



ALICE BONTEMPI BISPO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DO
INSTITUTO BUTANTAN - SP**

**LAVRAS -MG
2023**

ALICE BONTEMPI BISPO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE
BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DO INSTITUTO BUTANTAN - SP**

Relatório de estágio obrigatório
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Medicina Veterinária, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Christian Hirsch
Orientador

**LAVRAS-MG
2023**

ALICE BONTEMPI BISPO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA
E BIOFÍSICA DO INSTITUTO BUTANTAN - SP**

**SUPERVISED INTERNSHIP PERFORMED IN THE BIOCHEMISTRY AND
BIOPHYSICS LABORATORY IN INSTITUTO BUTANTAN - SP**

APROVADA em 28 de novembro de 2023

Dr. Christian Hirsch	UFLA
Dra. Érika Aparecida Oliveira	UFLA
Dra. Rafaella Silva Andrade	UFLA

Relatório de estágio obrigatório apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Christian Hirsch
Orientador

**LAVRAS-MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Elizete e Paulo, por serem, durante toda minha vida e, principalmente nestes cinco anos, a minha fonte de força, amor e compreensão, permitindo que eu tivesse tudo o que precisava para me tornar quem sou hoje. À minha irmã Maria Paula, que sempre foi fonte de apoio, cuidado e risadas, seja a 8.000 ou 400 quilômetros de distância. À minha avó, Dona Dita, que não pôde me ver formada, mas que nunca deixou de orar por mim a cada ida à Lavras e que sempre fez questão de vibrar com as minhas conquistas.

Aos meus animais de estimação, Maggie, Nino, Cherrie, Nina, Cueia, Pingo, Renata, Yasmin e ao eterno Tom, que me mostraram o caminho que deveria seguir, dedicando minha vida a estudá-los e entendê-los, com todo o amor e carinho do mundo.

Aos meus amigos, que se tornaram minha família, Júlia, Pedro, Bruna, Aline, Júlia A. e Carla, além de todos os outros do NEP. Obrigada por acolherem uma paulista com a simpatia, alegria e jeito único de vocês. Minha vida não seria a mesma se não tivéssemos cruzado nossos caminhos e dividido todas as experiências dessa graduação juntos. Em especial à Juju, que se tornou minha irmã e minha “metade” dentro da faculdade e fora dela. Amo vocês.

À Mariana, Júlia e Letícia, por serem fonte de risadas, conversas, amor e apoio ao longo do cursinho e da faculdade. Amo vocês.

À Bárbara e à Bia, que me acompanham e torcem por mim mesmo de tão longe, cada uma em uma cidade diferente. Amo vocês.

Ao Núcleo de Estudos em Saúde Única, por me mostrar as diversas faces da Medicina Veterinária e a importância de se cuidar da natureza, animais e seres humanos igualmente.

Ao LISASC, pelo acolhimento, aprendizado, paciência e risadas. Sem esta oportunidade eu jamais descobriria meu caminho na graduação.

À Universidade Federal de Lavras, por me permitir realizar meu sonho

Ao Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, por ter me proporcionado tanto aprendizado, experiências e amizades ao longo de três meses. Em especial à Adriana, pela oportunidade e dedicação, e ao Rodrigo, pela paciência, parceria e risadas ao longo do dia.

À banca, por ter aceitado participar deste momento tão importante para minha graduação.

Não humanizo bicho porque é ofensa. Há que respeitá-lhe a natureza; eu é que me animalizo.

- Clarice Lispector

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo descrever a experiência de Estágio Supervisionado realizado no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, localizado na cidade de São Paulo - SP, com enfoque na rotina laboratorial para pesquisa de enzimas de aracnídeos. Ao longo de três meses foram realizados diferentes trabalhos com *Amblyomma sculptum*, espécie parasita de diferentes mamíferos, especialmente equinos e capivaras parasitando ocasionalmente humanos. Esta espécie de Ixodídeo é responsável pela transmissão de Febre Maculosa, grande problema atual para saúde pública, e também de babesiose equina, doença amplamente conhecida na Medicina Veterinária. Está presente em todo o território brasileiro e pode ser encontrado facilmente no meio ambiente e em diferentes espécies, enquanto completa seu ciclo de vida trioxeno. A fim de entender melhor a função de enzimas intestinais deste parasita hematófago tão importante em termos de saúde pública, foram realizadas ao longo de três meses diferentes atividades de caracterização e descrição de quitinase, por meio da dissecação de oito fêmeas ingurgitadas e oito fêmeas semi-ingurgitadas, homogeneização de seus intestinos, quantificação de proteína das amostras, avaliação de atividade enzimática, cromatografia e eletroforese, possibilitando a criação de um protocolo para isolamento de sua quitinase intestinal, para que futuros estudos sejam realizados.

Palavras-chave: Profissionalização; Medicina Veterinária; Bioquímica; Ensino; Estágio

ABSTRACT

The present work aims to describe the Supervised Internship experience carried out at the Biochemistry and Biophysics Laboratory of the Butantan Institute, located in the city of São Paulo - SP, focusing on the laboratory routine for research into arachnid enzymes. Over the course of three months, different works were carried out with *Amblyomma sculptum*, a parasitic species of different mammals, especially equines and capybaras, occasionally parasitizing humans. This species of Ixodid is responsible for the transmission of Spotted Fever, a major current public health problem, and also of equine babesiosis, a disease widely known in Veterinary Medicine. It is present throughout the Brazilian territory and can be easily found in the environment and in different species, while it completes its trioxene life cycle. In order to better understand the function of intestinal enzymes of this hematophagous parasite, which is so important in terms of public health, different characterization and description activities of chitinase were carried out over three months, through the dissection of eight engorged females and eight semi- engorged, homogenization of their intestines, protein quantification of the samples, evaluation of enzymatic activity, chromatography and electrophoresis, enabling the creation of a protocol for the isolation of their intestinal chitinase, allowing future studies to be carried out .

Key-words: Professionalization; Veterinary Medicine; Biochemistry; Teaching; Internship

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. INSTITUTO BUTANTAN.....	10
2.1. Histórico do local	10
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	14
3.1. Aspectos gerais	14
3.2. Dissecção de <i>Amblyomma sculptum</i>.....	17
3.3. Homogeneização dos intestinos	18
3.4. Avaliação de atividade enzimática de quitinase de homogeneizado de <i>Amblyomma sculptum</i>	19
3.5. Avaliação da atividade de quitinase com tampão TRIS	23
3.6. Quantificação de proteínas por Ácido Bicinchonínico (BCA).....	24
3.7. Cromatografia.....	28
3.8. Eletroforese	31
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

O Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras conta com dez semestres letivos, nos quais são transmitidos conhecimentos práticos e teóricos no seu decorrer. Ao ingressar no décimo e último semestre, é exigida a atividade PRG-107, que compõe-se de 68 horas de teoria e 408 horas de atividades práticas, contabilizando um total de 476 horas. A carga horária prática é realizada na forma de estágio supervisionado e a descrição deste em um Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), que conta como a parte teórica da disciplina. A atividade tem como objetivo possibilitar ao aluno o aprofundamento do conhecimento prático e teórico na área de Medicina Veterinária que desejar seguir ao longo de sua vida profissional. No caso do presente estágio supervisionado, possibilitou também o desenvolvimento de raciocínio para pesquisas científicas.

No formato de relatório de estágio, este trabalho descreve as atividades desenvolvidas no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, localizado no bairro Butantã, na cidade de São Paulo. O laboratório é palco de diferentes pesquisas na área de bioquímica, em sua maioria envolvendo animais, sejam eles aracnídeos, insetos, serpentes ou anfíbios e suas diferentes peçonhas, venenos e outros bioprodutos. O estágio foi realizado no período de 11 de agosto de 2023 até o dia 27 de outubro do mesmo ano, sob supervisão da Profa. Dra Adriana Rios Lopes Rocha e de seu aluno de doutorado, MSc. Rodrigo Valladão. As atividades e o Trabalho de Conclusão de Curso foram orientados pelo Prof. Dr. Christian Hirsch do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Este trabalho tem como intuito descrever as técnicas utilizadas para isolamento e caracterização de enzimas de aracnídeos, área de pesquisa da Dra. Adriana Rocha, em especial quitinase de *Amblyomma sculptum*, conhecidamente localizada no intestino deste parasita de grande importância em saúde humana e animal, trazendo uma abordagem e um olhar através do conceito de Saúde Única, por meio de pesquisa científica e rotina laboratorial. Cada atividade citada conta com uma explicação de sua importância e relevância no isolamento de quitinase, além de contar com a descrição dos materiais necessários para execução. Desta forma, é possível compreender a linha de pensamento para criação e execução de um protocolo dentro de um laboratório de pesquisa, além de aprender diversas técnicas envolvidas no estudo de proteínas

2. INSTITUTO BUTANTAN

2.1. Histórico do local

Fundado em 1899 pelo Governo do Estado de São Paulo, na antiga Fazenda Butantan, na Zona Oeste da cidade, o Instituto Butantan foi primeiramente chamado de Instituto Serumtherápico e tinha como intuito produzir soro antipestoso para combater a peste bubônica que se alastrava do Porto de Santos para o Brasil. Era inicialmente vinculado ao Instituto Bacteriológico (atualmente Instituto Adolfo Lutz), mas em 1901 se tornou independente, com a coordenação do médico sanitarista Vital Brasil, assistente de Adolfo

Lutz na época. Após realizado o controle da peste no país, o Instituto, ainda coordenado por Brasil, seguiu no rumo de pesquisa e produção de soros e vacinas, partindo para o campo dos animais peçonhentos, em especial as serpentes brasileiras, que eram protagonistas de diversos acidentes na cidade e em todo o país.

Em 1914 foi fundado o Prédio Central, um edifício espaçoso e com capacidade de comportar diferentes laboratórios, a fim de aumentar o potencial do Instituto (na época, ainda Serumtherápico) na produção de soros antiofídicos, junto ao serpentário, inaugurado em 1915. Posteriormente, em 1925, o Instituto foi denominado Instituto Butantan e rapidamente ganhou reconhecimento nacional e internacional.

Com o passar dos anos, o Instituto aumentou significativamente seu número de laboratórios e pesquisadores, trabalhando em diversas áreas da biotecnologia, pesquisa e desenvolvimento, utilizando produtos biológicos de animais, bactérias e fungos. De acordo com o *Global Vaccine Market Report* de 2021, o Instituto é o maior produtor de vacinas e soros da América Latina e o maior produtor de imunobiológicos do Brasil. Conta com programas de especialização na área de desenvolvimento de processos, biotecnologia e toxinologia, além da pós-graduação em toxinologia.

Atualmente, o Prédio Central é chamado de Edifício Vital Brasil, e é sede da biblioteca, com um acervo para consulta, salas de reunião, salas de descanso e computadores com acesso livre aos funcionários, estagiários e pesquisadores. O Instituto agora possui um local de lazer e conhecimento aberto ao público, denominado “Parque da Ciência”, que comporta 3 museus: Museu Biológico, Museu de Microbiologia e Museu da Vacina; o Horto Oswaldo Cruz; Espaço Terra Firme de Exposições; Macacário, Serpentário e Reptário; Centro de Memórias e os

laboratórios de pesquisa e desenvolvimento, sendo estes últimos os únicos não abertos à visitação do público. Ambos estão representados, respectivamente, nas figuras 1 e 2.

O Programa de Estágio Curricular Obrigatório do Instituto Butantan é fornecido pela Escola Superior do Instituto Butantan (ESIB) e ocorre semestralmente; cada laboratório com seus respectivos pesquisadores decide se há possibilidade de abertura de vagas para orientação. O processo seletivo se dá por meio de inscrição através do site da ESIB, selecionando o laboratório desejado, enviando certificados de atividades extracurriculares, Coeficiente de Rendimento Acadêmico, histórico escolar e posteriormente uma entrevista com os pesquisadores do respectivo laboratório.

Figura 1 - Frente do Edifício Vital Brasil/Biblioteca



Fonte: Da autora (2023).

Figura 2 - Mapa do Parque da Ciência



Fonte: parquedaciencia.butantan.gov.br

2.2. O Laboratório de Bioquímica e Biofísica

O Laboratório de Bioquímica e Biofísica, representado pela figura 3, se localiza nas proximidades do Edifício Vital Brasil, no Instituto Butantan, e desempenha um papel fundamental em diversas pesquisas. Utilizando uma variedade de espécies animais, o laboratório investiga venenos, secreções, enzimas e outros produtos biológicos. Conta com seis pesquisadores com diferentes linhas de pesquisa, quatro técnicos de laboratório e alunos de mestrado, doutorado e em estágio curricular obrigatório. O laboratório possui em sua estrutura diferentes equipamentos regularmente utilizados na análise de biomoléculas e na rotina, como: espectrômetro de massas; cromatógrafo (High Performance Liquid Chromatography); espectrofluorímetro; espectrofotômetro; capela de fluxo laminar, autoclave, centrífugas, banho-maria, liofilizador, entre outros. O prédio é dividido em quatro laboratórios diferentes, porém, sem distinção exata das atividades realizadas em cada um, sendo eles integrados.

No total, foram aceitos no segundo semestre de 2023, seis alunos para estágio curricular obrigatório, que contam cada um com a supervisão e orientação de um dos pesquisadores e de

um ou mais alunos de pós-graduação, que são responsáveis por ensinar técnicas para estudo e pesquisa de bioprodutos de diversas espécies animais, através de cromatografia, eletroforese, filtração, teste de atividade enzimática, quantificação de proteínas, liofilização entre outros. Cada pesquisador do laboratório possui uma especialidade, trabalhando com espécies animais diferentes, como serpentes, escorpiões, aranhas, rãs e sapos venenosos, mantendo uma tradição do Instituto de se trabalhar na área de toxicologia. São estudadas diferentes biomoléculas, tanto para sua descrição e caracterização quanto para aplicação biotecnológica.

Figura 3 - Frente do Laboratório de Bioquímica e Biofísica



Fonte: Da autora (2023).

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Tabela 1 - Atividades desenvolvidas durante o período de estágio, entre 11/08/2023 e 27/10/2023 e quantidade de vezes realizadas.

Atividades desenvolvidas	Quantidade de vezes realizadas
Dissecção de <i>Amblyomma sculptum</i>	16 (16 animais no total)
Homogeneização de intestinos de <i>A. sculptum</i>	5 (cada homogeneização contava com 2 intestinos de 2 animais diferentes)
Cromatografia iônica (HiTrapQ)	6
Cromatografia hidrofóbica (HiTrap Butyl)	6
Avaliação da atividade de quitinase	20
Avaliação da atividade da quitinase em tampão TRIS	1
Quantificação de proteína por BCA	15
Eletroforese	2

3.1. Aspectos gerais

Durante os três meses de estágio obrigatório foram realizadas diferentes técnicas envolvendo o isolamento e caracterização de quitinase, enzima presente no intestino de aracnídeos, área de pesquisa da Dra. Adriana Rocha e de seu aluno de doutorado, Msc Rodrigo Valladão, responsáveis pela supervisão do estágio. A fim de trazer as atividades para o âmbito da Medicina Veterinária, as etapas foram realizadas em *Amblyomma sculptum*, parasita de grande importância na saúde humana e animal.

Amblyomma sculptum, antes denominado *Amblyomma cajennense* e popularmente conhecido como “carrapato-estrela” é um carrapato da família Ixodidae, trioxeno e amplamente distribuído no território brasileiro, sendo descrito em todas as regiões, mas em menor quantidade nos estados do extremo-sul, pois as baixas temperaturas impedem que seu ciclo de vida se complete (LABRUNA et al., 2000). Para a saúde animal, este parasita apresenta um

risco na saúde de diferentes espécies, visto que não tem alta especificidade por hospedeiros. Em equinos, pode transmitir babesiose, doença causada por dois protozoários, *Babesia caballi* e *Babesia equi*, que, por definição morfológica, podem ser denominados de *Theileria equi*. Esta doença, também chamada de piroplasmose, é causadora de grandes perdas econômicas devido à queda de trabalho e índice reprodutivo dos animais, fora os gastos com cuidados veterinários. Mesmo que não infectados com o parasita, os carrapatos podem causar anemia no hospedeiro quando em grandes quantidades, além de participar na transmissão de diferentes bactérias, gerando uma infecção local ou até mesmo sistêmica no animal (CASTAGNOLLI et al., 2003).

Em seres humanos, *Amblyomma sculptum* pode ser responsável por transmitir *Borrelia* (agente infeccioso da doença de Lyme) e *Rickettsia rickettsi*, agente etiológico da Febre Maculosa, doença que vem tomando espaço nos noticiários brasileiros devido ao aumento no número de casos, gerado por um avanço urbano em regiões preservadas e desconhecimento da população acerca dos riscos, entrando em contato com diferentes animais silvestres, principalmente as capivaras, uns dos principais hospedeiros periurbanos deste parasita.

Devido à sua importância, este parasita foi escolhido como motivo de pesquisa durante os três meses de estágio obrigatório no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, de maneira que se buscou isolar, avaliar e testar a enzima quitinase, a qual já tinha seu papel na ecdise do animal conhecida, mas que se acreditava também estar presente no intestino do parasita. A quitinase, se isolada do intestino, poderia ser relacionada com uma possível resposta à infecção por microorganismos nos carrapatos, visto que a enzima já tem seu papel no sistema imune descrito em mamíferos (DI ROSA et al., 2016). Além disto, de acordo com o trabalho de Martins et al. (2017), carrapatos infectados apresentam um transcriptoma com mais proteínas no intestino e glândulas salivares do que aqueles não infectados, indicando que o animal possivelmente expressa fatores para tentar barrar a infecção, já que esta é prejudicial para eles.

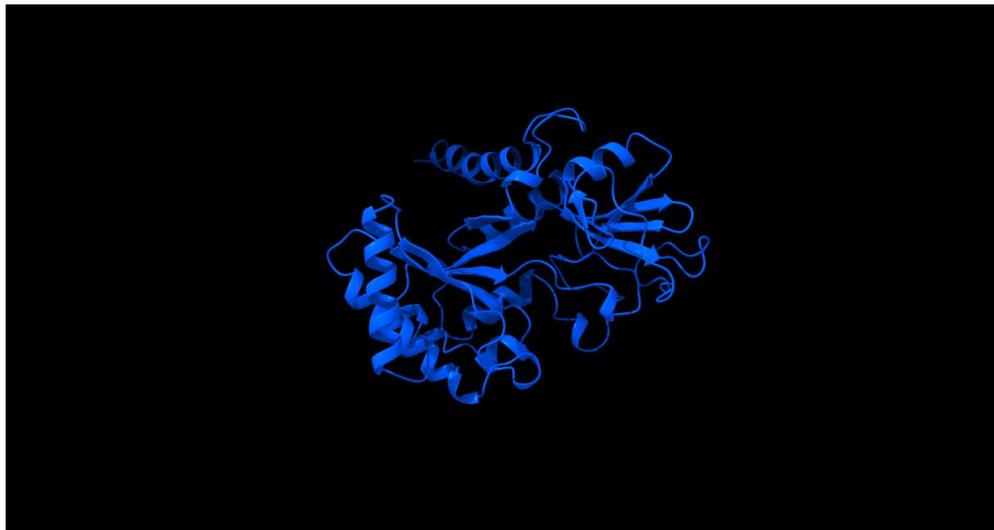
Enzimas são, em sua maioria, proteínas, cuja função em qualquer organismo é catalisar reações, ou seja, diminuir a energia de ativação, aumentando a velocidade e sem perder sua estrutura neste processo, sendo capazes de repeti-lo por inúmeras vezes. Elas apresentam alta especificidade, interagindo com um substrato, em seu sítio de ligação. Estas proteínas são de suma importância para a manutenção do metabolismo celular e servem como motivo de pesquisa devido à sua aplicação biotecnológica, na produção de fármacos, inseticidas, vacinas, entre outros. As quitinases são descritas como endoglicosil-hidrolases, compostas por ligações de N-acetil-glicosamina, que clivam as ligações de quitina, um polissacarídeo estrutural

encontrado no exoesqueleto de invertebrados e parede celular de fungos. Desta forma, isolá-las e caracterizá-las permite ao pesquisador entender seu papel no organismo estudado, sua expressão e função, possibilitando seu manuseio para futuras aplicações tecnológicas.

No caso de *Amblyomma sculptum*, o isolamento da quitinase nos permitiu compreender seu comportamento quando extraída do intestino, a melhor maneira de isolá-la, através das técnicas de cromatografia, avaliar sua atividade cinética e estrutura molecular.. Logo, por meio do trabalho desenvolvido durante o período de estágio, foi possível iniciar uma pesquisa acerca do metabolismo de um parasita de grande importância para a saúde pública.

Abaixo, podemos observar uma imagem da estrutura quaternária de uma quitinase intestinal de *Amblyomma sculptum*, gerada pelo programa *ChimeraX*, através da sequência de aminoácidos que a compõem. Isto foi possível graças ao trabalho de Moreira e colaboradores (2017), que depositaram o transcriptoma de intestino, ovários e glândulas salivares do parasita no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI).

Figura 4 - Quitinase intestinal de *Amblyomma sculptum*



Fonte: Gerado por ChimeraX (2023).

3.2. Dissecção de *Amblyomma sculptum*

Inicialmente foi possível acompanhar a Dra. Adriana Rocha na dissecção dos carrapatos, a fim de coletar seus intestinos. Para isso, foram utilizados 16 animais, sendo oito fêmeas

ingurgitadas e oito fêmeas semi-ingurgitadas, fornecidos pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, no qual eram alimentados em coelhos saudáveis do Biotério Central.

Os animais foram insensibilizados por meio do frio, sendo colocados em gelo até diminuição de sua atividade metabólica. A dissecação foi feita em uma placa de parafina, com um microscópio com câmera acoplada, onde foi possível observar com mais precisão. Como o carrapato é hematófago, ao dissecá-lo, o sangue do hospedeiro é derramado, dificultando a visualização. Desta forma, foi aplicado com pipeta Pasteur descartável uma solução de NaCl 3 mM, isotônica ao tecido do animal, fazendo com que este se preserve e que seja possível visualizar suas estruturas internas.

Foram separados dois intestinos em cada microtubo, totalizando oito, denominados “Lote”, de maneira que o Lote 1 ao 4, possuíam dois intestinos de fêmeas ingurgitadas em cada tubo, e o Lote 5 ao 8, dois intestinos de fêmeas semi-ingurgitadas por tubo. Após a coleta dos intestinos, estes permaneceram em gelo até o transporte para um congelador, onde devem ser congelados para evitar a degradação tecidual por meio das enzimas e putrefação por meio de bactérias contaminantes e da microflora do carrapato. Já no congelador, os microtubos foram identificados por Lote, data e conteúdo, posicionados em uma caixa identificada com o nome do estagiário, no caso, “Alice”.

Materiais necessários:

- 8 carrapatos fêmea ingurgitados e 8 semi-ingurgitados
- Placa de Petri com parafina sólida
- Pinça
- Tesoura
- Gelo
- Solução salina 3mM
- Pipeta Pasteur descartável
- Microscópio eletrônico
- 8 Microtubos identificados com lote, data e nome do aluno

3.3. Homogeneização dos intestinos

A homogeneização dos intestinos tem como intuito principal lisar os enterócitos, liberando assim a enzima com que se deseja trabalhar. Este processo foi inicialmente realizado nos intestinos do Lote 1 e 2. Seguindo o protocolo criado por MORETI et al. (2013), foram adicionados 900 μ L de água ultrapura (MilliQ) e o conteúdo transferido para um tubo Potter-Elvehjen, em gelo, para maceração. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L de E-64 (1,5 mM), para inibição de cisteíno-peptidases, as quais, no momento da lise celular, são liberadas e podem acarretar na desnaturação das enzimas que buscamos isolar. Este conteúdo foi transferido para um microtubo e centrifugado a 4°C, 13.200 rotações por minuto por 30 minutos. O sobrenadante foi então coletado e transferido para outro microtubo, identificado com o lote, data da homogeneização e conteúdo (homogeneizado de dois intestinos de *Amblyomma sculptum*).

Materiais necessários:

- Intestino de *Amblyomma sculptum*
- Tubo Potter-Elvehjen
- Água ultrapura (MilliQ)
- 3 Microtubos
- Gelo
- E-64 (1,5mM)
- Pipeta automática
- Pipeta Pasteur
- Centrífuga

Figura 5 - Intestinos homogeneizados em tubo Potter-Elvehjen no gelo



Fonte: Da autora (2023).

3.4. Avaliação de atividade enzimática de quitinase de homogeneizado de *Amblyomma sculptum*

Enzimas são proteínas que catalisam reações no metabolismo dos seres vivos, elas estão presentes em diversos compartimentos, diminuindo a energia de ativação necessária para que as reações intracelulares aconteçam, conseqüentemente aumentando sua velocidade. Nos aracnídeos não é diferente, seu organismo é complexo e as enzimas têm grande importância nas vias metabólicas. Desta forma, é importante caracterizá-las e descrevê-las, para, num primeiro momento, entendê-las e posteriormente utilizá-las de diversas formas, seja através da sua inibição, da sua utilização em reações ou em síntese de compostos.

No intuito de melhor compreender seu papel e em quais condições as enzimas atuam, foram realizados testes de avaliação de atividade enzimática. Estes testes consistem na aplicação de diluições do homogeneizado de intestinos e de porções fracionadas por

cromatografia iônica em uma placa de 96 poços. O protocolo seguido foi criado pela Dra. Adriana Rios e seu aluno de doutorado, Msc. Rodrigo Valladão.

Materiais necessários:

- Enzimas (no homogeneizado ou separadas por cromatografia)
- Substrato específico (4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (MUC))
- Tampão citrato-fosfato (pH 4)
- Solução de parada (GlyNaOH 0,5M - pH 10)
- Placa de 96 poços
- Microtubos
- Gelo
- Pipeta automática
- Banho-Maria a 30°C
- Espectrofluorímetro (Gemini XPS)

O primeiro ensaio realizado foi para averiguar a atividade do homogeneizado do Lote 1. Antes de iniciar o teste, foi necessário diluir o homogeneizado em tampão citrato-fosfato (pH 4), devido à alta concentração da enzima na amostra. Sem a diluição, não é possível avaliar a atividade enzimática em um gráfico linear, já que todos os sítios ativos estariam saturados.

Uma vez realizada a diluição, deve-se fazer o mesmo com o substrato, de forma que o substrato específico da quitinase (4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (MUC)) deve ser diluído sete vezes no mesmo tampão.

A placa de 96 poços foi então posicionada em gelo e 25 μ L da amostra diluída foi aplicada em cada poço de uma coluna, ocupando o total de quatro poços por coluna, pois são utilizados quatro tempos diferentes, a fim de expressar os resultados em uma reta de fluorescência emitida por minuto. O quinto poço foi utilizado para o teste Branco, constituído de amostra e tampão, para avaliar se a enzima tem atividade mesmo sem seu substrato específico. O mesmo foi feito com o substrato, a fim de testar se há leitura de atividade mesmo sem enzima.

Após este processo, 25 μ L de substrato diluído foi depositado em cada poço, para cada enzima que se deseja avaliar a atividade. Em seguida, a placa foi colocada em banho-maria a 30°C. O processo durou uma hora, e a cada 15 minutos foi adicionado em cada linha 200 μ L da

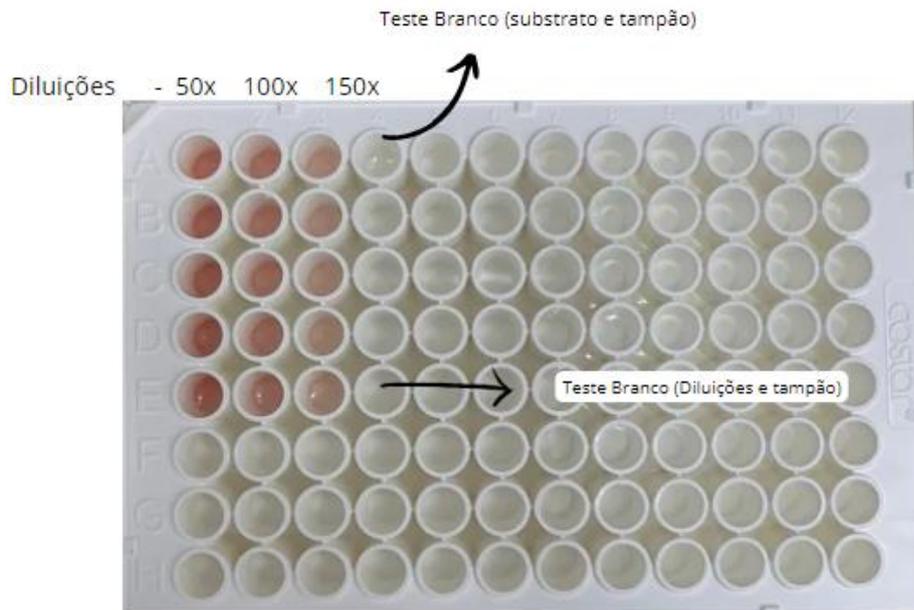
solução de parada (GlyNaOH), para alterar o pH para básico e impedir a atuação das enzimas. A placa com o ensaio está representada na figura 6.

Ao fim, a placa foi levada para o espectrofluorímetro (Gemini XPS), equipamento para avaliar a quantidade de fluorescência emitida e, portanto, quantidade de substrato clivado pelas enzimas. A leitura é realizada nos seguintes comprimentos de onda: Excitação-360 nm; Emissão-460 nm.

Ao final do experimento, os valores foram utilizados para montar um gráfico de Fluorescência x Tempo (minutos) . O coeficiente angular da equação da reta é utilizado para calcular a atividade absoluta da enzima, ao comparar com a curva padrão, realizada anteriormente no laboratório e utilizada para os experimentos posteriores.

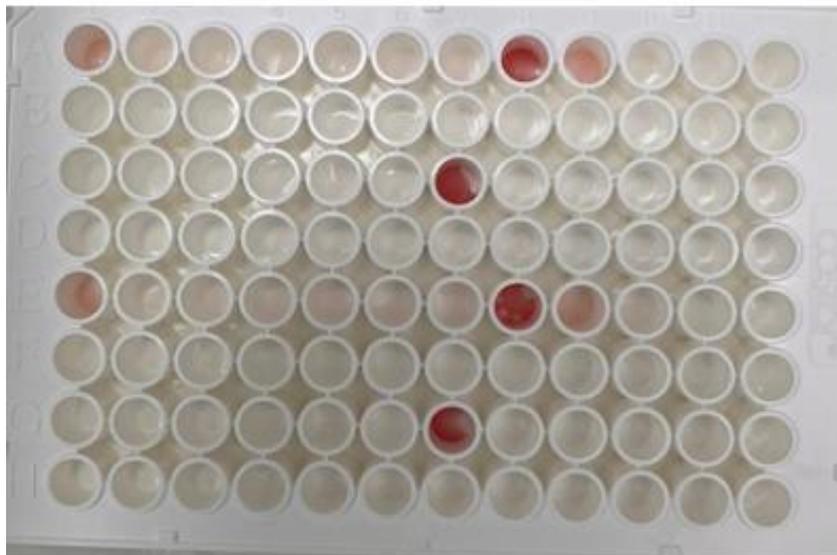
No caso de avaliação de atividade das frações de cromatografia, não é necessário que se realize diluição, visto que a enzima já se encontra diluída em tampão. A quantidade de poços a serem utilizados é referente ao número de frações coletadas. Neste caso, a placa deve permanecer em banho-maria a 30°C por 30 minutos, e então todos os poços devem receber ao final deste tempo a solução de parada. A avaliação de atividade enzimática das frações visa elucidar em quais delas foi isolada a quitinase, ou seja, onde há mais fluorescência, e então permite averiguar se a técnica funcionou, se o gradiente de tampão foi eficiente e se é possível juntar frações para realizar outra cromatografia, a fim de isolar ainda mais a proteína desejada. O gráfico 1 representa a atividade de cada fração coletada em uma cromatografia HiTrapButyl, avaliando a fluorescência emitida por minuto, captada pelo Espectrofluorímetro (Gemini XPS), a placa referente a este ensaio está representada pela figura 7.

Figura 6 - Placa de atividade enzimática da quitinase nas diluições 50x, 100x e 150x



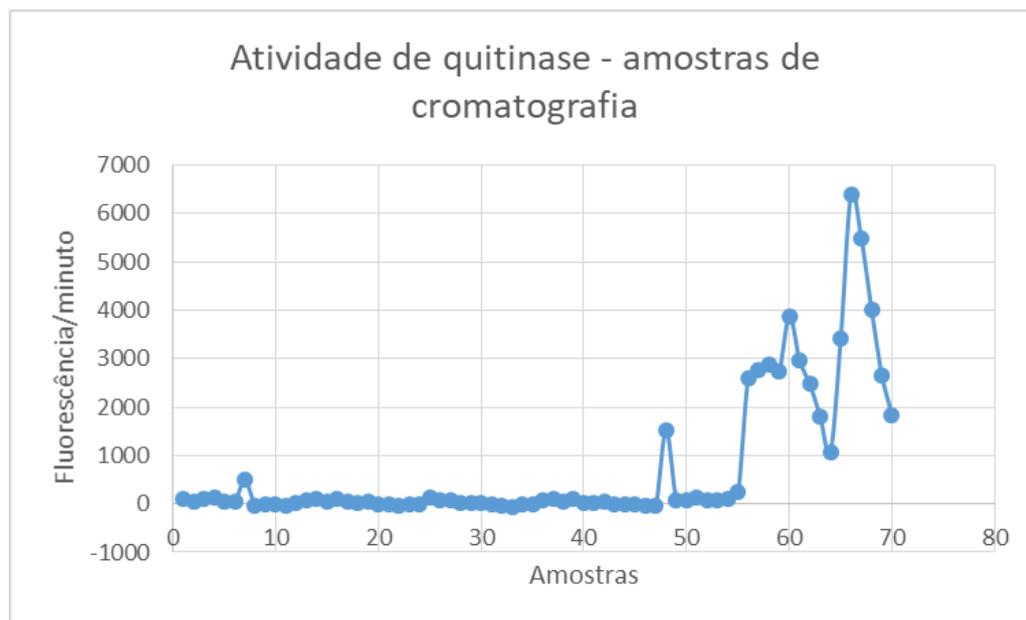
Fonte: Da autora (2023).

Figura 7 - Teste de atividade enzimática da quitinase de 71 frações de cromatografia HiTrapButyl



Fonte: Da autora (2023).

Gráfico 1: Atividade enzimática de quitinase das amostras de cromatografia HiTrapButyl



Fonte: Da autora (2023).

3.5. Avaliação da atividade de quitinase com tampão TRIS

Para realizar o isolamento da quitinase do homogeneizado, é necessário utilizar uma técnica de separação de proteínas, no caso, a técnica escolhida foi a cromatografia por troca iônica e por afinidade hidrofóbica, que serão descritas posteriormente. Esta técnica necessita de um tampão que altere a carga da molécula de quitinase, deixando-a negativamente carregada, para interagir com a coluna, que tem carga positiva. Desta forma, escolheu-se o tampão TRIS (tris-hidroximetilaminometano), que atua na faixa de pH 7-9 e que, portanto, seria capaz de tirar a quitinase de seu ponto isoelétrico ($PI = 5,75$) e a deixaria com carga oposta à coluna (no caso, carga negativa). No entanto, era necessário testar se este tampão inibiria a atividade desta enzima, então foi realizada uma avaliação de atividade enzimática, comparando a atividade da quitinase em tampão TRIS e em citrato-fosfato.

Desta maneira, seguindo um protocolo criado pela Dra. Adriana Rios, foram realizadas duas diluições de 100 vezes com o homogeneizado, cada uma com um tampão diferente e duas diluições de 200 vezes, da mesma forma, totalizando quatro diluições. Cada diluição diferente era colocada em um microtubo transparente. Foram transferidos 100 μ L de cada diluição para

uma placa de 96 poços, apoiada em gelo, de modo em que cada coluna, de um até quatro receberam 25 µL em cada linha (de A a D). Posteriormente, foram adicionados 25µL de substrato em cada poço e a placa foi colocada em banho-maria a 30°C. A cada 15 minutos, era adicionada uma “solução de parada”, GlyNaOH, que altera o pH e interrompe a reação.

Ao final, medindo os valores pelo espectrofluorímetro (Gemini XPS), foi possível averiguar que havia atividade muito semelhante da enzima no tampão citrato-fosfato e no TRIS, possibilitando seu uso na cromatografia.

Materiais necessários:

- Homogeneizado de intestinos
- Placa de 96 poços
- Gelo
- Pipeta automática
- Tampão TRIS
- Tampão citrato-fosfato
- Espectrofluorímetro (Gemini XPS)
- Banho-maria a 30°C
- Solução de parada (GlyNaOH)

3.6. Quantificação de proteínas por Ácido Bicinchonínico (BCA)

Quantificar proteínas em sua amostra é essencial para entender melhor a composição de um homogeneizado e estimar a dificuldade para posteriormente isolar as enzimas desejadas. Além disso, após a separação de proteínas por cromatografia, é importante entender os remanescentes e a quantidade de “contaminação” existente na amostra isolada. Desta forma, a técnica de quantificação de proteínas por meio do Ácido Bicinchonínico (BCA) se faz essencial em um laboratório de bioquímica.

O processo de avaliação da quantidade de proteínas se dá pela captação de absorvância em um comprimento de onda de 562 nM, no espectrofotômetro (Spectramax 190). Quanto mais escura (arroxeadada) a reação, maior a absorvância e, conseqüentemente, maior a quantidade de proteínas naquele poço. O óxido de cobre (Cu²⁺), que se apresenta em coloração azul, é reduzido por meio das ligações peptídicas das proteínas, através do aquecimento em 60°C por

30 minutos. O cobre, agora reduzido, consegue ser quelado pelo ácido bicinchonínico, formando um complexo com o mesmo, gerando uma coloração arroxeada conforme a quantidade de proteínas (SMITH et al., 1985).

Materiais necessários:

- Placa de 96 poços transparente
- Pipetas automáticas
- Água ultrafiltrada (MilliQ)
- Ovoalbumina 10x diluída
- Óxido de cobre líquido
- Ácido Bicinchonínico
- Banho-maria a 60°C
- Espectrofotômetro (Spectramax 190)
- Frações de cromatografia

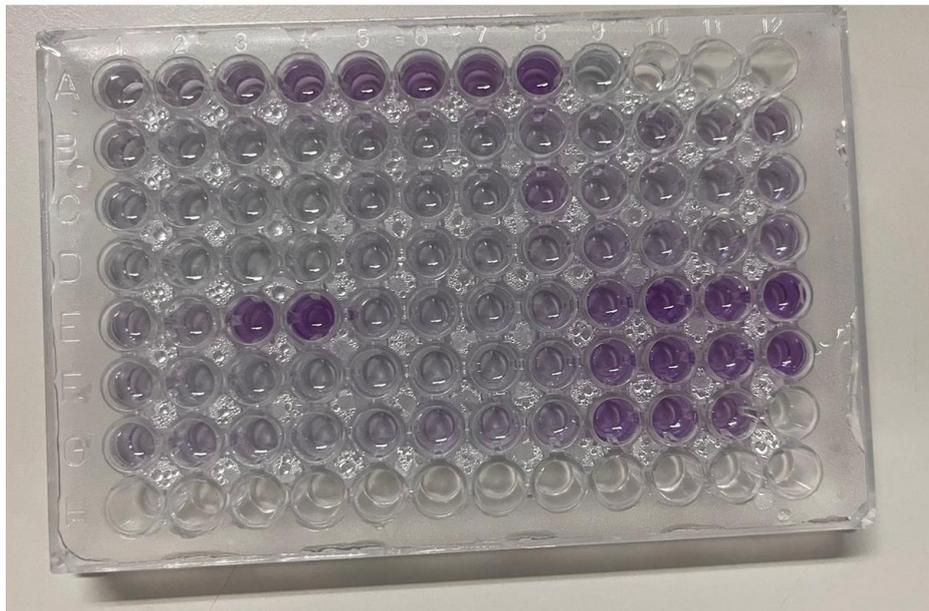
Utilizou-se o protocolo de Smith *et al* (1985) como referência para a realização desta atividade. O processo se inicia realizando uma curva padrão para que pudéssemos avaliar os dados das amostras. Desta forma, ovoalbumina foi utilizada, sendo acrescentada em volume crescente em cada poço da primeira linha (2 μL ; 4 μL ; 6 μL ; 8 μL ; 10 μL ; 12 μL ; 14 μL e 16 μL), os quais contém as respectivas concentrações de ovoalbumina: 0,4 μg , 0,8 μg ; 1,2 μg , 1,6 μg , 2 μg , 2,4 μg , 2,8 μg e 3,2 μg . Posteriormente, os poços foram completados com água ultrapura (MilliQ), para que todos atingissem o mesmo volume de 16 μL . A ovoalbumina é necessária para realização da curva pois permite estabelecer um padrão para quantificação da proteína presente em cada fração ou amostra. Em seguida, 16 μL de cada fração que se deseja avaliar foi adicionada em cada poço. Preparou-se uma diluição (1:50) de ácido bicinchonínico e óxido de cobre e 200 μL foram adicionados em cada poço, incluindo a curva padrão. A placa foi então colocada em banho-maria a 60°C por 30 minutos.

A figura 8 representa o resultado visual que se obtém da placa após os 30 minutos no banho-maria a 60°C, e a figura 9, a curva padrão obtida por meio da ovoalbumina diluída em água ultrapura e a absorbância captada pelo equipamento.

O gráfico 2 demonstra a quantificação de proteína gerado após análise de espectrofluorímetro, relacionando absorbância e frações de cromatografia. O gráfico 3 demonstra uma comparação da entre a quantidade de proteína e de atividade enzimática de cada

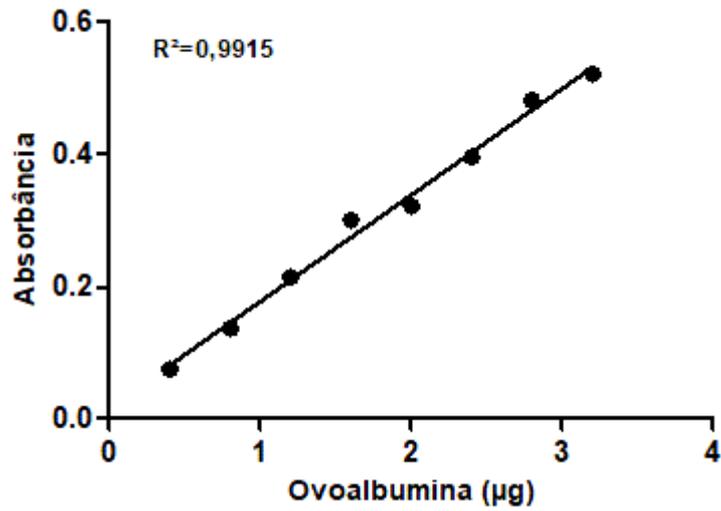
fração, o que nos permitiu avaliar se a cromatografia havia isolado a quitinase, de maneira que as frações que contém maior atividade e menos quantidade de proteína indicam sucesso no isolamento.

Figura 8 - Placa de 96 poços com amostras de cromatografia e Ácido Bicinchonínico e cobre cuproso, após banho-maria por 30 minutos a 60°C.



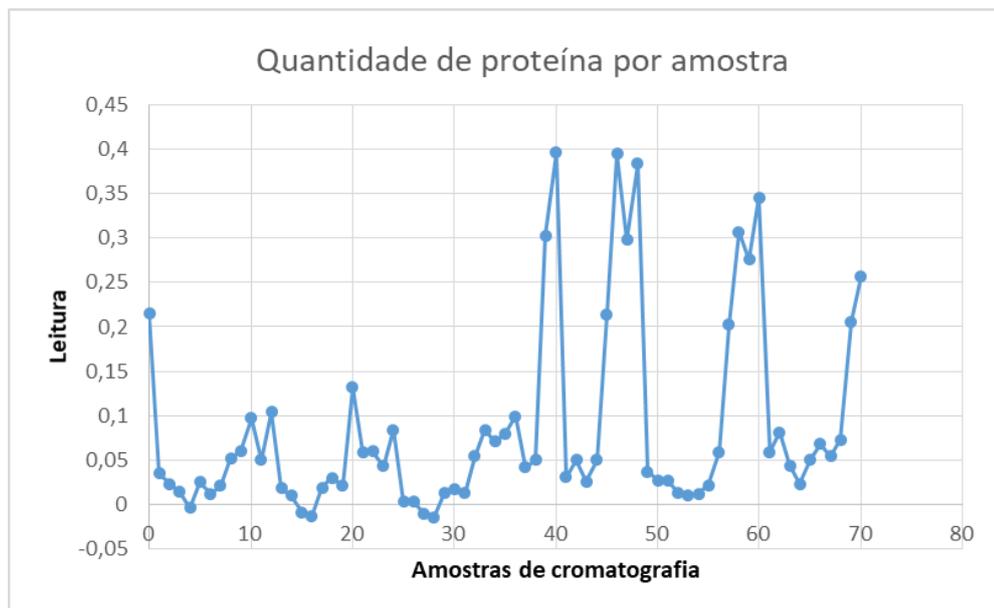
Fonte: Da autora (2023).

Figura 9 - Curva padrão de ovoalbumina



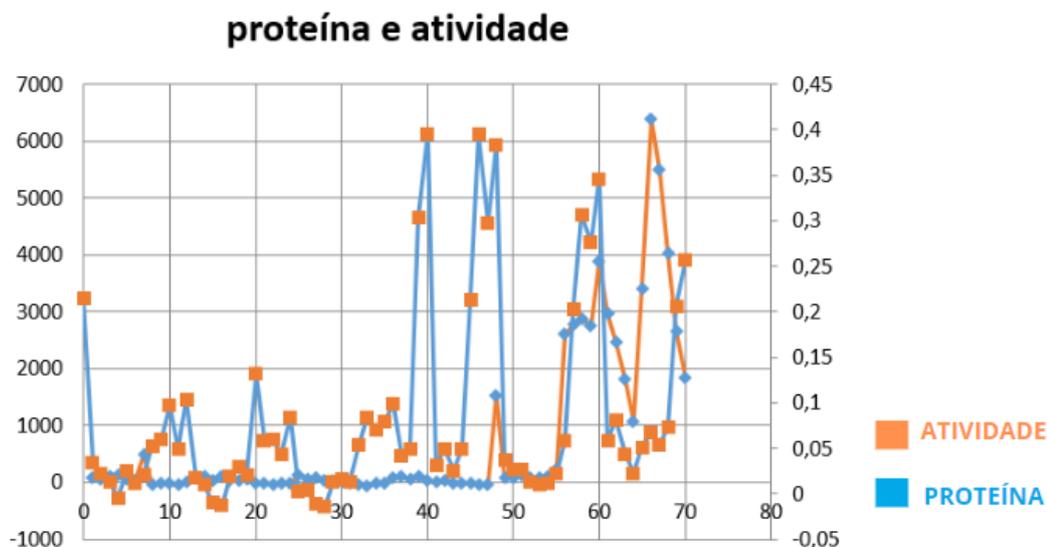
Fonte: Da autora (2023).

Gráfico 2: Resultados de quantificação por BCA de frações coletadas de HiTrapButyl



Fonte: Da autora (2023).

Gráfico 3: Comparação de quantidade de proteínas e atividade enzimática de mesmas frações de cromatografia



Fonte: Da autora (2023).

3.7. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica utilizada para separar proteínas de uma amostra aplicada em uma coluna constituída de diferentes materiais, denominados de “resina”, a depender do tipo de separação que se deseja fazer e da carga da proteína em questão (MARZOCCO e TORRES, 2015, p.30). O processo consiste na interação das proteínas do *pool* aplicado com a coluna, de forma que se deseja coletar todas elas, porém, em momentos diferentes, já que cada uma tem sua característica de afinidade com a resina. Para a coleta, um fluxo de tampão TRIS com diferentes concentrações de NaCl é adicionado, fazendo com que as proteínas percam a força de ligação e sejam liberadas, sendo então sequencialmente coletadas nos microtubos.

Antes de escolher as melhores técnicas de cromatografia para separação das proteínas e consequentemente isolamento daquela desejada, é necessário entender algumas características sobre ela. No caso da quitinase, é preciso conhecer seu ponto isoelétrico, ou seja, pH em que sua carga fica neutra, para que fosse possível adicionar tampão que alterasse esta carga para negativa, desprotonando as carboxilas, a fim de fazer com que ela interaja com a coluna da primeira cromatografia (HiTrapQ - que possui resina de carga positiva). Foi possível averiguar o pH para ponto isoelétrico através do site ExPASy (web.expasy.org), revelando que a proteína

tem carga neutra em pH 5,75, e então escolher um tampão que a alterasse (no caso, TRIS pH 7-9), tornando o meio básico.

No período de estágio, foram utilizadas duas técnicas distintas de cromatografia, HiTrapQ e HiTrap Butyl, seguindo o protocolo do fabricante (MabSelect Xtra) e o adaptando para isolar a quitinase. A primeira coluna consiste numa cromatografia de troca iônica, em que a amostra aplicada, no caso, o homogeneizado de carrapato diluído em tampão TRIS, irá interagir com a resina, que é positivamente carregada, enquanto a proteína desejada (quitinase) está negativamente carregada, devido à adição do tampão e aumento do pH. Desta forma, ao adicionar o *pool* de proteínas, as quitinases deverão se ligar fortemente à coluna, e ao adicionar diferentes concentrações de tampão adicionado de NaCl, permitir separar as diferentes frações de proteínas, visto que os ânions irão interagir com a resina e permitir que as proteínas antes ligadas percam sua força e sejam eliminadas e coletadas (SONG et al., 2002). Nesta primeira etapa, foram adicionados 300 µL de homogeneizado em 1mL de tampão TRIS, desta solução foram adicionados 1 mL na coluna e 50 µL foram salvos para teste de atividade enzimática. Foram coletadas 31 frações em microtubos numerados de 0 a 30 e as concentrações de tampão TRIS adicionado de sal foram: 0M NaCl; 0,2M NaCl, 0,4M NaCl; 0,6M NaCl; 0,8M NaCl e 1M NaCl.

A segunda forma de separação, HiTrap Butyl, consiste numa coluna composta de alta concentração de ligações de carbono, caracterizando-a como extremamente hidrofóbica. A proteína hidrofóbica irá aderir firmemente à coluna por afinidade, de forma que outras proteínas serão coletadas conforme se adicione diferentes concentrações de sal, de maneira que as mais hidrofílicas serão separadas inicialmente, pois estão isoladas pelos ânions do sal e interagem com a água que dissolve a solução.

Desta forma, as frações coletadas e avaliadas com alta atividade de quitinase na primeira cromatografia (HiTrapQ) foram unidas e adicionadas nesta segunda coluna, a fim de purificar ainda mais a proteína. Antes de aplicar 1,5 ml de amostra na coluna, foi necessário adicionar 3mM de NaCl, para permitir que as proteínas interajam com o sal e sejam envolvidas por ele, a fim de facilitar seu isolamento. Para realizar a separação nesta segunda coluna, novos tampões com sal foram adicionados, fazendo com que a enzima fosse coletada ao final da passagem do último tampão, devido ao grande aumento de água e descolamento.. As concentrações de tampão TRIS/NaCl para separação foram: 3M NaCl; 2 M NaCl; 1,5 M NaCl; 1 M NaCl; 0,5 M NaCl; 0,25 M NaCl; 0 M NaCl. Ao final, era testada a atividade enzimática de todas as frações (no caso, 71) e realizada sua dosagem de proteína por BCA, para averiguar

se foi realmente possível purificar e isolar a enzima. Este processo se repetiu 6 vezes ao longo do período de estágio.

A figura 8 representa a primeira coluna utilizada, HiTrapQ, enquanto a figura 9 ilustra as 71 frações coletadas após uma cromatografia hidrofóbica, HiTrap Butyl.

Materiais necessários:

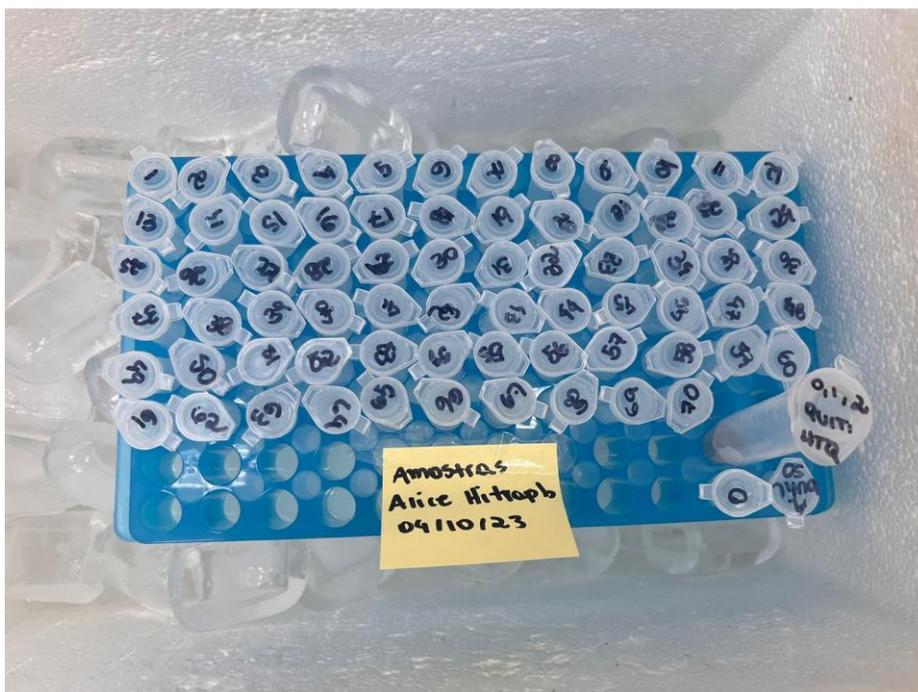
- Homogeneizado de intestino de carrapato
- Tampão TRIS-HCl
- Tampão TRIS-HCl com NaCl em diferentes concentrações
- Coluna HiTrapQ
- Coluna HiTrap Butyl
- Bomba de fluxo contínuo
- Microtubos
- Gelo

Figura 10: Coluna HiTrap Butyl



Fonte: Da autora (2023).

Figura 11: Frações de cromatografia coletadas da coluna HiTrapButyl



Fonte: Da autora (2023).

3.8. Eletroforese

Eletroforese é uma técnica que possibilita a separação de proteínas de uma amostra, ao mesmo tempo que nos permite averiguar seu tamanho quando comparada a um padrão conhecido. O processo se dá através de um gel de poliacrilamida, que permite a passagem de corrente elétrica e faz com que as proteínas migrem por seu interior, a depender de sua carga e tamanho. (SIMPSON, 2006).

No período de estágio, o tipo de eletroforese realizada é chamado de SDS-PAGE, que utiliza um gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS), um surfactante aniônico que confere carga negativa às proteínas e promove desnaturação, fazendo com que sua estrutura primária seja perdida. Neste caso, o intuito é separar as proteínas apenas pelo seu tamanho e não pela sua carga, visto que estarão todas negativas e migrarão para o polo positivo da cuba.

Ao realizar o experimento, a amostra foi secada por meio de liofilização. Este equipamento concentra a amostra e retira a parte líquida, auxiliando na retirada do acúmulo de sal proveniente do tampão utilizado na coluna. A amostra deve ficar 24 horas no equipamento. Assim que retirada, é fervida por 15 minutos, para que suas dobras se desfaçam. Posteriormente,

foram adicionados 25 μ L de tampão de amostra, cuja função é deixar as proteínas negativamente carregadas, de forma que migrem para o polo positivo do gel assim que a corrente for ativada e também reduzir as pontes de dissulfeto, através do 2-beta-mercaptoetanol, conferindo linearidade às proteínas.

No primeiro poço do gel de poliacrilamida foram adicionados 4 μ L do marcador (True Color High Range Protein Marker (10-245 kDa) - Sinapse Biotecnológica), no segundo, 25 μ L da sua amostra. Tampão de corrida (pH 8,3) foi então adicionado para manter o gradiente de carga entre tampão, gel e amostra. São usados 200 Volts por 40 minutos para que a corrida aconteça e ocorra a separação de proteínas, o processo ocorre numa cuba vertical de eletroforese, representada pela figura 12.

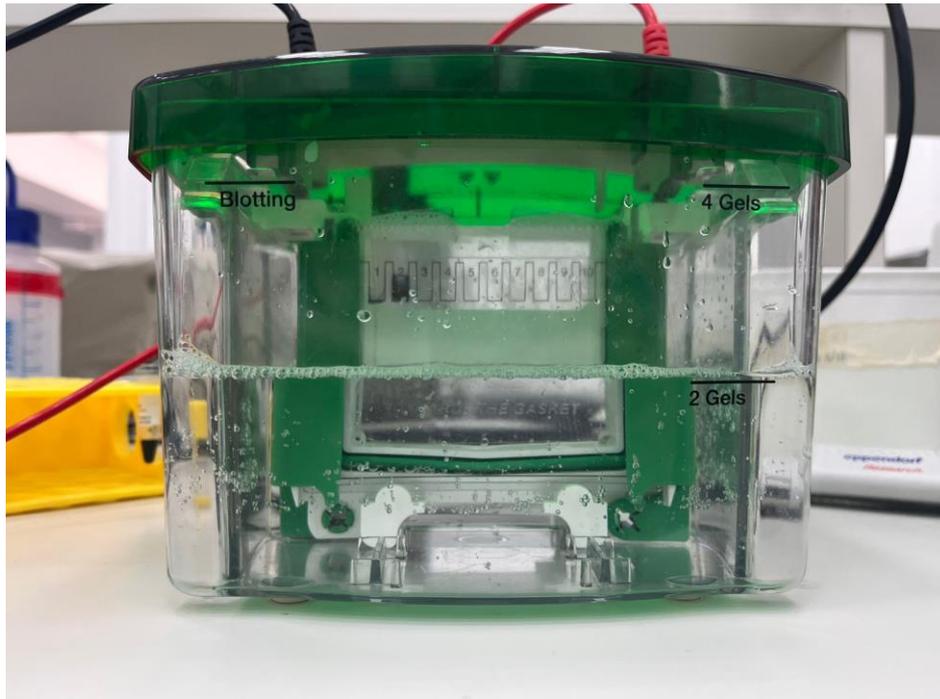
Para visualizar os resultados, foi necessário corar o gel por prata, uma técnica utilizada quando há um número relativamente baixo de proteínas na amostra, o que foi observado através da quantificação por BCA, supracitada.

Ao final, foi possível observar uma faixa de proteínas isoladas, como é possível visualizar na figura 13. No entanto, devido ao tamanho em relação ao padrão adicionado, acredita-se que o visualizado é a albumina de coelho, pois estava em maior quantidade do que a quitinase dos carrapatos e seu tamanho (68 kDa) é compatível com esta proteína, de acordo com o sistema Uniprot (uniprot.org).

Materiais necessários:

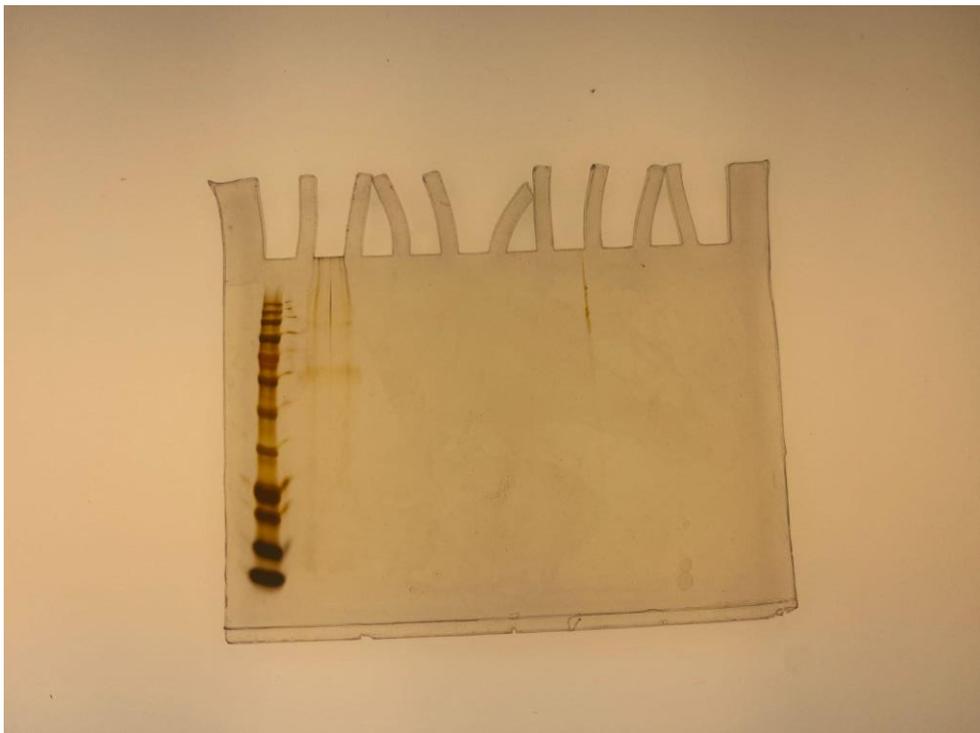
- Gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN TGX Gels)
- Cubo vertical de eletroforese
- Marcador (True Color High Range Protein Marker (10-245 kDa) - Sinapse Biotecnológica)
- Pipetas automáticas
- Tampão de corrida
- Tampão de amostra
- *Pool* de proteínas

Figura 12 - Cuba vertical de eletroforese com gel e tampão



Fonte: Da autora (2023).

Figura 13 - Gel de eletroforese



Fonte: Da autora (2023).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período de estágio curricular obrigatório no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan permitiu o desenvolvimento de capacidade para execução e desenvolvimento de protocolos, leitura de artigos científicos, aprendizado em diferentes áreas da bioquímica, principalmente da separação e avaliação de enzimas. A experiência foi essencial para consolidar a vontade de ter uma carreira que envolva rotina laboratorial e pesquisa.

Ao estagiar em um ambiente que não se relaciona diretamente com a Medicina Veterinária, foi possível visualizar diferentes maneiras de introduzir o aprendizado durante os 5 anos de curso em outra área, a da bioquímica e parasitologia. Ao longo da graduação, sempre houve interesse pelo conceito da Saúde Única e maneiras de aplicar esta abordagem em cada componente curricular; e no estágio obrigatório não foi diferente. Ao estudar um parasita que causa riscos à saúde de humanos e animais foi possível verificar claramente a abrangência da Saúde Única no contexto da pesquisa realizada neste trabalho. No mais, conclui-se que o protocolo criado para extração, avaliação e caracterização de quitinase de *Ambyomma sculptum* foi eficiente e pode ser replicada em estudos futuros com este ou outro carrapato. Este período de estágio foi imprescindível para que fossem conhecidas técnicas antes não exploradas na graduação, como cromatografia, avaliação de atividade enzimática, quantificação de proteínas, preparo de tampões e soluções e liofilização.

REFERÊNCIAS

- APWEILER, R. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 90001, p. 115D119, 1 jan. 2004.
- ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n. 2, p. 201–216, 9 out. 2009.
- BITENCOURTH, K. et al. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 31, n. 4, p. 427–437, 28 jul. 2017.
- DE LIMA, P. H. C. et al. Sequencing and comparative analysis of the *Amblyomma sculptum* mitogenome. *Veterinary Parasitology*, v. 247, p. 121–128, 30 nov. 2017.
- DE PAULA, L. G. F. et al. Seasonal dynamics of *Amblyomma sculptum*: a review. *Parasites & Vectors*, v. 15, n. 1, 6 jun. 2022.
- DI ROSA, M. et al. Chitinases and immunity: Ancestral molecules with new functions. *Immunobiology*, v. 221, n. 3, p. 399–411, mar. 2016.
- ESTEVEZ, E. et al. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, v. 214, n. 3-4, p. 322–326, 1 dez. 2015.
- JUAN, P. et al. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south–eastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 103, n. 1, p. 57–72, 1 jan. 2009.
- KARINA CARRÃO CASTAGNOLLI et al. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, v. 117, n. 4, p. 271–283, 1 nov. 2003.
- LEE, C. G. et al. Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury. *Annual Review of Physiology*, v. 73, n. 1, p. 479–501, 17 mar. 2011.
- MARTINS et al. The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsii* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, 28 abr. 2017.
- MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo B. *Bioquímica Básica*. [Rio de Janeiro, RJ]: Grupo GEN, 2015. E-book. ISBN 978-85-277-2782-2. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2782-2/>. Acesso em: 08 nov. 2023.

MORETI, R.; PERRELLA, N. N.; ADRIANA RIOS LOPES. Carbohydrate digestion in ticks and a digestive α -l-fucosidase. *Journal of Insect Physiology*, v. 59, n. 10, p. 1069–1075, 1 out. 2013.

NASSER, H. et al. A deep insight into the whole transcriptome of midguts, ovaries and salivary glands of the *Amblyomma sculptum* tick. *Parasitology International*, v. 66, n. 2, p. 64–73, 1 abr. 2017.

OCHOA, J.-L. . Hydrophobic (interaction) chromatography. *Biochimie*, v. 60, n. 1, p. 1–15, mar. 1978.

PATEL, S.; GOYAL, A. Chitin and chitinase: Role in pathogenicity, allergenicity and health. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 97, p. 331–338, abr. 2017.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A. et al. Clinical and serological evaluation of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) successively exposed to an *Amblyomma sculptum*-derived strain of *Rickettsia rickettsii*. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 22 jan. 2020.

SIMPSON, R. J. SDS-PAGE of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2006, n. 1, p. pdb.prot4313, jun. 2006.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences*, v. 15, n. 1, p. 30–38, 3 dez. 2014.

SONG, M. et al. Prediction of Protein Retention Times in Anion-Exchange Chromatography Systems Using Support Vector Regression. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 42, n. 6, p. 1347–1357, 15 out. 2002.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.

TULLY, B. G.; HUNTLEY, J. F. A *Francisella tularensis* Chitinase Contributes to Bacterial Persistence and Replication in Two Major U.S. Tick Vectors. *Pathogens*, v. 9, n. 12, p. 1037, 10 dez. 2020.

WANG, Y.-J. et al. Structural Insight Into Chitin Degradation and Thermostability of a Novel Endochitinase From the Glycoside Hydrolase Family 18. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 30 out. 2019.

YOU, M. et al. Identification and Molecular Characterization of a Chitinase from the Hard Tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 10, p. 8556–8563, mar. 2003.