



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



PALOMA TAVARES MACEDO

**ESTUDO ESTRUTURAL E MOLECULAR DE
EXOGLUCANASES DE *Moniliophthora perniciosa*
(STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA**

Feira de Santana, BA
2025

PALOMA TAVARES MACEDO

**ESTUDO ESTRUTURAL E MOLECULAR DE
EXOGLUCANASES DE *Moniliophthora perniciosa*
(STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Guimarães Benevides

Feira de Santana, BA
2025

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

M123e

Macedo, Paloma Tavares

Estudo estrutural e molecular de exoglucanases de *Moniliophthora*
perniciosa (Stahel) Aime & Phillips-Mora / Paloma Tavares Macedo. – 2025.
94 f.: il.

Orientadora: Raquel Guimarães Benevides

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2025.

1. Biotecnologia. 2. Enzimas celulolíticas. 3. Modelagem comparativa.
4. Bioprocessos industriais sustentáveis. 5. Cana-de-açúcar. I. Benevides,
Raquel Guimarães, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana.
III. Título.

CDU 577.15

Daniela Machado Sampaio Costa - Bibliotecária - CRB-5/2077

PALOMA TAVARES MACEDO

**Detecção da expressão gênica e caracterização in silico de
exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME
& Phillips-Mora.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Feira de Santana, Bahia, 30 de setembro de 2025

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL GUIMARAES BENEVIDES**
Data: 03/10/2025 12:20:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof^a. Dr^a. **Raquel Guimarães Benevides**
Universidade Federal do Ceará

Documento assinado digitalmente
 **EDDY JOSE FRANCISCO DE OLIVEIRA**
Data: 06/10/2025 15:52:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof. Dr. **Eddy José Francisco Oliveira**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **ROGERIO MERCES FERREIRA SANTOS**
Data: 06/10/2025 15:09:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Rogério Mercês Ferreira Santos**
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

AGRADECIMENTOS

Se cheguei até aqui, foi porque não caminhei sozinha. A força que me sustentou em cada etapa veio de Deus, a quem devo a fé e a esperança nos momentos mais desafiadores.

À minha família, que é a minha base, expresso minha gratidão. À minha mãe, Aidê, exemplo de coragem e inspiração, agradeço por cada gesto de amor e incentivo. Ao meu pai, Silvestre, devo as lições de resiliência e determinação. Aos meus avós, Iolanda e Vital, sou grata pelos valores que permanecem como guia da minha vida. Ao meu irmão Fellipe, que me ensinou a importância da serenidade, e à família Tavares, que sempre me mostrou a força da coletividade, meu carinho e reconhecimento.

Ao meu companheiro, Luiz Eduardo, agradeço pela parceria, paciência e pela leveza que trouxe aos dias mais intensos desta caminhada.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, que me acolheu e foi cenário de tantas vivências que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, deixo minha gratidão.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), pelo apoio, pelos aprendizados compartilhados e pela oportunidade de amadurecimento científico, deixo meu reconhecimento. À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Raquel Guimarães Benevides, agradeço pelo suporte e pela confiança depositada neste trabalho.

Às amigas que tornaram o percurso mais leve e cheio de significado, minha sincera gratidão pela companhia, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Por fim, agradeço à CAPES pelo apoio, por meio da concessão da bolsa de estudos e à banca examinadora por aceitar o convite, pela leitura atenta e pelas contribuições valiosas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar, resíduo lignocelulósico gerado nas indústrias sucroalcooleiras, é constituído por polissacarídeos passíveis de conversão em glicose de interesse industrial por meio da ação de celulasas. O *Moniliophthora perniciosa*, agente causador da fitopatologia “vassoura-de-bruxa”, apresenta potencial para a síntese dessas biomoléculas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* por meio de análises *in silico* e estruturais, bem como verificar a expressão dos genes codificadores dessas enzimas, avaliando o seu potencial biotecnológico. Desse modo, o estudo foi conduzido com a identificação e caracterização *in silico* de exoglucanases, cujas estruturas tridimensionais foram preditas por modelagem comparativa. Na sequência, foram realizadas as análises moleculares. Inicialmente, foram projetados iniciadores específicos para os genes codificadores das proteínas em estudo. Em seguida, o RNA de melhor qualidade, extraído do meio contendo material lignocelulósico, foi utilizado para a síntese do cDNA, posteriormente amplificado, e o produto de PCR obtido foi purificado. As sequências analisadas foram identificadas como pertencentes à família GH6, apresentando regiões conservadas típicas do grupo. Os modelos tridimensionais gerados apresentaram alta qualidade estrutural, com preservação das regiões funcionais essenciais, evidenciando o potencial biotecnológico dessas enzimas. As condições de cultivo do fungo em meio lignocelulósico mostraram-se favoráveis à indução da expressão de celulasas, sendo detectada a expressão do gene correspondente à exoglucanase. Esses resultados indicam que a sequência obtida do cDNA constitui uma candidata promissora para expressão heteróloga, purificação e caracterização, reforçando o potencial de celulasas de *Moniliophthora perniciosa* na otimização de bioprocessos industriais sustentáveis.

Palavras-chave: Basidiomiceto; Celulase; GH6; Modelagem comparativa; Aplicação biotecnológica.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse, a lignocellulosic residue generated in sugar-ethanol industries, is composed of polysaccharides that can be converted into glucose of industrial interest through the action of cellulases. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the plant disease “witch’s broom,” shows potential for synthesizing these biomolecules. This study aimed to characterize *M. perniciosa* exoglucanases through in silico and structural analyses, as well as to evaluate the expression of the genes encoding these enzymes, assessing their biotechnological potential. Accordingly, the study involved the identification and in silico characterization of exoglucanases, whose three-dimensional structures were predicted by comparative modeling. Subsequently, molecular analyses were performed. Specific primers were initially designed for the genes encoding the proteins under investigation. Next, high-quality RNA extracted from the medium containing lignocellulosic material was used for cDNA synthesis, which was later amplified, and the resulting PCR product was purified. The analyzed sequences were identified as belonging to the GH6 family, displaying conserved regions typical of the group. The generated three-dimensional models showed high structural quality, with preservation of essential functional regions, highlighting the biotechnological potential of these enzymes. The fungal cultivation conditions in lignocellulosic medium proved favorable for the induction of cellulase expression, and expression of the gene corresponding to the exoglucanase was detected. These results indicate that the cDNA sequence obtained constitutes a promising candidate for heterologous expression, purification, and characterization, reinforcing the potential of *Moniliophthora perniciosa* cellulases in optimizing sustainable industrial bioprocesses.

Keywords: Basidiomycete; Cellulase; GH6; Comparative modeling; Biotechnological application.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO GERAL	13
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	14
3.1.1	PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO	17
3.1.2	PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO	17
3.1.3	PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO	17
3.2	AS ENZIMAS CELULOLÍTICAS	18
3.2.1	ENDOGLUCANASES	19
3.2.2	EXOGLUCANASES	20
3.2.3	B-GLICOSIDASES	21
3.3	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES	22
3.4	ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES	24
3.4.1	O <i>MONILIOPHTHORA PERNICIOSA</i>	25
3.4.2	INTERAÇÃO PATÓGENO X HOSPEDEIRO	26
3.5	PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS	28
3.6	UTILIZAÇÃO DA BIOINFORMÁTICA PARA O ESTUDO DE PROTEÍNAS	30
3.6.1	MODELAGEM COMPARATIVA POR HOMOLOGIA	31

4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	BIOINFORMÁTICA	33
4.1.1	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOGLUCANASES NO GENOMA DE <i>MONILIOPHTHORA PERNICIOSA</i>	33
4.1.2	ALINHAMENTOS ENTRE AS SEQUÊNCIAS ALVO E OUTRAS SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS	34
4.1.2.1	SELEÇÃO DA PROTEÍNA MOLDE PARA MODELAGEM COMPARATIVA	35
4.1.2.2	CONSTRUÇÃO DO MODELO 3D	35
4.1.2.3	VALIDAÇÃO	35
4.2	REATIVAÇÃO DO FUNGO	36
4.3	CULTIVO DO FUNGO	36
4.4	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	36
4.5	DESENHO DE INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) PARA O GENE DA PROTEÍNA EM ESTUDO	38
4.6	SÍNTESE DE CDNA E AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	38
4.7	PURIFICAÇÃO	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	BIOINFORMÁTICA	43
5.1.1	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CELOBIOHIDROLASES (EXOGLUCANASES) NO GENOMA DE <i>MONILIOPHTHORA PERNICIOSA</i>	43

5.1.2	ALINHAMENTOS ENTRE AS SEQUÊNCIAS ALVO E OUTRAS SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS	49
5.1.3	MODELAGEM COMPARATIVA	51
5.1.3.1	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MOLDES	51
5.1.3.2	CONSTRUÇÃO DOS MODELOS 3D	55
5.1.3.3	VALIDAÇÃO DOS MODELOS 3D	55
5.2	REATIVAÇÃO DO FUNGO	62
5.3	CULTIVO DO FUNGO NOS MEIOS INDUTORES WY E CMC	62
5.4	EXTRAÇÃO DE RNA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	64
5.5	DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	66
5.6	SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA DE <i>MONILIOPHTHORA PERNICIOSA</i>	68
5.7	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR	71
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade, a organização e o desenvolvimento das civilizações estiveram dependentes da evolução da geração de energia. Nas sociedades modernas, o aumento da demanda energética representa, sobretudo, a crescente utilização dos combustíveis fósseis para a geração de energia e, entre eles, têm-se o gás natural, o carvão mineral, o petróleo e os seus subprodutos que compõe o modelo energético mundial vigente – baseado em recursos finitos e que – por essa razão, não conseguirão sustentar o aumento progressivo do consumo de energia. Além disso, o agravamento dos problemas ambientais é intensificado à medida que há aumento na concentração de gases poluentes dispersos na atmosfera em função da queima destes combustíveis (Robak; Balcerek, 2018).

Diante deste cenário, a diversificação da matriz energética torna-se uma estratégia essencial para mitigar os impactos ambientais sem comprometer o crescimento econômico. Nesse contexto, os resíduos lignocelulósicos, a exemplo do bagaço da cana-de-açúcar, têm se destacado como matérias-primas promissoras para a produção de biocombustíveis. Esses resíduos são constituídos pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e lignina, e apresentam viabilidade no que concerne à geração de energia a partir da conversão da matéria orgânica em açúcares fermentescíveis, resultando na produção de bioetanol de segunda geração (Robak; Balcerek, 2018).

No entanto, é sabido que a etapa de hidrólise enzimática da celulose a partir de sistemas convencionais apresenta limitações operacionais e econômicas devido à complexidade estrutural deste polissacarídeo e aos altos custos das enzimas comerciais. Nesse sentido, uma alternativa que garante a otimização da etapa de hidrólise da celulose consiste na manipulação de microrganismos capazes de sintetizar moléculas bioativas de interesse industrial (Robak; Balcerek, 2018).

No que concerne aos microrganismos produtores de celulasas, têm-se bactérias anaeróbicas, a exemplo do gênero *Clostridium*, bactérias aeróbicas do gênero *Cellulomonas*, além de actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Hirano et al., 2016; Ventrino et al., 2016; Broda; Yelle; Serwanska, 2022). No caso dos fungos

filamentosos, as espécies pertencentes ao filo *Ascomycota* e *Basidiomycota*, sobretudo as fitopatogênicas, merecem destaque porque o mecanismo de infecção vegetal está associado à secreção de um amplo arsenal de enzimas hidrolíticas (Florencio; Badino; Farinas, 2017).

Dentre esses microrganismos, destaca-se o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da “vassoura-de-bruxa”, fitopatologia que ainda afeta a produção de cacau no Brasil, embora tenha causado maiores prejuízos às lavouras no sul da Bahia, durante a década de 90, o que resultou em implicações econômicas e sociais significativas, gerando o enfraquecimento da economia local, êxodo rural e desemprego (Santos et al., 2023).

Ainda que devastador do ponto de vista agrícola, esse fungo apresenta potencialidade quanto à produção de hidrolases denominadas celulasas e que atuam degradando os constituintes da parede celular do vegetal, disponibilizando moléculas de glicose destinadas à produção de bioetanol de segunda geração (Almeida; Ribeiro; Assis, 2021).

Em função do potencial biotecnológico dessas enzimas, destaca-se a possibilidade de produzi-las a partir de sistemas de expressão heterólogo, utilizando-se células de *Escherichia coli* – que representa um eficiente mecanismo de expressão de enzimas estáveis – além de conferir vantagens quanto à necessidade de substratos de baixo custo e genoma bem caracterizado, o que viabiliza a manipulação genética e a obtenção de grandes quantidades da enzima recombinante de interesse, facilitando a sua purificação e caracterização funcional, bem como amplia as expectativas futuras no que concerne ao processamento de biocombustíveis (Vázquez-Ortega et al., 2022).

Apesar dos avanços da biologia molecular contribuírem com o desenvolvimento de trabalhos que abordam aspectos genômicos relevantes de *Moniliophthora perniciosa*, ainda há uma escassez de estudos que explorem seu potencial biotecnológico para além do contexto fitopatológico, principalmente no que concerne às exoglucanases com possível aplicabilidade biotecnológica. Nesse sentido, este trabalho propõe uma abordagem integrativa ao associar as ferramentas de biologia

molecular e bioinformática, visando a pré-seleção de uma exoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* com maior eficiência biotecnológica (Santana et al., 2023).

A facilidade ao acesso aos bancos de dados *online* tem possibilitado a obtenção de sequências genômicas e proteômicas de uma ampla variedade de fungos filamentosos, incluindo espécies filogeneticamente relacionadas ao *Moniliophthora perniciosa*. Os estudos *in silico* permitem a identificação de domínios catalíticos conservados, análises de propriedades físico-químicas, bem como a obtenção de estrutura tridimensional de proteínas e análise funcional preditiva (Santana et al., 2020).

Dentre as ferramentas computacionais, a modelagem estrutural por homologia, também conhecida como modelagem comparativa, se destaca como uma abordagem robusta para a predição de modelos tridimensionais de proteínas a partir de estruturas primárias que apresentam estrutura tridimensional resolvida experimentalmente. No contexto deste estudo, a geração de modelos estruturais de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* pode viabilizar o entendimento acerca dos aspectos funcionais da enzima e possíveis mecanismos envolvidos na interação com substratos lignocelulósicos, obtendo-se, de forma mais precisa, sequências mais promissoras a serem produzidas em sistemas de expressão heteróloga (Santana et al., 2020).

Portanto, considerando-se os aspectos apresentados, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização *in silico* de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa*, incluindo a predição de suas estruturas tridimensionais por modelagem comparativa, bem como identificar molecularmente essas enzimas por meio da extração de RNA e da confirmação de sua expressão via análise de DNA complementar (cDNA).

Desse modo, ao integrar a predição estrutural às análises moleculares, este trabalho pretende evidenciar o potencial biotecnológico de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa*, contribuindo para sua futura aplicação em contextos industriais e sustentáveis, como a bioconversão de resíduos agroindustriais e a geração de produtos de alto valor agregado.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* em nível estrutural e molecular, por meio de análises *in silico* e verificação da expressão gênica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar e caracterizar *in silico* exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa*;
- b) Determinar e analisar as estruturas tridimensionais teóricas das exoglucanases de interesse;
- c) Reativar o fungo *Moniliophthora perniciosa* em meio BDA;
- d) Cultivar o *Moniliophthora perniciosa* nos diferentes meios indutores WY e CMC;
- e) Extrair o RNA do micélio em meios de cultura constituído de material lignocelulósico e em meio sintético;
- f) Desenhar os iniciadores específicos correspondentes às sequências codificantes da proteína em estudo;
- g) Sintetizar o cDNA a partir do RNA extraído em meio WY;
- h) Amplificar a sequência codificante do cDNA de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* por técnica de PCR;
- i) Purificar o produto de PCR obtido a partir do cDNA.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica constitui a matéria seca de origem vegetal presente em grande parte da superfície terrestre, sendo, portanto, uma fonte renovável abundante e rica em polissacarídeos fermentáveis, como a celulose e a hemicelulose, configurando-se uma alternativa promissora para a produção de bioetanol de segunda geração (Devi et al., 2022).

Quanto à classificação dos recursos lignocelulósicos disponíveis, pode-se destacar três principais categorias, sendo elas: a biomassa virgem, representada pelas plantas herbáceas, arbustos, árvores e espécies aquáticas; as culturas energéticas, caracterizadas por plantas com capacidade de gerar grande volume de biomassa, a exemplo de *Cenchrus purpureus*, espécie popularmente conhecida como capim-elefante; e a biomassa residual que engloba os resíduos provenientes da indústria agrícola e da atividade florestal, o que compreende as palhas, as cascas e as fibras (Broda; Yelle; Serwanska, 2022; Devi et al., 2022).

Devido à sua complexa composição química, a biomassa residual tem ganhado destaque como precursora de produtos de alto valor agregado, especialmente no contexto da bioeconomia circular. Desse modo, a crescente preocupação ambiental e a busca por fontes renováveis impulsionam o interesse na valorização desses resíduos que, anteriormente, eram direcionados para o descarte ou até mesmo subutilizados (Broda; Yelle; Serwanska, 2022; Devi et al., 2022).

Os principais constituintes estruturais da biomassa lignocelulósica são a celulose, a hemicelulose e a lignina, polissacarídeos complexos quem compõem a parede celular vegetal, conforme indica a Figura 1 (Catelan; Pinotti, 2019).

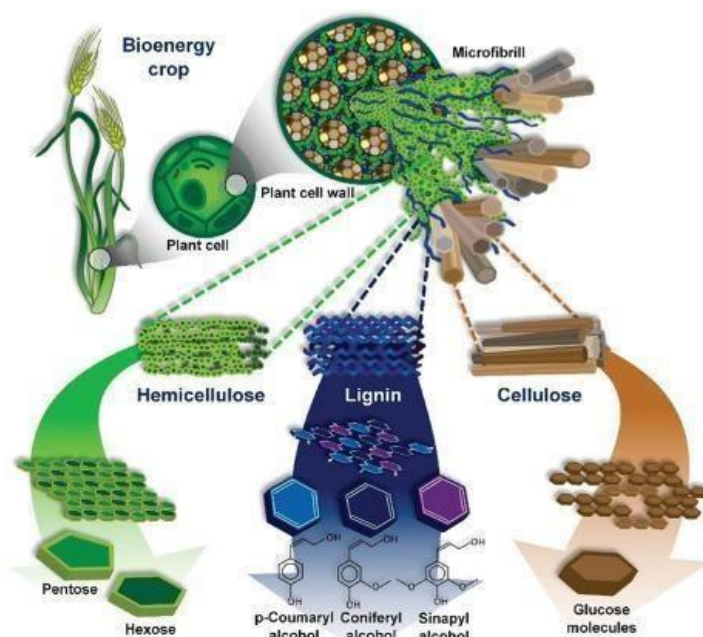


Figura 1: Representação da Constituição da parede celular vegetal.

Fonte: IMLIMTHAN et al., 2017.

A proporção desses polissacarídeos varia de acordo com a espécie vegetal, as condições do clima e do solo e o estágio de desenvolvimento da planta no momento da colheita, o que acaba influenciando diretamente nos mecanismos de processamento e aproveitamento biotecnológico da biomassa (Catelan; Pinotti, 2019).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante encontrado na parede celular dos vegetais e sua proporção na biomassa lignocelulósica seca varia entre 30% e 50%. Além disso, por constituir a maior fonte de biomassa renovável disponível no planeta, é um recurso que exhibe potencialidade quanto à geração de energia (Broda; Yelle; Serwanska, 2022).

Independentemente da fonte vegetal, a celulose é um polímero linear de alta cristalinidade e elevado peso molecular, sendo responsável pela rigidez e resistência da parede celular da planta. É formada por monômeros do dissacarídeo celobiose que, por sua vez, resulta da união de duas moléculas de β -D-glicose por meio de ligações β -1,4-glicosídicas. Devido à presença de grupos hidroxila (OH^-), há a formação de uma densa rede de ligações de hidrogênio dentro da própria cadeia e entre diferentes cadeias, o que resulta na formação de regiões cristalinas organizadas, alternadas por áreas amorfas menos estruturadas, conforme indica a Figura 2 (Broda; Yelle; Serwanska, 2022; Devi et al., 2022).

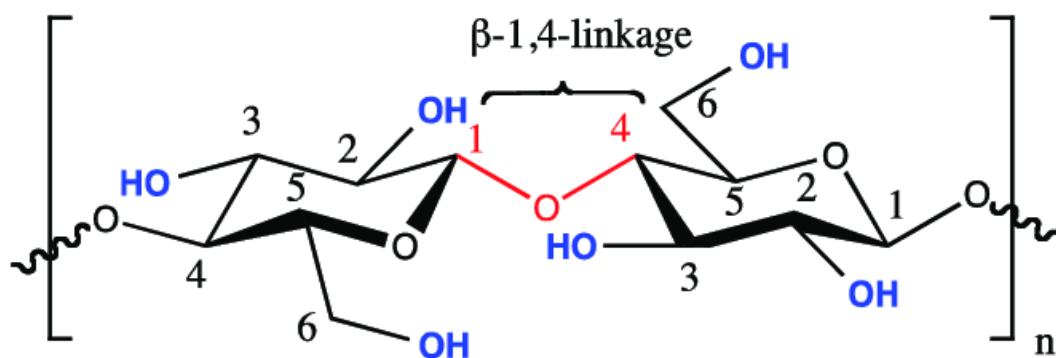


Figura 2: Representação de uma cadeia de celulose com destaque para duas moléculas de glicose unidas por ligação β -1,4-glicosídica.

Fonte: HEMRAZ; SANASEE, 2018.

A hemicelulose, que corresponde a aproximadamente 15% a 30% da massa seca da biomassa lignocelulósica, apresenta peso molecular intermediário e é formada por heteropolissacarídeos de cadeias curtas e ramificadas. Devido ao arranjo das cadeias, apresenta estrutura predominantemente amorfa. Na parede celular do vegetal, as hemiceluloses formam uma rede entrelaçada com as microfibrilas de celulose, conectando-se a elas por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, conferindo maior resistência e estabilidade à parede celular (Broda; Yelle; Serwanska, 2022; Devi et al., 2022).

A lignina é um polímero amorfo de estrutura tridimensional, altamente ramificada e reticulada, que representa aproximadamente 15% a 30% da massa seca de biomassa lignocelulósica. Sua complexidade estrutural confere rigidez à parede celular vegetal, desempenhando um papel essencial na proteção contra a ação de microrganismos e na resistência à degradação enzimática (Broda; Yelle; Serwanska, 2022).

No Brasil, a produção de cana-de-açúcar é um exemplo emblemático do potencial de valorização da biomassa lignocelulósica. A utilização integrada desse resíduo não apenas agrega valor ao setor sucroenergético, mas também contribui para a diversificação da matriz energética e a mitigação de impactos ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis (Rodrigues et al., 2017).

No entanto, em função da estrutura altamente recalcitrante da biomassa lignocelulósica, resultante do alto grau de empacotamento e cristalização da celulose, bem como a associação físico-química entre a lignina e a hemicelulose, esse

complexo estrutural constitui uma barreira significativa à ação enzimática. A fim de superar essa limitação, são necessários pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos que promovam a desorganização das cadeias poliméricas, facilitando a liberação de açúcares fermentescíveis essenciais à produção de bioetanol de segunda geração (Awogbemi; Kallon, 2022).

3.1.1 Pré-tratamento físico

Os pré-tratamentos físicos aplicados à biomassa lignocelulósica têm como objetivo modificar a sua estrutura altamente recalcitrante através de métodos mecânicos, térmicos ou eletromagnéticos a fim de aumentar a área de superfície e a acessibilidade das enzimas aos polissacarídeos estruturais. Técnicas como moagem, extrusão e sonicação, por exemplo, têm se mostrado eficazes na desestruturação parcial da biomassa, embora estejam associados a um elevado consumo energético (Awogbemi; Kallon, 2022; Broda; Yelle; Serwanska, 2022).

3.1.2 Pré-tratamento químico

Métodos químicos utilizando ácidos ou compostos alcalinos são frequentemente utilizados para romper a estrutura da biomassa lignocelulósica. Apesar da eficiência quanto à remoção parcial da lignina e exposição das fibras de celulose, esses processos demandam alta energia, utilizam reagentes agressivos e podem gerar subprodutos tóxicos que dificultam a fermentação. Isso eleva os custos e podem ocasionar riscos ambientais. Por tais razões, métodos mais sustentáveis, como o tratamento biológico com enzimas, têm ganhado destaque (Awogbemi; Kallon, 2022; Broda; Yelle; Serwanska, 2022).

3.1.3 Pré-tratamento biológico

Esse tipo de pré-tratamento baseia-se na ação de microrganismos especializados, a exemplo de algumas espécies de fungos e bactérias, ou ainda, nas enzimas que eles produzem, capazes de degradar os componentes estruturais da

biomassa. A eficiência desse tipo de pré-tratamento depende de fatores como a escolha do microrganismo, o tamanho das partículas da biomassa e as condições do ambiente. Dentre as vantagens observáveis, pode-se destacar o baixo consumo energético, a não utilização de reagentes químicos agressivos, menor geração de compostos inibitórios e a sustentabilidade do processo. Por outro lado, a lentidão da degradação e a necessidade de monitoramento constante são fatores limitantes. Ainda assim, o interesse nesse método cresce, especialmente devido à ação de enzimas microbianas específicas, como as celulasas (Awogbemi; Kallon, 2022; Broda; Yelle; Serwanska, 2022).

3.2 AS ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Após o pré-tratamento, a biomassa lignocelulósica é submetida à etapa de hidrólise com o objetivo de liberar açúcares fermentescíveis, como pentoses, a exemplo da xilose e arabinose, além de hexoses, como a glicose e a manose. Dentre esses monossacarídeos, a glicose se destaca como o mais relevante do ponto de vista industrial por ser o principal produto da degradação da celulose. Além disso, a sua conversão em etanol ocorre de forma mais direta e com maior rendimento, tornando-a o alvo preferencial nos processos biotecnológicos de produção de biocombustíveis (Broda; Yelle; Serwanska, 2022).

Embora a hidrólise possa ser promovida por agentes químicos, como ácidos e bases, o uso de enzimas produzidas por microrganismos tem se destacado por ser uma alternativa mais eficiente e ambientalmente sustentável nos processos de conversão da biomassa lignocelulósica (Awogbemi; Kallon, 2022). Nesse contexto, as celulasas desempenham um papel fundamental, atuando como catalisadores biológicos responsáveis pela degradação da celulose em açúcares fermentescíveis, representando uma etapa crítica no processo de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração (Solís, 2016; Broda; Yelle; Serwanska, 2022).

As celulasas constituem um grupo de enzimas hidrolíticas pertencentes à classe das glicosil hidrolases (GHs - EC 3.2.1.x), cuja principal função é catalisar a

quebra das ligações β -1,4-glicosídicas presentes na estrutura da celulose, originando produtos como glicose, celobiose e celooligossacarídeos. Essas enzimas são classificadas como CAZimas (enzimas que atuam sobre carboidratos), apresentando domínios específicos capazes de reconhecer, modificar e romper ligações glicosídicas em substratos polissacarídicos (Soni; Sharma; Soni, 2018).

A conversão total da celulose em monômeros de glicose depende da atuação conjunta e coordenada de diferentes classes de celulasas, cuja sinergia é fundamental para a eficiência do processo de hidrólise. Produzidas por microrganismos, essas enzimas são classificadas conforme a sua atuação no substrato (Figura 3), a exemplo das endoglucanases (endo 1,4- β -glucanase EC 3.2.1.4) que atuam na clivagem das ligações internas da celulose; as exoglucanases ou celobiohidrolases (exo-1,4- β -D-glucanase, CBH, EC 3.2.1.91), responsáveis por clivar as regiões externas e as β -glicosidases (1,4- β -D-glucosidase, BG, EC 3.2.1.21), que atuam promovendo a hidrólise de celobiose em moléculas de glicose (Soni; Sharma; Soni, 2018).

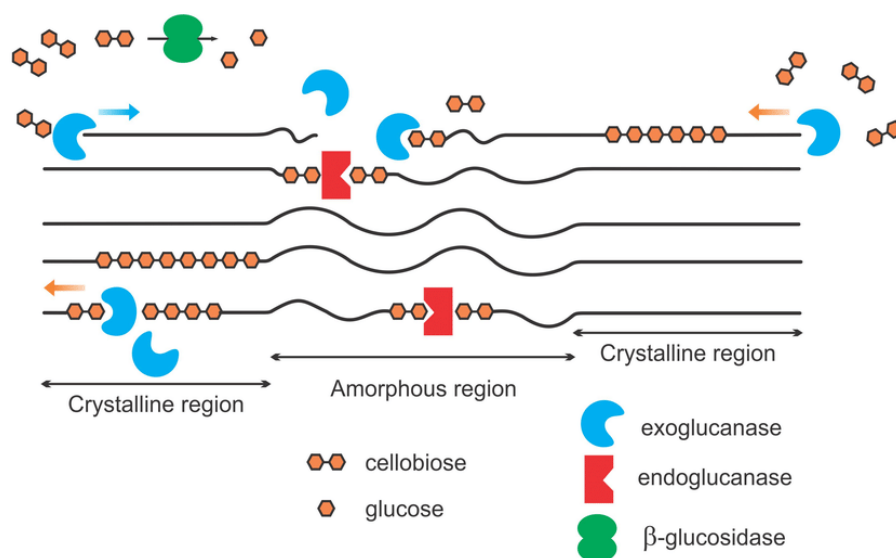


Figura 3: Representação do mecanismo de ação das celulasas na fibra celulósica.

Fonte: AKHTAR, 2016.

3.2.1 Endoglucanases

As endoglucanases iniciam a clivagem das ligações β -1,4-glicosídicas presentes nas regiões internas e desorganizadas da cadeia polimérica. Esse

mecanismo reduz o grau de polimerização do substrato, gerando oligossacarídeos como produtos intermediários (Nargotra et al., 2023).

Essas enzimas são produzidas por uma variedade de organismos, incluindo bactérias aeróbicas e anaeróbicas, arqueas, protozoários e fungos. Para fins industriais, no entanto, as linhagens fúngicas, especialmente dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* constituem as principais fontes para a produção em larga escala (Nargotra et al., 2023).

3.2.2 Exoglucanases

As exoglucanases, também chamadas de celobiohidrolases (CBHs), são amplamente produzidas por fungos e bactérias e desempenham papel fundamental na degradação da celulose, catalisando principalmente a liberação de celobiose a partir das extremidades da cadeia celulósica. Os dois principais tipos, CBHI e CBHII, compõem as famílias GH7 (EC 3.2.1.176) e GH6 (EC 3.2.1.91), nessa ordem, e atuam respectivamente nas extremidades redutoras e não redutoras do polímero (Machado, 2019).

Em termos de organização estrutural, algumas exoglucanases podem ser classificadas como proteínas bimodulares, pois são constituídas por dois domínios funcionais e estruturais distintos: o domínio de ligação ao carboidrato (CBM) e o domínio catalítico (CD), que encontram-se conectados por uma região interligadora, denominada *linker* (Figura 4), cuja função principal é preservar a independência estrutural e funcional de cada domínio (Colussi, 2012).

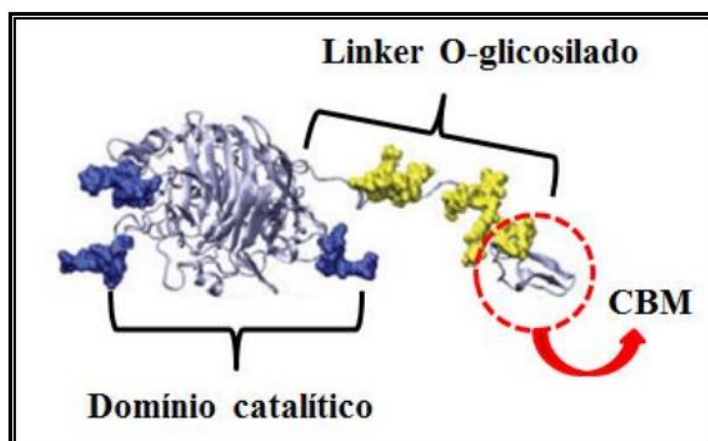


Figura 4: - Representação de celobiohidrolase CBH1, demonstrando o domínio catalítico conectado ao domínio de ligação a carboidratos, através do linker.

Fonte: BECKHAM et al., 2010.

O domínio catalítico das exoglucanases possui uma estrutura em forma de túnel, embora existam diferenças específicas entre as regiões catalíticas das enzimas CBI e CBII. Uma característica fundamental dessas enzimas é sua capacidade de agir processivamente (Figura 5), ou seja, de se prender a uma única cadeia de celulose e promover a liberação contínua de moléculas de celobiose. A catálise ocorre dentro desse túnel fechado, que mantém a cadeia de celulose destacada da superfície cristalina, permitindo que a enzima realize múltiplas reações consecutivas sem que a cadeia retorne à sua forma original cristalina (Colussi, 2012).

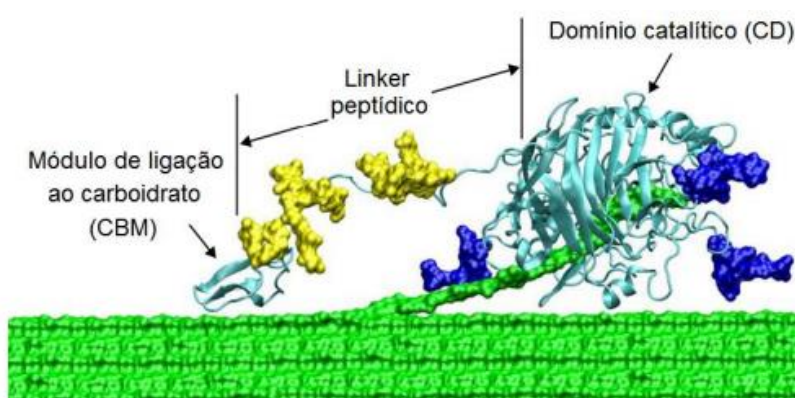


Figura 5: - Representação do mecanismo de ação de celobiohidrolases.

Fonte: TAYLOR et al., 2012.

3.2.3 β -glicosidases

As β -glicosidases desempenham um papel crucial na etapa final da degradação da celulose, catalisando a conversão da celobiose em unidades de D-glicose. Sua presença em níveis adequados é essencial para a manutenção da eficiência do processo de hidrólise, pois impede o acúmulo de celobiose – um intermediário que, em altas concentrações, pode causar inibição enzimática e desencadear a repressão catabólica, comprometendo a atividade de outras enzimas do complexo celulolítico (Baseri; Chakrabort; Charma, 2024).

3.3 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES

A versatilidade funcional das celulasas, aliada à busca por soluções mais sustentáveis e eficientes, impulsionam pesquisas voltadas ao aprimoramento da sua atividade enzimática, estabilidade e custo-benefício em condições industriais. Devido à sua ampla aplicação em segmentos como o têxtil, de detergentes, de rações, de alimentos, de papel e celulose e biorrefinarias, essas enzimas ocupam atualmente uma posição de destaque no mercado global (Ejaz; Sohail; Ghanemi, 2021).

A indústria têxtil é uma das maiores beneficiadas pelas aplicações comerciais de celulasas, que são amplamente utilizadas no tratamento do jeans, no biopolimento e na melhoria do acabamento dos tecidos. Já no setor de detergentes domésticos, as celulasas atuam em conjunto com outras enzimas, sendo que esse mercado representa cerca de 20% a 30% do consumo de enzimas industriais. Para que sejam eficazes nesse contexto, as celulasas precisam apresentar estabilidade térmica, resistência a pH alcalino e compatibilidade com os demais componentes químicos do detergente (Ikbal et al., 2024).

Na área da nutrição animal, as celulasas são empregadas no pré-tratamento de rações à base de grãos e na silagem. Desta maneira, estas enzimas atuam na quebra de componentes de difícil digestão ou com ação antinutricional, contribuindo com uma maior eficiência na absorção de nutrientes e, portanto, promovendo melhorias na saúde intestinal dos animais (Asmare, 2014).

Diante dos desafios impostos pelas mudanças climáticas, pela urbanização crescente e pelo aumento da população mundial, a produção e o processamento de alimentos tornaram-se questões centrais para garantir a segurança alimentar. Há uma demanda crescente por alimentos com características aprimoradas de textura, sabor, cor e praticidade em termos de embalagem e consumo. Por essa razão, as enzimas surgem como ferramentas promissoras para atender a essas exigências no setor alimentício (Raveendran et al., 2018).

Embora o uso de celulasas ainda não seja amplamente explorado na indústria alimentícia, essas enzimas apresentam potencial significativo. Espécies bacterianas como *Paenibacillus* e *Bacillus*, bem como fungos, a exemplo de *Trichoderma* e *Aspergillus*, têm sido identificadas como fontes eficazes de celulase para aplicação em alimentos. Entre as possíveis utilizações destacam-se o amaciamento de frutas, a clarificação de sucos, a extração de compostos aromáticos e óleos essenciais (Raveendran et al., 2018).

Além das aplicações no setor alimentício, as celulasas também vêm ganhando destaque em processos industriais voltados à sustentabilidade, especialmente no contexto das biorrefinarias. Nas últimas décadas, diversos estudos têm explorado o uso dos resíduos da agroindústria como matéria-prima alternativa para a produção de compostos de valor agregado (Ravindran et al., 2016).

Essa abordagem tem sido particularmente relevante em países com economias fortemente baseadas na agricultura, como é caso do Brasil, o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de bioetanol (Solomon; Barnes; Halvorsen, 2007). Atualmente, o bioetanol representa a principal aplicação comercial de resíduos agroindustriais, sendo obtido por meio de rotas fermentativas que envolvem a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos (Ravindran; Jaiswal, 2016).

Nesse cenário, a atenção de pesquisadores e pesquisadoras tem se voltado à conversão desses resíduos agrícolas em substratos viáveis para a produção de enzimas, como as celulasas, por exemplo. Esse movimento está alinhado com o crescente interesse por tecnologias que associam a eficiência econômica à sustentabilidade ambiental (Ravindran; Jaiswal, 2016). As celulasas, além de seu papel na transformação alimentar, vêm se consolidando como importantes

biocatalisadores em processos de biorrefinaria, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de biocombustíveis e outros produtos bioeconômicos (Ravindran; Jaiswal, 2016; Ejaz; Sohail; Ghanemi, 2021).

Apesar da expressiva consolidação do setor sucroenergético no cenário nacional, observa-se que o aproveitamento biotecnológico dos resíduos lignocelulósicos ainda é incipiente, especialmente no que diz respeito à utilização de enzimas produzidas por microrganismos. Isso evidencia uma oportunidade estratégica de inovação, capaz de ampliar a eficiência dos processos e agregar valor à cadeia produtiva do bioetanol (Ejaz; Sohail; Ghanemi, 2021).

3.4 ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES

Aspectos relacionados à termotolerância, à facilidade de crescimento em diferentes meios, principalmente em substratos lignocelulósicos, bem como a capacidade de fermentar carboidratos simples, como a xilose e a glicose, constituem características que devem ser consideradas para selecionar microrganismos de interesse biotecnológico (Robak; Balcerek, 2018).

Diversos microrganismos, incluindo bactérias *Thermobifida fusca*, *Clostridium spp.*, *Cellulomonas spp.*, e *Bacillus spp.*, têm demonstrado significativa atividade celulolítica em ambientes extremos, evidenciado seu potencial para a produção de celulases. As bactérias apresentam taxas de crescimento elevados e metabolismos acelerados, características que podem contribuir para a redução do tempo necessário nas etapas iniciais do processo de conversão da biomassa lignocelulósica (Broda; Yelle; Serwanska, 2022; Igwebuike; Awad; Andrès, 2024).

Embora as bactérias apresentem vantagens operacionais relevantes, os fungos filamentosos têm se destacado como os principais alvos da biotecnologia industrial, principalmente por sua elevada capacidade de hidrólise da biomassa. Essa superioridade está associada à sua notável produção de celulases, resultado direto de suas características fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas (Morais et al., 2016; Chauhan, 2020). Espécies potenciais consistem em *Trichoderma reesei* e *Aspergillus*

niger, ascomicetos que apresentam sistemas eficientes de indução e secreção de celulasas (Zhang et al., 2017; Yan; Xu; Yu, 2021).

Especializações relacionadas ao mecanismo de infecção desenvolvidas pelos fungos filamentosos fitopatogênicos são condições que promovem o aumento da produção de hidrolases que atuam na degradação da parede celular vegetal e, com isso, provocam alterações no metabolismo celular do vegetal através do estabelecimento da fitopatologia e subsequente morte dos tecidos vegetais (Moraes et al., 2016).

Nesse sentido, o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* provoca a infecção e a necrose dos tecidos vegetativos nas plantações de cacau, consistindo em uma espécie capaz de expressar celulasas com potencial de hidrólise. Inclusive, estudos têm verificado a expressão de endoglucanases e atividade enzimática de uma β -glicosidase de *Moniliophthora perniciosa*, o que corrobora o potencial biotecnológico dessa espécie (Almeida; Ribeiro; Assis, 2021).

3.4.1 O *Moniliophthora perniciosa*

Do ponto de vista taxonômico, a espécie *Moniliophthora perniciosa* passou por algumas modificações quanto à sua classificação. Em 1915, este fungo foi definido como *Marasmius perniciosa*, conforme a classificação proposta por Stahel. Em seguida, por volta de 1942, foi introduzido ao gênero *Crinipellis*, conforme Singer. Em 2005, com base em análises filogenéticas mais consistentes, além de estudos envolvendo técnicas de sequenciamento de DNA, o fungo causador da fitopatologia “vassoura-de-bruxa” foi categorizado como *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA, sobretudo em função da similaridade evolutiva com *Moniliophthora roreri*, permitindo categorizá-los como pertencentes à família *Marasmiaceae* (Meinhardt et al., 2008; Teixeira et al., 2012).

É sabido que os fungos que parasitam plantas, denominados fitopatogênicos, apresentam a capacidade de produzir uma ampla concentração de proteínas que atuam na degradação da parede celular vegetal e isso está intimamente relacionado

com as especializações e adaptações no que concerne ao modo de infecção e patogenicidade que permitem que as enzimas hidrolíticas provoquem a clivagem e a mobilização de nutrientes, repercutindo em alterações no metabolismo da célula vegetal e subsequente estabelecimento da fitopatologia, podendo desencadear a morte dos tecidos da planta (Morais et al., 2016).

Trabalhos baseados na produção e caracterização de celulasas produzidas pelo *Moniliophthora perniciosa* constituem importantes ferramentas capazes de dinamizar os processos biotecnológicos. Nesse sentido, em um estudo testando diferentes cepas, foi identificado que a cepa 948F resultou na expressão de endoglucanase, embora em níveis considerados baixos, demonstrou algum nível de potencial de hidrólise da celulose. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho corroboram o potencial biotecnológico do fungo, necessitando de alguns ajustes que podem otimizar a produção destas enzimas em pesquisas subsequentes (Guedes et al., 2014).

Em um estudo mais recente, foi verificado a atividade enzimática de β -glicosidase de *Moniliophthora perniciosa* – com base na fermentação submersa e em diferentes faixas de pH – o que representa uma estratégia capaz de ampliar e diversificar a aplicabilidade industrial desta biomolécula (Almeida; Ribeiro; Assis, 2021).

Por essa razão, o desenvolvimento de trabalhos que visam a seleção de celulasas bioativas, com eficiente atividade enzimática quando submetidas às alterações do pH, da temperatura e influência de sais, por exemplo, associados à produção recombinante destas enzimas podem contribuir com o aumento da produtividade e redução de custos em escala comercial (Rodríguez-Zúñiga et al., 2011).

3.4.2 Interação Patógeno X Hospedeiro

O processo de entendimento do mecanismo de patogênese entre fungos e plantas está intimamente dependente da atuação do complexo de enzimas

extracelulares celulolíticas sintetizadas por esses microrganismos e isso ocorre à medida que há a invasão e subsequente infecção dos tecidos vegetais (Morais et al., 2016).

Nesse contexto, tanto a planta quanto o patógeno empregam estratégias opostas de defesa e infecção, envolvendo diversas alterações fisiológicas e a indução de enzimas hidrolíticas. Assim, à medida que o patógeno secreta seus metabólitos, a célula vegetal responde com aumento da permeabilidade plasmática, refletindo um mecanismo de defesa desencadeado pela interação dos compostos excretados com receptores localizados na membrana da planta (Odjakova; Hadjiivanova, 2001; Ceita et al., 2007).

É observável que há uma variedade de níveis de especializações nas interações entre os hospedeiros e uma determinada espécie vegetal. Assim, os processos de adaptação natural, bem como evolutivo, permitem aos fitopatógenos infectar uma determinada espécie vegetal ou, ainda, atingir uma extensa variedade de espécies de plantas (Santana, 2010).

No caso do *Moniliophthora perniciosa*, a variação de biótipos existentes, sendo eles: C, H, L e S, atuam ocasionando fitopatologias em diferentes gêneros vegetais. Nesse sentido, a literatura apresenta o biótopo C responsável por invadir os tecidos de plantas do gênero *Herrania* e *Theobroma*, como é o que acontece com os cacauzeiros – *Theobroma cacao* (Rincones, 2006).

Nesse sentido, o mecanismo de infecção desenvolvido pelo *Moniliophthora perniciosa* nessa espécie vegetal envolve o ciclo de vida hemibiotrófico (Figura 6) que é dividido em duas fases, sendo a fase inicial ou biotrófica, caracterizada pelo surgimento da germinação dos basidiósporos nos tecidos meristemáticos e, em seguida, as hifas penetram o espaço intracelular. À medida que os tubos germinativos penetram os tecidos meristemáticos, ocorre a formação de um micélio haploide, atingindo todos os espaços intercelulares através das hifas (Teixeira et al., 2012).

O estágio biotrófico só é finalizado quando é iniciado o processo de necrose, o que caracteriza a fase saprofítica. Nesse estágio, ocorre a formação de um micélio dicariótico constituído de grampos de conexão que se desenvolve em tecidos mortos, através da produção de basidiomas (Teixeira et al., 2012).

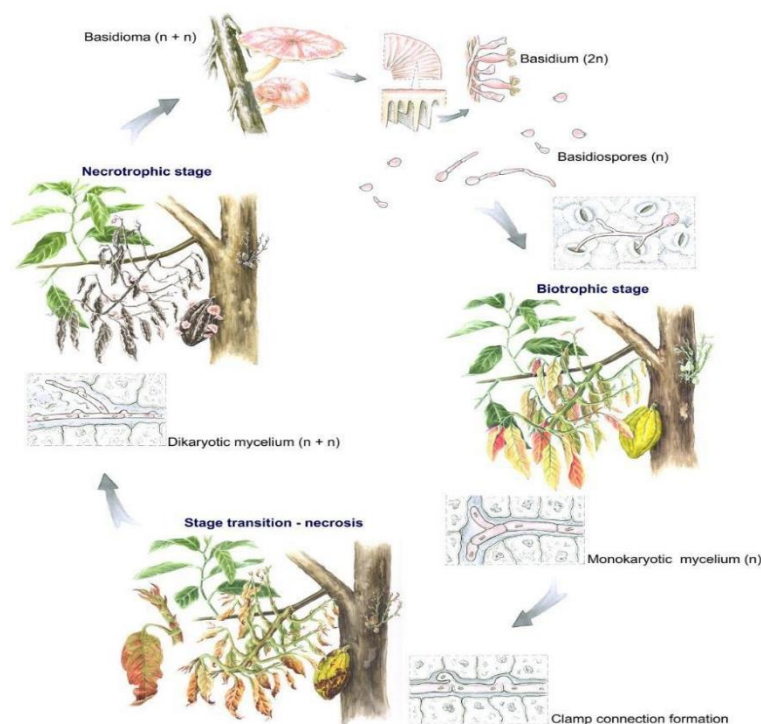


Figura 6: Representação do ciclo de vida do fungo *Moniliophthora perniciosa*.

Fonte: TEIXEIRA; THOMAZELLA; PEREIRA, 2025.

O estudo da interação entre fungos e plantas fornece subsídios importantes não apenas para a compreensão das doenças que atingem os vegetais, mas também para o avanço de aplicações biotecnológicas. A caracterização das celulasas envolvidas nesse processo permite identificar potenciais alvos para uso industrial em função da sua capacidade em degradar componentes estruturais da biomassa (Vitor et al., 2024).

Nesse contexto, a transição do conhecimento básico sobre patogenicidade para estratégias aplicadas tem favorecido o desenvolvimento de abordagens que utilizam a engenharia genética, bem como a produção heteróloga de celulasas em sistemas mais eficientes, o que representa uma perspectiva promissora para obtenção de moléculas bioativas com maior estabilidade, especificidade e rendimento (Vitor et al., 2024).

3.5 PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

A produção recombinante constitui uma estratégia biotecnológica amplamente aplicada e que envolve a inserção de um gene de interesse em um sistema heterólogo capaz de expressar a proteína codificada. Essa abordagem tem se consolidado como uma ferramenta essencial no avanço da produção de enzimas, como as celulasas, especialmente no contexto da conversão de biomassa lignocelulósica (Zeeshan et al., 2018).

No cenário dos biocombustíveis de segunda geração, o uso de sistemas recombinantes eficientes é crucial para viabilizar a produção em larga escala dessas enzimas com alta atividade catalítica e estabilidade sob condições industriais. A seleção de sistemas de expressão adequados e o aprimoramento das condições de cultivo e indução são, portanto, etapas determinantes para o sucesso de bioprocessos voltados à geração sustentável de energia (Lambertz et al., 2014; Dadwal; Sharma; Satyanara, 2020).

Atualmente, uma variedade de organismos hospedeiros têm sido empregada na expressão de celulasas recombinantes, incluindo bactérias, como espécies dos gêneros *Escherichia* e *Clostridium*, leveduras do gênero *Saccharomyces* e até mesmo plantas, como o milho e o tabaco. Esses sistemas diferem amplamente quanto à composição e estrutura da parede celular, à organização dos compartimentos subcelulares responsáveis pelo tráfego e processamento de proteínas, além da capacidade de secreção, fatores que influenciam diretamente a eficiência e a funcionalidade da enzima produzida (Lambertz et al., 2014).

Nesse cenário, a bactéria *Escherichia coli* é amplamente empregada como sistema de expressão heteróloga, sendo favorecida por sua genética bem elucidada, facilidade de manipulação molecular, ampla disponibilidade de cepas e vetores comerciais, além do cultivo em substratos de baixo valor econômico (Zeeshan et al., 2018).

Estudos já demonstraram a viabilidade da expressão heteróloga de celulasas em *Escherichia coli*, através da detecção da atividade funcional de uma celobiohidrolase de *Phanerochaete chrysosporium* na hidrólise de substratos celulolíticos, como carboximetilcelulose e Avicel (Howard; Masoko; Abotsi, 2003). Além disso, uma β -glicosidase recombinante, obtida por meio da construção de um

gene sintético baseado na sequência codificante de *Moniliophthora perniciosa*, apresentou desempenho satisfatório na hidrólise de resíduos lignocelulósicos, evidenciando seu potencial para aplicações biotecnológicas na conversão de biomassa (Vitor et al., 2024).

Diante dos avanços na obtenção de celulasas recombinantes derivadas de fungos filamentosos, torna-se essencial integrar abordagens computacionais aos estudos experimentais. O uso de ferramentas de bioinformática permite não apenas prever propriedades estruturais e funcionais das proteínas, mas também direcionar otimizações específicas que podem aumentar sua estabilidade e eficiência catalítica (Gu et al., 2019; Sobri et al., 2020).

Assim, a associação entre análises *in silico* e técnicas moleculares surge como uma estratégia fundamental para otimizar a seleção e o desenvolvimento de biocatalisadores voltados à conversão de resíduos lignocelulósicos, reduzindo o tempo e os custos envolvidos nos ensaios experimentais (Bahaman et al., 2020; Sobri et al., 2020).

3.6 UTILIZAÇÃO DA BIOINFORMÁTICA PARA O ESTUDO DE PROTEÍNAS

Os avanços das ferramentas de bioinformática têm transformado significativamente a forma como as proteínas são estudadas, permitindo análises em larga escala que abrangem desde a predição estrutural até a simulação de interações moleculares. Mesmo na ausência de dados experimentais completos, essas abordagens possibilitam uma compreensão aprofundada das propriedades funcionais das proteínas, sendo fundamentais para a pré-seleção e o aprimoramento de biocatalisadores aplicados em processos biotecnológicos (Ogunjobi et al., 2025).

Na bioinformática estrutural, a compreensão da relação entre a organização da sequência linear de aminoácidos, caracterizada pela estrutura primária, como determinante para a conformação tridimensional de proteínas – representada pela estrutura terciária – é essencial para a elucidação de sua função biológica (Ogunjobi et al., 2025).

Nesse sentido, a predição da estrutura tridimensional de uma proteína de interesse pode envolver a utilização de moldes resolvidos por métodos experimentais, como a cristalografia por difração de raios-X, que consiste na análise do padrão de difração gerado quando cristais da proteína são expostos a raios X, permitindo a construção de um mapa da densidade eletrônica, ou ainda, através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), que fornece informações estruturais com base no comportamento dos núcleos atômicos em um campo magnético. Apesar de apresentarem algumas vantagens, essas técnicas possuem algumas limitações por demandarem altos investimentos financeiros e tempo prolongado para a obtenção da estrutura da proteína de interesse (Davis; St-Galley; Kleywegt; 2008; Srivastava et al., 2018).

No entanto, também é possível obter moldes de alta confiabilidade e precisão, por meio de ferramentas que otimizam a modelagem comparativa sem a necessidade de ensaios laboratoriais prévios, a exemplo do *AlphaFold* (Jumper et al., 2021).

Nesse contexto, a modelagem comparativa desponta como uma alternativa consolidada para a predição de estrutura tridimensional de proteínas ainda não definidas experimentalmente com base na utilização de moldes preditos por métodos de alta performance, o que amplia significativamente a disponibilidade de estruturas iniciais para a modelagem, resultando em uma base sólida de análises estruturais e funcionais das biomoléculas (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2023; Chen, 2024).

3.6.1 Modelagem Comparativa Por Homologia

Essa ferramenta computacional baseia-se na utilização de estruturas tridimensionais já determinadas experimentalmente e que são utilizadas como moldes para a predição da estrutura da proteína de interesse, também chamada de proteína-alvo, exibindo, portanto, alta similaridade entre as sequências. Essa técnica tem como princípio o fato de que proteínas homólogas apresentam sequências semelhantes e tendem a compartilhar dobras estruturais semelhantes, uma vez que a conservação estrutural é geralmente maior do que a conservação da sequência ao longo da

evolução, especialmente em regiões centrais com importância funcional (Pearce; Zhang, 2021; Chen, 2024).

Nesse sentido, as regiões estruturais conservadas tendem a ser mantidas ao longo do tempo evolutivo, enquanto regiões de alças ou com maior flexibilidade apresentam maior variação. Substituições de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes, como tamanho ou hidrofobicidade, são comuns nesses processos, permitindo que a estrutura geral da proteína se mantenha estável mesmo com modificações na sequência (Pearce; Zhang, 2021; Chen, 2024).

A eficácia dessa técnica depende diretamente do nível de semelhança entre a proteína de interesse e a proteína de referência. Dessa maneira, de um modo geral, considera-se que o método é aplicável quando a identidade entre as estruturas primárias das proteínas comparadas atinge, no mínimo, entre 25% e 30%, conforme determinado por alinhamento de sequência (Pearce; Zhang, 2021; Chen, 2024).

É sabido que estudos já utilizaram a modelagem por homologia como etapa inicial para investigar propriedades estruturais de celulasas provenientes de diferentes microrganismos. Um exemplo é a caracterização *in silico* de uma β -glicosidase de *Trichoderma asperellum*, cuja análise estrutural fundamentou sua viabilidade para expressão heteróloga em *Escherichia coli*. De forma semelhante, uma celobiohidrolase da família GH7, proveniente de *Heterobasidion irregulare*, foi modelada estruturalmente, contribuindo para a compreensão de sua atuação no processamento da celulose. Esses trabalhos demonstram como a modelagem comparativa representa uma importante ferramenta para prever a estrutura tridimensional de enzimas, fornecendo subsídios relevantes para aplicações biotecnológicas (Momeni et al., 2013; Sobri et al., 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BIOINFORMÁTICA

4.1.1 Identificação e Caracterização de Exoglucanases no Genoma de *Moniliophthora perniciosa*

O sequenciamento completo do genoma de *Moniliophthora perniciosa* foi gentilmente disponibilizado pelo Professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica da UNICAMP. Esse recurso permitiu a realização de análises *in silico*, fundamentais para a identificação de alvos moleculares e planejamento das etapas subsequentes, proporcionando uma abordagem integrada.

As sequências de nucleotídeos foram analisadas utilizando-se o programa BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Wheeller; Bhagwat, 2007).

Em seguida, foi realizada a tradução, utilizando-se a ferramenta ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>), viabilizando a geração das sequências de aminoácidos de interesse para as avaliações posteriores.

Para a etapa de identificação dos domínios funcionais presentes nas sequências das proteínas em estudo e classificação conforme as famílias descritas na base de dados CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*), utilizou-se a ferramenta dbCAN2 *meta server* (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>), baseado na combinação de três métodos de predição, sendo eles HMMER, DIAMOND e *Hotpet*. Para garantir a confiabilidade dos resultados, os critérios *E-value* inferior a 1×10^{-15} e cobertura superior a 35% foram adotados, conforme as recomendações previamente estabelecidas na literatura (Zhang et al., 2018).

Foi utilizado o banco de dados CAZy - *Carbohydrate-Active enZymes* (<https://www.cazy.org/>) para a notação das sequências de proteínas identificadas, conforme as diretrizes da *Enzyme Commission* (EC). Essa ferramenta também foi utilizada para a obtenção de informações complementares sobre resíduos catalíticos,

mecanismo de ação das enzimas e formato estrutural do domínio catalítico característico da família.

Para a validação das análises acerca de domínios estruturais, funcionais e regiões conservadas, como o sítio ativo, foi utilizada a ferramenta *Expasy - PROSITE* (<https://prosite.expasy.org/>) (Sigrist, 2012).

O *SignalP* 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) foi utilizado para identificar a presença de peptídeo sinal nas sequências analisadas. Essa ferramenta permite prever sequências sinal localizadas na extremidade N-terminal das proteínas, as quais indicam direcionamento para a via secretora e, consequentemente, potencial atuação no meio extracelular (Teufel et al., 2022).

Os parâmetros físico-químicos, como o número de aminoácidos, o peso molecular e o ponto isoelétrico das exoglucanases de interesse, foram obtidos através da ferramenta *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005).

4.1.2 Alinhamentos Entre as Sequências Alvo e Outras Sequências Homólogas

A ferramenta *BLASTp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizada para a análise de similaridade e relação filogenética entre as sequências de *Moniliophthora perniciosa* e de fungos relacionados filogeneticamente. Para a avaliação da confiabilidade, os critérios de percentual de identidade, valor de *E-value*, score e percentual de cobertura foram considerados (Antunes; Cruz; Telles, 2014).

Os alinhamentos entre as sequências foram realizados utilizando-se a ferramenta *CLUSTAL* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) a fim de identificar regiões conservadas e localizar eventuais (*gaps*) entre as sequências (Sievers; Higgins, 2018).

As análises iniciais de identificação e caracterização das sequências foram conduzidas com o propósito de estabelecer a fundamentação necessária para a etapa seguinte de modelagem comparativa.

Modelagem Comparativa

4.1.2.1 Seleção Da Proteína Molde Para Modelagem Comparativa

Utilizou-se a plataforma *SWISS-MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/>) para a busca de estruturas proteicas disponíveis no *Protein Data Bank (PDB)*, com o objetivo de identificar os moldes estruturais mais adequados para a modelagem das quatro sequências analisadas (Bordoli; Schwede, 2017). Foram priorizados moldes obtidos por *AlphaFold* por ser uma predição de alta confiabilidade. A seleção dos moldes levou em consideração o percentual de identidade entre a sequência alvo e a sequência do molde (Verli, 2014).

Foram realizados alinhamentos entre as sequências alvo e os moldes selecionados, utilizando-se o *CLUSTAL*, a fim de analisar as regiões conservadas e os segmentos não alinhados (Verli, 2014).

4.1.2.2 Construção do modelo 3D

Para a modelagem estrutural das proteínas, utilizou-se os moldes preditos pelo *AlphaFold*, disponibilizados na plataforma *SWISS-MODEL*. A seleção dos moldes considerou não apenas os parâmetros de identidade e cobertura de sequência, mas também o índice *GMQE (Global Model Quality Estimate)*, que varia de 0 a 1. Valores mais próximos de 1 indicam maior confiabilidade do modelo (Waterhouse *et al.*, 2018). A integração desses parâmetros assegurou a escolha de moldes de alta qualidade, contribuindo para a construção de modelos tridimensionais robustos e confiáveis.

4.1.2.3 Validação

Os modelos considerados mais confiáveis foram submetidos à avaliação estereoquímica, utilizando-se a plataforma *MolProbity*

(<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), integrada à ferramenta *SWISSMODEL*, sendo analisados com base no diagrama de *Ramachandran*. A obtenção e a análise dos modelos estruturais foram realizadas por meio do software *PyMOL* (v 1.3) (Schrödinger, 2009), que também foi empregado para realizar a sobreposição entre os modelos e suas proteínas-molde correspondentes.

4.2 REATIVAÇÃO DO FUNGO

O fungo *Moniliophthora perniciosa* CCMB561 foi obtido na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB), sendo reativado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubado em B.O.D a 27 °C por 8 dias.

4.3 CULTIVO DO FUNGO

Para indução da expressão do complexo celulolítico, foram testados dois meios de cultura diferentes, sendo estes, o meio de cultura semissólido WY, (40 g de farelo de trigo; 6 g de extrato de levedura; 1,0 g Fosfato de Potássio; 0,2 g de sulfato de magnésio; 0,2 g de cloreto de Potássio; 1L de água destilada) e o meio líquido CMC, ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 7g; K_2HPO_4 – 1,5g; MgSO_4 – 0,5g; CaCl_2 – 0,3g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,184g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,178g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,158g; carboximetilcelulose (como fonte de carbono) – 5g; H_2O – 1L). O fungo foi incubado em B.O.D com tempo de crescimento de 8 dias a 27 °C.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os ácidos ribonucleicos foram extraídos do fungo *Moniliophthora perniciosa* – isolados no meio WY e CMC no período de 8 dias – utilizando-se o *Kit TRIZOL Reagent* (Invitrogen®). Para o processo de extração, a remoção do micélio do fungo da placa de *petri* foi realizada usando-se uma espátula, transferindo-o para o cadinho

e macerando em nitrogênio líquido. Após a maceração total, o material foi transferido para um microtubo de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL do reagente *Trizol*, seguindo-se de homogeneização em vórtex por, aproximadamente, 5 segundos. Após a homogeneização, o material foi incubado em gelo por 5 minutos.

Para a etapa de separação das fases, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e, em seguida, agitou-se manualmente por 15 segundos. O material foi incubado por 3 minutos em gelo e centrifugado a 12.000 x *g*, por 15 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, houve a formação de 3 fases, sendo elas: clorofórmio-fenol, interfase e a fase aquosa, sendo que esta última encontra-se o RNA e, por essa razão, foi transferida para um novo microtubo estéril. Para o isolamento do RNA, adicionou-se 500 µL de isopropanol 100% à fase aquosa e, em seguida, o material foi incubado em gelo por 10 minutos. Após isso, centrifugou-se a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi retirado e o pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, agitou-se em vórtex e, em seguida, centrifugou-se novamente a 7500 x *g* por 5 minutos a 4°C.

Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet secou em capela por aproximadamente 30 minutos. Após a secagem total, o RNA foi ressuscitado em 25 µL – 35 µL de água RNase-free.

As amostras de RNA extraídas foram avaliadas quanto à concentração, pureza e integridade, utilizando-se espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, através do espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*®), considerando o fator de correção 40.

Em seguida, o material extraído foi analisado por visualização em fotografia digital (*KODAK EDAS 290*®), após 30 minutos de corrida eletroforética a 100 V e 90 mA. Para a eletroforese, utilizou-se gel de agarose a 1% em 40 mL de tampão TAE (Tris-Acetato-ETDA).

4.5 DESENHO DE INICIADORES (*PRIMERS*) PARA O GENE DA PROTEÍNA EM ESTUDO

Os *primers forward* e *reverse* correspondentes às sequências codificantes das proteínas em estudo foram desenhados a partir das sequências nucleotídicas: 2927, 2928, 2929 e 4282 de exoglucanases (Apêndice A - D), selecionadas a partir do sequenciamento completo do Genoma de *Moniliophthora perniciosa*, fornecidas pelo Professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e analisadas utilizando-se a ferramenta *on-line OligoAnalyzer 3.1 - Integrated DNA Technologies* (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), observando-se os seguintes parâmetros: temperatura de anelamento (T_m) e formação de estruturas secundárias (*Hairpin*, *Self-dimer* e *Hetero-dimer*). Além disso, foram adicionados sítios de restrição visando uma futura clonagem em vetor de expressão pET28a, utilizando-se o programa *NEB cutter 2.0* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), a fim de identificar os sítios específicos presentes na sequência, bem como as enzimas de restrição que não clivam a sequência.

4.6 SÍNTESE DE CDNA E AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a síntese de cDNA, foi realizada a técnica de transcriptase reversa, utilizando-se inicialmente, a enzima *ImProm-IITM Reverse Transcriptase* (Promega®). O procedimento foi efetuado em duas etapas. Na primeira etapa, adicionou-se em um microtubo *ependorf* estéril de 200µL, 2,5 µL do RNA total extraído a partir do meio indutor WY, 1,25 µL de Oligo-dT, completando-se com Água *Nuclease free*, resultando em um volume final de 5 µL. Posteriormente, a reação foi incubada em termociclador a 70°C por 5 minutos. Decorridos os 5 minutos, a amostra foi rapidamente resfriada em gelo, procedendo-se a segunda etapa, onde foram utilizados 4 µL do tampão 5x; 2,4 µL de MgCl₂; 1 µL dNTP 10 mM; 1 µL da enzima, completando-se com Água *Nuclease free* para 15 µL, sendo o volume final total de 20

μL. Em seguida, a reação a reação foi incubada a 37° por 1 hora e armazenada a -20°C.

Outras amostras de cDNA foram sintetizadas, utilizando-se uma outra enzima, em função da disponibilidade no laboratório. A transcriptase utilizada nos testes seguintes foi da marca *NZYtech*®. Para a primeira etapa, adicionou-se em um microtubo *ependorf* estéril de 200μL, entre 2,5 μL e 3,0 μL do RNA total extraído a partir do meio indutor WY; 1 μL de Oligo-dT; 1 μL dNTP 0,5 mM, completando-se com Água *Nuclease free*, resultando em um volume final de 16 μL. Posteriormente, a reação foi incubada em termociclador a 65°C por 5 minutos. Decorridos os 5 minutos, a amostra foi rapidamente resfriada em gelo, procedendo-se a segunda etapa, onde foram utilizados 2 μL do tampão 10x; 1 μL da enzima, completando-se com Água *Nuclease free* para 20 μL. Em seguida, a reação foi cuidadosamente misturada e incubada a 42°C por 5 minutos, seguidas de aquecimento a 70°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em gelo e armazenadas a -20°C.

Para a amplificação do cDNA, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Como fita molde, foi utilizada a primeira fita de cDNA e, como iniciadores, os *primers* desenhados para as sequências codificantes em estudo. A reação foi feita utilizando-se o kit *Qiagen*® *Master Mix*, em um tubo *ependorf* estéril, utilizando-se as seguintes concentrações de reagentes: 0,5 μL de *primer F*; 0,5 μL de *primer R*; 2,5 μL de cDNA; 12,5 μL de enzima *Master Mix*, completando-se com Água *Nuclease free* para um volume final de 25 μL. As condições de amplificação para a reação de PCR foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, conforme descritas na tabela 1, seguindo-se as etapas da tabela 2.

Tabela 1: Dados referentes aos reagentes utilizados na reação de PCR.

Reagente	Quantidade (μL)
cDNA <250 ng	2,5
<i>Primer F</i> (10 μM)	0,5
<i>Primer R</i> (10 μM)	0,5
TopTaq Master mix (5 U/μL)	12,5
Água <i>nuclease free</i>	q.s.p. 25

Tabela 2: Etapas referentes à reação de PCR.

PASSO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	Nº CICLOS
Desnaturação Inicial	94	3'	1
Desnaturação	94	30''	30
Anelamento	57-64*	90''	30
Extensão	72	2'	30
Extensão Final	72	10'	1

* Faixas de temperatura de anelamento testadas.

Em função da indisponibilidade da enzima *Master Mix Promega®*, os testes seguintes foram realizados utilizando-se o *kit Taq DNA Polymerase Sinapse inc®* e o *Kit 2x Green Master Mix NZYtech®*.

Para as reações utilizando-se a *Taq DNA Polymerase Sinapse inc®*, em um tubo *ependorf* estéril, foram utilizados os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão; 1,2 µL de MgCl₂; 0,5 µL de dNTP; 1,0 µL de *primer F*; 1,0 µL de *primer R*; 2,5 µL de cDNA; 0,5 µL de enzima, completando-se com *Água Nuclease free* para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação para a reação de PCR foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, conforme descritas na tabela 3, seguindo-se as etapas da tabela 4.

Tabela 3: Dados referentes aos reagentes utilizados na reação de PCR.

Reagente	Quantidade (µL)
PCR Buffer (1x)	2,5
dNTPs (0,2 mM)	0,5
cDNA (10 pg – 1 µg)	2,5
<i>Primer F</i> (0,4 µM - 1)	0,5
<i>Primer R</i> (0,4 µM- 1)	0,5
MgCl ₂ (1-4 mM)	1,2
Taq DNA Polymerase mix (5 U/µL)	0,5

Água <i>nuclease free</i>	q.s.p. 25
---------------------------	-----------

Tabela 4: Etapas referentes à reação de PCR.

PASSO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	Nº CICLOS
Desnaturação Inicial	94	3'	1
Desnaturação	94	30''	30
Anelamento	57-64*	30''	30
Extensão	72	1'	30
Extensão Final	72	10'	1
Incubação adicional	72-4	10'	∞

* Faixas de temperatura de anelamento testadas.

Para as reações utilizando-se o *Kit 2x Green Master Mix NYYtech®*, em um tubo *epENDORF* estéril, foram utilizados os seguintes reagentes: 1,25µL de *primer* F; 1,25 µL de *primer* R; 2,5 µL de CDNA; 12,5 µL de enzima, completando-se com Água *Nuclease free* para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação para a reação de PCR foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, conforme descritas na tabela 5, seguindo-se as etapas da tabela 6.

Tabela 5: Dados referentes aos reagentes utilizados na reação de PCR.

Reagente	Quantidade (µL)
cDNA (5 pg – 0,5 pg)	2,5
<i>Primer</i> F (0,2 µM - 0,5 µM)	1,25
<i>Primer</i> R (10 µM)	1,25
Taq 2x Green Master Mix (5 U/µL)	12,5
Água <i>nuclease free</i>	q.s.p. 25

Tabela 6: Etapas referentes à reação de PCR.

PASSO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	Nº CICLOS
Desnaturação Inicial	95	3'	1

Desnaturação	90	30''	35
Anelamento	57-64*	60''	35
Extensão	72	2'	35
Extensão Final	72	10'	1

* Faixas de temperatura de anelamento testadas.

Durante o processo, foram realizados ajustes nas concentrações dos reagentes para testar diferentes condições, especialmente nas concentrações de *primers* (0,1–1 µM), MgCl₂ (1,0–4,0 mM) e cDNA (0,5–1,0 µg), a fim de otimizar a eficiência e a especificidade da amplificação por PCR.

4.7 PURIFICAÇÃO

O produto obtido a partir da reação de PCR foi purificado utilizando-se o *KitPureLink® PCR Purification Invitrogen* e o procedimento foi feito conforme as etapas do protocolo. A princípio adicionou-se 4 volumes do tampão B2 (com isopropanol) para cada volume de PCR, transferindo-se para uma coluna *PureLink* inseridas em um microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 x *g* por 1 minuto e a coluna transferida para um novo tubo. Em seguida, adicionou-se 650 µl de Tampão de lavagem (W1) (com etanol) onde foi centrifugado a 10.000 x *g* por 3 minutos, para a remoção do tampão. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 2 mL e adicionou-se 20 µl de água *nuclease free* para eluição. O material foi incubado por 1 minuto e posteriormente centrifugado a 12.000 x *g*.

As amostras foram avaliadas quanto à concentração, utilizando-se espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, através do espectrofotômetro *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®)*, considerando o fator de correção 40.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOINFORMÁTICA

5.1.1 Identificação e Caracterização das Celobiohidrolases (exoglucanases) no Genoma de *Moniliophthora perniciosa*

A avaliação e a caracterização *in silico* de proteínas, por meio de ferramentas de bioinformática, buscam dinamizar as análises moleculares em função da grande quantidade de proteomas já sequenciados acessíveis em bancos de dados *online*. Desta forma, os *softwares* especializados direcionam os estudos envolvendo sequências nucleotídicas e análises de similaridade filogenética entre organismos, resultando no estabelecimento de relações genéticas e funcionais consistentes, devido à alta probabilidade e grau de confiabilidade no que concerne às semelhanças entre as sequências em estudo (Verli, 2014; Santana et al., 2020).

Nesse contexto, é possível acessar uma ampla variedade de enzimas responsáveis pela produção e clivagem de carboidratos, classificando-as de acordo com a sua especificidade em relação a um substrato, além de obter modelos estruturais e funcionais em 3D, através de bancos de dados que reúnem informações transcriptômicas, genômicas e proteômicas (Cantarel et al., 2008; Terrapon et al., 2016).

A partir da análise do genoma de *Moniliophthora perniciosa* utilizando-se o BLASTx, foi possível identificar quatro sequências com elevada similaridade às exoglucanases previamente descritas em outros organismos, sendo elas: Seq_2927; Seq_2928; Seq_2928 e Seq_4282. Essa correspondência com proteínas já caracterizadas reforça a anotação funcional e sugere o envolvimento dessas sequências em processos relacionados à degradação de polissacarídeos (Machado, 2019).

A tradução das sequências nucleotídicas em sequências de aminoácidos foi fundamental para viabilizar análises *in silico* mais detalhadas, possibilitando a

investigação de domínios funcionais e a comparação com famílias de enzimas catalogadas em bases de dados especializadas.

Desse modo, a partir dessas sequências traduzidas, as análises utilizando-se a ferramenta *dbCAN2 meta server* (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>), para detectar e classificar domínios proteicos de acordo com as famílias CAZy, permitiram identificar as sequências proteicas codificadas pelo genoma de *Moniliophthora perniciosa* (Zhang et al., 2018).

Portanto, as análises revelaram que as sequências denominadas Seq_2927; Seq_2928; Seq_2929; Seq_4282, pertencem à família GH6 e estão associadas à atividade de celobiohidrolases tipo II (exoglucanases), enzimas que atuam nas extremidades das regiões não redutoras da celulose, liberando unidades de celobiose, conforme indica Tabela 7 (Machado, 2019).

Tabela 7: Análise das sequências codificadoras de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* utilizando-se o *dbCAN2 meta server*.

Sequência	Família CAZy	Atividade enzimática	E-value	Cobertura (%)
Seq_2927	GH6	<i>Exoglucanase II</i>	$5,8 \times 10^{-82}$	95,8
Seq_2928	GH6	<i>Exoglucanase II</i>	$7,4 \times 10^{-73}$	95,8
Seq_2929	GH6	<i>Exoglucanase II</i>	$2,9 \times 10^{-13}$	91,3
Seq_4282	GH6	<i>Exoglucanase II</i>	$5,7 \times 10^{-76}$	95,2

Fonte: *dbCAN2 meta server*, 2025.

Os dados fornecidos pelo servidor para as sequências em estudo, indicaram *E-value* $<1 \times 10^{-15}$ e *Coverage* $>35\%$. Esses valores seguem os critérios descritos na literatura, confirmando uma identificação confiável e a presença do domínio característico de outras proteínas da família GH6, indicativos da função enzimática atribuída (Zhang et al., 2018).

Conforme diretrizes determinadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), a classificação das *Glicosil Hidrolases* (GH) se dá em função da especificidade em relação a um substrato determinante e, para além disso, também mantém relação com cada reação de catálise em particular. Existe, portanto, um código que caracteriza uma dada enzima, sendo este denominado *Enzyme*

Commission number, em que cada dígito do modelo EC 3.2.1.x expressa uma funcionalidade. Desta maneira, o dígito 1 determina o tipo de reação catalítica, os dígitos 2 e 3 caracterizam a ação da enzima sob um grupo particular e, por fim, o dígito 4 indica a ação da enzima em função de um substrato específico, ou ainda, pode expressar a classificação das ligações químicas entre moléculas (Colussi, 2012).

Nesse cenário, utilizando-se o banco de dados Cazy (<https://www.cazy.org/>), a família GH6 do tipo *celobiohidrolase* II exibe notação EC 3.2.1.91 (exo- β -1,4-glucobiosidase). Além disso, também foi possível inferir que estas enzimas apresentam um sítio ativo constituído pelo aminoácido aspartato (D), cujo mecanismo catalítico de inversão da glicose ocorre porque a molécula de água age diretamente no sentido do carbono anomérico deste monossacarídeo. Em relação ao domínio catalítico, esse ocorre estruturalmente em forma de túnel (Figura 7) – região onde é encontrado o sítio ativo – de modo que os dobramentos são dispostos em barris numa configuração (β/α)₈ (Gerlt, Raushel, 2003; Machado, 2019).

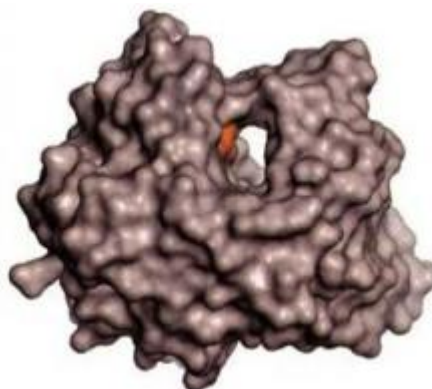


Figura 7: Representação do domínio catalítico em túnel da celobiohidrolase II de *Trichoderma reesei*. Em laranja, a representação do resíduo do aminoácido aspartato.

Fonte: DAVIES; HENRISSAT, 1995 apud, MACHADO 2019.

A fim de obter mais informações acerca dos domínios e das regiões conservadas (sítios ativos), as quatro sequências foram submetidas a uma nova análise, utilizando-se a ferramenta *Expasy - PROSITE* (<https://prosite.expasy.org/>). Nesse sentido, em relação à Seq_2927 e Seq_2929, os dados analisados revelaram a presença de dois domínios funcionais, dentre eles: o domínio catalítico GH6 – também identificado nas demais sequências analisadas – e o domínio CBM1, que, apesar de não apresentar uma atividade catalítica, atua especificamente facilitando a

fixação da proteína à superfície do substrato, favorecendo a interação enzimática (Boraston et al., 2004).

Sugere-se, portanto, que a ausência do domínio CBM1 nas Seq_2928 e Seq_4282 pode comprometer a eficiência da enzima na degradação do substrato. Isso acontece porque o domínio CBM1 tem a capacidade de alterar a estrutura do substrato de forma específica e irreversível, tornando-o mais acessível à ação da celulase (Bernardes et al., 2004).

As regiões correspondentes à assinatura do sítio ativo apresentaram o resíduo do aminoácido aspartato, importante para a catálise, além de constituir uma característica padrão das celobiohidrolases do tipo II, conforme indica a Tabela 8 (Gerlt, Raushel, 2003; Machado, 2019). No entanto, observou-se que, para a Seq_2929, foram identificadas duas assinaturas associadas ao sítio ativo, sendo a primeira localizada entre os resíduos de aminoácidos 164-168 e, a segunda, entre os resíduos de aminoácidos 212-221.

Tabela 8: Assinaturas do sítio ativo de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa*. Os resíduos catálícos Asp(D) estão destacados em verde. Em parênteses, a posição do resíduo catalítico.

Sequência	Assinatura do sítio ativo
Seq_2927	VAIVEP D SLA (226)
Seq_2928	VIYDLPG R DCAAKASNG (111)
Seq_2929	VVYNLPER D CAALASNG (172) / VAVVEP D SLA (218)
Seq_4282	VIYDLPG R DCAAKASNG (116)

Fonte: Expasy-PROSITE 2025.

Portanto, esses resultados sugerem que o sítio ativo da Seq_2929 é composto por múltiplos resíduos de ácido aspártico, dispostos em diferentes regiões de uma mesma estrutura catalítica, podendo desempenhar papéis complementares no processo catalítico. Essa característica foi observada também na celobiohidrolase Cel6A de *Trichoderma reesei*, onde dois resíduos de ácido aspártico foram

identificados no sítio ativo, embora apenas um tenha sido caracterizado como o ácido catalítico principal (Koivula et al., 2002).

A presença de peptídeo sinal nas exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa*, identificado por meio da ferramenta *SignalP* 6.0, indica que essas enzimas são secretadas para o meio extracelular, onde exercem sua função na degradação da parede celular do hospedeiro (Tabela 9).

Tabela 9: Predição de peptídeo sinal de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa*.

Sequência	Número de resíduos	Peptídeo sinal
Seq_2927	444	MIKSTALLSLVALAPLVARA (1-20)
Seq_2928	369	MKTSFVLLAALVGLAVA (1-17)
Seq_2929	439	MKSTGLIALAALLPFAWA (1-18)
Seq_4282	374	MKTVSALLSIAAVLGAATASPTLQAR (1-26)

Fonte: SinalP 6.0, 2025.

Esse processo é essencial para a virulência do fungo, uma vez que facilita a penetração e colonização dos tecidos vegetais. Além disso, a secreção dessas enzimas reflete diretamente na interação patógeno–hospedeiro, permitindo que o fungo obtenha nutrientes e estabeleça sua presença no tecido vegetal de maneira eficiente. A detecção do peptídeo sinal confirma o direcionamento das exoglucanases à via secretora, reforçando o papel dessas proteínas na dinâmica de infecção (Hématy; Cherck; Somerville, 2009; Barbosa et al., 2018).

Adicionalmente, a caracterização *in silico* de propriedades físico-químicas é importante para fornecer informações preliminares sobre massa, carga, estabilidade e solubilidade das proteínas, antes da realização de experimentos laboratoriais. Esses dados são particularmente úteis no planejamento de protocolos de purificação, ensaios enzimáticos e na comparação com referências da literatura sobre exoglucanases da família GH6 de origem fúngica (Rivero-Pino; Millan-Linares; Montserrat-de-la-Paz, 2023).

Desse modo, a partir da ferramenta ProtParam, foram obtidos dados relativos ao número de resíduos de aminoácidos, massa molecular e pI das sequências analisadas, conforme apresentado na Tabela 10. Estes valores correspondem às sequências desprovidas do peptídeo sinal, uma vez que este segmento, localizado no extremo N-terminal da proteína, é removido durante o processo de secreção, originando a forma madura que desempenha a função enzimática (Auclair; Bhanu; Kendall; 2011).

Tabela 10: Número de resíduos de aminoácidos, massa molecular (kDa) e ponto isoelétrico (pI) das sequências analisadas.

Sequência	Nº de resíduos de aminoácidos	Massa molecular (kDa)	pI teórico
2927	424	44,76	4,82
2928	352	37,46	4,33
2929	421	45,30	5,07
4282	348	37,47	5,68

Fonte: ProtParam 2025.

Os valores obtidos para as massas moleculares teóricas das sequências 2927 e 2929 estão consistentes com o padrão observado em celobiohidrolases GH6 fúngicas relatadas na literatura. Por exemplo, a CBHII de *Penicillium funiculosum* apresenta 422 resíduos e massa molecular calculada de 47,7 kDa, enquanto a CBHII de *Talaromyces emersonii* tem massa prevista de 47 kDa. O fato de 2927 e 2929 apresentarem domínio de ligação a carboidratos (CBM), explica o patamar de massa ligeiramente superior em relação às sequências sem CBM (2928 e 4282) e está em acordo com o comportamento de outras glicosil hidrolases GH6 fúngicas, nas quais a presença do CBM contribui para o aumento da massa molecular da proteína madura (Murrays et al., 2003; Chinnathambi et al., 2015).

Em relação ao pI encontrado para as sequências estudadas, os valores estão de acordo com dados reportados na literatura para celobiohidrolases GH6 fúngicas. As proteínas analisadas apresentam caráter ácido, como observado em CBHII de *Penicillium funiculosum*, *Talaromyces emersonii* e *Trichoderma reesei*, em que os valores de pI variam tipicamente entre 4,3 e 6,0. Estes resultados reforçam que a

predominância de resíduos ácidos é uma característica conservada nas GH6 fúngicas, influenciando solubilidade, estabilidade e interação com o substrato celulósico (Herpoel-Gimbert et al., 2008; Murrays et al., 2003; Chinnathambi et al., 2015).

5.1.2 Alinhamentos entre as sequências alvo e outras sequências homólogas

A fim de encontrar sequências depositadas de fungos filamentosos relacionados filogeneticamente com as sequências de aminoácidos de *Moniliophthora perniciosa*, foi realizada uma avaliação de similaridade entre estas sequências, através da ferramenta online *BLASTp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – que constitui um banco de dados de proteínas – fornecendo um alinhamento simplificado baseado em parâmetros que permitem a seleção do melhor alinhamento possível. De acordo com a literatura, tais critérios consideráveis consistem no percentual de identidade, *E-value* e *score*, sendo que esse último exibe um melhor parâmetro de confiabilidade à medida que atinge maiores valores e isso está intimamente relacionado com valores negativos atribuídos às regiões onde são inseridos ou removidos nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos, sendo denominadas *gaps*, que podem interferir na funcionalidade de uma determinada proteína, ou ainda, as chamadas regiões *mismatch*, locais em que não há correspondência de nucleotídeos (Antunes; Cruz; Telles, 2014).

Sendo assim, com base na análise de tais critérios, todas as quatro sequências de aminoácidos analisadas estabeleceram similaridade filogenética com as proteínas do fungo *Moniliophthora roreri*, sendo que a Seq_2927 apresentou o maior valor de *score* correspondente a 870, seguida da Seq_2929 com 818; Seq_4282 com um *score* de 729 e, por fim, a Seq_2928 apresentando um valor de 697.

É importante ressaltar que todos os valores encontrados para o parâmetro *E-value* foi igual a 0, corroborando o que há descrito na literatura, uma vez que altos valores indicam um menor grau de confiabilidade. Além disso, todas as sequências apresentaram um percentual de cobertura (*Query cover*) de 100%, indicando uma

cobertura total dos resíduos de aminoácidos quando submetidos ao programa durante a análise comparativa. A Seq_2927 também apresentou o maior nível de identidade quando comparada às demais sequências consenso e às sequências de *Moniliophthora roreri* depositas no *GenBank*, exibindo um percentual de 94,63%.

Utilizando-se a ferramenta online *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), foram realizados alinhamentos entre as sequências de aminoácidos de *Moniliophthora perniciosa* e as sequências de *Moniliophthora roreri* a fim de identificar o percentual de identidade entre as regiões conservadas (Apêndice E - H).

Com base nos resultados apresentados pelo alinhamento global de sequências, todas as quatro sequências exibiram um desempenho significativo, sendo que a Seq_2927 apresentou o maior percentual de identidade. No entanto, foram observados resíduos de aminoácidos sem correspondência (*gaps*), também presentes na Seq_2929, o que pode indicar regiões de divergência que, dependendo da sua localização, têm potencial para impactar aspectos estruturais ou funcionais da proteína em nível molecular (Antunes; Cruz; Telles, 2014).

Observou-se, também, a substituição de valina por isoleucina (posição 214) no alinhamento entre a sequência 2929 e a homóloga de *Moniliophthora roreri* (Apêndice G). Como se trata de uma substituição conservativa, não há indicação de que essa mudança represente um prejuízo estrutural ou funcional para a proteína (Betts; Russell, 2003).

A relevância contextual da análise das sequências obtidas neste estudo é reforçada ao considerar *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri* espécies intimamente relacionadas do gênero *Moniliophthora*, ambas associadas a doenças devastadoras do cacaueiro, conhecidas, respectivamente, como “vassoura-de-bruxa” e *monilíase* (Barbosa et al., 2018).

Apesar de apresentarem diferenças nos modos de infecção e na variedade de hospedeiros, *Moniliophthora perniciosa* tem um alcance mais amplo, atacando plantas de famílias como *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Malpighiaceae* e *Bignoniaceae*, e acomete diferentes tecidos meristemáticos do cacaueiro, incluindo brotos, flores e frutos, resultando na formação das chamadas “vassouras-de-bruxa”. Em contraste,

Moniliophthora roreri possui um padrão mais restrito de infecção, concentrando-se principalmente nos frutos do cacaueiro e em espécies do gênero *Herrania* (Barbosa *et al.*, 2018).

Mesmo com essas diferenças, ambas as espécies apresentam características genéticas e funcionais semelhantes, incluindo genes relacionados à patogênese. Essa semelhança pode ser entendida como uma adaptação convergente, ou seja, embora as espécies sigam trajetórias evolutivas distintas, desenvolveram soluções similares para enfrentar desafios ecológicos e interagir com o hospedeiro, como mecanismos de infecção e degradação de tecidos vegetais (Barbosa *et al.*, 2018).

Desse modo, essa contextualização biológica reforça a importância da análise de exoglucanases, pois a conservação de regiões funcionais e a presença de elementos catalíticos essenciais indicam adaptações evolutivas compartilhadas, o que justifica não apenas a investigação de sua estrutura e função, mas também permite aprofundar a caracterização *in silico* por meio de modelagem comparativa, avaliando a conformação tridimensional, sítios ativos e padrões estruturais críticos para seu potencial biotecnológico.

5.1.3 Modelagem Comparativa

5.1.3.1 Seleção e Identificação Dos Moldes

Para a construção das estruturas tridimensionais, foram realizadas buscas por proteínas com estruturas já disponíveis em bancos de dados, utilizando-se a plataforma *SWISS-MODEL*. A seleção dos moldes levou em consideração o percentual de identidade e cobertura entre as sequências, priorizando modelos obtidos pelo *AlphaFold*. O *AlphaFold* fornece previsões de alta confiabilidade para a conformação de proteínas inteiras, permitindo a obtenção de moldes precisos mesmo na ausência de dados experimentais previamente determinados (Jumper *et al.*, 2021). As informações detalhadas dos moldes selecionados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11: Dados referentes às análises dos parâmetros para seleção dos moldes.

Sequência	Código do Molde	Organismo de Origem	Identidade Sequencial (%)	Cobertura (%)	Família
Seq_2927	A0A369JLX6.1.A	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	70,43	100	GH6
Seq_2928	V2YR75.1.A	<i>Moniliophthora roreri</i>	92,12	100	GH6
Seq_2929	V2X4U0.1.A	<i>Moniliophthora roreri</i>	92,01	100	GH6
Seq_4282	A0A0D7B3Z0.1.A	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	73,53	100	GH6

Fonte: SWISSMODEL, 2025.

A análise dos dados apresentados na Tabela 11, mostra que os moldes selecionados possuem um alto grau de similaridade com as sequências alvo, com identidade superior a 50% e valores de cobertura a 1 (100%), indicativos de um bom alinhamento e correspondência entre molde e sequência alvo (Verli, 2014). Dessa forma, os moldes selecionados se mostraram adequados para a modelagem comparativa, fornecendo uma base confiável que possibilita avançar para as etapas subsequentes de construção estrutural e análise funcional das proteínas estudadas.

Após a identificação dos moldes apropriados, foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando o *CLUSTAL*, com o objetivo de comparar a sequência alvo com os moldes selecionados. Esse procedimento permitiu avaliar o grau de conservação dos resíduos ao longo das estruturas, com especial atenção para aqueles considerados característicos da assinatura da glicosil hidrolase em estudo.

Nesse sentido, o alinhamento das quatro sequências estudadas revelou alta similaridade com os moldes de referência, apresentando predominância de resíduos idênticos, como indicam os Quadros 1 e 2 e os Apêndices I e J. Ao analisar as regiões correspondentes à assinatura correspondente ao sítio ativo, constatou-se que o resíduo catalítico aspartato (D) permaneceu conservado em todas as sequências. As regiões com *gaps* encontram-se distantes do sítio ativo, o que sugere que não há comprometimento da função enzimática, conforme indica o Quadro 1.

De maneira semelhante, a sequência 2929 apresentou a mesma troca de aminoácido (Quadro 2).

Quadro 2: Alinhamento entre resíduos de aminoácidos da sequência Seq_2928 de *Moniliophthora perniciosa* e o molde. Em amarelo, a assinatura do sítio ativo; em vermelho, a substituição de aminoácidos e, em verde, o resíduo catalítico.

2929	MKSTGLIALAALLPFAWAQSPAQAQCGGIGWSGPTTCASGSTCTKVNDYYSQCIPGSDPG	60
V2X4U0.1.A	MKSAGLVALAASLPFALAQSPAQCGGIGWSGPTSCASGSTCTKVDDYYSQCIPGSNPG	60
	::**** *****.*****:*****:*****:***	
2929	NPGPTSSSTLSSTAAPPTNTQSPVEDNPYTGTYIYLSPIYADEIDAAAKITDPTLKVQA	120
V2X4U0.1.A	NPESTST-TPSSTVAPPTNTQPPVADNPYTGTYIYLSPIYADEIDAAAANITDSTLAKA	119
	** **: * ***,***** ** *****:*** ***,**	
2929	LKVKEIPTFIWFDTTAKLSTLEPYLKDASAKGKAEKGYLLQI	180
V2X4U0.1.A	LKVKEIPTFIWFDTTAKLSTLEPYLKDASAKGKAEKGYLLQI	179

2929	ELSIDNGGEVKYREYIDTMVATIKKYPDVRV	240
V2X4U0.1.A	ELTIDNGGEAKYRQYIDAMVATIKKYPDVRV	239
	.:***.***:***:*****:*****:*****:***:***	
2929	TSTQYALKQLDTAGVYMYLDAGHAGWLGWPANLTPAQLFQQVWQDAGSPKFVRGLATNV	300
V2X4U0.1.A	TSTQYALKQLDTAGVYMYLDAGHAGWLGWPANLTPAAQLFQQVWQDAGSPKSVRGLSTNV	299
	*****:***** ***:***	
2929	ANFNALRAASDPVTSQNPNYDEIHYIESLADTSLPFFAHFIVDQGRAGQQNLRKEWGDW	360
V2X4U0.1.A	ANFNALRAASDPVTSQNPNYDEIHYIESLAGVLSPFFAHFIVDQGRAGQQNLRKEWSDW	359
	*****.*****.*****	
2929	CNVKGAGFGTRPTTNTGSSLIDSIVWVKPGGESDGTSDSSAARFDAKCVSASSHVPAPPA	420
V2X4U0.1.A	CNVKGAGFGTRPTTNTGSSLIDSIVWVKPGGESDGTSDSSAARFDAGCVSASSHVPAPPA	419
	***** *****	
2929	GTWFQEYFEALVRNANPAL	439
V2X4U0.1.A	GTWFQEYFEALVRNANPAL	438

Fonte: CLUSTAL, 2025

* Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

: Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

. Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

Por se tratarem de aminoácidos hidrofóbicos com propriedades físico-químicas semelhantes, a substituição de valina por isoleucina é considerada conservativa, de modo que não compromete a conformação local do sítio ativo (Betts; Russell, 2003). Desse modo, a preservação do resíduo catalítico, assim como da maior parte do sítio ativo, constitui uma base para as análises estruturais subsequentes.

5.1.3.2 Construção Dos Modelos 3D

Para além das análises de identidade entre as sequências das proteínas com as sequências associadas ao molde, uma etapa fundamental é a avaliação do *GMQE* (*Global Model Quality Estimate*). Ressalta-se que todos os moldes utilizados foram obtidos por predição via *AlphaFold*, disponibilizados no *SWISS-MODEL*.

Segundo a literatura, o *GMQE* varia de 0 a 1, sendo que valores mais elevados indicam maior confiabilidade do modelo (Waterhouse et al., 2018). Esse índice, associados à identidade e à cobertura previamente mencionadas reforçam a robustez e a confiabilidade dos modelos preditos via *AlphaFold* e analisados com a plataforma *SWISS-MODEL*.

Nesse sentido, todos os resultados obtidos contemplam o que é descrito na literatura em relação a este parâmetro, estando de acordo com os valores recomendados para modelos confiáveis, conforme pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de *GMQE* (*Global Model Quality Estimate*) utilizados na modelagem comparativa das exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa*.

Sequência	Código do Molde	Organismo de Origem	GMQE
Seq_2927	A0A369JLX6.1.A	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	0,91
Seq_2928	V2YR75.1.A	<i>Moniliophthora roreri</i>	0,94
Seq_2929	V2X4U0.1.A	<i>Moniliophthora roreri</i>	0,91
Seq_4282	A0A0D7B3Z0.1.A	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	0,94

Fonte: SWISSMODEL, 2025.

5.1.3.3 Validação dos Modelos 3D

A validação dos modelos tridimensionais obtidos foi realizada utilizando-se a plataforma *MolProbity*, integrada ao *SWISS-MODEL*, por meio da análise do diagrama de *Ramachandran*. Essa avaliação da qualidade estereoquímica considera a

porcentagem de resíduos localizados nas regiões energeticamente favoráveis, conforme descrito por (Ramachandran; Sasisekharan, 1968).

A análise estereoquímica dos modelos tridimensionais revelou resultados satisfatórios, com todas as sequências apresentando mais de 90% dos resíduos localizados em regiões energeticamente favoráveis do diagrama de *Ramachandran*. Esses valores estão em concordância com o que é descrito na literatura como indicativo de alta qualidade estrutural reforçando a confiabilidade dos modelos gerados (Laskowski et al.,1994; Verli, 2014).

A Tabela 13 reúne os dados completos de avaliação estrutural das proteínas, sendo complementada pelos gráficos de Ramachandran, os quais permitem comparar a qualidade estrutural entre as diferentes estruturas analisadas (Figuras 8 e 9).

Tabela 13: Avaliação da qualidade estereoquímica dos modelos estruturais gerados para as sequências alvo.

Modelo gerado para a sequência	% de resíduos em regiões energeticamente favoráveis
Seq_2927	92,31
Seq_2928	93,99
Seq_2929	94,97
Seq_4282	92,74

Fonte: MOLPROBITY-SWISSMODEL, 2025.

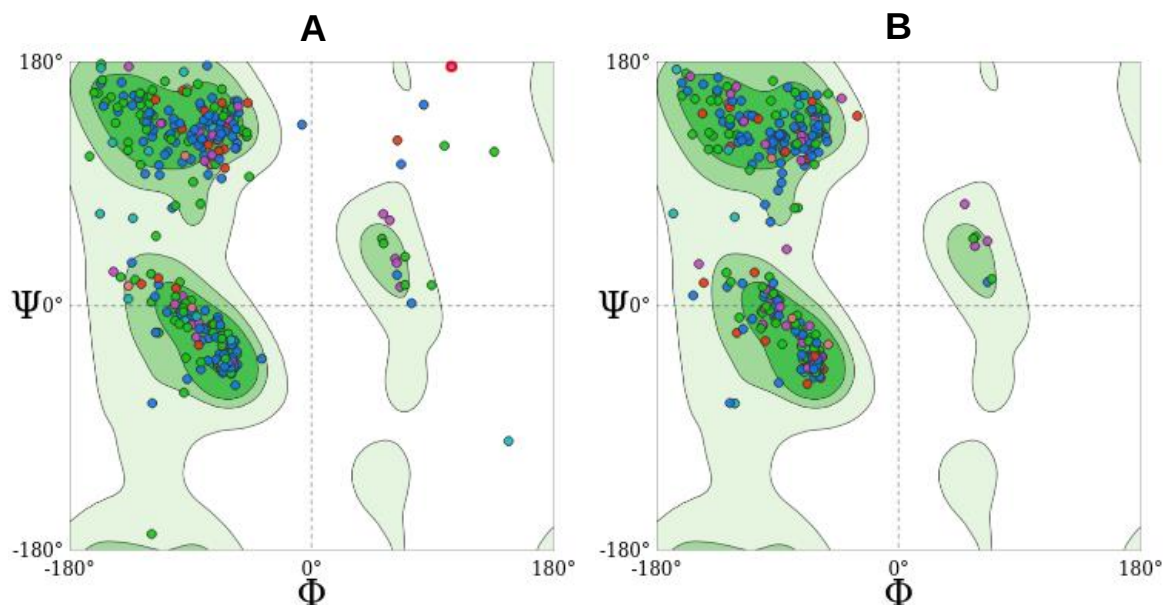


Figura 8: Gráficos Ramachandran mostrando os resíduos de aminoácidos localizados em regiões energeticamente favoráveis (região em verde escuro). A: gráfico gerado para o modelo Seq_2927; B: gráfico gerado para modelo Seq_2928.

Fonte: SWISS-MODEL, 2025.

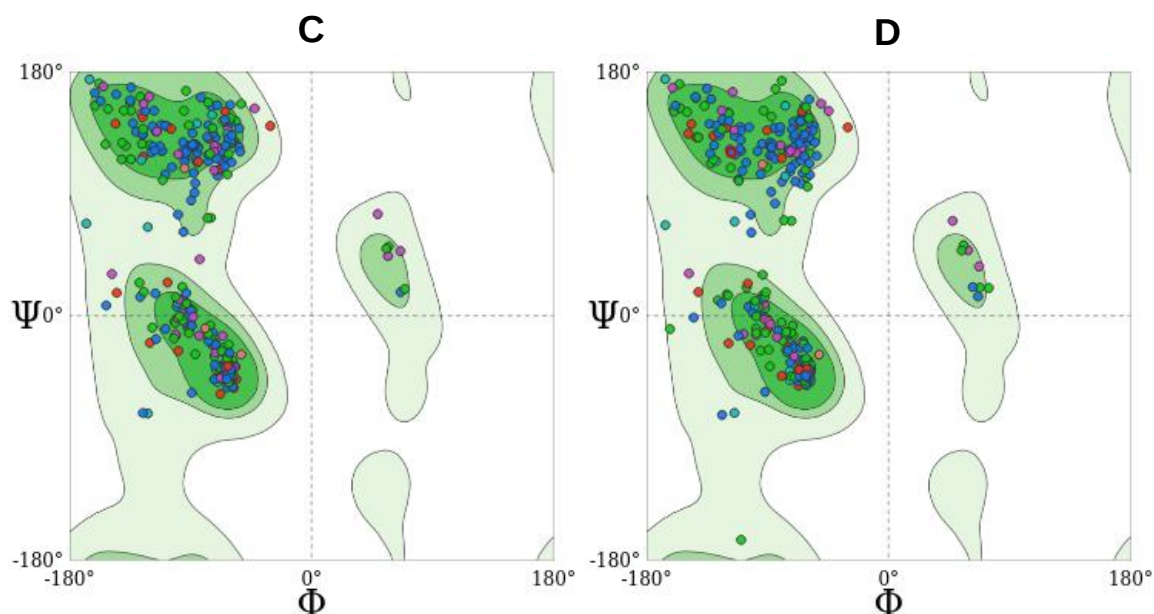


Figura 9: Gráficos Ramachandran mostrando os resíduos de aminoácidos localizados em regiões energeticamente favoráveis (região em verde escuro). C: gráfico gerado para o modelo Seq_2929; D: gráfico gerado para modelo Seq_4282.

Fonte: SWISS-MODEL, 2025.

A partir da ferramenta *PyMOL*, foram geradas as estruturas tridimensionais de cada modelo, destacando o sítio ativo, bem como as folhas β e α -hélices, características típicas das glicosil hidrolases. Além disso, foi realizada uma

sobreposição entre os modelos tridimensionais preditos para as sequências de interesse e os moldes utilizados, considerando o parâmetro RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*). O RMSD mede a diferença média entre as posições dos átomos correspondentes nas duas estruturas, sendo que quanto menor o valor, maior a semelhança entre o modelo predito e o molde experimental. Valores de RMSD entre 0 e 2 Å são indicativos de excelente concordância estrutural, evidenciando que o modelo predito apresenta alta similaridade com o molde experimental (Sikic; Tomic; Carugo, 2010).

Nesse sentido, todos os valores de RMSD obtidos na sobreposição dos modelos preditos com os moldes experimentais foram considerados satisfatórios, indicando excelente concordância estrutural entre as sequências analisadas (Tabela 14).

Tabela 14: Valores de RMSD obtidos a partir do alinhamento entre modelos tridimensionais de exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* com seus respectivos moldes.

Modelo gerado para a sequência	Molde experimental	RMSD (Å)
Seq_2927	A0A369JLX6.1.A	0,060
Seq_2928	V2YR75.1.A	0,059
Seq_2929	V2X4U0.1.A	0,055
Seq_4282	A0A0D7B3Z0.1.A	0,082

Fonte: PYMOL, 2025

Portanto, a análise dos elementos secundários revelou que as α -hélices e folhas β estão presentes tanto no modelo tridimensional quanto na sobreposição entre o molde e a estrutura cristalográfica, inclusive na região correspondente ao sítio ativo, o que sugere que a predição estrutural preserva as características essenciais da proteína, conforme indicam as Figuras 10, 11, 12 e 13.

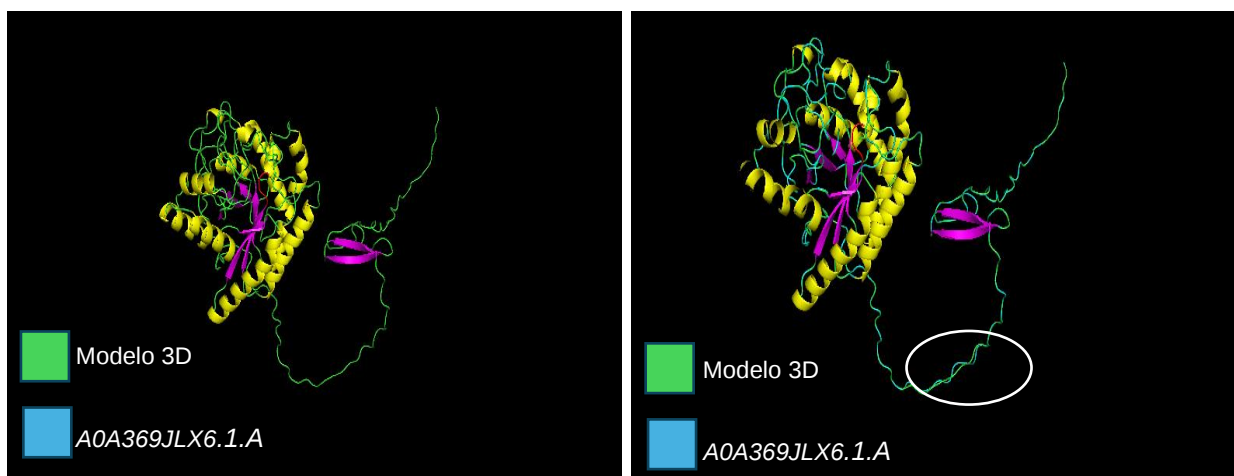


Figura 10: À esquerda, o modelo tridimensional da proteína Exo_2927, obtido a partir do molde A0A369JLX6.1.A. À direita, sobreposição entre o modelo e o molde. α hélices (amarelo); folhas β (magenta), sítio ativo (vermelho) e regiões divergentes (branco).

Fonte: PYMOL, 2025.

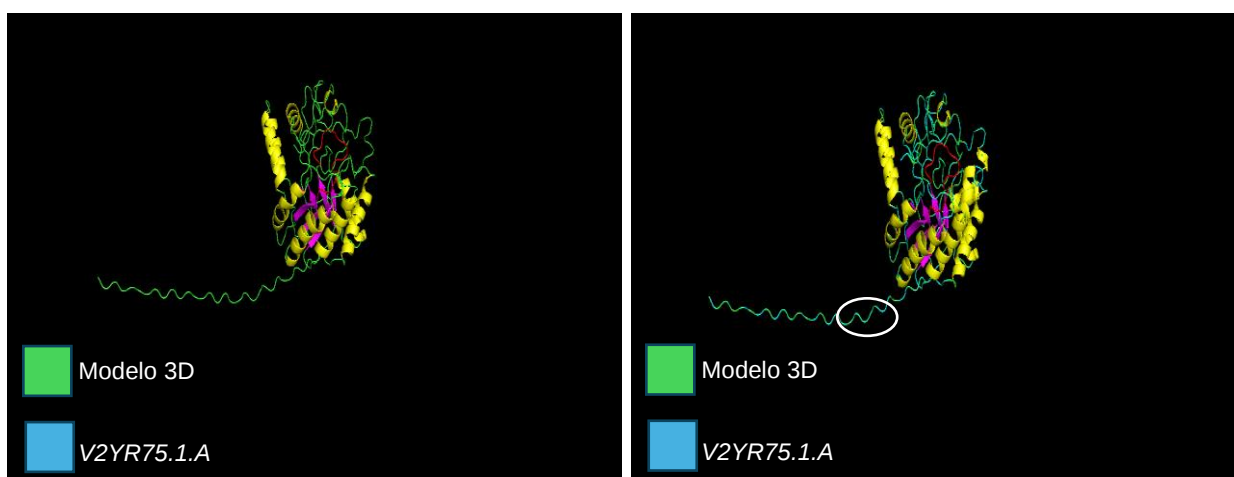


Figura 11: À esquerda, o modelo tridimensional da proteína Exo_2928, obtido a partir do molde V2YR75.1.A. À direita, sobreposição entre o modelo e o molde. α hélices (amarelo); folhas β (magenta), sítio ativo (vermelho) e regiões divergentes (branco).

Fonte: PYMOL, 2025.

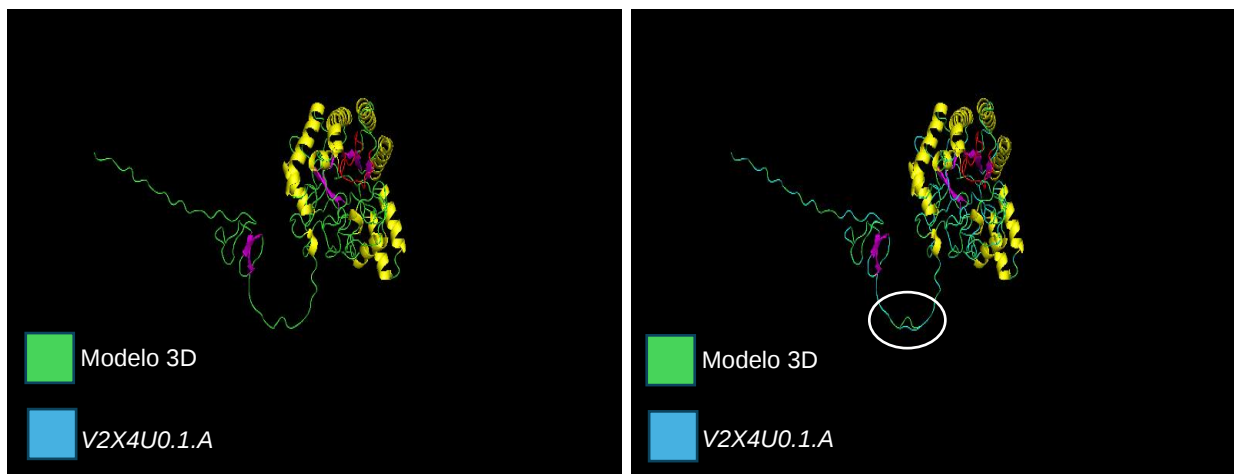


Figura 12: À esquerda, o modelo tridimensional da proteína Exo_2929, obtido a partir do molde V2X4U0.1.A. À direita, sobreposição entre o modelo e o molde. α hélices (amarelo); folhas β (magenta), sítio ativo (vermelho) e regiões divergentes (branco).

Fonte: PYMOL, 2025.

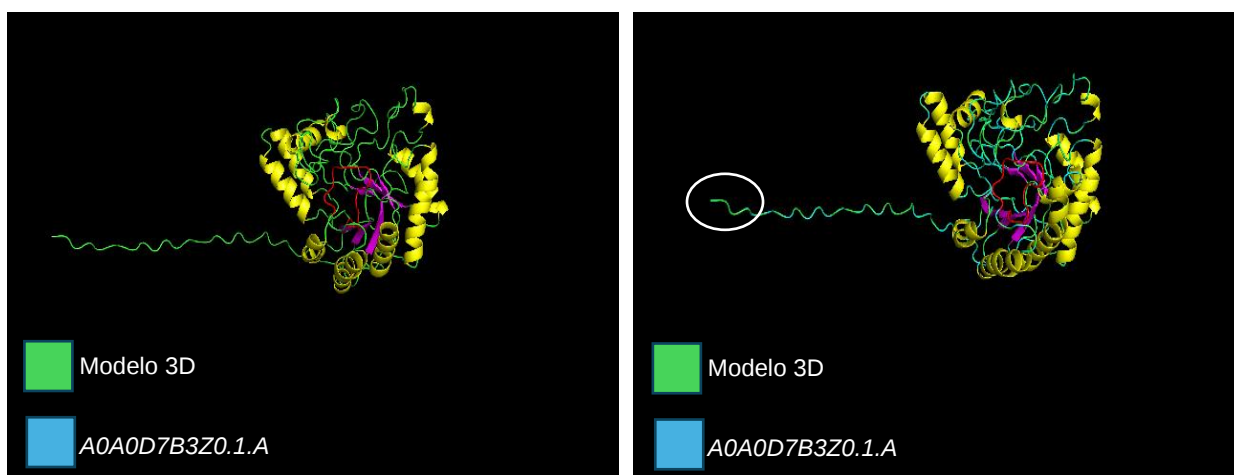


Figura 13: À esquerda, o modelo tridimensional da proteína Exo_4282, obtido a partir do molde A0A0D7B3Z0.1.A. À direita, sobreposição entre o modelo e o molde. α hélices (amarelo); folhas β (magenta), sítio ativo (vermelho) e regiões divergentes (branco).

Fonte: PYMOL, 2025.

Nesse sentido, conforme descrito no CAZypedia, as celobiohidrolases da família GH6 apresentam a característica conformação $(\beta/\alpha)_8$, na qual oito folhas β paralelas formam o núcleo do barril, cada uma conectada a uma α -hélice adjacente, padrão também observado em celobiohidrolases GH6 de fungos como *Phanerochaete chrysosporium* e *Chaetomium thermophilum* (Thompson et al., 2012; Yamaguchi et al., 2024). Essa organização estrutural é particularmente evidente nos modelos das sequências Seq_2927 e Seq_2929, destacando o arranjo regular das folhas β e das α -hélices.

As pequenas divergências observadas nas extremidades das proteínas são consideradas comuns em modelos preditivos, podendo refletir a flexibilidade natural dessas regiões. Embora a conformação estrutural $(\beta/\alpha)_8$ seja característico de glicosil hidrolases pertencentes à família GH6, a visualização precisa desse arranjo em modelos preditivos, incluindo gerados a partir de moldes obtidos pelo AlphaFold, pode ser limitada (Stevens; He, 2022).

Essa limitação se deve principalmente à flexibilidade das regiões de loop, que podem resultar em um padrão aparentemente desordenado do barril. Além disso, a precisão da predição tende a diminuir à medida que aumenta o número de resíduos em uma mesma região flexível. Outro aspecto relevante é que esta ferramenta preditiva apresenta uma estimativa da quantidade de α -hélices e folhas β que pode não coincidir exatamente com o número real desses elementos secundários na proteína (Stevens; He, 2022).

Ainda assim, a identificação do padrão conformacional $(\beta/\alpha)_8$ e a manutenção de elementos estruturais essenciais, especialmente o sítio ativo, reforçam a confiabilidade dos modelos para estudos funcionais e ensaios subsequentes.

Desse modo, as análises *in silico* desempenharam um papel estratégico na pré-seleção das exoglucanases de *Moniliophthora perniciosa* a serem investigadas, permitindo a identificação de sequências com domínios funcionais conservados, assinaturas de sítios ativos característicos e propriedades físico-químicas favoráveis à atividade catalítica.

Esses dados forneceram informações prévias essenciais, orientando as análises moleculares experimentais de forma mais direcionada. Portanto, a integração dos resultados obtidos por meio das abordagens computacional e experimental possibilita uma avaliação abrangente das proteínas, considerando tanto aspectos estruturais quanto funcionais, e oferece subsídios importantes para a exploração do potencial biotecnológico dessas exoglucanases.

5.2 REATIVAÇÃO DO FUNGO

O cultivo do fungo em meio constituído por Ágar, Batata e Dextrose, em B.O.D a 27 °C, entre 7 e 14 dias, viabilizou o crescimento da biomassa micelial de forma satisfatória (Figura 14), o que pode ser explicado com base na constituição nutricional, principalmente de carboidratos, além da relação de carbono e nitrogênio que integram o meio (Cutrim et al., 2006).

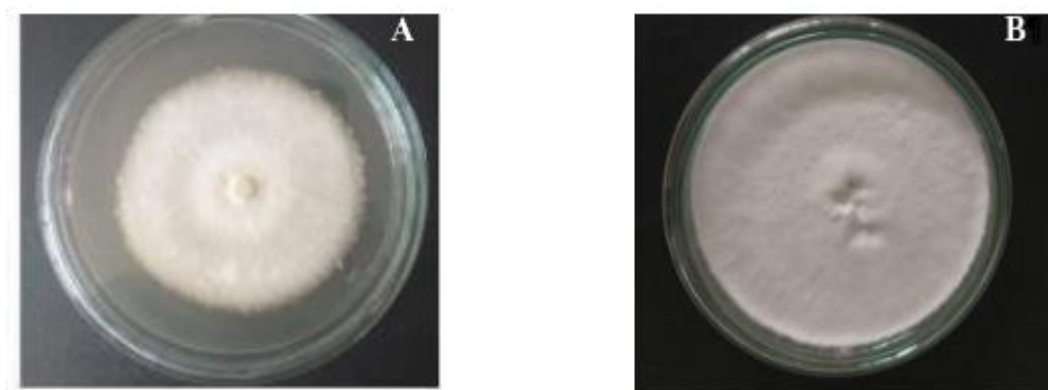


Figura 14: Em A, cultivo do fungo *Moniliophthora perniciosa* em meio BDA no 7º dia de cultivo. Em B, no 14º dia de cultivo.

Portanto, a obtenção desses resultados corrobora o que há descrito na literatura quanto à observação do crescimento micelial, uma vez que isolados fúngicos cultivados em meio de cultura natural apresentam substâncias estimulantes específicas, principalmente os açúcares, resultando no desenvolvimento e reprodução ideal desses microrganismos (Souza et al., 2015).

Apesar de apresentar limitações para a análise da atividade enzimática, a reativação do fungo em meio BDA fornece uma base adequada para os experimentos subsequentes envolvendo a indução enzimática (Cutrim et al., 2006).

5.3 CULTIVO DO FUNGO NOS MEIOS INDUTORES WY E CMC

Para verificar a indução da atividade enzimática, transferiu-se a fração micelial de *Moniliophthora perniciosa* para os meios de cultivo indutores WY e CMC.

No que concerne à região associada à atividade enzimática, é sabido que está associada à formação do halo micelial – região de coloração esbranquiçada que ocorre durante o crescimento do fungo (Junior Paz *et al.*, 2020). Portanto, levando-se em consideração os substratos que apresentam a capacidade de indução enzimática, como é o caso do meio CMC e WY, essa região tornou-se evidente no 8º dia de incubação.

No entanto, durante o período de incubação, foi possível visualizar diferenças no que se refere à estrutura e ao crescimento micelial nos diferentes substratos, considerando as mesmas condições de armazenamento, tempo de cultivo e temperatura.

Nesse sentido, considerando-se o período de 8 dias, foi observado que o meio semissólido WY – que apresenta em sua constituição farelo de trigo – favoreceu um melhor crescimento de biomassa micelial, apresentando uma estrutura mais uniforme, em comparação ao meio sintético CMC, cuja única fonte de carbono é a carboximetilcelulose (Figura 15).

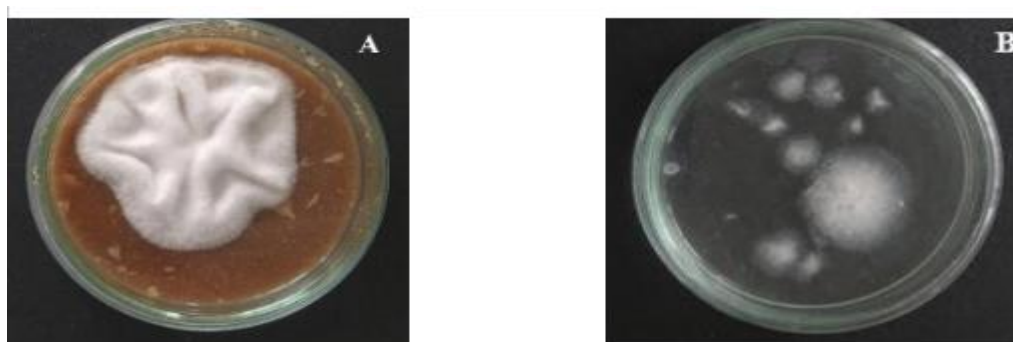


Figura 15: - Em A, cultivo do fungo *Moniliophthora perniciosa* em meio WY no 8º dia de cultivo. Em B, em meio CMC, no 8º dia de cultivo.

Assim sendo, esses resultados estão de acordo com o que há descrito na literatura, pois a disponibilidade de resíduos lignocelulósicos que compõe o meio WY repercute no maior crescimento do micélio de *Moniliophthora perniciosa* e, portanto, confere maior potencialidade quanto à indução de diferentes celulasas e hemicelulasas (Silva *et al.*, 2019).

Além disso, a composição do farelo de trigo, rica em carboidratos e nutrientes essenciais, pode promover não apenas a expansão da biomassa, mas também a manutenção da viabilidade e atividade metabólica do micélio, criando condições mais

favoráveis à indução enzimática. Do mesmo modo, seu baixo custo e disponibilidade constitui um insumo atrativo para aplicabilidade biotecnológica (Biswas et al., 2019).

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

As análises quantitativas das amostras obtidas a partir da extração de RNA em meio CMC indicaram valores de pureza inferiores ao ideal, possivelmente devido à dificuldade em remover o micélio da placa de petri durante uma das etapas do processo de extração. Além disso, verificou-se que uma das amostras apresentou concentração abaixo do limite considerado aceitável (Tabela 15).

Tabela 15: Valores referentes à análise quantitativa do RNA extraído a partir do meio CMC pela técnica de espectrofotometria.

Amostras	Razão: A260/280	Concentração (ng/μl)
CMC. 1	2,41	237,0
CMC.2	3,04	47,9

De acordo com a literatura, a relação entre as leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm é utilizada como indicador da pureza do RNA. Sendo assim, amostras com razão entre 1,7 e 2,0 tendem a apresentar baixo nível de contaminantes, enquanto valores menores ou maiores podem apontar, respectivamente, presença de proteínas ou de substâncias como fenóis. Já a concentração da amostra deve atingir valores acima de 50 ng/μL para assegurar a qualidade das análises (Regitano, 2007; Gouveia et al., 2011).

No caso das amostras obtidas por extração de RNA em meio WY, os resultados foram consistentes, apresentando valores adequados tanto para a pureza quanto para a concentração do material genético, atendendo aos parâmetros necessários para as análises subsequentes (Tabela 16).

Tabela 16: Valores referentes à análise quantitativa do RNA extraído a partir do meio WY pela técnica de espectrofotometria.

Amostras	Razão: A260/280	Concentração (ng/μl)
WY. 1	1,84	152,3
WY.2	1,9	468,3
WY.3	1,9	353,0
WY.4	1,79	1342,2

Em relação às amostras obtidas a partir da extração de RNA em meio CMC, observou-se um micélio com textura extremamente fina, fator determinante quanto à incorporação de uma quantidade considerável do substrato na biomassa micelial.

Apesar da celulose apresentar uma característica recalcitrante, resultando na possibilidade de indução de secreção de celulasas por algumas espécies de fungos (Inforsato, 2016), sua presença pode ter dificultado a extração eficiente do RNA, interferindo na pureza do material obtido. Consequentemente, os resultados de análise qualitativa indicaram comprometimento das subunidades ribossômicas 28S e 18S, podendo impactar aplicações posteriores, como síntese de cDNA e amplificação por PCR (Figura 16).

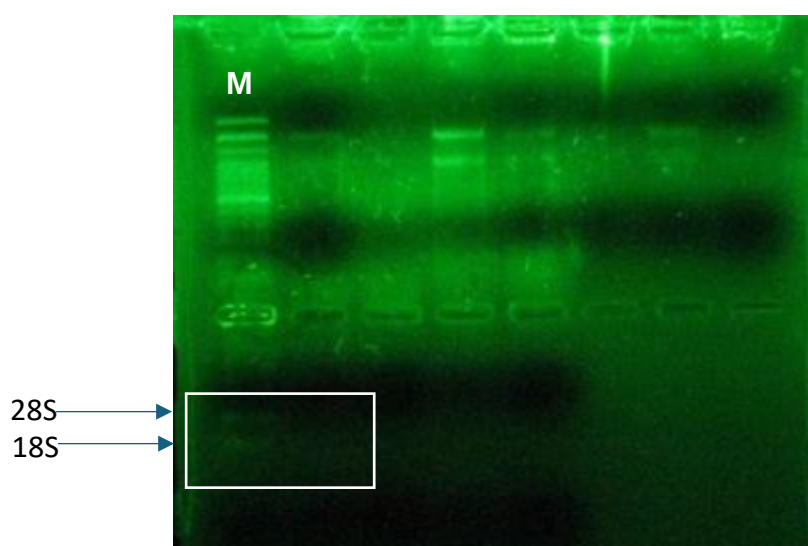


Figura 16: Gel de agarose a 1% com resultado da extração de RNA de *Moniliophthora perniciosa* cultivado em meio CMC. Em M, o marcador molecular de 100 pb.

Em relação à extração obtida a partir do fungo em meio semissólido WY, observou-se que as bandas correspondentes às subunidades ribossômicas 28S e 18S permaneceram bem definidas (Figura 17), indicando que o RNA manteve sua integridade.

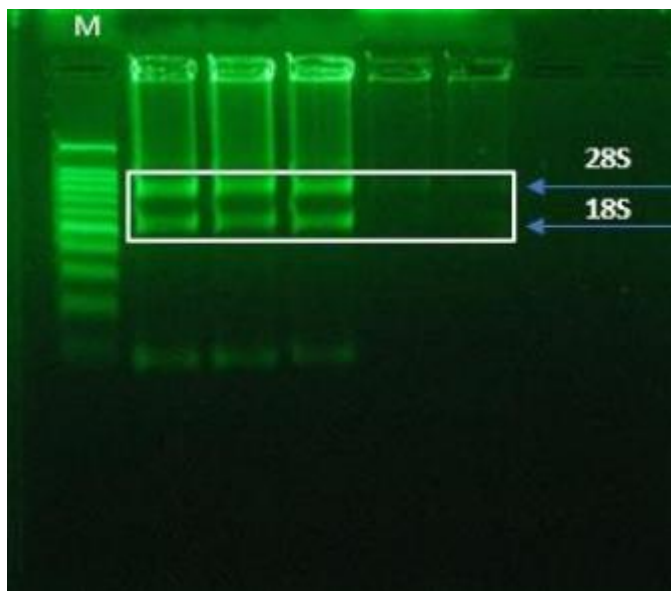


Figura 17: Gel de agarose a 1% com resultado da extração de RNA de *Moniliophthora perniciosa* cultivada em meio WY. Em M, o marcador molecular 100 pb.

Ao comparar com o RNA extraído de fungos cultivados em meio CMC, verificou-se que a facilidade de separar o micélio do substrato em WY não comprometeu a quantidade de biomassa coletada, permitindo a obtenção de material genético de qualidade adequada. Esses resultados estão de acordo com estudos que associam a integridade do RNA à eficiência na recuperação do micélio durante a extração, sugerindo que meios que permitem manuseio mais simples do micélio reduzem perdas e degradação do RNA (Silva, 2018).

5.5 DESENHO DOS PRIMERS

Os iniciadores específicos (*primers*) para a sequência codificante da proteína em estudo foram projetados, buscando subsequente clonagem do fragmento amplificado no vetor de expressão pET-28a. Por meio do programa *NEB cutter 2.0*

(<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), verificou-se quais sítios específicos existiam nas sequências e quais as enzimas que não clivam as sequências.

Com base nessas informações, os *primers* foram desenhados contendo sítios de clivagem diferentes daqueles encontrados dentro da sequência de interesse e compatíveis com os sítios de restrição presentes no sítio de clonagem do vetor pET-28a, sendo selecionados os sítios NcoI e HindIII para *primers* direto (F) e reverso(R) respectivamente.

Considerando que a eficiência da clivagem por enzimas de restrição pode ser reduzida quando o sítio está próximo à extremidade 5', nucleotídeos foram adicionados nessa extremidade para assegurar a efetividade da digestão na etapa subsequente. Detalhes adicionais sobre os *primers* estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Dados referentes aos *primers* diretos e reversos desenhados para exoglucanases.

Denominação	Sequência (5' 3')	Temp. de melting
Exo_2927_NcoI F	GAG <u>CCA TGG*</u> CAG TCT CCC GTC TGG GGT C	67,0 °C
Exo_2927_HindIII R	CAC <u>AAG CTT*</u> TTA** TTA CAA TGG TGG GTT	55,0 °C
Exo_2928_NcoI F	GAG <u>CCA TGG*</u> ACT CCC GCT CCT CCC ATC	66,0 °C
Exo_2928_HindIII R	CAC <u>AAG CTT*</u> TTA** TTA GAT CGG GGG GTT G	58,0 °C
Exo_2929_NcoI F	GAG <u>CCA TGG*</u> CAG TCA CCC GCC TGG GC	69,0 °C
Exo_2929_HindIII R	CAC <u>AAG CTT*</u> TTA** TTA GAG GGC AGG GTT G	58,0 °C
Exo_4282_NcoI F	GAG <u>CCA TGG*</u> TCT CCT ACG CTG CAG GC	65,0 °C
Exo_4282_HindIII R	CAC <u>AAG CTT*</u> TTA** TCA GAA GGA AGG AAT G	55,0 °C

*Sequência referente à enzima de restrição; **Códon stop.

5.6 SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA DE *MONILIOPTHORA* *PERNICIOSA*

Para a síntese de cDNA, foram utilizadas as amostras provenientes do meio WY, uma vez que, nessa condição, observou-se melhor crescimento micelial. Em contrapartida, as amostras de RNA obtidas a partir do CMC apresentaram qualidade e integridade inferiores, o que comprometeria a síntese e amplificação subsequente do cDNA. Dessa forma, a escolha do WY permitiu obter um material genético mais consistente, aumentando a precisão e confiabilidade na amplificação das sequências alvo.

Nesse sentido, para todas as quatro sequências foram testadas diferentes faixas de temperatura, entre 57°C e 61°C. No entanto, foi possível obter a amplificação da Seq_2928, detectando por eletroforese em gel de agarose a 1%, a presença do fragmento esperado em uma temperatura de anelamento a 59°C. É importante ressaltar que na temperatura de 57°C houve o aparecimento de fragmentos inespecíficos, como indica a figura 18.

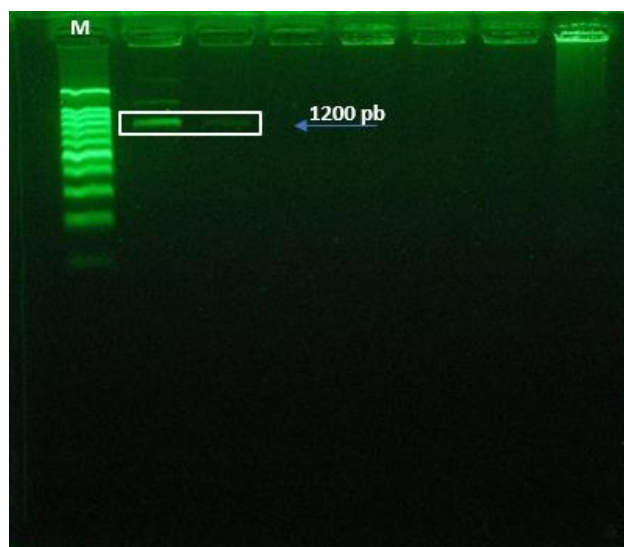


Figura 18: Amplificação do cDNA de *Moniliophthora perniciosa* correspondente à sequência 2928. Em M, o marcador molecular de 1 kb.

O fragmento amplificado apresenta cerca de 1.200pb, o que indica que há correspondência com a sequência do genoma, contendo 1.110 pb, além de evidenciar

a expressão do RNAm correspondente à sequência codificante para exoglucanase de interesse.

Tais resultados estão em consonância com a literatura sobre a produção de enzimas celulolíticas microbianas a partir de substratos lignocelulósicos, como o farelo de trigo, amplamente utilizado em estudos de interesse industrial. A eficiência na indução dessas enzimas está intimamente relacionada à presença de nutrientes essenciais que fornecem os precursores necessários para o crescimento micelial e a síntese enzimática (Santos, 2015).

Além disso, o farelo de trigo apresenta composição rica de carboidratos complexos, o que confere elevado potencial para a geração de produtos de valor agregado. Esse substrato pode ser aproveitado em processos voltados tanto para a síntese de insumos de base biológica e química, contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis (Pruckler et al., 2014).

Outros testes foram realizados, utilizando-se o *kit de Taq Polymerase* disponível no laboratório. Porém, não foi possível encontrar resultados de amplificação para nenhuma das sequências (Figura 19).

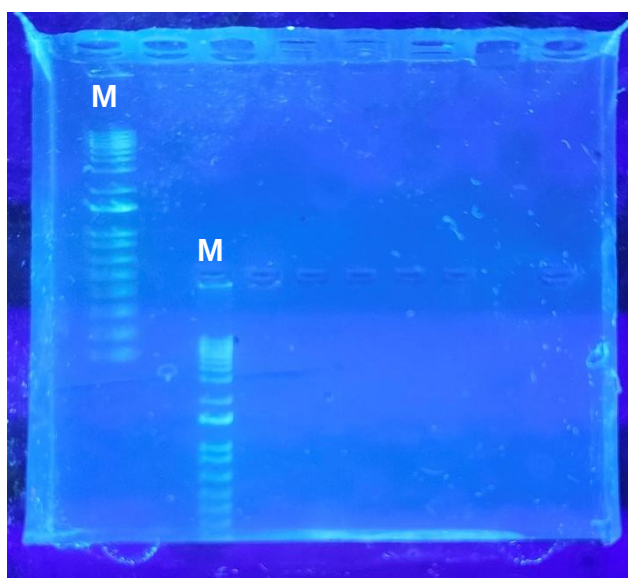


Figura 19: Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da reação de PCR. Não foram observadas bandas correspondentes às sequências de interesse. Em M, o marcador molecular de 1 kb. Visualização em transiluminador UV Portátil.

Foram realizados ajustes no protocolo de PCR, incluindo variações na concentração de *primers* (0,1–1 μ M), $MgCl_2$ (1,0–4,0 mM) e quantidade de cDNA (0,5–

1,0µg), com o objetivo de otimizar a eficiência e a especificidade da amplificação. Apesar dessas modificações, não foi possível observar amplificação das sequências-alvo. O gel de eletroforese apresentado na Figura 20 ilustra os resultados obtidos, evidenciando a ausência de produtos amplificados mesmo após a realização das alterações experimentais.

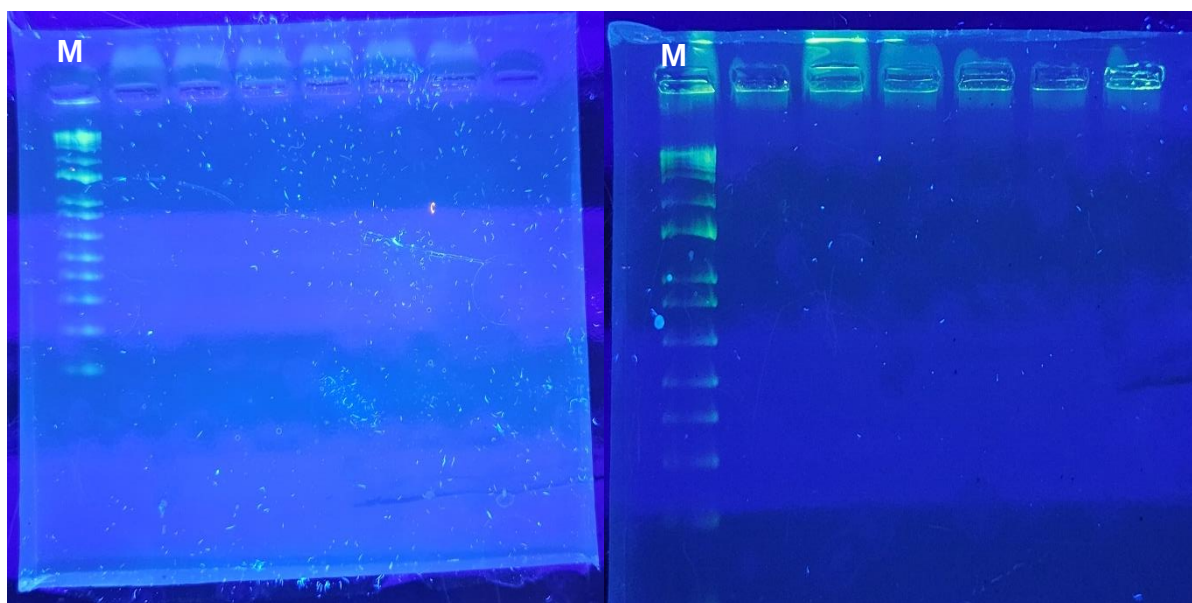


Figura 20: Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da reação de PCR. Não foram observadas bandas correspondentes às sequências de interesse. Em M, o marcador molecular de 1 kb. Visualização em transiluminador UV Portátil.

É importante ressaltar que os ajustes no protocolo foram planejados levando-se em consideração os princípios da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Portanto, a variação da concentração de $MgCl_2$ buscou otimizar a atividade da DNA polimerase, uma vez que os íons magnésio atuam como cofatores essenciais que influenciam tanto a eficiência quanto a especificidade da reação (Tbahriti et al., 2025). O ajuste na quantidade de cDNA buscou aumentar a disponibilidade de cópias da sequência alvo, o que pode favorecer a amplificação (Peirson; Butler; Foster, 2003). Já as alterações na concentração dos *primers* teve como objetivo melhorar o pareamento correto com a sequência alvo, minimizando a formação de produtos inespecíficos (Lorenz, 2012).

No entanto, mesmo com essas intervenções, a ausência de amplificação pode estar associada à presença de estruturas secundárias no cDNA, que dificultam a ligação dos *primers* e a progressão da polimerase, bem como a integridade do cDNA,

que pode ter sido afetada por degradação parcial ou até mesmo pela presença de impurezas no processo de síntese. Além disso, a especificidade dos *primers* pode não ter sido direcionada às regiões de baixa complementaridade ou altamente repetitivas, o que impediu a formação de produtos amplificados correspondentes às demais sequências de estudo, mesmo com os ajustes realizados (Lorenz, 2012).

5.7 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

O produto positivo de PCR foi purificado e posteriormente quantificado, revelando uma concentração relativamente baixa, correspondente a 2,6 ng/μL. A baixa concentração do produto de PCR, mesmo com evidência de expressão do gene alvo, pode estar associada à formação de estruturas secundárias, à quantidade limitada de cDNA ou ao pareamento inadequado dos *primers*, mas também pode ter ocorrido perdas do material durante o processo de purificação.

Algumas estratégias podem ser adotadas em análises subsequentes para melhorar a recuperação e a qualidade do cDNA obtido. Uma delas é a realização de eluições sucessivas com o tampão de eluição, que permite recuperar parte do DNA que permanece retido na coluna após a primeira eluição. Embora essa abordagem aumente o rendimento total, a concentração do cDNA por microlitro pode ficar ligeiramente menor, uma vez que o material recuperado se distribui em um volume maior de tampão (Dilley; Pagan; Chapman, 2021).

Uma abordagem adicional para aumentar a concentração do cDNA purificado consiste em reduzir o volume de eluição. Estudos demonstram que volumes menores de tampão resultam em uma maior quantidade de DNA por microlitro, o que é especialmente útil quando se deseja obter uma amostra mais concentrada para análises subsequentes (Norgen Biotek, 2021). Apesar de a redução do volume de eluição poder diminuir levemente o rendimento total de DNA recuperado, essa prática permite otimizar a concentração da amostra sem comprometer significativamente a qualidade do cDNA (El-Mogy; Simkin; Haj-Ahmad, 2021).

Há ainda uma possibilidade alternativa à utilização dos *kits* comerciais para purificação do produto de PCR, como a precipitação com etanol-acetato de sódio (EtOH-NH₄Ac). Essa abordagem pode proporcionar um rendimento significativamente maior do produto de PCR em comparação aos *kits* comerciais testados em alguns estudos (Al-Saad; Al-Zaalan, 2019). Outra alternativa é a precipitação com polietileno glicol (PEG), que também apresenta bons resultados de purificação (Aksu, 2025).

Um aspecto importante na escolha do método é o tamanho do fragmento de DNA, uma vez que a precipitação com PEG tende a ser mais eficiente para fragmentos acima de 150 pb, enquanto a precipitação com etanol-acetato de sódio é mais eficaz para fragmentos de menor peso molecular (Aksu, 2025).

Além disso, uma das principais vantagens desses métodos consiste no custo mais baixo em relação aos *kits* disponíveis no mercado. No entanto, essas metodologias geralmente demandam mais etapas e maior cuidado operacional, tornando o procedimento mais trabalhoso (Al-Saad; Al-Zaalan, 2019).

Dessa forma, a seleção do método de purificação deve considerar tanto o tamanho do produto de PCR quanto a disponibilidade de tempo e recursos, equilibrando rendimento, eficiência e praticidade.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A identificação das sequências obtidas permitiu caracterizá-las como exoglucanases pertencentes à família GH6, revelando a presença de regiões conservadas, incluindo o sítio ativo e os elementos essenciais para a ação catalítica característica dessas enzimas. A análise *in silico* também revelou a presença do peptídeo sinal, fundamental para o direcionamento das exoglucanases à via secretora, o que indica sua atuação direta na degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal. Parâmetros físico-químicos mostraram que os domínios de ligação a carboidratos influenciam a massa molecular da proteína madura, enquanto o valor de pI sugere caráter ácido.

Esses achados reforçam o papel funcional dessas enzimas na interação patógeno-hospedeiro, evidenciando como a secreção enzimática e as propriedades físico-químicas conservadas, contribuem para a adaptação do fungo ao ambiente e à obtenção de nutrientes a partir do hospedeiro.

Além disso, o alinhamento das sequências obtidas, realizado por meio da ferramenta *BLAST*, revelou alta similaridade com proteínas de *Moniliophthora roreri*, indicando uma relação filogenética próxima entre essas espécies e sustentando a conservação das regiões funcionais das exoglucanases. Observou-se, entretanto, que a sequência 2929 não apresentou correspondência total no sítio ativo em relação à sequência homóloga de *Moniliophthora roreri*, apresentando uma substituição entre aminoácidos hidrofóbicos. Essa alteração, embora represente uma divergência local, tende a preservar as características estruturais do sítio ativo, reforçando a relevância biológica das sequências identificadas.

Os resultados obtidos evidenciam que todos os modelos estruturais gerados demonstraram boa concordância em relação aos moldes utilizados, com poucas divergências observadas. A manutenção de folhas β e α -hélices, bem como a sobreposição de regiões funcionais, incluindo o sítio ativo, reforça a confiabilidade da modelagem realizada. Esse padrão estrutural, característico de glicosil hidrolases, confirma a robustez das predições e sustenta a relevância funcional das proteínas analisadas.

A predominância de materiais lignocelulósicos no meio WY favoreceu o maior desempenho de massa micelial, viabilizando a extração de RNA e a síntese de cDNA. A utilização do *primer* 2928 apresentou desempenho positivo, resultando na amplificação de um fragmento de aproximadamente 1.200 pb, correspondente à região específica do genoma de *Moniliophthora perniciosa*, indicando compatibilidade do *primer* com a sequência alvo. Das quatro sequências desenhadas, apenas esta foi amplificada, possivelmente devido à expressão diferencial dos genes de exoglucanase nas condições do meio WY, à maior afinidade do *primer* utilizado ou a limitações técnicas relacionadas à eficiência dos demais *primers* e à qualidade do RNA extraído.

A integração entre as análises de bioinformática e moleculares reforça a relevância da exoglucanase como uma biomolécula de interesse. A detecção da expressão gênica nos ensaios experimentais fornece evidência funcional de que este gene está ativo nas condições avaliadas, o que se alinha aos achados *in silico* que apontaram a presença de domínios catalíticos conservados, predição de estrutura estável e sinalização secretória.

Esse conjunto de dados, portanto, não apenas confirma a identidade da proteína como uma exoglucanase funcional, mas também sugere seu potencial na degradação de substratos lignocelulósicos, corroborando sua importância em processos biotecnológicos, como a produção de bioetanol.

Dessa forma, a consistência entre os diferentes níveis de análise fortalece a hipótese de que essa exoglucanase pode ser explorada como alvo estratégico para expressão heteróloga, contribuindo para a otimização de bioprocessos.

No que se refere às perspectivas futuras, a expressão heteróloga de uma exoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* possibilitará confirmar sua atividade enzimática e avaliar seu potencial de aplicação em processos de degradação de resíduos lignocelulósicos. Estudos futuros também poderão investigar diferentes condições de cultivo e substratos, a fim de compreender melhor a regulação gênica e a eficiência da produção enzimática, fornecendo informações relevantes para aplicações biotecnológicas em escala laboratorial ou industrial.

REFERÊNCIAS

AKSU, D. A. Effects of Different PCR Product Purification Methods on DNA Sequencing. **Afyon Kocatepe University – Journal of Science and Engineering**, v. 25, p. 234–239, 2025. DOI: 10.35414/akufemubid.1500606.

ALMEIDA, L. E. da S.; RIBEIRO, G. C. A.; APARECIDA de A. B-Glucosidase produced by *Moniliophthora perniciosa*: Characterization and application in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, v. 69., n. 3, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1002/bab.2167.

AL-SAAD, L. A.; AL-ZAALAN, A. R. Short Communication: Evaluating the efficiency of ethanol precipitation method in purification of gDNA and PCR product. **Basrah Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2019. DOI: 10.37077/25200860.2019.174.

ANTUNES, A. M.; CRUZ, L. K. S. da; TELLES, M. P. de C. **Como desvendar enigmas genéticos a partir da comparação de sequências**: Genética na Escola, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 136-145, 2014. Sociedade Brasileira de Genética.

ASMARE, B. Biotechnological advances for animal nutrition and feed improvement. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 115–118, 2014. DOI: 10.12691/wjar-2-3-5.

AUCLAIR, S. M.; BHANU, M. K.; KENDALL, D. A. Signal peptidase I: Cleaving the way to mature proteins. **Protein Science**, v. 21, n. 1, p. 13–25, 2011. DOI: 10.1002/pro.757.

AWOGBEMI, O.; KALLON, V. Daramy Vandí. Pretreatment techniques for agricultural waste. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 6, p. 100229, 2022. DOI: 10.1016/j.cscee.2022.100229.

BAHAMAN, A. H. et al. Molecular docking and molecular dynamics simulations studies on β glucosidase and xylanase from *Trichoderma asperellum* to predict degradation

order of cellulosic components in oil palm leaves for nanocellulose preparation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 7, p. 2628–2641, 2020. DOI: 10.1080/07391102.2020.1751713.

BARBOSA, C. S. et al. Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. **BMC Genomics**, v. 19, p. 509, 2018. DOI: 10.1186/s12864-018-4875-7.

BASERA, P.; CHAKRABORTY, S.; SHARMA, N. Lignocellulosic biomass: insights into enzymatic hydrolysis, influential factors, and economic viability. **Discover Sustainability**, v. 5, n. 1, 2024. DOI: 10.1007/s43621-024-00543-5.

BERNARDES, A. et al. Carbohydrate binding modules enhance cellulose enzymatic hydrolysis by increasing access of cellulases to the substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 57–68, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.108.

BETTS, M. J.; RUSSELL, R. B. **Amino acid properties and consequences of substitutions**. In: BARNES, M. R.; GRAY, I. C. (Ed.). *Bioinformatics for geneticists*. Chichester: Wiley, 2003. p. 289–316. DOI: 10.1002/0470867302.ch14.

BISWAS, P. et al. Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (MOW) paper. **Bio Resources**, v. 14, n. 3, p. 5788–5806, 2019. DOI:10.15376/biores.14.3.5788-5806.

BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 3, p. 769–781, 2004. DOI: 10.1042/BJ20040892.

BRODA, M.; YELLE, D. J.; SERWAŃSKA, K. Bioethanol production from lignocellulosic biomass—challenges and solutions. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8717, 2022. DOI: 10.3390/molecules27248717.

CANTAREL, B. L. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZY): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233–D238, 2009. DOI: 10.1093/nar/gkn663.

CATELAN, T.C.; PINOTTI, L. M. Avanço das pesquisas envolvendo *Aspergillus niger* e bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono visando à produção de celulases: Uma análise bibliométrica. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, n. 2, p. 1-14, 2019. DOI: 10.1590/s1517-707620190002.0691.

CEITA, G. de O. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, v. 173, p. 106-117, 2007. DOI: 10.1016/j.plantsci.2007.04.007.

CHAUHAN, P. S. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review. **Biocatalysis in Agriculture and Biotechnology**, v. 23, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101498.

CHEN, Ye. Advancements and Applications of Protein Structure Prediction Algorithms. **Theoretical and Natural Science**, v. 74, p. 119–127, 2024.

CHINNATHAMBI, V. et al. Molecular cloning and expression of a family 6 cellobiohydrolase gene cbhII from *Penicillium funiculosum* NCL1. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 213-222, 2015. DOI: 10.4236/abb.2015.63021.

COLUSSI, F. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da Celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum* envolvida na hidrólise da biomassa lignocelulósica**. Tese (Doutorado). São Carlos: São Paulo, 2012.

CUTRIM, F. D. A. Influence of culture media and the carbon-nitrogen interaction on growth and sporulation of *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 85 - 88, 2006.

DADWAL, A.; SHARMA, S.; SATYANARAYAN, T. Progress in Ameliorating Beneficial Characteristics of Microbial Cellulases by Genetic Engineering Approaches for Cellulose Saccharification. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01387.

DAVIS, A.M., ST-GALLAY; KLEYWEGT, G. J. Limitations and lessons in the use of X-ray structural information in drug design. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 831–841, 2008. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.06.006.

DILLEY, R.; PAGAN, J.; CHAPMAN, J. Methods for ensuring the highest DNA concentration and yield in nucleic acid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1631, p. 461–470, 2020. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461470.

DEVI, A. et al. Lignocellulosic biomass valorization for bioethanol production: a circular bioeconomy approach. **Bioenergy Research**, v. 15, n. 4, p. 1820–1841, fev. 2022. DOI: 10.1007/s12155-022-10401-9.

EL-MOGY, M.; SIMKIN, M.; HAJ-AHMAD, Y. The Effect of Elution Volume on DNA Quantity and Quality Using Norgen's Saliva DNA Isolation Kit. **Thorold: Norgen Biotek Corporation**, 2021.

EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. **Biomimetics**, v. 6, n. 3, 2021. DOI: 10.3390/biomimetics6030044.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of Cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Química Nova**, v., n. 9, p. 1082-1093, 2017.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. **Totowa**: Humana Press, 2005. p. 571–607. DOI: 10.1385/1-59259-890-0:571.

GERLT, John A.; RAUSHEL, Frank M. Evolution of function in $(\beta/\alpha)_8$ -barrel enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 252–264, 2003. DOI: [10.1016/s1367-5931\(03\)00019-x](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(03)00019-x).

GOUVEIA, G. R. et al. Comparison of three different protocols for RNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded samples. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 649–654, 2011.

GU, Y. et al. Characterization of two thermophilic cellulases from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and their synergistic action on cellulose hydrolysis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0211300.

GUEDES, C. E. S. et al. Enzyme activity of cellulases produced by *Moniliophthora perniciosa*, the causing factor of “witch-broom” in cacao plants. **Magistra**, v. 26, n. 4, p. 545-553, 2014.

HÉMATY, K.; CHERCK, C.; SOMERVILLE, S. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 406 - 413 2009. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.06.007.

HERPOËL-GIMBERT, I. et al. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 18, 2008. DOI:10.1186/1754-6834-1-18.

HIRANO, K. et al. Enzymatic diversity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome is crucial for the degradation of crystalline cellulose and plant biomass. *Scientific Reports*, v. 6, n. 35709, 2016. DOI: 10.1038/srep35709.

IKBAL, M. S., et al. Eco-friendly biopolishing of cotton fabric through wasted sugarcane bagasse-derived enzymes. **Helyon**, v. 10, n. 4, p. 26346, 2024. DOI: 10.1016/j.helyon.2024.e26346.

IGWEBUIKE, C. M.; AWAD, S.; ANDRÈS, Y. Renewable energy potential: second-generation biomass as feedstock for bioethanol production. **Molecules**, v. 29, n. 7, p. 1619, 2024. DOI: 10.3390/molecules29071619.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

JÚNIOR PAZ, F. B. da et al. Evaluation of the proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* isolated from the IFPE — Campus Recife memorial room. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 60502-60508, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n8-459.

KOIVULA, A.; et al. The active site of cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*: The roles of aspartic acids D221 and D175. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 34, p. 10616–10623, 2002. DOI: 10.1021/ja020527b.

LAMBERTZ, C. et al. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 118, p. 135, 2014. DOI: 10.1186/s13068-014-0135-5.

LASKOWSKI, R. A. et al. Knowledge-based validation of protein structure coordinates derived by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 5, p. 731-737, 1994. DOI: 10.1016/S0959-440X(94)80024-4.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 3998, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3791/3998>.

MACHADO, A. S. da. **Estudo de glicosil hidrolases das famílias 6 e 7 provenientes de basidiomicetos**. Tese (Doutorado). Lorena: São Paulo, 2019.

MEINHARDT, L. W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577-588, 2008. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x.

MOMENI, M. H. et al. Structural, biochemical, and computational characterization of the glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolase of the tree-killing fungus *Heterobasidion irregulare*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 8, p. 5861–5872, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.440891.

MORAIS, M. S. et al. Cellulolytic complex produced by two species of phytopathogenic fungi isolate from cassava. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 3, p. 249-253, 2016. DOI: 10.1590/0100-5405/2151.

MURRAY, P. G. et al. Molecular cloning, transcriptional, and expression analysis of the first cellulase gene (cbh2) from *Talaromyces emersonii*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1351–1358, 2003. DOI:10.1128/AEM.05659-11.

NARGOTRA, P. et al. Microbial lignocellulolytic enzymes for the effective valorization of lignocellulosic biomass: a review. **Catalysts**, v. 13, n. 1, p. 83, 2023. DOI: 10.3390/catal13010083.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogen defense in plants.

Bulgarian Journal Plant Physiology, v. 27, n.1-2, p. 101-109, 2001.

OGUNJOBI, T. T., et al. *Bioinformatics tools in protein analysis: structure prediction, interaction modelling, and function relationship*. **European Journal of Sustainable Development Research**, v. 9, n. 3, 2025. DOI: <https://doi.org/10.29333/ejosdr/16340>.

PEARCE, R.; ZHANG, Y. Toward the solution of the protein structure prediction problem. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 1, 2021. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100870.

PEIRSON, S. N. et al. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 14, p. e73, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gng073>.

PRÜCKLER, M. et al. Wheat bran-based biorefinery 1: composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT-Food Science Technology**, v. 56, n. 2, p. 211–221, 2014. DOI:10.1016/j.lwt.2013.12.004.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283–438, 1968. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60402-7.

RAVEENDRAN, S., et al. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018. DOI: 10.17113/ftb.56.01.18.5491.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.07.106.

REGITANO, L. C. A. et al. **Protocols in molecular biology applied to animal production**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

RINCONES, J. et al., Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America. **Mycological research**, v. 100, n. 7, 821-832, 2006. DOI: 10.1016/j.mycres.2006.05.002.

RIVERO-PINO, F.; MILLAN-LINARES, M. C.; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, S. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties, bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 138, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.023>.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **National Library of Medicine**, v. 56, n. 2, 2018. DOI: 10.17113/ftb.56.02.18.5428.

RODRIGUES, C. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. IN: RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria**. 1ª ed. São Paulo: Edgar Blucher Ltda, v. 04, 2017. Cap. 8, p. 283-314, 2017.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000800018.

SANTANA, M. L. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulases de *Moniliophthora perniciosa***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

SANTANA, R. S. et al. Caracterização da enzima oxidase alternativa do fungo *Moniliophthora perniciosa* com o auxílio das ferramentas de bioinformática. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81420–81430, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n10-533.

SANTANA, C. S. de. et al. **Molecular and structural characterization of cDNA from a cellulase of *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora**. Sete Editora, 2023.

SANTOS, F. A. **Produção de celulase por *Penicillium sp.* FSDE 15 e hidrólise enzimática do sabugo de milho**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal da Paraíba, 2015.

SANTOS, R. L. et al. Região Cacaueira Pós- Vassoura de bruxa: Uma Análise do Uso e Ocupação do Solo. **Revista 39 Foco**, v. 16, n. 6, 2023. DOI: 10.54751/revistafoco.v16n6-124.

SCHRÖDINGER, L. L. C. **The PyMOL Molecular Graphics System**. New York: Schrödinger; 2009.

SILVA, G. A. et al. Fungo do cerrado com potencial para produção de enzima celulase. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 2, p. 1–8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5555/20209910023>.

SILVA, R. A. da. **Caracterização molecular e estrutural de quitinases de *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 135–145, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.

SIGRIST, C. J. A. et al. New and continuing developments at PROSITE. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D344–D347, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>.

SIKIC, K.; TOMIC, S.; CARUGO, O. Systematic comparison of crystal and NMR protein structures deposited in the Protein Data Bank. **The Open Biochemistry Journal**, v. 4, p. 83–92, 2010. DOI: 10.2174/1874091X01004010083.

SOBRI, M. F. et al. In-Silico Characterization of Glycosyl Hydrolase Family 1 β -Glucosidase from *Trichoderma asperellum* UPM1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, 2020. DOI: 10.3390/ijms21114035.

SOLÍS, N. et al. Use of Cellulase enzyme obtained from *Monilia (Moniliophthora roreri)* for treatment of soli waste of Cob, Rice husks and Cocoa shell. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 03, p. 66-70, 2016. DOI: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60311>.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 6, p. 416-425, 2007. DOI: 10.1016/j.biombioe.2007.01.023.

SONI, S. K.; SHARMA, A.; SONI, R. Cellulases: Role in lignocellulosic biomass utilization. **Methods In Molecular Biology**, V. 1796, p. 3-23, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_1.

SRIVASTAVA, A., *et al.* Role of Computational Methods in Going beyond X-ray Crystallography to Explore Protein Structure and Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19113401>.

STEVENS, A. O; He Y. Benchmarking the accuracy of AlphaFold 2 in loop structure prediction. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, 2022. DOI: [10.3390/biom12070985](https://doi.org/10.3390/biom12070985).

TBAHRITI, H. F. *et al.* Comprehensive review and meta-analysis of magnesium chloride optimization in PCR: Investigating concentration effects on reaction efficiency and template specificity. **Analytical Biochemistry**, v. 705, p. 115909, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2025.115909>.

TEIXEIRA, J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. D. T.; PEREIRA, G. A. G. Time for Chocolate: Current Understanding and New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 10, p. 1-8, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005130>.

TEIXEIRA, P. J. *et al.* The fungal pathogens *Moniliophthora perniciosa* has genes similar to plant PR-1 that are highly expressed during its interaction with cacao. **PLOS One**, v. 7, n. 9, p. 45929, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045929>.

TERRAPON, N. *et al.* **The CAZy database/the carbohydrate-active enzyme (CAZy) database: principles and usage guidelines.** In: KINOSHITA, K. (Ed.). *A practical guide to using glycomics databases*. Tokyo: Springer Japan, 2016. p. 117–131. DOI: https://doi.org/10.1007/978-4-431-56454-6_6.

TEUFEL, F. *et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1023–1025, 3 jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>.

THOMPSON, A. J. *et al.* Structure of the catalytic core module of the Chaetomium thermophilum family GH6 cellobiohydrolase Cel6A. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 8, p. 875-882, 2012. DOI: [10.1107/S0907444912016496](https://doi.org/10.1107/S0907444912016496).

VENTORINO, V. et al. Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2061, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02061.

VÁZQUEZ-ORTEGA, P. G. et al. Expression of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Escherichia coli* using a synthetic optimized gene and stability improvements by immobilization using magnetite nano-support. **Protein Expression and Purification**, v. 190, 2022. DOI: 10.1016/j.pep.2021.106009.

VARADI, M. et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 52, p. D368–D375, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>.

VERLI, H. **Bioinformatics: from biology to molecular flexibility**. 1. ed. Porto Alegre, 2014.

VITOR, A. B. et al. Cloning, heterologous expression and characterization of β -glucosidase deriving from *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime and Phillips Mora. **3 Biotech**, v. 14, n. 11, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-04128-x>.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Reserach**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018. DOI:10.1093/nar/gky427.

WHEELER, David; BHAGWAT, Medha. **BLAST QuickStart: exemplo prático de tutorial baseado na web**. In: MITCHELL, Alan et al. (Ed.). *Comparative Genomics*. Totowa, NJ: Humana Press., p. 179–205, 2007. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-514-5_9.

ZEESHAN, N.; NAZ, S.; NAZ, S.; AFROZ, A.; ZAHUR, M.; ZIA, S. Heterologous expression and enhanced production of β -1,4-glucanase of *Bacillus halodurans* C-125 in *Escherichia coli*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 34, 2018. DOI: 10.1016/j.ejbt.2018.05.001.

ZHANG, H. et al. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W95 – W101, 2018;46. DOI:10.1093/nar/gky418.

YAMAGUCHI, S. et al. Thermotolerance mechanism of fungal GH6 cellobiohydrolase. Part II. Structural analysis of thermotolerant mutant from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 71, n. 2, p. 63–72, 2024. DOI: https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2023_0018.

YAN, S.; XU, Y.; YU, X. From induction to secretion: a complicated route for cellulase production in *Trichoderma reesei*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 107, 2021. DOI: 10.1186/s40643-021-00461-8.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Sequência nucleotídica do gene identificado como 2927, obtida a partir do genoma de *Moniliophthora perniciosa*. As sequências correspondentes ao desenho dos *primers* direto (F) e reverso (R) estão destacadas em vermelho.

>2927_g SCAF_50 175735 177791 1

ATGATCAAGTCTACTGCCCTCCTTTCTCTGGTCGCTCTGGCGCCTCTAGTCGCTCGTGCG**CAG**
TCTCCCGTCTGGGGTCAGTGCGGAGGAATTGGCTGGTCGGGTTCCACCTCCTGCGCCTCGGG
 CTCGAGCTGCGTGAAGCAGAACGATTATTACTCTCAATGCATGCCAGGAAGCTCAGTTCCAC
 CACGACTGTCGCTCAACCTCCGTCCTCCACTGCTGGACCAACTGGCACCGCCACTACTTCCCG
 ACCAACATCTAGTACAACACCCTCTGCTGACAACCCTTACAATGGCTATGAGATCTTCCTCAGT
 CCCTTCTACGCCAACGAAGTCCAAGCCGCTTCGACTGCTATTGGTGACTCCTCTTTAAAGTCCA
 AGGCTGCGGGTATCGCAAACATTCCGACCTTCACATGGTTCGATACAATTTCAAAGCTACCCG
 ACCTAGGGACATCGCTTTCCCAAGCTAGTGCCCAAGGAAAGTCTACGGGAAAGAAGATGCTCG
 TTCAGATCATCGTCTACGACTTACCCGACCGTGACTGTGCTGCTTTGGCTTCCAACGGTGAAC
 GAGCATTGCCAATGATGGTGAAACCAAATACCACGGCTATATCGATGGGCTCGTCGAACAAAT
 TCAGCAATACCCCGATGTGAGGGTGGTTGCGATAGTGGAACCCGATTCTCTAGCCAACCTTGT
 CACCAACATGAACGTGCAGAAGTGTGCGAACGCCGCTGCCAGGAGCGTCACCTACGCAATGC
 AGCAGCTCAATACCGTTGGTGTGTACATGTATCTGGACGCGGGGCACGCAGGTTGGCTTGGTT
 GGCCTGCAAACCTTGGGTCCTGCAGCACAGATGTTCCAACAGCTCTACACTGACGCTGGATCTC
 CAAAATTCGTCCGTGGCTTAGCTACTAACGTTGCTAATTACAATGCTCTGTCTGCTTCCACCCC
 AGACCCAATCACCCAAGGCAACAACAACACTACGACGAGATCCACTACATTCAGGCACTTGCCGG
 CGTTTTGGGTTCAATCCCTGCTCACTTCATCGTTGATCAAGGTCGATCTGGTCAGCAGAACATT
 CGTCAACAGTGGGGTGACTGGTGCAACGTCAAGGGCGCCGGCTTTGGAACGCGTCCTACGTT
 GAACACTGGTTCACTCACTCATCGACGCCATTGTGTGGGCCAAACCAGGTGGTGAGAGTGACG
 GAACCAGCGACTCCTCTTCTGTTGCTTTGATGCTCACTGTGGTCAATCTGATGCGTTCATGCC
 AGCTCCCGAAGCTGGAACCTGGTTCCAAGCATACTTTGAGCAATTGGTCTCCAAAGCT**AACCC**
ACCATTGTAA

APÊNDICE B: Sequência nucleotídica do gene identificado como 2928, obtida a partir do genoma de *Moniliophthora perniciosa*. As sequências correspondentes ao desenho dos *primers* direto (F) e reverso (R) estão destacadas em vermelho.

>2928_g SCAF_50 178877 180502 1

ATGAAGACCTCTTTCGTTTTGCTCGCTGCTCTCGTCGGCCTCGCGGTTGCT**ACTCCCGTCTCT**
CCCATCAAGAAGCGCCAGGTCACTCTCGAGGGTAACCCCTTCGAGGGCCGCACCCTCCATGC
 TAACAGCCGATACCGTGCAGAGGTGAGGCTGCTGCCGGAACCTCACGGACCCAAGCTTGG
 AGGCGGCAGCTCTCAGGGTTGCTGATATTGGAACCTTCTTGTGGCTTGATACTATTTCCACCGT
 CTAACCTTTCGAAAGCATCCTCACGGAAACCGGTGAAAATGAGATCTTTGGTGTGTGTCATCTAC
 GACCTGCCAGGACGTGATTGCGCTGCCAAAGCTTCAAACGGTGAGCTCGCTGTGCGAGAGAT
 CGATAGGTACAAGAGCGAGTACATTGACCCATTGTGCGGATTGTCGAGGCACACCCCGATAT
 TGCAATTGCCGCTGTAATTGAGCCCGAGCAACAATCTGCCGCCGGATACAGAGAAGGTGTTCA

```

GTACGCCCTCAGCAGCTTGAACCTACCCAACGTTGCTATGTACATTGACGCCGGACATGGTGG
CTGGTTAGGCTGGGACGCCAACCTTCAACCAGGTGCACAGGAACTCGCGGCTGCTTAACTG
GTGCTGGTTCTCCTTCCTCCGTCCGTGGATTGCCACGAACGTTGCTGGCTGGAATGCAGTCC
AACAAAACCCCGGTGAATTCGAAAACGCACCTGATGGCCAATACAACAAGGCTCAGGACGAAG
ATCGTTACGTTACCCTCTTCGGAGCTGCTCTAGCTTCCGCTGGTATGCCCAACCATGCTATCGT
TGAACTGGTAGGGATGGTGTACTGGCCTCAGGGACGAGTGGGGTGAAGTGGTGAACGTCG
ACGGTGCCGGTTTCGGTGCTAGGCCACGACCAGCACGGTTAACGACTTGATGGACGCTTAC
GTTTGGGTCAAGCCCGGTGGTGAATCTGACGGAACCTCCGACACCTCTGCTACCCGCTACGAC
TCTTTCTGCGGTAACGCTGATGCCTACAAGCCATCTCCCGAAGCCGGAACCTTGAACCAAGCC
TACTTCGAAATGCTGCTCAGGAATGCCAACCCCCGATCTAA

```

APÊNDICE C: Sequência nucleotídica do gene identificado como 2929, obtida a partir do genoma de *Moniliophthora perniciosa*. As sequências correspondentes ao desenho dos primers direto (F) e reverso (R) estão destacadas em vermelho.

```

>2929_g SCAF_50 181422 183335 1
ATGAAATCTACTGGTTTAATCGCTTTGGCTGCGTTGCTGCCTTTCGCCTGGGCACAGTCACCC
GCCTGGGCTCAATGTGGAGGGATCGGGTGGTCGGGACCCACTACTTGTGCGTCTGGTTCTAC
CTGTACCAAGGTAAATGACTACTACTCACAGTGCATTCTGGATCCGACCCTGGCAATCCTGG
ACCAACTTCTTCGAGCACTCTTTCTTCTACCGCGGCGCCCCCTACCAATACCCAGTCACCTGTA
GAGGATAACCCATATACAGGCTACACCATCTACCTCAGCCCTTACTACGCCGATGAAATTGAC
GCTGCTGCTGCCAAGATCACCGATCCCACTTTGAAAGTTCAGGCTCTCAAAGTGAAGGAAATT
CCAACATTCATCTGGTTCGATACCACCGCCAAACTGTCTACTCTGGAACCATATCTCAAGGACG
CTAGCGCCAAAGGAAAGGCTGAGGGCAAGAAGTACCTTCTCCAAATAGTGGTTTACAACCTTC
CGGAACGTGATTGTGCTGCCTTGGCATCTAACGGCGAGCTCAGCATCGACAACGGGGGTGAA
GTGAAGTACCGTGAATATATCGACACAATGGTTGCCACCATCAAGAAATACCCCGATGTCAGA
GTGGTTGCGGTAGTTGAACCCGACTCGCTGGCCAACTTGGTCACCAATCTCAACGTCCAGAAG
TGCAGCAAAGCTCAGACTATCTACAAGACTTCTACGCAATACGCCTTGAAACAACCTCGATACCG
CTGGTGTATACATGTACTTGGATGCTGGTCACGCAGGCTGGCTTGGCTGGCCTGCGAACCTGA
CTCCTACTGCTCAGCTCTTCCAGCAGGTCTGGCAGGATGCTGGTTCGCCCAAGTTTGTCCGCG
GATTGGCAACCAATGTTGCTAACTTTAATGCGCTTCGGGCCGCCTCACCTGATCCTGTTACTTC
GCAAATCCCAACTACGATGAAATCCACTACATCGAGTCCCTTGCCGATACTCTCTCGCCTTTC
CCAGCTCACTTCATCGTTGACCAGGGGCGAGCTGGTCAACAGAATTTGAGGAAGGAGTGGGG
TGAAGTGGTGAACGTCAAGGGCGCTGGATTCCGGGACTCGTCCTACCACCAACACCGGGTCAT
CCCTGATTGATTCTATTGTATGGGTGAAACCAGGGGGCGAATCTGACGGAACCGAGCTCCT
CTGCAGCTCGTTTCGACGCAAATGTGTCTCTGCTTCTCTCATGTCCCTGCACCTGAGGCCG
GAACTTGGTTCCAAGAGTACTTTGAGGCCTTGGTCCGCAATGCCAACCCTGCCCTCTAA

```

APÊNDICE D: Sequência nucleotídica do gene identificado como 4282, obtida a partir do genoma de *Moniliophthora perniciosa*. As sequências correspondentes ao desenho dos primers direto (F) e reverso (R) estão destacadas em vermelho.

>4282_g SCAF_10 283296 284946 1

```

ATGAAGACCGTCTCGGCTTTACTGTCAATCGCTGCTGCTACTGGGTGCTGCTACAGCCTCTCCT
ACGCTGCAGGCTCGCGCACCGTGACGACTGCGGTCAGATTATCGGGCAACCCATTCCAAGG
ACGTACGCTCCATGCGAACAACCACTATGGTGACTACGTCCGTGCTGCGGCCAACCGGATCA
GCGATTCTTCGTTGAAGCAGAAGGCGCTGGCAGTTGCCAATGTCGGGACTTTCTTGTGGCTTG
ATACCATTTCTACCATCCCGACCTTTGAATCCCACCTCACGAATACGAGTTGCAACGAAATCTT
TGGTGTGTCATCTATGACTTACCCGGACGCGACTGTGCTGCCAAGGCATCGAACGGTGAAC
CCCTGTGCGGCTCGATCAACAGGTACAAGACCGAGTACATCGACCCCATTTGTCAGGATCATCAA
GGCCACCCGGAGGTGGCAATTGCGGCGGTTCATCGAGCCCGAGCAATCTTCTGCCTCGGGAT
ACAGAGAAGGTGTTTCAGTATGCTCTTCGCAACTTGAACCTTCCCAACGTCGCTATGTACATCGA
CGCCGGACATGGTGGTTGGCTCGGCTGGGACGCCAATCTCCAACCGGGTGCGCAGGAACTT
GCCAACGCCTACAAAGGTGCTGGCTCGCCCGCCTCAGTCCGTGGATTGCGCACCAACGTCGC
TGGATGGAACGCATGGAAGAAGGTTCCCGGTGAATTCGAGAACACAGCTGACGGTCAGTACA
ACAAGTGCCAGGATGAGGACCGATACGTGACTAGGTTTGGTGCTTCCTTGGCTTCTGCTGGTA
TGCCCAATCACGCTATCGTCGATACCGGAAGGAATGCTGTCCAGGGATTGAGGCAGGAGTGG
GGTCATTGGTGCAACGTGAACGGTGCTGGATTGCGGTGTCAGGCCAACGACTAGCACATCCAAT
ACGCTTGCTGATGCATTTGTTTGGGTCAAGCCCGGTGGTGAATCCGATGGAACCTTCTGATACTT
CTGCTACTCGCTACGATTCTTTCTGTGGTGAATCCGATGCTTTCAAGCCAAGCCCTGAAGCTG
GCCAATGGAACCAAGCGTACTTTGAGATGTTGCTCAAGAACGCCATTCCTTCCTTCTGA

```

APÊNDICE E: Alinhamento entre a Seq_2927 de *Moniliophthora perniciosa* e a Seq_ESK94155.1 de *Moniliophthora roreri*, apresentando 95,27% de identidade. Em amarelo, o sitio ativo; em verde, o resíduo catalítico e, em azul, as regiões não correspondentes (gaps).

2927	MIKSTALLSLVALAPLVARAQSPVWGQCGGIGWSGSTSCASGSSCVKQNDYYSQCM PGSS	60
ESK94155.1	MIKSAALLSVVALAPLVARAQSPVWGQCGGIGWSGSTTCASGSSCVKQNDYYSQCM PGSS	60
	****.****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
2927	VPTTTVAQPPSSTAGPTGTATTSRPTSSTTPSADNPYNGYEIFLSPFYANEVQAATAIG	120
ESK94155.1	APT TTVAQPPSSTAGPTSTATTSRPTSSTTPSADNPYNGYEIFLSPFYANEVQAATTDIG	120
	.*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
2927	DSSLKSKAAGIANIPTFTWFDTISKLPDLGTSLSQASAQ GKSTGKKMLVQIIIVYDLPDRD	180
ESK94155.1	DSSLKSKASSVANIPTFTWFDTISKIPDLGTYLSQASAQ GKSTGKKMLVQIIIVYDLPDRD	180
	*****:.:*****:***** ***** ***** ***** *****	
2927	CAALASNGELSIANDGETKYHGYIDGLVEQIQQYPDVRVVAIVEP DSLANLVTNMNVQKC	240
ESK94155.1	CAALASNGELSIANDGEAKYRGYIDSLVEQIQQYPDVRVVAIVEP DSLANLVTNMNVQKC	240
	*****:.*:****.*****:*****:*****:*****:*****:*****	
2927	ANAAARSVTYAMQQ LNTVGVMYLDAGHAGWLGPANLGPAQM FQQLYTDAGSPKF	297
ESK94155.1	ANAAAVYKRSVVYAMQQ LNTVGVMYLDAGHAGWLGPANLGPAQM FQQLYTDAGSPKF	300
	***** ***.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
2927	VRGLATNVANYNALSASTPDPITQGNNNYDEIH YIQALAGVLGSFPAHFIVDQGRSGQQN	357
ESK94155.1	VRGLATNVANYNALSASTPDPITQGNSNYDEIH YIQALSGVLGSFPAHFIVDQGRSGQQN	360
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
2927	IRQQWGDWCNVKGAGFGTRPTLNTGSSLIDAIVWAKPGGESDGTSDSSSVRFDAHCGQSD	417
ESK94155.1	IRQQWGDWCNVKGAGFGMRPTLNTGSSLIDAIVWAKPGGESDGTSSSVRFDAHCGQSD	420
	***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
2927	AFMPAPEAGTW FQAYFEQLVSKANPPL	444
ESK94155.1	AFIPAPEAGTW FQAYFEQLVSKANPPL	447
	** :*****:*****:*****:*****:*****:*****	

Fonte: CLUSTAL, 2025

* Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

: Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

. Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

APÊNDICE F: Alinhamento entre a Seq_2928 de *Moniliophthora perniciosa* e a Seq_KTB38245.1 de *Moniliophthora roreri*, apresentando 92,14% de identidade. Em amarelo, o sítio ativo; em verde, o resíduo catalítico e, em azul, as regiões não correspondentes (gaps).

```

2928      MKTSFVLLAALVGLAVATPAPPIKKRQVTLEGNPFEGRTLHANSRYRAEVEAAAGNLTD 60
KT38245.1 MKSSFVLLAALVGLAVATPTLPVKKRQVTLEGNPFQGRTLHANGRYRQEVEAAAGNLTD 60
          **:*****: *:*****:*****.*** *****

2928      SLEAAALRVADIGTFLWLDTISTVSTFESILTETGENEIFGVVIYDLPGRCAAKASNGE 120
KT38245.1 SLQEAALKVADVGTFLWLDTISTIESFESYLTETGENEIFGVVIYDLPGRCAAKASNGE 120
          **: ***:***:*****:.:*** *****

2928      LAVGEIDRYKSEYIDPIVAIVEAHPDIAIAAVIEPEQQSAAGYREGVQYALSSLNLPNVA 180
KT38245.1 LAVGEIDRYKSEYIDPIAAIEAHPDIAIAAVIEPEQQSAAGYREGVQYALSSLNFPNVA 180
          *****.**:*****:*****

2928      MYIDAGHGGWLGWDANLQPGAQELAAAYTGAGSPSSVRGFATNVAGWNAVQQNPGEFENA 240
KT38245.1 MYIDAGHGGWLGWDANLQPGAQELAAAYTGAGSPSSVRGFATNVAGWNAVQQVPGEFENA 240
          *****

2928      PDGQYNKAQDEDRYVTLFGAALASAGMPNHAIVDTGRDGVGTGLRDEWGDWCNVDGAGFGA 300
KT38245.1 PDGQYNKAQDEDRYVTLFGAALAAAGMPNNAIVDTGRDGVGTGLRDEWGDWCNVNAGFGM 300
          *****:*****:*****:*****

2928      RPTTSTVNDLMDAYVWVKPGGESDGTSDTSATRYDSFCGNADAYKPSPEAGTWNQAYFEM 360
KT38245.1 RPTTSTVNSLMDAYVWVKPGGESDGTSDTSAARYDSFCGNPDAFKPSPEAGTWNQAYFEM 360
          *****.*****:***** **.:*****

2928      LLRNANPPI 369
KT38245.1 LLKNANPPF 369
          **:****:

```

Fonte: CLUSTAL, 2025

* Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

: Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

. Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

APÊNDICE G: Alinhamento entre a Seq_2929 de *Moniliophthora perniciosa* e a Seq_ESK94153.1 de *Moniliophthora roreri*, apresentando 92,01% de identidade. Em amarelo, o sitio ativo; em verde, o resíduo catalítico e, em azul, as regiões não correspondentes (gaps).

2929	MKSTGLIALAALLPFAWAQSPAWAQCGIGWSGPTTCASGSTCTKVNDYYSCIPGSDPG	60
ESK94153.1	MKSAGLVALAASLPFALAQSPAWQCGIGWSGPTSCASGSTCTKVDDYYSCIPGSNPG	60
	::*** **	
2929	NPGPTSSSTLSSTAAPPTNTQSPVEDNPYTYGYTIYLSPPYADEIDAAAKITDPTLKVQA	120
ESK94153.1	NPESTSTTPSSTVAPPTNTQPPVADNPYTYGYTIYLSPPYADEIDAAAANITDSTLKAKA	119
	** **: * **	
2929	LKVKEIPTFIWFDTTAKLSTLEPYLKDASAKGKAEGKKYLLQI	180
ESK94153.1	LKVKEIPTFIWFDTTAKLSTLEPYLKDASAKGKAEGKKYLLQI	179

2929	ELSIDNGGEVKYREYIDTMVATIKKYPDVRV	240
ESK94153.1	ELTIDNGGEAKYRQYIDAMVATIKKYPDVRV	239
	** :***** .***:***:*****:*****:***:*	
2929	TSTQYALKQLDTAGVYMYLDAGHAGWLGPANLTPAQLFQQVWQDAGSPKFVRGLATNV	300
ESK94153.1	TSTQYALKQLDTAGVYMYLDAGHAGWLGPANLTPAAQLFQQVWQDAGSPKSVRGLSTNV	299
	*****:***** **	
2929	ANFNALRAASDPVTSQNPNYDEIHYIESLADTLSPFPAHFIVDQGRAGQQNLRKEWGDW	360
ESK94153.1	ANFNALRAASDPVTSQNPNYDEIHYIESLAGVLSPPFAHFIVDQGRAGQQNLRKEWSDW	359
	***** .***** .**	
2929	CNVKGAGFGTRPTTNTGSSLIDSIVWVKPGGESDGTSDSSAARFDAKCVSASSHVPAPPA	420
ESK94153.1	CNVKGAGFGTRPTINTGSSLIDSIVWVKPGGESDGTSDSSAARFDAGCVSASSHVPAPPA	419
	***** *****	
2929	GTWFQEYFEALVRNANPAL	439
ESK94153.1	GTWFQEYFEALVRNANPAL	438

Fonte: CLUSTAL, 2025

* Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

: Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

. Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

APÊNDICE H: Alinhamento entre a Seq_4282 de *Moniliophthora perniciosa* e a Seq_KTB29514.1 de *Moniliophthora roreri*, apresentando 93,32% de identidade. Em amarelo, o sitio ativo; em verde, o resíduo catalítico e, em azul, as regiões não correspondentes (gaps).

```

4282      MKTVSALLSIAAVLGAATASPTLQARAPCTTAVRLSGNPFQGRTLHANNHYGDYVRAAAN 60
KTB29514.1 MKTVSALLSIAAVLGAATASPTLQARAPCTTPVRISGNPFQGRTLYANSHYGDYVRAAAN 60
*****
*****

4282      RISDSSLKQKALAVANVGTFWLWDTISTIPTFESHLTNTSCNEIFGVVIYDLPGRDCAAK 120
KTB29514.1 QISDSSLKQKALAVANVGSFLWLDISTISTFEQHLRNTSCSEVFGVVIYDLPGRDCAAK 120
:*****
*****

4282      ASNGELPVGSIINRYKTEYIDPIVRIIKAHPEVAIAAVIEPEQSSASGYREGVQYALRNLN 180
KTB29514.1 ASNGELAVGEINRYKTEYIDPIVKIIKAHPEVAIAAVIEPEQASASGYREGVQYALRNLN 180
*****
*****

4282      LPNVAMYIDAGHGGWLGDANLQPGAQELANAYKGAGSPASVRGFATNVAGWNAWKVPG 240
KTB29514.1 LPNVAMYIDAGHGGWLGDANLQPGAQELANAYRGAGSPASVHGFATNVAGWNAWKVPG 240
*****
*****

4282      EFENTADGQYNKCQDEDRYVTRFGASLASAGMPNHAIVDTGRNAVQGLRQEWGHCNVNG 300
KTB29514.1 EFENAPDGQYNKCQDEDRYVTRFGAALASAGMPNHAIVDTGRNAVQGLRQEWGHCNVNG 300
****: *****
*****

4282      AGFGVRPTTSTSNLADAFVWVKPGGESDGTSDTSATRYDSFCGESDAFKPSPEAGQWNQ 360
KTB29514.1 AGFGVRPTTSTSNLADAFVWVKPGGESDGTSDTSAARYDSFCGYPDFAFKPSPEAGQWNQ 360
*****
*****

4282      AYFEMLLKNAIPSF 374
KTB29514.1 AYFEMLLRNAIPSF 374
*****
*****

```

Fonte: CLUSTAL, 2025

* Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

: Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

. Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

APÊNDICE I: Alinhamento entre resíduos de aminoácidos da sequência Seq_2928 de *Moniliophthora perniciosa* e o molde. Em amarelo, a assinatura do sítio ativo; e, em verde, o resíduo catalítico.

2928	MKTSFVLLAALVGLAVATPAPPIKKRQVTLEGNPFEGRTLHANSRYRAEVEAAAGNLTD	60
V2YR75.1.A	MKSSFVLLAALVGLAVATPTLPVKKRQVTLEGNPFQGRTLHANGRYRQEVEAAAGNLTD	60
	** : ***** : * : ***** : ***** . *** *****	
2928	SLEAAALRVADIGTFLWLDTISTVSTFESILTETGENEIFGVVIYDLPGRDCAAKASNGE	120
V2YR75.1.A	SLQEAAALKVADVGTFLWLDTISTIESFESYLTETGENEIFGVVIYDLPGRDCAAKASNGE	120
	** : *** : *** : ***** : . : *** *****	
2928	LAVGEIDRYKSEYIDPIVAIVEAHPDIAIAAVIEPE-----QQAAGYREG	166
V2YR75.1.A	LAVGEIDRYKSEYIDPIAAIEAHPDIAIAAVIEPDSLPNLVTNSDLATCQAAGYREG	180
	***** . ** : ***** : *****	
2928	VQYALSSLNLPNVAMYIDAGHGGWLGWDANLQPGAQELAAAYTGAGSPSSVRGFATNVAG	226
V2YR75.1.A	VQYALSSLNFPNVAMYIDAGHGGWLGWDANLQPGAQELAAAYTGAGSPSSVRGFATNVAG	240
	***** : *****	
2928	WNAVQQNPGEFENAPDGQYNKAQDEDRYVTLFGAALASAGMPNHAIVDTGRDGVGTGLRDE	286
V2YR75.1.A	WNAVQQVPGEFENAPDGQYNKAQDEDRYVTLFGAALAAAGMPNNAIVDTGRDGVGTGLRDE	300
	***** ***** : ***** : *****	
2928	WGDWCNVGDGAGFGARPTTSTVNDLMDAYVWVKPGGESDGTSDTSATRYDSFCGNADAYKP	346
V2YR75.1.A	WGDWCNVNGAGFGMRPTTSTVNSLMDAYVWVKPGGESDGTSDTSAARYDSFCGNPDAFKP	360
	***** : ***** ***** . ***** : ***** ** : **	
2928	SPEAGTWNQAYFEMLLRNANPPI	369
V2YR75.1.A	SPEAGTWNQAYFEMLLKNANPP-	382
	***** : *****	

Fonte: CLUSTAL, 2025

* Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

: Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

. Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

APÊNDICE J: Alinhamento entre resíduos de aminoácidos da sequência Seq_4282 de *Moniliophthora perniciosa* e o molde. Em amarelo, a assinatura do sítio ativo; e, em verde, o resíduo catalítico.

4282	MKTVSALLSIAAVLGAATASPTLQARAPCTTAVRL--SGNPFQGRTLHANNHYGDYVRAA	58
A0A0D7B3Z0.1.A	MRLSSTFLSLSTAITAVLAAPSVNKRAACSSAVTIAQSENPFSGRTLHANAKYREEVETA	60
	*: *:***::: *: *:***: ** *:***: * ***.***** *: *:***	
4282	ANRISDSSLKQKALAVANVGTFWLDTISTIPTFESHNTNTSCNEIFGVVIYDLPGRDCA	118
A0A0D7B3Z0.1.A	VAAITDSSLKAKAAKVADVGSFLWLDTISTIPSFEGYLNQTSCEEIFGVVIYDLPGRDCA	120
	. *:***** ** **:***:*****:***:*.**:***:*****	
4282	AKASNGELPVGSIINRYKTEYIDPIVRIIKAHPEVAIAAVIEPE-----QSS	164
A0A0D7B3Z0.1.A	AKASNGELATGQLSTYKTQYIDPIVSIKANPNIAIAVIEPDSLPLVNTSNLTTCQSA	180
	***** .*.:. **:***** **:***:***:*****: **:	
4282	ASGYREGVQYALRNLPNVAMYIDAGHGGWLGWDANLQPGAQELANAYKGAGSPASVRG	224
A0A0D7B3Z0.1.A	ASEYREGVAYALKQLNLPNVAMYIDAGHGGWLGWNDNLTPGATELANAYKNAGSPSSVHG	240
	** ***** **:***:*****: ** *** *****.*****:***:	
4282	FATNVAGWNAWKVPGEFENTADGQYNKCQDEDRYVTRFGASLASAGMPNHAIVDTGRNA	284
A0A0D7B3Z0.1.A	VASNVAGWNAWIKNPGEFENTPDGQYNKAQDESRVQYFGAALSSAGMPNHFIIDTGRNA	300
	.*:***** * ***** *****.***.*** **:***:***** *:*****	
4282	VQGLRQEWGHCNVNGAGFGVRPTTSTSNLADAFVWVKPGGESDGTSDTSATRYDSFCG	344
A0A0D7B3Z0.1.A	VQGLRLEWGDWCNVKGAGFGVRPTETTGNSLADAFVWVKPGGESDGTSDSSATRYDSFCG	360
	***** ***.***:*****:*.**:***:*****:*****	
4282	ESDAFKPSPEAGQWNQAYFEMLLKNAIPSF	374
A0A0D7B3Z0.1.A	KDDAYKPSPEAGTWNQAYFEELIKNAVPSF	390
	:.***:***** ***** *:***:***	

Fonte: CLUSTAL, 2025

* Identidade de todos os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

: Similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada.

. Baixa similaridade dos resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada

- Não há similaridade entre os resíduos de aminoácidos alinhados na coluna indicada