo de potencial origem do material genético em estudo. Assim, obtiveram-se os resultados indicados na tabela 1 como os três melhores *hits* dessa busca, sendo:

- *Phyllobacterium* sp. 628 chromosome, complete genome (Accession CP050301.1);
- *Phyllobacterium zundukense* strain Tri-48, complete sequence (Accession CP017940.1);
- *Mesorhizobium* sp. 113-1-2 DNA, complete genome (Accession AP023242.1).

Tabela 1: Três melhores resultados do BLASTN contra o banco nr/nt.

Descrição	Pontuação Máxima	Pontuação Total	Cobertura	E-value	Percentual de Identidade
Phyllobacterium sp. 628 chromosome, complete genome	8608	21074	95%	0,0	88,03%
Phyllobacterium zundukense strain Tri-48, complete sequence	6611	11444	63%	0,0	81,66%
Mesorhizobium sp. 113-1-2 DNA, complete genome	2626	6765	45%	0,0	74,30%

Dessa forma, realizou-se nova busca, contra o banco wgs, dado que o material genético em estudo é proveniente de metagenoma, e este é o banco de dados desse tipo de material. Contudo, para utilização desse banco, é necessário especificar alguma taxonomia e, por isso, inicialmente se utilizou o banco nt. Então, na busca contra o wgs, limitou-se ao gênero *Phyllobacterium*, excluindo-se o taxid 253813, dado que este estava gerando erro na busca.

Os cinco melhores resultados estão apresentados na tabela 2. O melhor *hit* é “*Phyllobacterium calauticae* strain R2-JL R2\_3, whole genome shotgun sequence” (*Accession* JAGENB01000003.1), com 97,14 % de identidade, enquanto os demais *hits* são com cepas distintas da espécie *Phyllobacterium myrsinacearum*, todos com 92,38 % de identidade.

Tabela 2: Cinco melhores resultados do BLASTN contra o banco wgs.

<b>Descrição da Sequência</b>	<b>Código de Acesso</b>	<b>Tamanho da sequência</b>	<b>Pontuações</b>	<b>Coertura</b>	<b>E-value</b>	<b>Identidade</b>	<b>Espaços (Gaps)</b>
Phyllobacterium calauticae strain R2-JL R2_3, whole genome shotgun sequence	JAGENB01000003.1	720379	Máxima: 23137 Total: 34954	100 %	0,0	97,14 % 13430 bases em 13826	0 % 17 bases em 13826
Phyllobacterium myrsinacearum strain DSM 5892 Ga0310499_102, [...]	SHLH01000002.1	1327176	Máxima: 20148 Total: 31304	99 %	0,0	92,38 % 12782 bases em 13836	0 % 32 bases em 13836
Phyllobacterium myrsinacearum strain HAMBI_1992 EJMNOJEN_2, [...]	QLKY01000002.1	537959	Máxima: 20148 Total: 31304	99 %	0,0	92,38 % 12782 bases em 13836	0 % 32 bases em 13836
Phyllobacterium myrsinacearum strain IAM 13584 Ga0215882_112, [...]	QGTP01000012.1	183684	Máxima: 20148 Total: 31182	99 %	0,0	92,38 % 12782 bases em 13836	0 % 32 bases em 13836
Phyllobacterium myrsinacearum strain DSM 5892 ZB100002, [...]	PVBT01000003.1	782320	Máxima: 20148 Total: 31304	99 %	0,0	92,38 % 12782 bases em 13836	0 % 32 bases em 13836

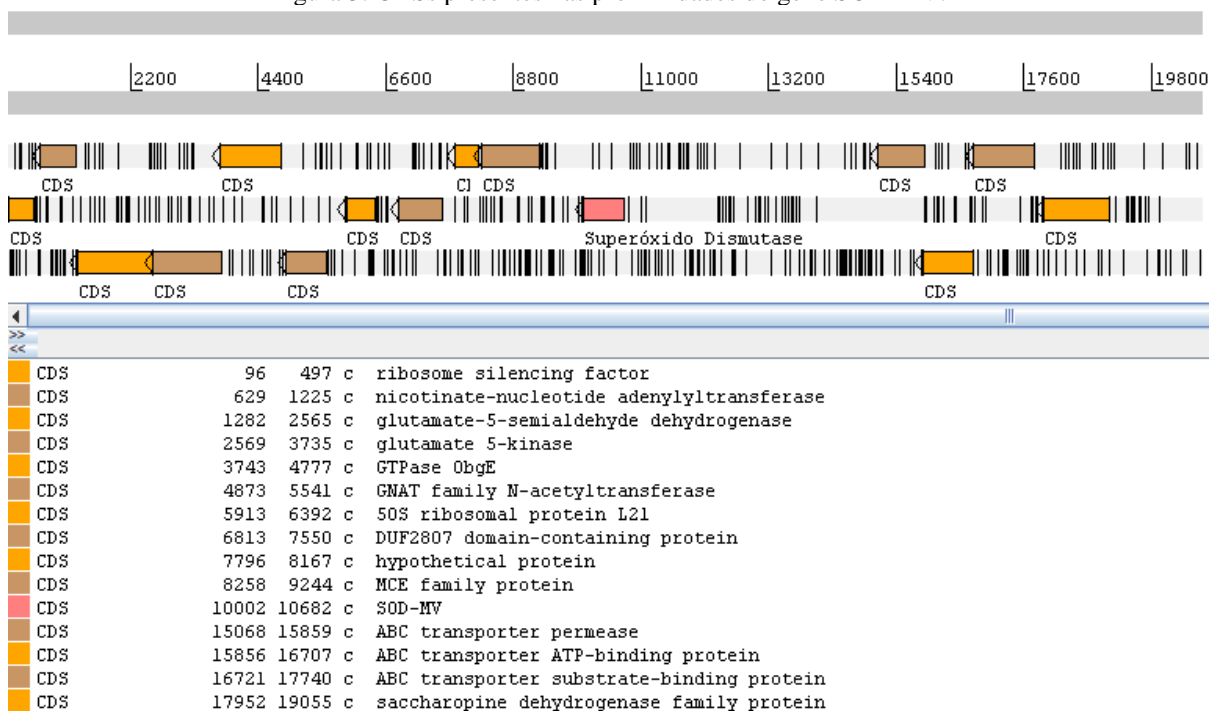
A espécie *Phyllobacterium calauticae* (LUSTERMANS *et al.*, 2021) é uma bactéria aeróbia, organoheterotrófica, isolada de um véu microaerofílico, ou seja, com baixíssimas concentrações de oxigênio, formado em um sedimento de água doce enriquecido com bactérias-cabo. Esta é, até o momento, a única espécie do gênero isolada a partir de sedimento, já que as



demais foram isoladas de partes de plantas. Ademais, foi identificado crescimento da bactéria a uma concentração de NaCl a 4 % (LUSTERMANS *et al.*, 2021). Sendo assim, tais características são condizentes com o local de origem do material utilizado para este trabalho, fornecendo indícios de que a espécie em questão é *Phyllobacterium calauticae*.

Em seguida, a sequência foi analisada em busca das ORFs, as quais em seguida foram analisadas por BLASTP a fim de identificar quais delas são *Coding Sequences* (CDSs) e, também, as funções dos genes. Assim, a visualização das CDSs presentes na sequência analisada se encontra na figura 3, juntamente com o nome dos produtos preditos. A partir dessa lista, não foi possível propor um operon, porém as enzimas presentes são condizentes com a de outros genomas de *Phyllobacterium*.

Figura 3: CDSs presentes nas proximidades do gene SOD-MV.



A seguir, analisaram-se os aminoácidos da proteína SOD-MV, a fim de determinar quais estão presentes no sítio catalítico da enzima. Para isso, realizou-se alinhamento múltiplo com superóxido dismutases com estrutura já caracterizada, as quais foram filtradas para as 4 sequências mais próximas da SOD-MV no cladograma gerado pelo programa Clustal Omega:

- SOD de *Anaplasma phagocytophilum* (PDB: 3JS4; DOI: 10.2210/pdb3js4/pdb);
- SOD de *Thermosynechococcus elongatus* (PDB: 1MY6; KERFELD *et al.*, 2003);
- SOD de *Aliivibrio salmonicida* (PDB: 2W7W; PEDERSEN; WILLASSEN; LEIROS, 2009);

- SOD de *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 (PDB: 3H1S; DOI: 10.2210/pdb3h1s/pdb).

O alinhamento múltiplo pode ser visto na Figura 4. A partir desse alinhamento, foi possível prever os aminoácidos presentes no sítio ativo da SOD-MV, sendo predito que se trata de uma Fe-SOD. As Fe-SODs compartilham os mesmos aminoácidos ligantes ao cofator metálico que Mn-SODs, porém diferem destas nos aminoácidos que compõem sua assinatura (PARKER; BLAKE, 1988; TEMPERTON; WILKINSON; KELLY, 1996). Sendo assim, foram identificados na sequência da SOD-MV, e estão indicados na Figura 4:

- Aminoácidos ligantes ao cofator metálico: His57, His108, Asp189 e His193;
- Aminoácidos que compõem a assinatura de Fe-SOD: Ala103, Gln104, Tyr111, Ala174 e Gly175.

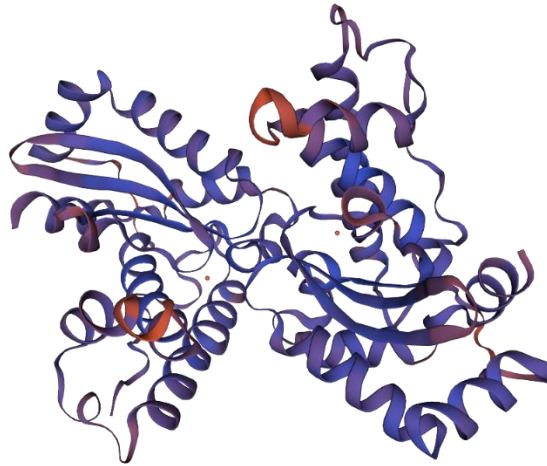
Figura 4: Alinhamento múltiplo de seqüências de proteínas superóxido dismutases.

SOD-MV	MDLNRDMLVLSGTVAATTLFAPNIQAHAAAPFKQPEL PYAEDALAP-VISARTVGLHYG	59
<i>A. phagocytophilum</i>	MAHHHH---HHMGTL-----EAQTQGGPMFELSDLPE--GLEP-YISSHLLDRHYN	47
<i>T. elongatus</i>	-----AFVQEPLPFDPGALEPYGMSAKTLEFHYG	29
<i>A. salmonicida</i>	-----MSFELPALPFAKDALEP-HISAETLDYHHG	29
<i>F. tularensis</i>	-----SNAMKFELPKLPYAVDALES-TISKETIEYHYG	32
	* ** : * : * . : * . :	
SOD-MV	KHHAGYFKKLSLVEKTPYADLSLEE---VVRACK--EGNMPVFNNAQAWNHNLWQQ	114
<i>A. phagocytophilum</i>	GHHKTYVDVNLKLVVGTTEFEGLGNESLGDIVVKAHNSGSAGRAIFNNAQIWNHDFYWQS	107
<i>T. elongatus</i>	KHHKGYVDNLKLTQDTE LADKSLED----VIRTTYGDAAKVGI FNNAQVWNHTFFWNS	85
<i>A. salmonicida</i>	KHHNTYVVKLNLIPGTEFEGKLEE----IIKTSTG-----GVFNNAQIWNHTFYWNC	80
<i>F. tularensis</i>	KHHQTYVTNLNLVEGTEHDGRNLEE----IVKTSNG-----GIFNNAQVFNHTFYWNC	83
	** * . ** * * . * . : : : : : * : * * * * : * * : * :	
SOD-MV	FQGG-SAPARGAFATAAESGFGGLDGLKKIVAESDNVFGTGWVWLVMDGD--KLAVAGM	171
<i>A. phagocytophilum</i>	MKPNGGGNPPEKLREMIHESFGSVGEFNNAFTTSGLGQFGSGWVWLVYDEDAKALKVVST	167
<i>T. elongatus</i>	LKPGGGVPTGDVAARINSAFGSYDEFKAQFNAAATQFGSGAWLVLE-A-GTLKVTKT	143
<i>A. salmonicida</i>	LAPNAGGQPTGAVAAAIDAAFSGFEEFKAKFTDSAINNFGSSWTWLVKNAD-GSLAIVNT	139
<i>F. tularensis</i>	LTPNKTEASS-QLKAALIETFGSVENFKEQFSKAAIATFGSGAWLVKNTG-KLEIVTT	141
	: . . . ** : : : : . ** : * * * * : * . :	
SOD-MV	KDAGDPLAE-GGKAVLGDVWEHAYYLDYENRRAEHVAAVLDKLVNMQFVSDRFDA----	226
<i>A. phagocytophilum</i>	ANADSPLLTQGQLPLATMDVWEHAYYLDYLNLRKKYIDVFL EHLNWFVLRLEDAGVL	227
<i>T. elongatus</i>	ANAENPLVH-GQVPLLTIDVWEHAYYLDYQNRPPDFIDNFLNQLVNWDFVAKNLAAA---	199
<i>A. salmonicida</i>	SNAATPLTDEGVTPLLTVDLWEHAYYIDFRNVRPDYMGAFW-SLVNWSFVEENLAK----	194
<i>F. tularensis</i>	SNAGCPLTE-NKKPLLTFDVWEHAYYIDYRNARPKYVEALW-DIVNMQFVSEQFAD----	195
	: * ** . : * : * * * * : * * . : . : * * * * . :	

Os aminoácidos ligantes ao cofator metálico estão indicados com fundo avermelhado, e aqueles que compõem a assinatura de Fe-SOD estão indicados com fundo azul. O asterisco (\*) indica posições com um único resíduo completamente conservado; os dois pontos (:) indicam conservação entre grupos de propriedades fortemente similares; enquanto um ponto (.), de propriedades fracamente similares.

Em seguida, realizou-se a modelagem da estrutura tridimensional da SOD-MV, filtrando-se apenas os *templates* cujos ligantes são átomos de ferro. O modelo com melhor qualidade está apresentado na Figura 5 e apresenta estrutura homodimérica com dois ligantes do íon Fe<sup>2+</sup>.

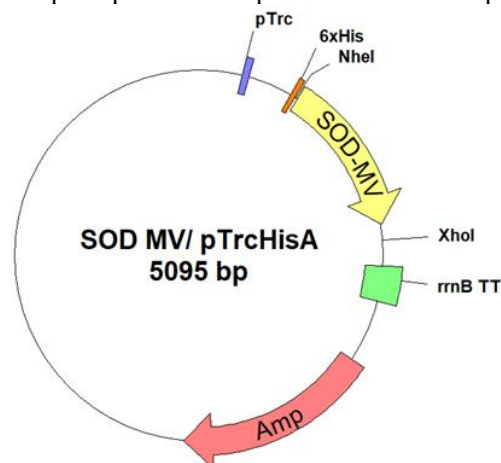
Figura 5: Estrutura predita computacionalmente para a proteína SOD-MV.



#### 4.2 Clonagem da proteína recombinante

A sequência SOD-MV foi clonada no vetor de expressão pTrc-HisA, entre os sítios de restrição de enzimas *NheI* e *XhoI* do plasmídeo. O vetor utilizado contém marca de resistência a ampicilina e expressão regulada pelo promotor Trc, pelo operador lacO e pelo repressor lacIQ, possibilitando um alto nível de transcrição de maneira regulada pelo indutor IPTG. Além disso, apresenta cauda de poli-histidina (6x His) na porção N-terminal da proteína, de modo a possibilitar uma purificação utilizando resina carregada com níquel. A Figura 6 apresenta o esquema do plasmídeo construído.

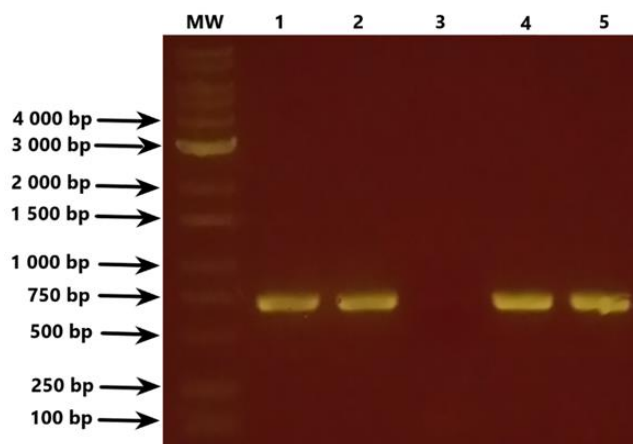
Figura 6: Mapa esquemático do plasmídeo SOD-MV/pTrcHisA.



Está apresentado o sítio de inserção do gene SOD-MV, entre os sítios de restrição *NheI* e *XhoI* (*ThermoFisher scientific*, USA), o marcador de resistência a ampicilina (Amp), o promotor e terminador, e a sequência de histidinas.

Após a clonagem e transformação, as bactérias foram selecionadas tanto com o antibiótico ampicilina, quanto através de PCR de colônia (Figura 7), por meio da qual foi possível identificar quatro colônias corretamente transformadas, dentre as cinco analisadas.

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose da PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo SOD-MV/pTrcHisA.

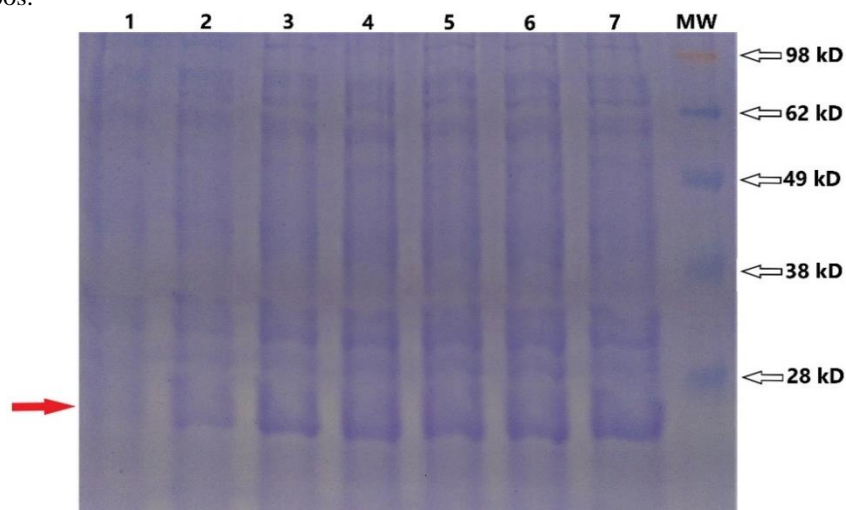


(1) ao (5) PCR de diferentes colônias transformadas e resistentes a ampicilina; (MW) 1 Kb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

### 4.3 Expressão da proteína recombinante

As bactérias selecionadas foram, então, induzidas por 18 horas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE 12,5%, demonstrando-se capazes de expressar a proteína SOD-MV (Figura 8). Com vistas a melhorar a qualidade da proteína superexpressa e evitar a formação de corpos de inclusão, buscou-se reduzir a duração da indução. Para isso, foi realizada uma avaliação qualitativa do melhor intervalo para indução, buscando, assim, o menor tempo possível capaz de gerar quantidade adequada de proteína recombinante, dentre os tempos de 30 minutos, 1 hora, 4 horas, 5 horas, 6 horas e 18 horas. Obtiveram-se os resultados apresentados na Figura 8, os quais permitiram concluir que a indução da SOD-MV requer uma indução de, no mínimo, 1 hora, dado que um tempo inferior a este se mostrou insuficiente para a indução.

Figura 8: Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da indução da proteína recombinante SOD-MV por diferentes tempos.

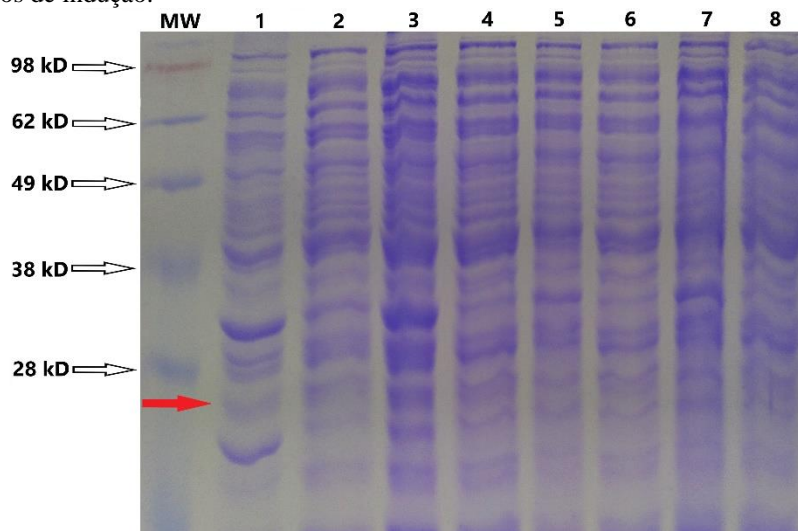


(1) Cultura bacteriana não induzida com IPTG; (2) cultura bacteriana induzida com 0,5mM de IPTG por 30 minutos; (3) cultura induzida por 1 hora; (4) cultura induzida por 4 horas; (5) cultura induzida por 5 horas; (6) cultura induzida por 6 horas; (7) cultura induzida por 18 horas; (MW) *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard* (*ThermoFisher scientific*). A seta vermelha indica, aproximadamente, a posição da proteína recombinante.

Em seguida, foi realizada nova análise de expressão, já incluindo a etapa seguinte, de sonicação, a fim de verificar se a proteína recombinante estaria presente na fração solúvel do lisado celular. Para isso, determinou-se um intervalo de indução a ser avaliado, sendo o tempo mínimo necessário para indução (1 hora) definido como limite inferior do intervalo e o tempo seguinte analisado na Figura 8 (4 horas) como o limite superior.

Assim, após indução, lise e centrifugação, avaliaram-se as frações solúvel e insolúvel de hora em hora dentro desse intervalo (Figura 9), permitindo verificar que a proteína estava presente na fração solúvel. Enfim, selecionou-se o tempo de 4 horas para a indução da proteína recombinante, por ter sido considerado mais adequado à superexpressão da enzima. Contudo, ressalva-se a limitação de não ter sido realizada análise quantitativa para determinação do tempo ótimo de indução, ficando esta análise para possíveis projetos futuros.

Figura 9: Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da lise da proteína recombinante SOD-MV após diferentes tempos de indução.



(1) Fração insolúvel após indução de 1 hora; (2) fração solúvel após indução de 1 hora; (3) fração insolúvel/2 horas; (4) fração solúvel/2 horas; (5) fração insolúvel/3 horas; (6) fração solúvel/3 horas; (7) fração insolúvel/4 horas; (8) fração solúvel/4 horas; (MW) *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (ThermoFisher scientific)*. A seta vermelha indica, aproximadamente, a posição da proteína recombinante.

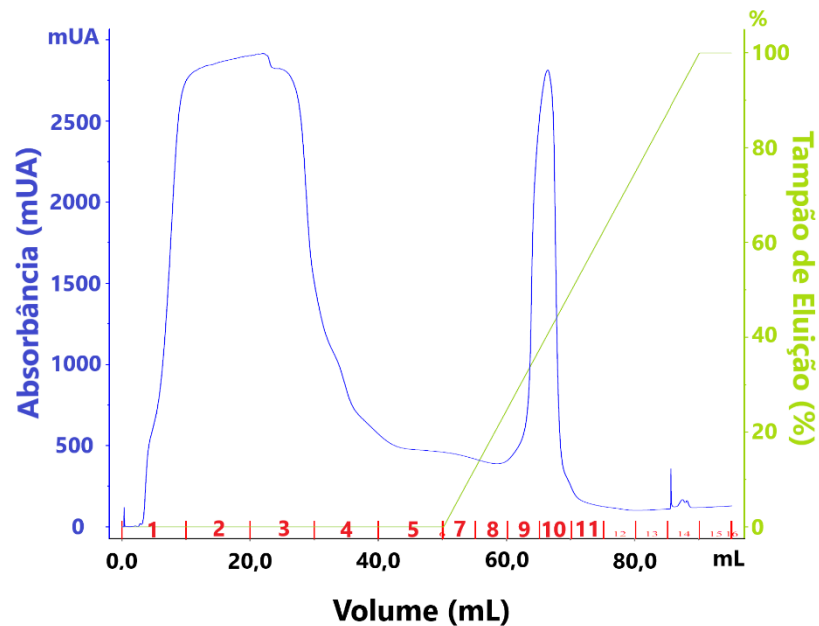
Além disso, definiu-se o meio *Circlegrow (MP Biomedicals, EUA)* para cultivo das bactérias e expressão da proteína, por ser um meio aprimorado e desenhado para um rápido crescimento de *E. coli* e alto rendimento da produção plasmidial. Ademais, a fim de evitar o aquecimento da amostra e a consequente degradação da proteína recombinante durante a etapa de lise celular, aumentou-se o tempo de pausa nos ciclos de sonicação, passando de 30 s pulso / 30 s pausa para 10 s pulso / 50 s pausa.

#### 4.4 Purificação e análise de atividade enzimática

##### 4.4.1 Purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

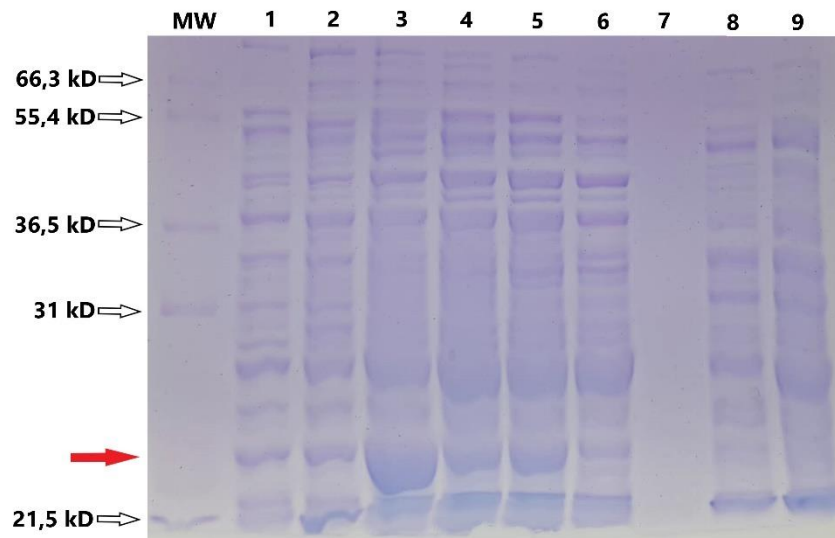
Após as etapas de indução e lise celular, a fração solúvel contendo a enzima SOD-MV foi submetida à purificação através de cromatografia de afinidade a níquel. A escolha dessa técnica se deu pela presença da cauda de histidina na proteína recombinante, a qual possui afinidade pelos íons de níquel imobilizados na resina, podendo ser eluída com a adição de imidazol. Contudo, conforme pode ser observado pelo resultado da eletroforese (figura 11), a proteína recombinante não ficou retida na coluna cromatográfica, sendo liberada nas frações de injeção da purificação, de acordo com o cromatograma apresentado na figura 10.

Figura 10: Cromatograma da purificação por afinidade a níquel da proteína recombinante SOD-MV.



A linha azul demonstra a quantificação de proteína (mUA) obtida pela absorbância (DO280); a linha verde indica a concentração do tampão de eluição utilizado (em porcentagem). Os números das frações coletadas são demonstrados na parte inferior do cromatograma: números 1, 2, 3, 4, 8, 9 e 10.

Figura 11: Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da purificação por afinidade a níquel da proteína recombinante SOD-MV.



(1) Cultura bacteriana não induzida com IPTG; (2) cultura bacteriana induzida com 0,5mM de IPTG; (3) fração insolúvel do lisado bacteriano; (4) fração solúvel do lisado bacteriano; (5) ao (8) frações 2, 3, 8, 9 e 10, respectivamente, coletadas após a purificação; (MW) *Mark 12 Unstained Standard* (ThermoFisher scientific). A seta vermelha indica, aproximadamente, a posição da proteína recombinante.

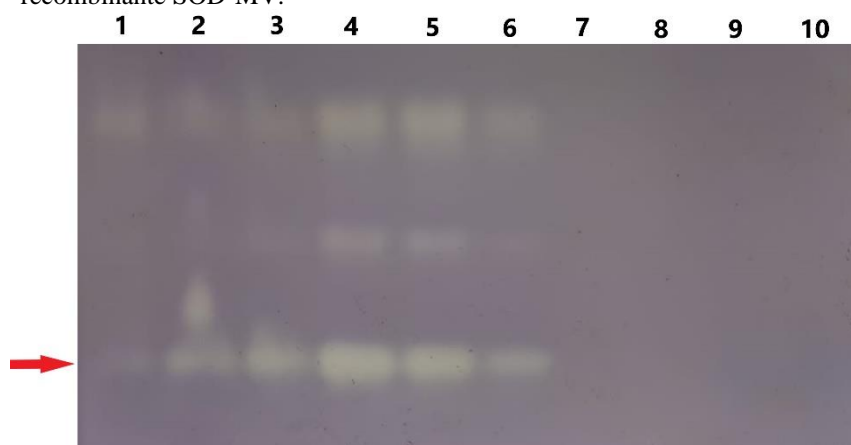
Com vistas a realizar uma análise adicional do resultado, foi realizada a avaliação da atividade enzimática das frações de indução, lise e purificação, apresentada na figura 12. A técnica utilizada foi escolhida por possibilitar a visualização da atividade enzimática mesmo em condições em que a enzima não se encontra pura, com a praticidade adicional de não requerer espectrofotômetro para leitura. Por outro lado, a técnica empregada apresenta a



limitação de não fornecer uma quantificação exata da atividade enzimática, limitando possíveis comparações com demais enzimas superóxido dismutases.

O método empregado utiliza o NBT como detector do ânion radical superóxido, gerado fotoquimicamente, enquanto na presença da enzima superóxido dismutase, a redução do NBT é inibida, gerando bandas acromáticas em um gel azul (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

Figura 12: Gel de atividade enzimática das frações da purificação por afinidade a níquel da proteína recombinante SOD-MV.



(1) Cultura bacteriana não induzida com IPTG; (2) cultura bacteriana induzida com 0,5mM de IPTG; (3) fração insolúvel do lisado bacteriano; (4) fração solúvel do lisado bacteriano; (5) a (10) frações 2, 3, 4, 8, 9 e 10, respectivamente, coletadas após a purificação. A seta vermelha indica, aproximadamente, a posição da proteína recombinante.

A partir desse ensaio, foi possível confirmar a localização da enzima SOD-MV nas frações de injeção da cromatografia, ao mesmo tempo em que demonstrou que a proteína estava presente em sua conformação ativa.

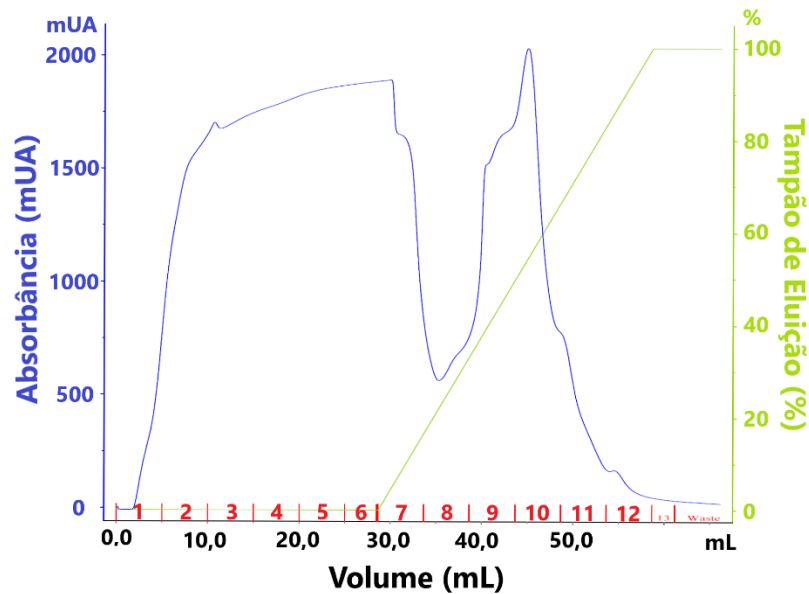
#### 4.4.2 Purificação por cromatografia de troca iônica

Assim sendo, as frações contendo a enzima foram unidas e dialisadas, a fim de se realizar nova tentativa de purificação, dessa vez empregando uma técnica diferente. A cromatografia de troca iônica se baseia na atração entre moléculas de cargas opostas e, por isso, foi utilizada resina de troca aniônica, tampão de equilíbrio com pH acima do ponto isoeletrico (pI) da proteína, estimado pelo ProtParam em 5.79, e tampão de eluição com alta concentração salina (JUNGBAUER; HAHN, 2009).

Entretanto, a enzima recombinante novamente não ficou retida na coluna, sendo eluída nas frações de injeção da cromatografia, conforme pode ser visto no gel de atividade, a partir da numeração do cromatograma (figuras 14 e 13, respectivamente).

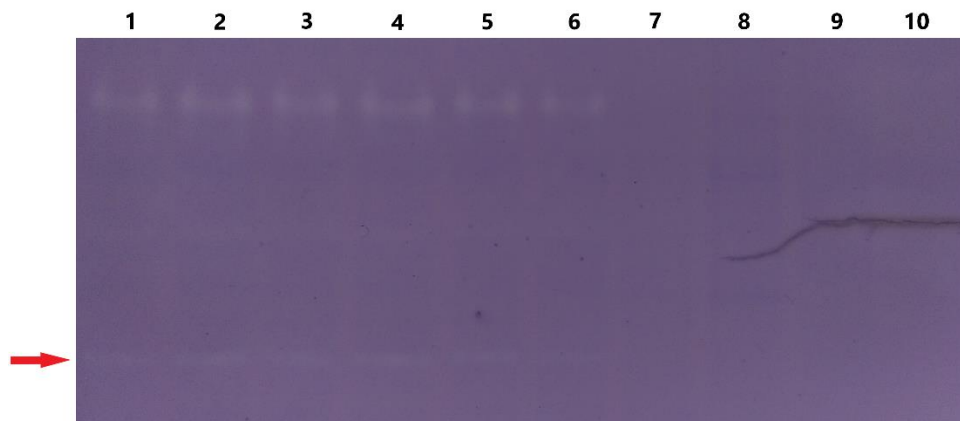


Figura 13: Cromatograma da purificação por troca iônica da proteína recombinante SOD-MV.



A linha azul demonstra a quantificação de proteína (mUA) obtida pela absorbância (DO280); a linha verde indica a concentração do tampão de eluição utilizado (em porcentagem). Os números das frações coletadas são demonstrados na parte inferior do cromatograma: números 1 ao 12.

Figura 14: Gel de atividade enzimática das frações da purificação por troca iônica da proteína recombinante SOD-MV.



(1) ao (10) frações 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11, respectivamente, coletadas após a purificação. A seta vermelha indica, aproximadamente, a posição da proteína recombinante.

#### 4.4.3 Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica

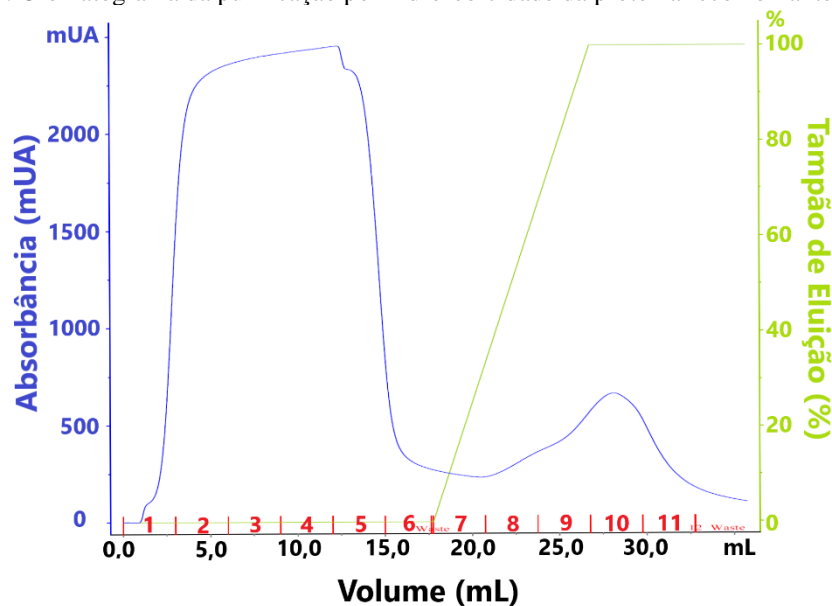
Devido aos resultados obtidos com as demais técnicas cromatográficas, foi realizada nova tentativa de purificação utilizando cromatografia de interação hidrofóbica. Para isso, foi realizado novo cultivo bacteriano, indução e lise celular e, após, a fração solúvel foi aplicada na coluna cromatográfica contendo a resina *Phenyl Sepharose Fast Flow*.

Nesse procedimento foram necessárias algumas mudanças nos parâmetros de indução e lise devido a algumas limitações, sendo principalmente pela diferença de tamanho entre as distintas colunas cromatográficas. Enquanto a coluna utilizada no item 4.4.1 possui 10 mL de

VC, a coluna empregada neste item possui 3 mL de VC. A fim de evitar a saturação da coluna, os volumes de cultura bacteriana e tampão de lise utilizados foram reduzidos pela metade. Por conta disso, o tempo de lise foi reduzido de 6 para 4 minutos, com vistas a evitar a degradação da amostra. Assim, após expressão, lise e centrifugação, prosseguiu-se para a etapa de purificação.

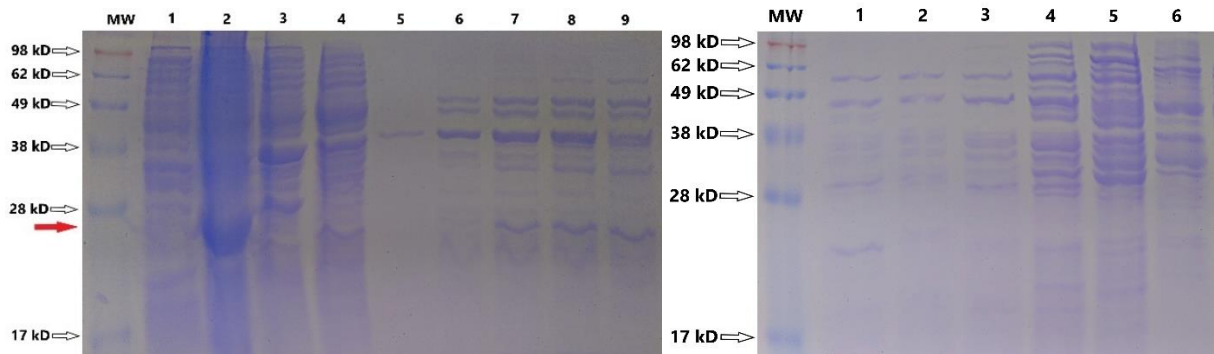
A técnica utilizada de cromatografia de interação hidrofóbica se baseia nas interações hidrofóbicas entre os ligantes da resina e regiões hidrofóbicas da proteína, favorecidas por um ambiente hidrofóbico, obtido com a utilização de tampão de equilíbrio aquoso com alta concentração salina (MCCUE, 2009). Todavia, o *Grand average of hydropathicity* (GRAVY) da proteína SOD-MV, calculado através do ProtParam, é de -0,175, indicando que a sequência é ligeiramente mais hidrofílica que hidrofóbica. Tal dado pode ajudar a explicar os resultados obtidos, visto que novamente a proteína não ficou retida na coluna cromatográfica (figuras 15, 16 e 17).

Figura 15: Cromatograma da purificação por hidrofobicidade da proteína recombinante SOD-MV.



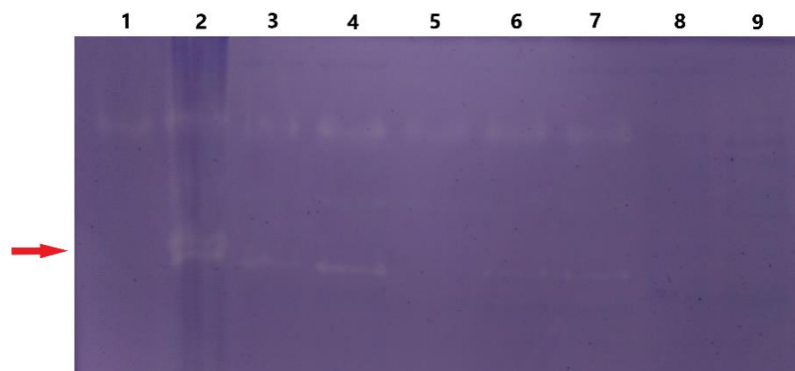
A linha azul demonstra a quantificação de proteína (mUA) obtida pela absorbância (DO280); a linha verde indica a concentração do tampão de eluição utilizado (em porcentagem). Os números das frações coletadas são demonstrados na parte inferior do cromatograma: números 1 ao 11.

Figura 16: Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%) da purificação por hidrofobicidade da proteína recombinante SOD-MV.



À esquerda: (1) Cultura bacteriana não induzida com IPTG; (2) cultura bacteriana induzida com 0,5mM de IPTG; (3) fração insolúvel do lisado bacteriano; (4) fração solúvel do lisado bacteriano; (5) ao (9) frações 1 a 5, respectivamente, coletadas após a purificação. À direita: (1) ao (6) frações 6 a 11, respectivamente, coletadas após a purificação. (MW) *Mark 12 Unstained Standard (ThermoFisher scientific)*. A seta vermelha indica, aproximadamente, a posição da proteína recombinante.

Figura 17: Gel de atividade enzimática das frações da purificação por hidrofobicidade da proteína recombinante SOD-MV.



(1) Cultura bacteriana não induzida com IPTG; (2) cultura bacteriana induzida com 0,5mM de IPTG; (3) fração insolúvel do lisado bacteriano; (4) fração solúvel do lisado bacteriano; (5) ao (9) frações 2, 3, 4, 9 e 10, respectivamente, coletadas após a purificação. A seta vermelha indica, aproximadamente, a posição da proteína recombinante.

## 5 CONCLUSÃO

Em concordância com os objetivos propostos, a enzima SOD-MV foi analisada por bioinformática, clonada no vetor pTrc-His-A, expressa no hospedeiro *E. coli* e teve sua atividade enzimática analisada.

A partir da análise de bioinformática, foi possível prever que o material genético em estudo pertence ao organismo *Phyllobacterium calauticae*, com um percentual de identidade de 97,14 % entre as sequências comparadas. Além disso, conclui-se que os aminoácidos envolvidos no sítio ativo da SOD-MV estão conservados em relação a outras enzimas Fe-SODs descritas na literatura. Assim, foram preditos os aminoácidos ligantes ao cofator metálico da enzima SOD-MV, que são His57, His108, Asp189 e His193, e os aminoácidos componentes da assinatura de Fe-SOD, que são Ala103, Gln104, Tyr111, Ala174 e Gly175. Também foi predito que a estrutura da enzima é homodimérica.

Adicionalmente, conclui-se que foi viável a superexpressão da enzima no hospedeiro em sua conformação ativa, conforme mostrado na análise por zimograma. Entretanto, não foi possível a purificação da proteína. Considera-se que isso foi devido a alguma característica conformacional da proteína, por exemplo, cauda de histidina não exposta, ou então à necessidade de uso de outras condições ou reagentes para purificação, como troca de resina de cromatografia, pH das soluções ou do tampão de cromatografia. Ressalta-se, também, que as limitações impostas pela pandemia de COVID-19 afetaram o ritmo de trabalho no laboratório, impondo limitações de tempo que não permitiram testar novos procedimentos para purificação da proteína, apesar de serem testadas três técnicas cromatográficas distintas.

Por fim, conclui-se que o desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso permitiu a complementação, de maneira prática e teórica, da minha formação acadêmica na área de biotecnologia.

## **6 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Dado o potencial biotecnológico de enzimas com o mesmo local de origem da SOD-MV, sugere-se, em estudos futuros, uma análise de propriedades como estabilidade térmica, temperatura ótima de funcionamento, tolerância salina e a metais pesados.

Além disso, podem-se utilizar outros procedimentos, como clonagem em vetor com sinal de secreção periplásmica, uso de outras resinas de cromatografia ou adição de etapas de pré-tratamento, ou, ainda, buscar otimizar os procedimentos empregadas neste trabalho, a fim de buscar a purificação da enzima.

REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ALLEMANN, I. B.; BAUMANN, L. et al. Antioxidants used in skin care formulations. **Skin Therapy Lett**, v. 13, n. 7, p. 5-9, 2008.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **The FEBS journal**, 272, n. 20, p. 5101-5109, 2005.
- ANTUNES, A.; NGUGI, D. K.; STINGL, U. Microbiology of the Red Sea (and other) deep-sea anoxic brine lakes. **Environmental Microbiology Reports**, 3, n. 4, p. 416-433, 2011.
- AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S. Oxygen radicals and related species. **Principles of Free Radical Biomedicine**, 1, p. 19-42, 2011.
- BADIEA, E. A. *et al.* A novel thermostable and halophilic thioredoxin reductase from the Red Sea Atlantis II hot brine pool. **PLOS ONE**, 14, n. 5, p. e0217565, 2019.
- BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. Superoxide dismutase: an industrial perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**, 31, n. 1, p. 65-76, 2011.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BEHZAD, H.; IBARRA, M. A.; MINETA, K.; GOJOBORI, T. Metagenomic studies of the Red Sea. **Gene**, 576, n. 2, Part 1, p. 717-723, 2016.
- BEISSENHIRTZ, M. K.; SCHELLER, F. W.; VIEZZOLI, M. S.; LISDAT, F. Engineered Superoxide Dismutase Monomers for Superoxide Biosensor Applications. **Analytical Chemistry**, 78, n. 3, p. 928-935, 2006.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, 2006.
- BERTONI, M. *et al.* Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 10480, 2017.
- CARVER, T. *et al.* Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, 28, n. 4, p. 464-469, 2011.
- CHAMBERGO, F. S. *et al.* Conformational stability of recombinant manganese superoxide dismutase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 19-24, 2012.

---

<sup>1</sup>De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023 (2018).

CHEN, X. *et al.* Topical application of superoxide dismutase mediated by HIV-TAT peptide attenuates UVB-induced damages in human skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 107, p. 286-294, 2016.

COCCHIA, N. *et al.* Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 75, n. 7, p. 1201-1210, 2011.

CULOTTA, V. C.; YANG, M.; O'HALLORAN, T. V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 747-758, 2006.

DUPONT, C. L.; NEUPANE, K.; SHEARER, J.; PALENIK, B. Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. **Environmental Microbiology**, 10, n. 7, p. 1831-1843, 2008.

ELBEHERY, A. H. A.; LEAK, D. J.; SIAM, R. Novel thermostable antibiotic resistance enzymes from the Atlantis II Deep Red Sea brine pool. **Microbial Biotechnology**, 10, n. 1, p. 189-202, 2017.

FERREIRA, A. J. S. *et al.* Core Microbial Functional Activities in Ocean Environments Revealed by Global Metagenomic Profiling Analyses. **PLOS ONE**, 9, n. 6, p. e97338, 2014.

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

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Chapter 22 Ion-Exchange Chromatography. *In*: BURGESS, R. R. e DEUTSCHER, M. P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, 2009. v. 463, p. 349-371.

KERFELD, C. A. *et al.* The 1.6 Å resolution structure of Fe-superoxide dismutase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 8, n. 7, p. 707-714, 2003.

KOO, D. D. H. *et al.* Endothelial cell protection against ischemia/reperfusion injury by lecithinized superoxide dismutase. **Kidney International**, 60, n. 2, p. 786-796, 2001.

KOST, O. A. *et al.* Superoxide Dismutase 1 Nanozyme for Treatment of Eye Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016, p. 5194239, 2016.

LAND, W. *et al.* The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. **Transplantation**, 57, n. 2, 1994.

LIU, H.; TIAN, Y.; XIA, P. Pyramidal, Rodlike, Spherical Gold Nanostructures for Direct Electron Transfer of Copper, Zinc-Superoxide Dismutase: Application to Superoxide Anion Biosensors. **Langmuir**, 24, n. 12, p. 6359-6366, 2008.

LIU, X.; KOKARE, C. Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry. *In*: BRAHMACHARI, G. (Ed.). **Biotechnology of Microbial Enzymes**: Academic Press, 2017. p. 267-298.

LUSTERMANS, J. J. M.; BJERG, J. J.; SCHRAMM, A.; MARSHALL, I. P. G. *Phyllobacterium calauticae* sp. nov. isolated from a microaerophilic veil transversed by cable bacteria in freshwater sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, 114, n. 11, p. 1877-1887, 2021.

MADEIRA, F. *et al.* The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic acids research**, 47, n. W1, p. W636-W641, 2019.

MAKSIMENKO, A. V.; VAVAEV, A. V. Antioxidant enzymes as potential targets in cardioprotection and treatment of cardiovascular diseases. Enzyme antioxidants: the next stage of pharmacological counterwork to the oxidative stress. **Heart international**, 7, n. 1, p. e3-e3, 2012.

MANJKREKAR, S.; WADEKAR, T.; SUMANT, O. **Enzymes Market Size & Industry Forecast by 2027**. Allied Market Research: Life Sciences, Diagnostics and Biotech, 2021. 341 p. Market Report.

MAY, S. W. Applications of oxidoreductases. **Current Opinion in Biotechnology**, 10, n. 4, p. 370-375, 1999.

MAY, S. W.; PADGETTE, S. R. Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: Current Status and Future Potential. **Bio/Technology**, 1, n. 8, p. 677-686, 1983.

MCCUE, J. T. Chapter 25 Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications. *In*: BURGESS, R. R. e DEUTSCHER, M. P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, 2009. v. 463, p. 405-414.

MCDONALD, A. G.; BOYCE, S.; TIPTON, K. F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. **Nucleic Acids Research**, 37, n. suppl\_1, p. D593-D597, 2008.

MEYER, A. S.; ISAKSEN, A. Application of enzymes as food antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, 6, n. 9, p. 300-304, 1995.

MOHAMED, Y. M. *et al.* Isolation and characterization of a heavy metal-resistant, thermophilic esterase from a Red Sea Brine Pool. **Scientific Reports**, 3, n. 1, p. 3358, 2013.

OTER, S. *et al.* Oxidants and antioxidants: friends or foes?. **Oxidants and antioxidants in medical science**, v. 1, n. 1, p. 1, 2012.

PARKER, M. W.; BLAKE, C. C. F. Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. **FEBS Letters**, 229, n. 2, p. 377-382, 1988.

PEDERSEN, H. L.; WILLASSEN, N. P.; LEIROS, I. The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*. **Acta Crystallographica Section F**, 65, n. 2, p. 84-92, 2009.



SÁEZ, G. T.; ESTÁN-CAPELL, N. Antioxidant Enzymes. *In*: SCHWAB, M. (Ed.). **Encyclopedia of Cancer**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 288-294.

SAGAR, S. *et al.* Cytotoxic and apoptotic evaluations of marine bacteria isolated from brine-seawater interface of the Red Sea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13, n. 1, p. 29, 2013.

SAMBROOK, J. *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold spring harbor laboratory press**, p. 1546, 1989.

SARROUH, B. *et al.* Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **J Bioprocess Biotech**, 4, p. 002, 2012.

SASAKI, H.; AKAMATSU, H.; HORIO, T. Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCat. **Journal of investigative dermatology**, v. 114, n. 3, p. 502-507, 2000.

SAYED, A. *et al.* A Novel Mercuric Reductase from the Unique Deep Brine Environment of Atlantis II in the Red Sea. **Journal of Biological Chemistry**, 289, n. 3, p. 1675-1687, 2014.

SONBOL, S. A.; FERREIRA, A. J. S.; SIAM, R. Red Sea Atlantis II brine pool nitrilase with unique thermostability profile and heavy metal tolerance. **BMC Biotechnology**, 16, n. 1, p. 14, 2016.

STUDER, G. *et al.* QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, 36, n. 6, p. 1765-1771, 2019.

SWIFT, S. A.; BOWER, A. S.; SCHMITT, R. W. Vertical, horizontal, and temporal changes in temperature in the Atlantis II and Discovery hot brine pools, Red Sea. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, 64, p. 118-128, 2012.

TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 76, n. 1, p. 339-343, 1996.

TIKHONOV, B. B. *et al.* Immobilized Enzymes from the Class of Oxidoreductases in Technological Processes: A Review. **Catalysis in Industry**, 11, n. 3, p. 251-263, 2019.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.

XU, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. **Industrial Biotechnology**, 1, n. 1, p. 38-50, 2005.

ZIKO, L. *et al.* Antibacterial and anticancer activities of orphan biosynthetic gene clusters from Atlantis II Red Sea brine pool. **Microbial Cell Factories**, 18, n. 1, p. 56, 2019.

**Amanda Cristina Esteves Leite**

## Publicações:

ADRIANI, P. P.; DE PAIVA, F. C. R.; DE OLIVEIRA, G. S.; **LEITE, A. C.** *et al.* Structural and functional characterization of the glutathione peroxidase-like Thioredoxin peroxidase from the fungus *Trichoderma reesei*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, p. 93-100, 2021.

## Participação em congressos:

**LEITE, A. C.**; CHAMBERGO, F. S. Estudo e caracterização das enzimas catalase e glutatona peroxidase de *Trichoderma reesei*. In Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP (SIICUSP), 2020. São Paulo.

## Projetos de pesquisa:

Bolsista Iniciação Científica, processo nº 2019/05227-0.

Julho 2019 – Julho 2021

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Estudo e caracterização das enzimas catalase e glutatona peroxidase de *Trichoderma reesei*.

## Estágio Curricular:

Agosto 2021 - Atual

Empresa Concedente: Savoy Indústria de Cosméticos S.A.

Atividades: Prestar análises físico-químicas e microbiológicas de cosméticos.

Área: Pesquisa e Desenvolvimento