



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



RAQUEL AGUIAR DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTRUTURAL DE
QUITINASES DE *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL)
AIME & PHILLIPS-MORA**

Feira de Santana, BA
2018

RAQUEL AGUIAR DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTRUTURAL DE
QUITINASES 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.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides
Co-orientador: Profa. Dra. Sandra Aparecida Assis

Feira de Santana, BA
2018

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

S583c Silva, Raquel Aguiar da
Caracterização molecular e estrutural de quitinases de
Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime & Phillips-Mora./ Raquel
Aguiar da Silva. – 2018.
82f.: il.

Orientadora: Raquel Guimarães Benevides
Co-orientadora: Sandra Aparecida Assis
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

1.Vassoura-de-Bruxa. 2.Quitinases. 3.Modelagem comparativa.
I.Benevides, Raquel Guimarães, orient. II.Assis, Sandra Aparecida, co-
orient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU : 582.28|

*Por ser para mim um exemplo de
coragem e perseverança. Por todas
as palavras de apoio e incentivo.
Pela dedicação e paciência.
Sem você eu não teria conseguido.
Com amor, à minha mãe dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e minha irmã pelo carinho, incentivo e suporte em todos os momentos. Vocês são os maiores responsáveis por todas as minhas conquistas.

Às pessoas que direta e indiretamente influenciaram na minha formação.

À UEFS e ao PPG em Biotecnologia, na figura dos professores e colegas que compartilharam comigo parte de suas vivências e conhecimentos.

À professora e orientadora Raquel Guimarães Benevides pela confiança e por me guiar durante o desenvolvimento da pesquisa científica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A quitina é considerada o segundo biopolímero mais importante da natureza. O acúmulo natural no meio ambiente é incompatível com sua produção ininterrupta, o que demonstra que existem mecanismos naturais responsáveis por sua degradação. As enzimas quitinolíticas encontradas em quase todos os tipos de seres vivos são alvo de grande interesse na biotecnologia porque permitem a degradação da quitina em derivados úteis para vários setores produtivos da economia, em destaque as de origem fúngica. Diante desse panorama, a caracterização molecular a partir de extração de RNA e amplificação do cDNA e a análise de estruturas 3D por modelagem comparativa de sequências de quitinases obtidas do genoma de *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA foram direcionadas para este estudo. O fungo cultivado em meio WY durante 8-10 dias cresceu vigorosamente em condições em que o farelo de trigo estava bem triturado. Como a expressão da quitinase é crucial para o crescimento do fungo, esse meio foi considerado satisfatório para a extração de RNA. O método tradicional de Trizol foi mais favorável do que o uso de kits para extração de RNA. Para a detecção de expressão de quitinases de *M. perniciosa* a partir de amplificação de cDNA, encontramos fragmentos relacionados à região de amplificação específica determinada por sequências do genoma (16426) e usando o par de *primers* Chit_TEIX_F / Chit_TEIX_R. A partir de 14 sequências de quitinases obtidas do genoma, todas apresentaram domínio catalítico detectado, uma das quais apresentou 49,48 % de identidade com o molde (3G6M). Uma análise estatística utilizando o gráfico RAMACHANDRAN mostrou que a sequência do melhor modelo gerado (997) possui 97,2% de resíduos em regiões favoráveis. Em 5 modelos foi possível identificar o sítio ativo, sua posição e os resíduos envolvidos na catálise. Os 5 modelos construídos a partir do alinhamento das sequências 15210, 1679, 4357, 5707 e 997 com seus respectivos moldes pelo MODELLER apresentaram uma estrutura clássica de barril alfa-beta contendo α -hélices e folhas- β . Após alinhamento sequencial, refinamento e Dinâmica Molecular, o modelo final (997) analisado pelo SWISS MODEL apresentou alta similaridade estrutural com seu respectivo molde. A partir dos modelos 3D das quitinases e o fragmento específico amplificado por PCR, o uso de *primers* específicos para os modelos gerados sequenciamento e clonagem são objetivos para trabalhos posteriores.

Palavras-chave: Vassoura-de-Bruxa, resíduos quitinolíticos, modelagem comparativa, expressão, cDNA.

ABSTRACT

Chitin is considered the second most important biopolymer in nature. The natural accumulation in the environment is incompatible with its uninterrupted production, which shows that natural mechanisms exist because of its degradation. These enzymes are found in almost all types of living beings; they are interest in biotechnology because they allow the degradation of chitin in products useful to several productive sectors of the economy, highlighted for fungal origin. In view of this scenario, a molecular characterization from RNA extraction and cDNA amplification and an analysis of 3D structures by comparative modeling of sequences from *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA genome were aimed in this study. The fungus grown on WY medium for 8-10 days grew vigorously under conditions where the wheat bran was well ground. As an expression of quitinase is crucial for the fungus growth, this medium was considered satisfactory for RNA extraction. The traditional Trizol method was more favorable than the use of RNA extraction kits. For detection of *M. perniciosa* quitinase expression from cDNA amplification, fragments related to the specific amplification region determined by genome sequences (16426) and using primers Chit_TEIX_F / Chit_TEIX_R were found. From the 14 chitinase sequences obtained from the genome, all of them showed catalytic domain, the best of them presented 49,48% identity to template (3G6M). A statistical analysis using the RAMACHANDRAN graph showed that the best model sequence (997) had 97,2% residues in favorable regions. In 5 models were found active site, its position and the residues involved in the catalysis. The 5 models constructed from the alignment of sections 15210, 1679, 4357, 5707 and 997 with their templates by MODELLER presented a classic alpha-beta barrel structure containing α -helices and β -sheets. After sequential alignment, refinement and Molecular Dynamics, the final model (997) analyzed by SWISS MODEL presented high structural similarity with its respective mold. From the 3D models of the chitinases and the specific fragment amplified by PCR, the use of specific primers for the generated models, sequencing and cloning are objectives for later works.

Keywords: Witch's broom, chitinous waste, comparative modeling, Expression, cDNA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 <i>Moniliophthora perniciosa</i>	14
3.2 A DOENÇA VASSOURA DE BRUXA	15
3.3 INTERAÇÃO ENTRE PLANTA E PATÓGENO	17
3.4 QUITINA E QUITINASES	19
3.5 APLICAÇÕES DA QUITINASE	22
3.6 QUITINASES DO FUNGO <i>Moniliophthora perniciosa</i>	23
3.7 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS	24
3.7.1 Bioinformática estrutural aplicada ao estudo tridimensional de proteínas	24
3.7.2 Modelagem Molecular Comparativa	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 CULTIVO DO FUNGO	28
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	28
4.3 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR	29
4.4 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS (<i>PRIMERS</i>) PARA A SEQUENCIA DA PROTEÍNA EM ESTUDO	30
4.5 AMPLIFICAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR	30
4.6 OBTENÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS SEQUENCIAS CODIFICANTES OBTIDAS A PARTIR DO GENOMA	31
4.7 SELEÇÃO DE PROTEÍNAS MOLDE E CONSTRUÇÃO DOS MODELOS 3D POR MODELAGEM COMPARATIVA	32
4.8 MODELAGEM COMPARATIVA	32
4.9 AVALIAÇÃO DOS MODELOS	3D
32	
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	33
5.3 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS (<i>PRIMERS</i>)	36
5.4 SÍNTESE DO cDNA e AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO	37
5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUENCIAS GH-18 DO GENOMA	39
5.6 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MOLDES	41
5.7 DESCRIÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS GERADOS	44
5.7.1 Análise da qualidade global e local dos modelos gerados	44
5.7.2 Análise estrutural dos modelos	45
5.7.3 Alinhamento estrutural	50
5.7.4 Minimização de Energia e Dinâmica Molecular	50
50	
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Ångström
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
dNTP	Desoxirribonucleotideo
B.O.D	Estufa incubadora refrigerada
GH	Glicosil hidrolases
°C	Graus centígrados
3D	Imagem tridimensional
BDA	Meio batata dextrose ágar
WY	Meio extrato de levedura e farelo de trigo
µL	Microlitros
µg	Microgramas
mA	Miliampères
mL	Mililitros
nm	Nanómetro
pb	Pares de Bases nitrogenadas
pI	Ponto Isoelétrico
%	Porcentagem
pH	Potencial Hidrogeniônico
PDB	Protein data bank
kDa	Quilodalton
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
PCR	Reação em cadeia da polimerase
s	Segundos
Tm	Temperatura de anelamento (melting)
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
V	Volts
xg	Força G

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do ciclo de vida do fungo <i>M. pernicioso</i> .	15
Figura 2. Frutos com amarelecimento precoce (a,b,c,d).	18
Figura 3. Ação de enzimas quitinolíticas sobre a quitina.	19
Figura 4. Produtos da degradação da quitina por quitinases em fungos.	20
Figura 5. Estrutura tridimensional de quitinases de fungos.	21
Figura 6. Crescimento do fungo <i>M. pernicioso</i> .	33
Figura 7. Eletroforese de extração de RNA de <i>M. pernicioso</i> .	35
Figura 8. Eletroforese da amplificação do produto de cDNA de quitinases em <i>M. pernicioso</i> .	38
Figura 9. Modelagem Comparativa do modelo 997 (3G6M).	46
Figura 10. Modelagem Comparativa do modelo 997 (3G6M).	47
Figura 11. Estimativa da qualidade do modelo pelo cálculo do QMean.	48
Figura 12. Imagem da posição do CFF no molde 3G6M.	48
Figura 13. Representação esquemática dos domínios presentes.	49
Figura 14. Modelagem Comparativa do modelo 997 (3G6M).	50
Figura 15. Alinhamento estrutural entre o molde e o modelo 997 (3G6M).	51
Figura 16. Estimativa da qualidade pelo cálculo do QMean do Modelo 997 (3G6M) após refinamento e Dinâmica Molecular.	51
Figura 17. Alinhamento estrutural realizado entre o molde e o modelo 997 (3G6M) do SWISS MODEL, após refinamento e Dinâmica Molecular.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de reação de polimerase em cadeia.	30
Tabela 2. Análise quantitativa e qualitativa do RNA.	33
Tabela 3. Dados referentes aos primeros diretos e reversos desenhados.	35
Tabela 4. Caracterização Bioquímica das Sequências.	39
Tabela 5. Caracterização dos Moldes selecionados para Sequências alvo de Quitinases de <i>M. pernicioso</i> .	41
Tabela 6. Análise da classificação, da origem e do método de determinação da estrutura tridimensional dos moldes selecionados	42
Tabela 7. Analise estereoquímica do gráfico de Ramachandran e dos valores de QMEAN dos modelos construídos de quitinases de <i>M. pernicioso</i> .	43

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos, na biosfera, 100 bilhões de toneladas de quitina, o segundo biopolímero mais abundante da Terra, são produzidas (HORN, et al., 2006; ZHU et al., 2007). Presente em uma infinidade de organismos vivos, a quitina desempenha uma variedade de funções fisiológicas que compõem principalmente conchas de artrópodes e paredes celulares de fungos (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005).

Todos os organismos com quitina como componente estrutural necessitam de um sistema quitinolítico eficaz para degradar este polímero, razão pela qual a quitina não é acumulada na biosfera (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005). Neste contexto, as quitinases, enzimas líticas das paredes celulares foram purificadas de várias espécies de fungos que apresentam diversidade estrutural e diferentes pesos moleculares. No entanto, esta enzima também pode ser encontrada em organismos que não produzem quitina, mas a usam como fonte de nutrientes (CHRISTODOULOU et al., 2001; HORN et al., 2006). Além disso, a quitinase também desempenha função defensiva contra agentes patogênicos, inclusive em seres humanos (GAVALA et al., 2012; GAUVREAU et al., 2013; DURU et al., 2013).

Além de alta disponibilidade a baixo custo e ser atóxica, a quitina também é biodegradável, o que torna uma excelente escolha de matéria-prima para vários setores produtivos da economia (AZEVEDO, 2007). Por esse motivo, o estudo de novas quitinases e subsequentes clonagens e a produção heteróloga tem sido amplamente aplicada em centros de pesquisa em todo o mundo (TONG et al., 2013; PRAKASH et al., 2013).

Nesse contexto, para estudar em profundidade um gene é necessário isolá-lo do resto do DNA e amplificá-lo para ter amostra suficiente para trabalhar (WATSON et al., 2005). O acesso ao material genético, seja DNA ou RNA, é o primeiro passo para a aplicação de técnicas de biologia molecular na seleção de ácidos nucleicos a ser utilizado. Assim, a tecnologia de DNA recombinante trouxe a possibilidade de manipulação de DNA permitindo a criação da “molécula da vida” (DEMAIN et al., 2009). Com uma compreensão maior sobre os fundamentos do DNA, do RNA e do metabolismo de proteínas,

os pesquisadores manipulam células para expressar genes clonados a fim de estudar seus produtos proteicos (NELSON e COX, 2014).

O entendimento estrutural, funcional e modo de ação das proteínas nos processos celulares é um passo chave na biotecnologia, sendo este um dos principais objetivos da bioinformática e da era pós-genômica (WATSON et al., 2005). Para isso, os métodos computacionais são usados como ferramentas na estrutura da proteína alvo para planejar modelos de sistemas bioquímicos. Para prever estruturas proteicas e avaliar a sua funcionalidade, este tipo de pesquisa utiliza coordenadas atômicas de proteínas tridimensionais já depositadas em estruturas de bancos de dados.

O *Moniliophthora perniciosa* é um fitopatógeno de grande importância econômica no Brasil, em especial na região do sul da Bahia, por ser o agente causador da doença do cacaueteiro, conhecida como Vassoura de Bruxa. Grande parte do potencial biotecnológico desse fungo se deve a diversidade da produção de enzimas hidrolíticas secretadas em meio extracelular, como as quitinases (CHAVAN; DESHPANDE, 2013). Por essa razão, esforços são empregados no sentido de buscar alternativas viáveis para o controle desse fungo, a exemplo do controle cultural, biológico e químico, além da utilização de cultivos resistentes ao *M. perniciosa* (COSTA, BEZERRA, et al., 2009; OLIVEIRA e LUZ, 2005). Devido ao grande impacto socioeconômico dessa doença no Estado da Bahia, foi criado em 2000 um grupo de instituições com o intuito de sequenciar o genoma do *M. perniciosa*. As primeiras análises do genoma nuclear de *M. perniciosa*, bem como o seu genoma mitocondrial, foram publicados em 2008 (MONDEGO JM et al., 2008). A disponibilidade desses dados atrelados com o uso de técnicas moleculares e de bioinformática atualmente disponíveis viabilizam o estudo e análise de sequências codificantes de enzimas de interesse biotecnológico, como as quitinases.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar por técnicas moleculares e *in silico* quitinases presentes em *Moniliophthora perniciosa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extrair RNA do micélio de *M. pernicioso* pelos métodos trizol e por kits comerciais de isolamento e sintetizar o cDNA;
- Caracterizar e desenhar iniciadores para sequencias codificantes de quitinases obtidas a partir do genoma de *M. pernicioso*;
- Avaliar a qualidade da síntese de cDNA a partir de RNA através da detecção de expressão de quitinases por PCR convencional;
- Desenvolver estruturas 3D por modelagem comparativa de sequências obtidas do genoma como ferramenta de seleção para produção futura de formas recombinantes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Moniliophthora pernicioso*

O fungo *Moniliophthora pernicioso* pertence ao Filo Basidiomycota, a ordem Agaricales (HIBBETT, et al., 2007) e a família Marasmiaceae (AIME, PHILLIPS MORA, 2005), sendo ele identificado inicialmente por Stahel, como *Marasmius perniciosus*, e posteriormente transferido por Singer para outro gênero, o *Crinipellis* (BRANDEAU, 1992). Entretanto, a classificação sofreu uma reformulação, por meio de análises filogenéticas. Aime e Phillips Mora (2005) determinaram que os fungos *Crinipellis pernicioso* e *Moniliophthora roreri* pertencem ao mesmo grupo taxonômico. Assim, o *C. pernicioso* passou a ser denominado de *Moniliophthora pernicioso* (COSTA, et al., 2009).

Este fungo é um patógeno que possui um ciclo de vida hemibiotrófico, apresentando duas fases fisiológicas e morfológicas distintas (Figura 1). A fase biotrófica possui células monocarióticas com hifas irregulares em sua espessura, intercelulares ao meristema do hospedeiro e com ausência de fíbulas, provocando grandes alterações morfofisiológicas na planta (LANA, 2004; SANTOS, 2005; MEINHARDT, et al., 2006). A fase necrotrófica, por sua vez, apresenta hifas delgadas e hialinas, com formação de fíbulas que colonizam os tecidos do hospedeiro intra e intercelularmente, encontradas somente em tecidos mortos (KILARU, HASENSTEIN, 2005; MUSE, et al., 1996; COSTA et al., 2009).

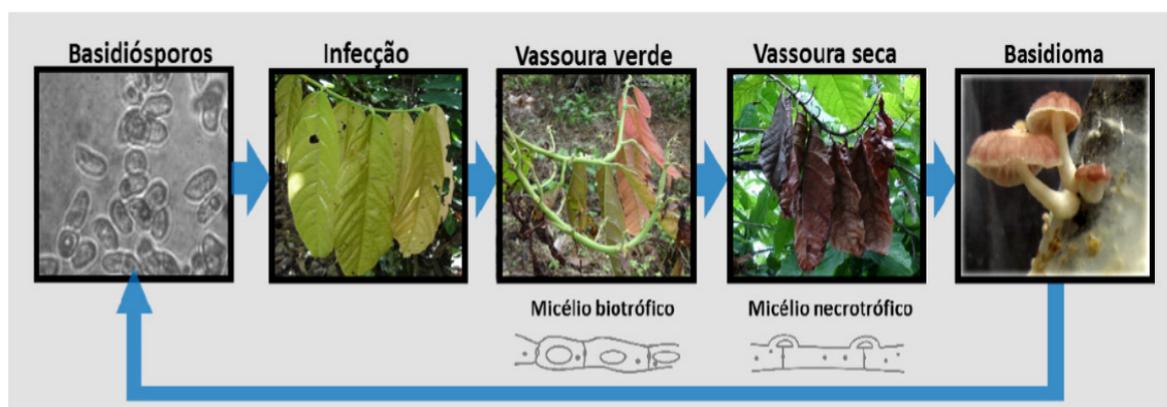


Figura 1. Ilustração do ciclo de vida do fungo *M. perniciosa*. Basidiósporos germinam sobre tecido meristemático do cacauero formando a vassoura verde, colonizada pelo micélio biotrófico. Na mudança para a fase necrotrófica do fungo ocorre a morte do tecido infectado, denominado vassoura seca. Neste estágio da doença são produzidos os basidiomas, que liberam os basidiósporos, reiniciando o ciclo de vida do patógeno. Fonte: Teixeira et al., 2013.

O fitopatógeno infecta plantas da família Malvaceae, Solanaceae, Bignoniaceae, Bixaceae e Malpighiaceae (RINCONES et al., 2006), podendo ser separado em grupos de acordo com os gêneros que infectam denominados biótipos. Desta forma, há três biótipos caracterizados: o biótipo Cacau (biótipo C) tem como hospedeiro as espécies do gênero *Theobroma*, principalmente o *T. cacao*, o biótipo Solanaceae (biótipo S) infecta as espécies da família Solanaceae, e o biótipo Liana (biótipo L) é encontrado em lianas e cipós das famílias Malpighiaceae e Bignoneaceae (PURDY, 2005). Além desses, um quarto biótipo foi relatado, o biótipo Bixa, mas não foi notificada a produção de basidiocarpos nos ramos infetados. Um quinto biótipo, o biótipo H, foi sugerido por Griffith et al., (2003) no qual se enquadra o *Heteropterys acutifolia*.

O *M. perniciosa* é o fungo causador da vassoura de bruxa do cacauero (*Theobroma cacao*). Desde a sua ocorrência na costa do Equador, em 1984, representa um dos principais fatores limitantes na produção de cacau na América do Sul e nas Ilhas do Caribe, tendo assumido o papel de patógeno mais importante do cacauero. Além disso, sua dispersão acompanhou a do *T. cacao* na Bacia Amazônica. Atualmente ambos são endêmicos nesta região (GRIFFITH et al., 1994).

3.2 A DOENÇA VASSOURA DE BRUXA

A doença Vassoura de bruxa foi descrita inicialmente por Ferreira em 1785 como “lagartão” devido às más formações da planta atacada pelo fungo (SANTOS, 2005). No entanto, apenas em 1890, Gregor Stahel iniciou a investigação científica sobre a devastação que esta doença causa em plantações, isolando o fungo causador e o nomeando como *Marasmius perniciosus*. Essa doença já foi detectada em países como Guiana (1906), Colômbia (1917), Equador (1921), Trindade e Tobago (1939), Granada (1948), São Vicente (1988), Bolívia (1989), Brasil (Bahia e Região da bacia Amazônica) (1989) e no Panamá (1989) (PURDY; SCHMIDT, 1996).

A Vassoura de bruxa é uma das mais importantes doenças do cacau, ocorrendo principalmente nos países da América do Sul. No Brasil, atingiu as lavouras cacauceiras da Bahia, sendo observada pela primeira vez em 1989, causando perdas de até 90% da produção (PURDY; SCHMIDT, 1996). O *M. perniciosus* foi considerado o agente fitopatológico responsável por esta doença (PEREIRA et al., 1990; KILARU et al., 2005) infectando lançamentos florais novos, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais, podendo provocar a morte da planta quando afetada por consecutivos ciclos do patógeno integrado à fatores abióticos (SILVA, 2002).

No estado da Bahia, a Vassoura de bruxa, nome popular da fitopatologia causada pelo fungo *M. perniciosus*, ainda tem gerado prejuízos milionários para os produtores rurais e para o Estado (BRASIL, 2013). Os esforços para produzir variedades de *Theobroma cacao* resistentes tem dado resultados muito relevantes no combate à Vassoura de bruxa, porém, estas variedades são suscetíveis a infecções por novas cepas originadas de outras regiões (VIEIRA; VALLE, 2006; BRASIL, 2013). A intervenção humana contribuiu para a propagação da vassoura de bruxa, podendo-se considerar as pessoas como os principais vetores de transmissão da praga (GRIFFITH et al., 2003)

Visto que a Vassoura de bruxa tem dizimado os cacauais, deixando mais de duzentos mil desempregados e causado danos irreparáveis à natureza, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), tem como uma de suas missões a recuperação da economia regional, enfatizando no combate a esta doença (CEPLAC, 2011).

3.3 INTERAÇÃO ENTRE PLANTA E PATÓGENO

Uma ampla variedade de microrganismos expõe continuamente plantas a infecções, essas, por sua vez, desenvolveram diversos mecanismos de defesa para combater potenciais patógenos (JONES & DANGL, 2006). No entanto, microrganismos patogênicos desenvolveram notáveis mecanismos para atenuar ou até impedir a ativação das defesas de seus hospedeiros (JONES & DANGL, 2006; STERGIOPOULOS & DE WIT, 2009).

A parede celular dos fungos protege o organismo contra um ambiente hostil e transmite sinais para a invasão e infecção de hospedeiros como plantas, animais e humanos. Esta parede é uma estrutura complexa formada por quitina, vários glucanos, lipídeos e peptídeos incorporados em uma matriz proteica (SELITRENNIKOFF et al., 2001). A quitina constitui de 22 a 44% da parede celular dos fungos (SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008). Várias classes de proteínas antifúngicas estão envolvidas na inibição da síntese da parede celular dos fungos ou na ruptura da estrutura desta parede, e outras agem na estrutura da membrana, resultando na lise celular (SELITRENNIKOFF et al., 2001).

A proteção da parede celular mediada por efetores é uma estratégia compartilhada por diferentes fungos fitopatogênicos (MARSHALL et al., 2011; MENTLAK et al., 2012), sugerindo um importante papel na evolução da patogenicidade destes organismos. Curiosamente, esta estratégia parece ter sido desenvolvida de forma independente nos diferentes fungos, uma vez que proteínas não relacionadas estão envolvidas neste mecanismo.

O processo de infecção do *Theobroma cacao* pelo fungo *M. pernicioso* ocorre através da germinação dos esporos nas superfícies foliares da planta. Para que ocorra a germinação é necessário, nesta etapa, a degradação do principal componente da parede celular do fungo, a quitina (PURDY, SCHMIDT, 1996; GRIFFITH, et al., 2003).

A infecção tem início quando os basidiósporos germinam e penetram no tecido meristemático e vagens da planta originam assim o estágio biotrófico da colonização. Com isso, ocorre uma hiperplasia das células hospedeiras. Estas desordens fisiológicas são frequentemente causadas pela liberação, dentro da célula, de grande quantidade de compostos fenólicos, etilênicos, açúcares

solúveis e taninos, levando a morte celular ou alterações no balanço hormonal (ODJAKOVA; HADJÜVANOVA, 2001; SCARPARI et al., 2005). Esse intumescimento leva a parte atingida a ter uma aparência de uma vassoura de bruxa. Essas vassouras, quando jovens, têm uma coloração verde, mas morrem com 1 a 2 meses dando uma coloração marrom às árvores infectadas, devido a necrose ocasionada pela colonização (estágio saprofítico). A infecção mais grave ocorre nas flores jovens e nos frutos que estão no tronco (Figura 2). Como o fungo responsável pela infecção que leva a vassoura de bruxa acomete plantas em desenvolvimento, somente a utilização de fungicidas não apresenta efetividade ficando o controle biológico como alternativa estratégica para o combate a propagação da vassoura de bruxa (GRIFFITH et al., 2003; RUBINI et al., 2005; PEREIRA, 1990).



Figura 2. Frutos com amarelecimento precoce (a,b,c,d). Deformados sem (c) e com lesões necróticas (d). Lesões circundadas por halos amarelados (fg). Quase totalmente necrosado (h). Fonte: OLIVEIRA e LUZ, 2005.

Com objetivo de criar novas formas de controle da praga, pesquisadores de várias instituições iniciaram o projeto genoma do *M. perniciosus*. Este projeto identificou genes importantes relacionados ao metabolismo do fungo e/ou ao seu mecanismo de infecção. Muitos desses genes codificam enzimas e

receptores essenciais para *M. pernicioso* e são considerados alvos moleculares para o desenvolvimento de fungicidas mais potentes e seletivos contra esse fungo. Adicionalmente, o entendimento do funcionamento do metabolismo do fitopatógeno a partir dos dados moleculares poderá levar ao desenvolvimento de diversas estratégias de controle da praga (PEREIRA, 2001).

3.4 QUITINA E QUITINASES

A quitina é um polímero linear e insolúvel encontrada em fungos, crustáceos e insetos, e em ecossistemas marinhos e terrestres (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005). Depois da celulose, é o polissacarídeo mais abundante na natureza (KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2015). Este homopolímero insolúvel de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unido por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (DUO-CHUAN, 2006; HAMID, 2013) forma espontaneamente estruturas cristalinas de microfibrilas (MERZENDORFER, 2006).

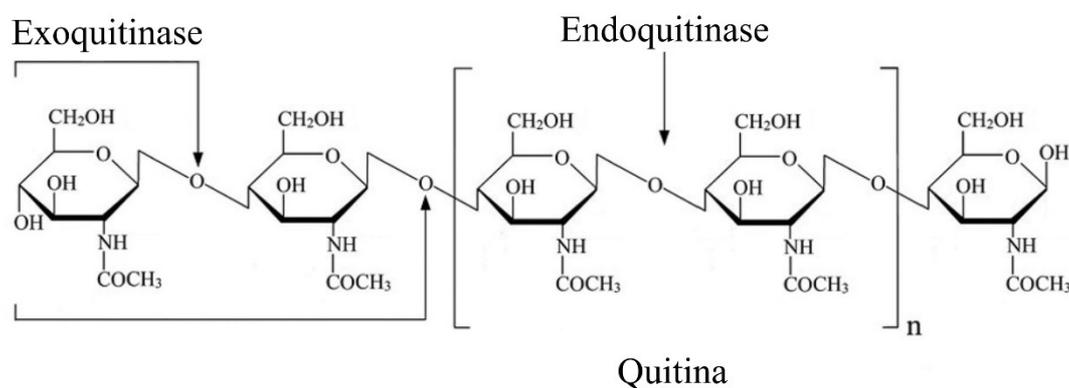


Figura 3. Ação de enzimas quitinolíticas sobre a quitina. Fonte: Adaptado de Stoykov et al., 2015.

A quitina é degradada a 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicosamina (N-acetilglucosamina – GlcNAc) por quitinases (EC 3.2.1.14) (DUO-CHUAN, 2006; DAHIYA et al., 2006). Dependendo do padrão de clivagem, as quitinases podem ser divididas em duas categorias: endo e exoquitinases (Figura 3) (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998). As endoquitinases clivam aleatoriamente a quitina em sítios no interior da cadeia, produzindo uma mistura de oligômeros de GlcNAc de baixo peso molecular. Enquanto as exoquitinases clivam a quitina de forma regular em sítios na extremidade da cadeia, catalisando a

liberação progressiva de um único produto, diacetilquitobiose, a partir da extremidade não-redutora do polissacarídeo (Figura 4) (SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008). Existem ainda aquelas enzimas que não podem ser diferenciadas em exo ou endoquitinases, pois, possuem modo de clivagem tanto como exoquitinase como de endoquitinase (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

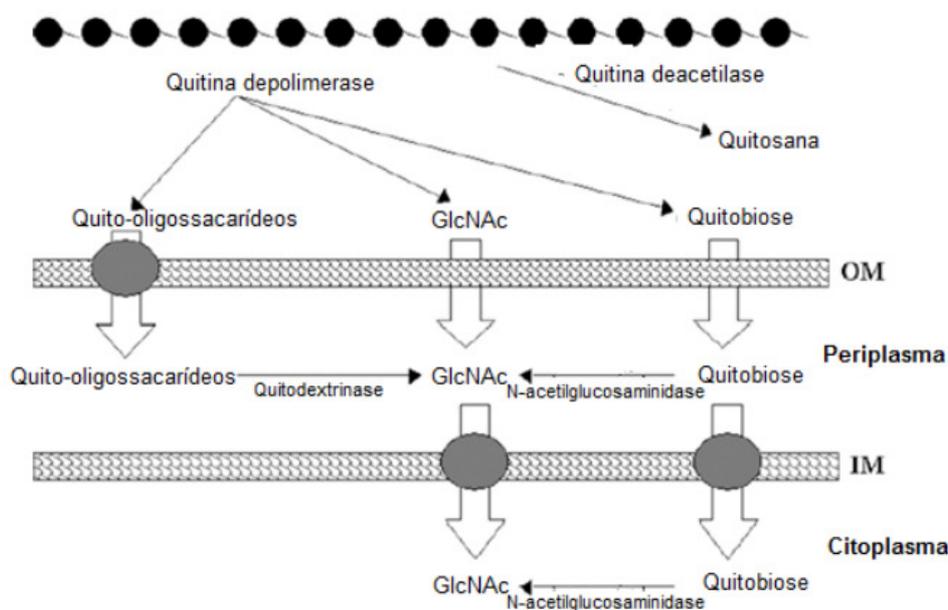


Figura 4. Produtos da degradação da quitina por quitinases em fungos. OM e IM representam a bicamada lipídica da membrana citoplasmática. Fonte: Adaptado de Soares et al., 2016.

Enzimas quitinolíticas são amplamente encontradas em uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, invertebrados (principalmente nematóides, insetos e crustáceos) e todas as classes de vertebrados (KARTHIK et al., 2014; HAMID, 2013). As quitinases constituem as Famílias 18, 19 e 20 da superfamília das β -glicosidrolases (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

As glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-) são um grupo generalizado de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um hidrato de carbono e uma porção não hidratada. A nomenclatura enzimática IUBMB das glicosil hidrolases se baseia na especificidade do substrato e eventualmente em seu mecanismo molecular (CaZy - *Carbohydrate-Active enZymes Database* - www.cazy.org)

A Família 18 das glicosil hidrolases é constituída pelas quitinasases da classe III, podendo ser encontradas em fungos e em plantas e pelas quitinasases da classe V, que são encontradas principalmente em bactérias, podendo também ocorrer em vírus, sendo a família mais diversificada em termos evolutivos (DUO-CHUAN, 2006). Quando encontradas em fungos, Quitinasases da Família 18 (Figura 3) possuem uma estrutura composta basicamente por cinco motivos/regiões: uma região N-terminal de peptídeo sinal, um domínio catalítico, uma região rica em treonina/serina, uma região de ligação à quitina e uma extensa região C-terminal (DUO-CHAN, 2006).

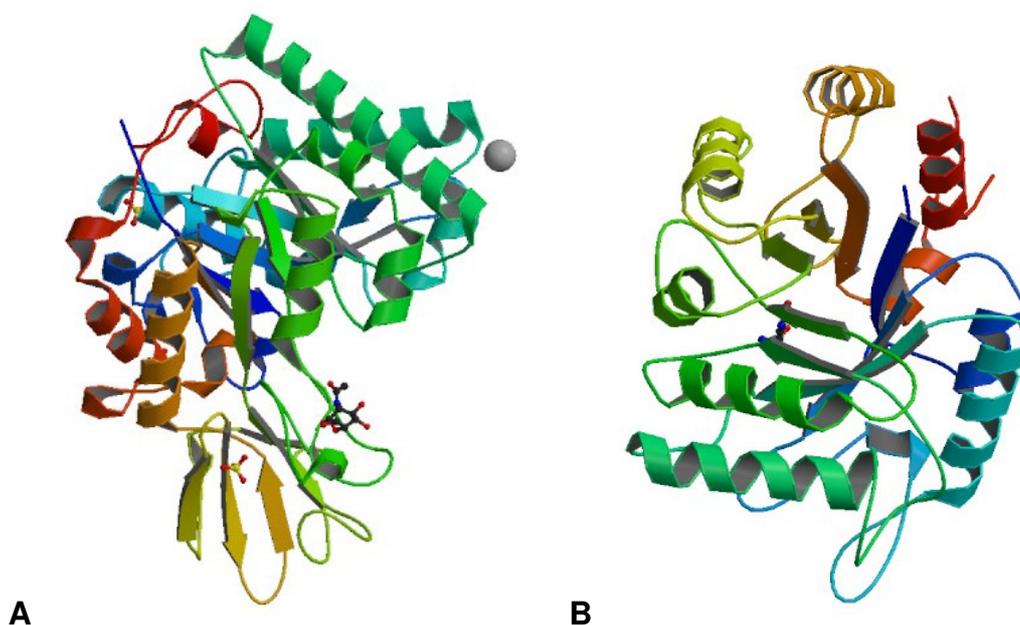


Figura 5. Estrutura tridimensional de quitinasases de fungos. A. *Neosartorya fumigata* (1WNO). B. *Saccharomyces cerevisiae* (2UY4). Fonte: *Protein Data Bank*, 2018.

A regulação da expressão de quitinasases secretadas é mediada por um sistema de indução-repressão, onde a quitina, a cutícula de diversos hospedeiros e/ou uma pequena quantidade de GlcNAc (0,1-0,5%) induzem a expressão de quitinasases no meio extracelular. De outro modo, a glicose, as concentrações mais elevadas de GlcNAc (1%) e o aminoácido alanina, regulam negativamente a expressão de quitinasases por repressão catabólica (BARROS et al., 2010).

O sítio ativo de quitinasases da família GH18 é constituído pelo motivo DXXDXDXE, sendo o glutamato (E) o aminoácido responsável pela doação de elétrons durante a hidrólise do substrato (HUANG et al., 2012).

Em geral, a hidrólise de uma ligação glicosídica é catalisada por dois resíduos de aminoácidos da enzima: um ácido geral (doador de prótons) e um nucleófilo como base (BOKMA, 2002). As quitinases possuem um resíduo de Asparagina (Asp) e Glutamato (Glu) no sítio catalítico, podendo ser doadores de prótons ou agir como nucleófilos (HENRISSAT, 1999).

As quitinases das Famílias 18 e 19 possuem estruturas tridimensionais e mecanismos moleculares completamente diferentes, desta forma, não compartilham similaridade em suas sequências de aminoácidos, indicando que estas famílias possuem ancestrais distintos (PERRAKIS et al., 1994)

Nos fungos, as quitinases são utilizadas nos processos de desenvolvimento e estão envolvidas com a nutrição e morfogênese (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012; SEIDL, 2008). Já as quitinases produzidas pelas plantas fazem parte do mecanismo de defesa contra organismos que possuem quitina em sua estrutura (GRAHAM; STICKLEN, 1994).

Além das diferentes funções que as quitinases desempenham nos organismos onde são encontradas, essas proteínas têm atraído grande interesse do ponto de vista biotecnológico, em virtude das diversas aplicações potenciais que as mesmas podem ter. Assim, quitinases podem ser utilizadas para converter biomassa contendo quitina em derivados úteis, serem exploradas para o controle de fungos patogênicos e insetos-praga que atacam culturas agrícolas (FANG; AZIMZADEH; ST LEGER, 2012).

3.5 APLICAÇÕES DA QUITINASE

As quitinases são de grande interesse biotecnológico, pois podem ser utilizadas na bioconversão da quitina em derivados úteis, serem exploradas no biocontrole de fungos e insetos patogênicos, além de serem empregadas em cuidados com a saúde humana, como por exemplo, no uso de preparações oftálmicas com quitinases e microbicidas (GOMAA, 2012). Alguns produtos da bioconversão da quitina, como os quito-oligossacarídeos, possuem importância médica, com ação antitumoral, anti-inflamatória e antifúngica (AAM et al., 2010). Além disso, monômeros de GlcNAc podem ser usados como adoçantes e suplementos nutricionais (HUANG et al., 2012; PATIL; JADHAV, 2014).

Na agricultura, as quitinases são amplamente utilizadas no combate a pragas como fungos e artrópodes. Entre os métodos usados está

a produção de quitinases recombinantes e a aplicação direta de genes de quitinases fúngicas em plantas, como na produção de plantas mais resistentes para a lavoura do tabaco (ALVES, 2002; ROBY et al., 1988).

Destaca-se seu uso como solubilizante de vitaminas e minerais, cicatrizante, além de ser usado como componente estrutural de implantes e suturas cirúrgicas (AZEVEDO et al., 2007). Podendo ser utilizadas também no clareamento de águas residuais, em produtos fotográficos, em agentes quelantes de metais pesados e na otimização do processo de produção de etanol (HAKI, RAKSHIT, 2003; HOWARD et al., 2003).

Quitinases termoestáveis apresentam uma série de vantagens para a aplicação em processos biotecnológicos. Reduzem o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. Além disso, apresentam resistência à ação de proteases e à desnaturação por alguns solventes orgânicos (GOMES et al., 2007).

Por estes motivos a aplicação de quitinases para a produção e comercialização de quitina e seus derivados é cada vez maior na indústria privada (HAKI; RAKSHIT, 2003).

3.6 QUITINASES DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa*

O grande interesse no estudo das quitinases é principalmente devido as suas propriedades antifúngicas (MATROUDI et al., 2008). A atividade inibitória das quitinases está relacionada com a proporção de quitina presente na parede celular de cada fungo. Aqueles fungos cuja proporção de quitina na parede celular for menor, serão menos susceptíveis às quitinases, visto que este é o único substrato presente na parede sobre o qual a enzima pode atuar (YAN et al., 2008).

Lopes (2005) ao analisar os genes relacionados ao sistema quitinolítico de *M. perniciosa*, descreve um gene de quitinase que sintetiza quitinases da classe I, essenciais à degradação do polímero de quitina, componente principal da parede celular de fungos (HOWARD et al., 2003; DUO-CHUAN, 2006).

Galante et al., (2012) descrevem a purificação parcial da enzima quitinase de *M. pernicioso*, um sistema quitinolítico composto por quatro isoenzimas, das quais, duas possuem características cinéticas semelhantes. Todas as enzimas possuem atividade máxima entre 50 e 70 °C, o que as tornam termoestáveis.

Um gene codificante desta proteína, denominado *MpChi*, foi identificado durante a inspeção de bibliotecas de RNA-seq de vassouras verdes e destacou-se por estar entre os genes mais expressos pelo fungo no estágio infectivo da doença vassoura de bruxa. Neste sentido, a elevada expressão deste gene durante a colonização do cacauero por *M. pernicioso* foi uma evidência que levou a inspeção do sítio ativo da enzima codificada por este gene. Notavelmente, verificou-se que esta proteína possui uma substituição de um importante aminoácido do seu sítio catalítico (glutamato 167 substituído por uma glutamina). Esta mutação, artificialmente realizada em quitinases de vários outros organismos, resulta na completa extinção da atividade quitinolítica da enzima. Diante de seu padrão de expressão e possível ausência de atividade quitinolítica, formulou-se a hipótese de que a proteína *MpChi* seria um mecanismo de proteção de *M. pernicioso* contra quitinases produzidas pela planta. Esta proteção poderia ser alcançada pela ligação da proteína à parede celular do fungo, bloqueando o acesso das enzimas hidrolíticas da planta (TEIXEIRA et al., 2003).

3.7 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS

3.7.1 Bioinformática estrutural aplicada ao estudo tridimensional de proteínas

A função de uma proteína pode ser determinada pela sua estrutura tridimensional e não apenas por sua sequência de resíduos de aminoácidos. A estrutura de uma proteína é peça de um interessante quebra-cabeça chamado proteoma (LESK, 2001). Na era pós-genômica, a proteômica juntamente com o entendimento estrutural e funcional das proteínas tem sido o foco dos estudos (DA SILVEIRA, 2005) que permitiram a separação, identificação e caracterização das proteínas (DORN e DE SOUZA, 2010; LESK, 2008).

O conceito de Bioinformática pode ser definido como o uso de computadores aliado às mais diversas áreas do conhecimento para o

armazenamento das informações biológicas ligadas a descobertas no campo científico biológico, representando a interação entre a biologia e a informática. (PACHECO, 2009).

Nesse sentido, a Bioinformática Estrutural é a conceituação da biologia em termos de moléculas, no sentido físico-químico, e a aplicação de técnicas de informática (provenientes de diversas áreas do conhecimento) para entender, organizar e explorar a informação estrutural associada a essas moléculas em grande escala (LUSCOMBE et al., 2001)

A bioinformática estrutural tem como principal objetivo a representação, armazenamento, recuperação, análise e visualização da informação estrutural das proteínas. A criação dessa sub-área da bioinformática se deu pelo aumento no número de estruturas tridimensionais disponíveis em bancos de dados, como o PDB (Protein Data Bank) cujo propósito é armazenar e distribuir estruturas proteicas de forma organizada (BERMAN et al., 2006). Os bancos de dados desempenham papel fundamental nos estudos das estruturas de proteínas, pois é a fonte básica de informações para a predição, análise e o estudo das estruturas.

Um dos principais desafios da Bioinformática Estrutural é entender como a informação decodificada em uma estrutura primária de uma proteína, possibilita a formação de sua estrutura tridimensional. Esforços têm sido feitos em todo o mundo, no sentido de elucidar o maior número possível de estruturas tridimensionais de proteínas (CHRISTODOULOU et al., 2001; DURU et al., 2013).

Algumas técnicas podem ser aplicadas para a obtenção dessas estruturas, como cristalografia de raios X, difração de nêutrons e ressonância magnética nuclear (RMN), porém muitos problemas persistem. A obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios necessários é, em muitos casos, difícil e os cristais obtidos nem sempre têm a qualidade necessária para o trabalho experimental (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005). Além disso, as proteínas de membrana celular raramente cristalizam e dificilmente podem ser tratadas de modo satisfatório por RMN.

A variabilidade e o volume das informações sobre estruturas de proteínas contribuem diretamente no desenvolvimento e aprimoramento dos métodos de predição. Em vista disso, foram desenvolvidos outros métodos de

elucidação de estruturas tridimensionais de proteínas, onde é possível, a princípio, predizer essas estruturas a partir de sua estrutura primária. Dentre estes métodos, o mais conhecido é o de modelagem comparativa de proteínas (DEMAIN et al., 2009; BIASINI et al., 2014).

3.7.2 Modelagem Molecular Comparativa

A modelagem comparativa (“*comparative protein modeling*”), é a ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas (ESWAR et al., 2006; BOKMA et al., 1997). Baseados nessa abordagem em nível molecular, alguns padrões gerais têm sido observados no processo de evolução biológica (PACHECO, 2009) como: (a) identidade entre sequência de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: α -hélices e folhas- β); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas (*loops*) que ligam os elementos de estrutura secundária (PACHECO, 2009).

Modelos comparativos podem ser úteis na identificação do sítio ativo e de interações moleculares (RING et al., 1993), em desenhos para testes de hipótese sobre função de proteínas mutantes (BOISSEL et al., 1993; WU et al., 1999), em simulações de acoplamento molecular entre proteína-proteína ou proteína-ligante (VAKSER, 1997), para refinar modelos baseados em restrições de RMN (MODI et al., 1996) e para confirmar uma relação estrutural remota ou putativa (GUENTHER et al., 1997).

Para a construção de um modelo tridimensional por modelagem comparativa é necessário um molde de estrutura conhecida, que compartilhe similaridade nas sequências dos resíduos de aminoácidos estatisticamente significativas, em padrões observados no processo de evolução biológica, para garantir a estrutura aproximada de uma proteína alvo (PINHEIRO, 2011). No entanto, esse modelo deve basear-se em uma estrutura 3D da família de proteínas em questão que tenha sido elucidada por técnicas experimentais e que a sequência de resíduos de aminoácidos seja conhecida. Entretanto, é necessário que entre ambas as sequências (problema-molde), haja um grau de

identidade (quantifica a porcentagem de caracteres idênticos entre duas sequências e é conseguida através do alinhamento das sequências) de pelo menos 30% (VERLI, 2014; PACHECO, 2009).

A busca pelos moldes realizada para a identificação dos moldes estruturais pode ser feita facilmente com o auxílio de ferramentas de buscas *online* disponíveis e gratuitas (BLAST/NCBI - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Estas ferramentas realizam alinhamentos locais que avaliam o grau de identidade dos resíduos de aminoácidos entre as sequências alvo e molde, assim como avaliam a extensão do alinhamento e a família proteica que melhor se candidata para molde (VERLI, 2014). Vários programas e servidores podem ser utilizados para a construção dos modelos comparativos, dentre os mais utilizados estão: o método de modelagem pela satisfação de restrições espaciais ("modeling by satisfaction of spatial restraints") implementado no programa MODELLER (ESWAR, 2006) e o método de modelagem pela união de corpos rígidos ("modeling by rigid-body assembly"), implementado no programa SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (BIASINI, 2014).

O programa MODELLER adquire restrições espaciais somente de estruturas conhecidas homólogas, ou seja, estruturas que estejam contidas na biblioteca do programa. A metodologia através da união dos corpos rígidos também pode ser empregada na modelagem comparativa. Nesta metodologia, a construção da proteína-problema ocorre por meio das transferências de coordenadas atômicas dos moldes utilizados. Após o alinhamento entre as sequências molde e problema, os resíduos são sobrepostos e trocados, mas as coordenadas espaciais são mantidas (GOLDSMITH-FISCHMAN; HONIG, 2003). Essa técnica baseia-se na divisão das estruturas das proteínas em três conjuntos: cadeias laterais, alças e as regiões centrais conservadas. Dessa forma, cada região da molécula participa separadamente na construção do modelo, no entanto a geometria molecular é preservada considerando-se um conjunto de ligações ou distâncias entre os sítios da molécula, cujos cumprimentos são fixos (COUTINHO, MORGAN, 2007). Em vista disso, neste trabalho, propõe-se a caracterização molecular de quitinases de *M. pernicioso* e a obtenção de estruturas 3D por modelagem comparativa de sequências obtidas do genoma como ferramenta de seleção para produção futura de formas recombinantes. Esta produção pode atender à demanda existente por

esta enzima - bem orientada para o controle de patógenos - e promover o avanço de atividades produtivas incipientes na Bahia (Brasil).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DO FUNGO

O *Moniliophthora perniciosa* CCMB561 foi cedido pela Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB). A ativação do fungo foi realizada em meio BDA, contendo 250 g de batata, 25 g de ágar, 20 g de Dextrose e água destilada, para posterior repique em meio indutor. Para o crescimento do fungo foi utilizado meio WY, contendo 40 g de farelo de trigo; 6 g de extrato de levedura; 1 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4$; 0,2 g de KCL e água destilada. O cultivo permaneceu entre 10 e 14 dias em estufa B.O.D a 25°C e a 27°C.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Os RNAs necessários para os estudos foram extraídos do fungo usando o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante, com modificações, ou o kit Miniprep RNA Direct-zol™ (Zymo Research®). Todos os utensílios utilizados neste processo (como cadinhos, espátulas e pilão) foram pré-tratados com 70% de hipoclorito de sódio (comercial), 70% de isopropanol e 70% de etanol para inibir a ação de RNAses.

Para a extração de RNA a partir do reagente Trizol, o micélio do fungo cultivado em meio WY foi removido integralmente da placa de Petri para um cadinho com o auxílio de uma espátula, removendo o máximo de meio de cultura que estivesse aderido. Em seguida, um pequeno volume de nitrogênio líquido foi adicionado ao cadinho e o material foi macerado com pistilo. Posteriormente, com auxílio da espátula, o micélio macerado foi transferido para um microtubo de 2 mL contendo 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen), e homogeneizado vigorosamente em agitador de tubo por 5 segundos. Essa mistura foi incubada em gelo por 5 minutos. Logo após, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e agitou-se a mistura manualmente por 15 s, incubada por 2-3

minutos em gelo e, em seguida, centrifugada a 12.000 x *g* por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo no qual foi adicionado 500 µL de isopropanol, e a mistura foi incubada em gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 12.000 x *g* por 10 min à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, o pellet formado foi lavado com etanol 75% e novamente centrifugado a 7500 x *g*, por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco foi ressuspensão em 40 µL de água *RNAse-free*. Por fim, o RNA foi armazenado a -80 °C.

A segunda técnica utilizada para a extração de RNA foi realizada utilizando o kit Direct-zol RNA Miniprep™ (Zymo Research®), utilizando também os procedimentos iniciais de maceração do micélio do fungo com nitrogênio líquido e transferidos para tubos contendo 1 mL do reagente Trizol, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em ambas as técnicas, todos os reagentes foram mantidos em gelo.

Os RNA extraídos foram analisados quantitativamente por espectrofotometria em comprimentos de onda de 260 e 280 nm (Lite NanoDrop, Thermo Scientific). Além da concentração de ácidos ribonucleicos, a análise espectrofotométrica indicou o padrão de qualidade de cada amostra a partir do resultado obtido pela razão 260/280 nm.

As amostras foram inspecionadas por fotodocumentação gerada no programa L.pix EX (Loccus Biotecnologia®) após 30 minutos de execução eletroforética a 100 V e 80 mA em gel de agarose a 1% dissolvido em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x e corado com 3 µl de SYBR® Green (Bio-Rad). Para a eletroforese, utilizou-se um marcador 1000 pb (Invitrogen).

4.3 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

A síntese de cDNA foi realizada por técnica de transcrição reversa usando a enzima Transcriptase reversa M-MLV (Promega®), realizada em duas etapas. No primeiro passo foi adicionado em um microtubo estéril de 200 µl, 2 µg de RNA total, 1 µl de Oligo dT (0,5 ug / µl) e 11 µl de água nuclease free. A reação foi incubada em um termociclador a 70 ° C durante 5 minutos. Após 5 minutos, a amostra foi rapidamente resfriada em gelo. O segundo passo foi a adição de 5 µl de tampão 5x, 2 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de enzima

M-MLV e 25 µl de água nuclease free. A reação foi incubada a 37 °C durante 1 hora e armazenada a -20 °C.

4.4 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS (*PRIMERS*) PARA A SEQUENCIA DA PROTEÍNA EM ESTUDO

Os iniciadores para a sequência da proteína quitinase foram desenhados a partir da sequência 16246 cedida pelo professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica – UNICAMP. Além disso, os iniciadores concebidos para a sequência de codificação da quitinase descrita por Teixeira et al., (2013) foram sintetizados (5'GAATTCGGATGCAAACCGAAAAATTAC3' e 5'AAGCTTCTACTTGGACAATCCGGCAC3').

Para os pares de iniciadores contendo sequência de codificação completa para quitinases foram adicionadas sequências correspondentes a sítios de restrição de *NdeI* e *HindIII* compatíveis com a clonagem em vetores de expressão pET-28a, tendo em vista futuros experimentos de expressão. Para verificar a estrutura de cada iniciador, porcentagem de conteúdo de C/G e temperatura de fusão (T_m), o programa gratuito <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> foi usado.

4.5 AMPLIFICAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR

Para a amplificação do cDNA, a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada usando 1 µL (0,5 µM) dos iniciadores específicos desenhados e a primeira cadeia de cDNA como modelo. Foram utilizados três kits diferentes de PCR com Taq Polimerases convencionais. O primeiro foi Taq convencional (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O kit TopTaq Master Mix (Qiagen) também foi usado nos casos em que o kit convencional não mostrou resultados satisfatórios. Outra polimerase, Platinum Taq polymerase (Invitrogen) foi testada para reação de PCR, de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR conteve a condição de reação descrita na tabela 1.

Em todos os protocolos foi seguida a recomendação do fabricante para as condições de reação, utilizando temperatura de anelamento variante de 57-60°C, dependendo do valor de T_m de cada *primer*.

O produto final foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% com a imagem capturada do gel com a L.pix EX (Loccus Biotecnologia®) para verificar a presença do fragmento específico amplificado.

Tabela 1. Parâmetros de reação de polimerase em cadeia de sequências codificantes de quitinases a partir de cDNA utilizados para todos os kits

Condições de Reação		Ciclos
Desnaturação inicial	94°C – 3min	1
Desnaturação	94°C – 45 seg	35
Anelamento	57-60°C - 30 seg	35
Extensão	72°C – 1 min	35
Extensão final	72°C – 10 min	1
Hold	4 a 10°C	1

4.6 OBTENÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS SEQUENCIAS CODIFICANTES OBTIDAS A PARTIR DO GENOMA

Posteriormente, 20 sequências traduzidas de enzimas das famílias GH18 e GH19 (Glicosil Hidrolases 18 e 19) foram obtidas a partir do sequenciamento completo do Genoma de *Moniliophthora perniciosa* fornecido pelo Professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica da UNICAMP e analisadas quanto a sua estrutura primária para posterior construção das estruturas tridimensionais das quitinases por modelagem comparativa.

Inicialmente, o alinhamento individual das sequências foi realizado usando a ferramenta BLASTp (JOHNSON et al., 2008) para identificar os domínios da proteína presentes e confirmar a família e o papel de cada enzima. O número e a posição dos resíduos de aminoácidos do domínio da proteína foram registrados. Assim, somente as sequencias cujo domínio GH18 ou 19

foram reconhecidos, seguiram para modelagem. Além disso, para identificar os sítios ativos, bem como a sua posição e os resíduos envolvidos na catálise, o servidor ProSite (<https://prosite.expasy.org/>) (DE CASTRO et al., 2006) foi utilizado. A ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), ainda estimou o peso molecular de cada enzima.

4.7 SELEÇÃO DE PROTEÍNAS MOLDE E CONSTRUÇÃO DOS MODELOS 3D POR MODELAGEM COMPARATIVA

Para a construção dos modelos para as sequências do genoma, a primeira etapa foi a busca por moldes. O alinhamento da sequência de cada sequência foi feito contra o banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB - <https://www.rcsb.org/>) usando a ferramenta BLASTp, no servidor do NCBI, com seleção da matriz de alinhamento BLOSUM62. Para a confirmação da qualidade das sequências das proteínas empregadas como moldes estruturais foi feita a busca por moldes diretamente no servidor da plataforma SWISS-MODEL (BIASINI et al., 2014). Esta ferramenta busca por sequências depositadas no PDB (que apresentam estrutura cristalográfica definida) e permite encontrar modelos segundo as recomendações encontradas na literatura (VERLI, 2014).

Para selecionar os moldes, a identidade sequencial maior que 30%, a resolução da estrutura cristalográfica $<2,0 \text{ \AA}$ e a presença de ligante foram os requisitos empregados para a filtragem considerando o tamanho da proteína molde e a cobertura de alinhamento.

As regiões estruturalmente conservadas e regiões variáveis foram localizadas por intermédio dos algoritmos disposto no T-COFFEE (NOTREDAME, 2000).

A etapa de busca por moldes para construção dos modelos só se aplica a utilização do SWISS-MODEL, pois o programa MODELLER realiza quase todos os estágios da modelagem molecular, desde a busca por melhores moldes até a construção dos modelos propriamente ditos.

4.8 MODELAGEM COMPARATIVA

Após a escolha dos modelos, um alinhamento com as sequências foi realizado usando a ferramenta CLUSTALΩ (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/clustalo>). Os programas MODELLER 9v19 (ESWAR, 2006) e SWISS-MODEL foram utilizados para a construção de modelos.

4.9 AVALIAÇÃO DOS MODELOS 3D

Para avaliar a qualidade da estrutura gerada, os melhores modelos (com ou sem ligantes) foram submetidos a análise estereoquímica utilizando a plataforma MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (HINTZE et al., 2016), onde foi possível gerar o gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968). Ainda com a finalidade de avaliar a qualidade da estrutura do modelo, foram utilizados os valores de QMEAN gerados pelo SWISS MODEL. Além disso, as ferramentas PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>) e Chimera (PETTERSEN et al., 2004) foram utilizadas para visualização das estruturas secundárias dos modelos. No final de todo processo, o modelo foi validado através do programa Atomic Non-Local Environment Assessment (ANOLEA). Este programa calcula a energia de conformação de cada resíduo da cadeia lateral da proteína (MELO, 1998).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Foram realizadas extrações de RNA total, a partir do micélio do fungo, quantificadas no espectrofotometro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific), onde obteve-se os seguintes dados para extração com Trizol e com o kit Direct-zol Plus (Zymo Research®) (Tabela 2).

O fungo cresceu em meio WY em condições em que o farelo de trigo estava bem triturado (Figura 6). O tempo de crescimento de 8-10 dias para esta cepa apresentou massa micelial suficiente para a extração de RNA. Segundo Meinhardt et al., (2006), as experiências de expressão de genes *in vitro* com os

micélios deste fungo foram cultivados durante 7 dias, apresentando bom crescimento. Como a expressão da quitinase é essencial para o crescimento do fungo, esse meio foi considerado satisfatório para experiências de extração de RNA.



Figura 6. Crescimento do fungo *M. perniciosus* em meio WY a 25°C durante 9 dias. Fonte: Autor, 2018.

Diferentes composições de meio de cultura podem interferir com o crescimento micelial e o metabolismo fúngico, o que afeta diretamente a expressão gênica e a produção de enzimas (TEIXEIRA et al., 2013). Em vista disso, de acordo com os dados obtidos, sugere-se que o ideal é cultivar este fungo em grandes placas para proceder à extração de RNA enquanto o fungo está crescendo (melhor condição para a expressão da quitinase).

Tabela 2. Análise quantitativa e qualitativa obtidos no espectrofotômetro NanoDrop do RNA extraído pelo método tradicional com Trizol de *M. perniciosus* e pelo kit Direct-Zol Plus da Zymo Research®

Extração		Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Relações de absorbancia (A260/280)	Relações de absorbancia (A260/230)
Identificação	Método			
2016 - 1	Kit Zymo	36,6	1,84	3,07
2016 - 2	Kit Zymo	32,1	1,01	0,97
2017 - 3	Tradicional	1,26	2,08	1,03
2017 - 4	Tradicional	1,79	1,93	0,61

2017 – 5	Tradicional	1,36	1,94	0,80
2017 – 6	Tradicional	1,64	2,02	4,1
2017 - 7	Tradicional	2,14	1,72	5,35

Tanto o método tradicional (Trizol) quanto o kit Zymo Research® forneceram um RNA de alta qualidade com valores de relação A260 / 280 entre 1,8 e 2,0. Amostras com relações de absorvância A260/230 acima de 1,8 são consideradas como produtos de extrações com elevados níveis de agentes contaminantes, como os fenóis utilizados na extração do RNA total (SAMBROOK, 2002). Soluções puras de DNA e RNA possuem valores de absorvância A260/280 de cerca de 1,8 e 2,0 respectivamente.

Na eletroforese em gel de agarose, a integridade do RNA total foi demonstrada pela presença de bandas íntegras de RNAr de 28s e 18s (Figura 6). No método do Trizol, uma banda com alto peso molecular correspondente ao DNA genômico estava presente.

Após alguns ciclos de cultivo em WY o fungo diminuía drasticamente seu desenvolvimento, dessa forma, a reativação do fungo no meio BDA, seguido de cultivo em média WY, foi ocasionalmente utilizada para fornecer uma extração de RNA bem sucedida.

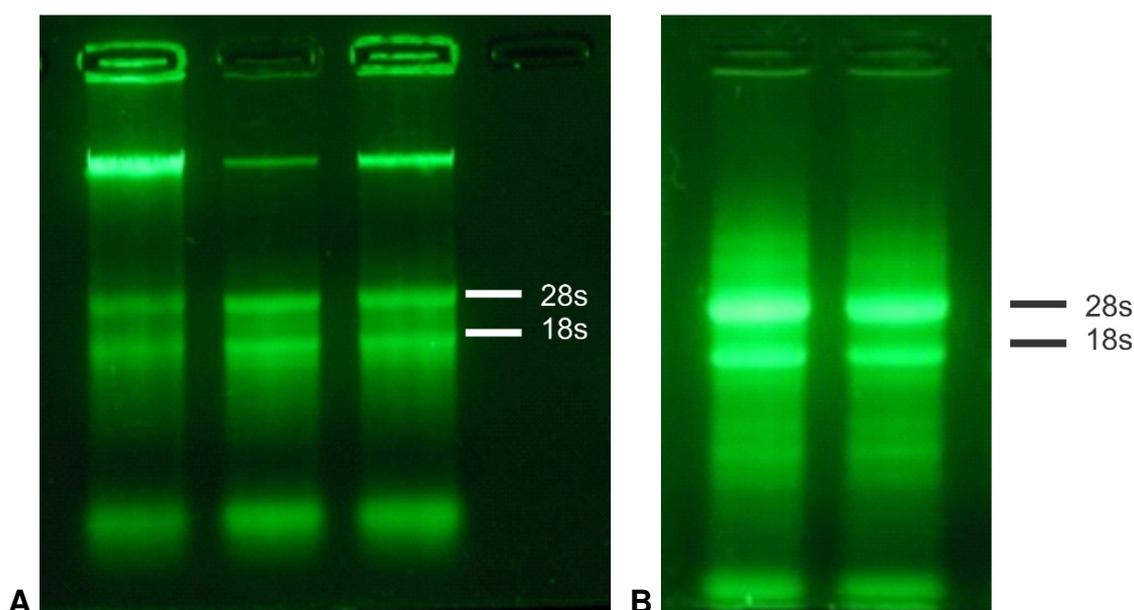


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% de extração de RNA de *M. pernicioso*. A) Método tradicional usando Trizol (Invitrogen). B) Método Kit Direct-zol. Em destaque as bandas correspondentes aos RNAr 28S e 18S.

O RNA total extraído traz informações genéticas traduzíveis em proteínas, tornando-se a mais indicada para a caracterização molecular de sequências proteicas. As moléculas fragmentadas originam uma má qualidade de dados; são obtidos bons resultados de extração quando o RNA é obtido puro, íntegro e livre de contaminantes (RUEGGER et al., 2004).

Neste trabalho, os melhores resultados qualitativos de extração foram obtidos usando o método tradicional (Trizol), uma vez que o perfil de RNA no gel de agarose demonstrou menor grau de degradação. Por outro lado, a extração realizada com o kit Direct-zol forneceu um método simples e útil para a purificação de RNA, mostrando ser uma técnica mais rápida, mas fornecendo um produto com maior grau de degradação. Assim, a amostra de extração do método tradicional foi considerada satisfatória e selecionada para a síntese de cDNA.

5.3 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS (*PRIMERS*)

Os iniciadores direto e reverso para as sequências codificantes obtidas a partir do genoma foram verificados quanto à temperatura de anelamento (T_m), porcentagem de conteúdo de GC e formação de estruturas secundárias (*hairpin*, *Self-dimer* e Hetero-dímero) e então delineado e selecionado usando a ferramenta online OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies®).

A inserção de sítios de restrição (em 5') não interferiu com o pareamento para a construção e nem interferiu significativamente nos valores de C/G%, T_m ou formação de estruturas secundárias. Os iniciadores e suas características são descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Dados referentes aos *primers* diretos e reversos desenhados, a proporção de Citosina e Guanina e a temperatura de anelamento (*Melting*)

Nome	Sequencia original	Sequencia (5'-3')	Direção	Conteúdo de C / G (%)	Temperatura de anelamento (T_m , °C)	Tamanho dos insertos (pb)
Chit_16246_F	Genoma	5'- GGAATCCA TATGATGA GTTGGCAA TATCTTCTA ACC -3'	Direto	38,9	59,8	1200

Chit_16246_R	Genoma	5'- GGCAAGCT TTTAGAATG CAGCAGAA GGAAT -3'	Reverso	45,2	61,8	1200
Chit_TEIX_F	Teixeira et al., (2013)	5'- GGACTCCA TATGGGAT GCAAACCG AAAAATTAC -3'	Direto	42,4	60,8	1000
Chit_TEIX_R	Teixeira et al., (2013)	5'- GGCAAGCT TCTACTTGG ACAATCCG GC -3'	Reverso	55,6	63,3	1000
oligodT	-	5'- GGCCACGC GTCGACTA GTACTTTT- 3'	-	-	≥ 50	-

Diferentes parâmetros, tais como temperatura de anelamento e pares de *primers* foram inicialmente testados para determinar a melhor condição para a síntese e amplificação do produto específico de cDNA.

5.4 SINTESE DO cDNA e AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO

Inicialmente, a síntese de cDNA a partir do RNA extraído e posterior amplificação do produto de cDNA do micélio cultivado em WY por 10 dias foi realizada com a Taq recombinante (Invitrogen), mas a análise em eletroforese não mostrou fragmentos amplificados esperados (1000 pb) para os dois pares de *primers* utilizados.

No experimento com fungos cultivados em um período mais curto (8 dias), com a temperatura de anelamento de 58 °C, foi possível observar a amplificação (Top Taq Master Mix - Qiagen) de fragmentos próximos ao tamanho esperado para o par de *primers* Chit_TEIX_F / Chit_TEIX_R, mas ainda com fragmentos menores (provavelmente não específicos). Para o par de *primers* Chit_16246_F / Chit_16246_R também foi possível detectar fragmentos de amplificação com tamanhos inferiores a 1000 pb (Figura 8).

Diferentes temperaturas de anelamento (57, 58, 59 e 60 ° C) e polimerases também foram testadas para se obter o fragmento de 1000 pb sem fragmentos inespecíficos. A temperatura de anelamento a 58 °C utilizando o

par Chit_TEIX_F / Chit_TEIX_R e a Polimerase Taq Platinum (Invitrogen) deram os resultados de amplificação de acordo com o tamanho esperado.

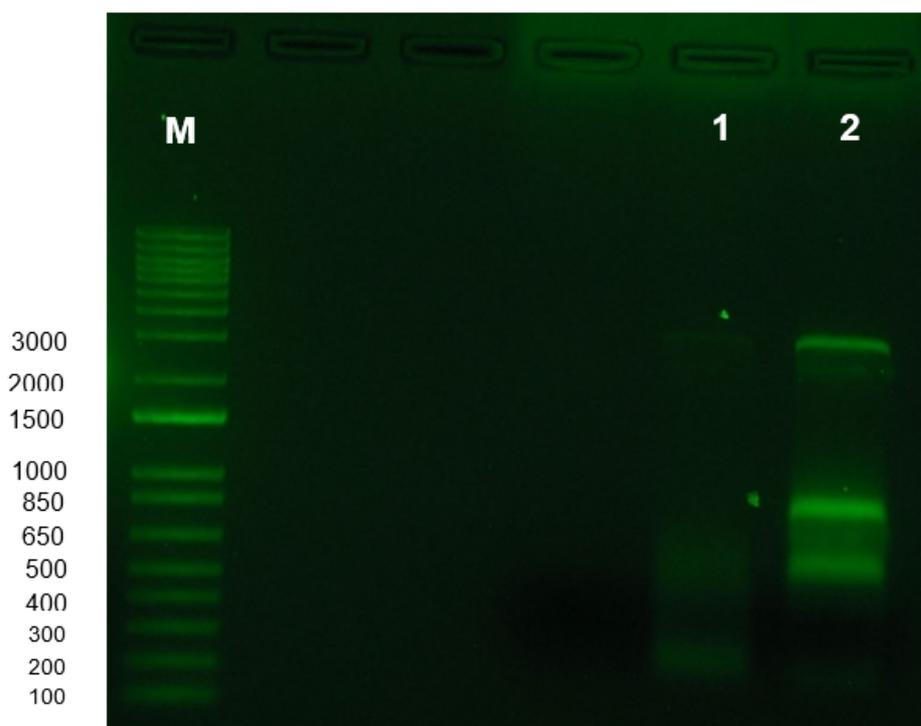


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do produto de cDNA de quitinases em *M. pernicioso*. (M) Marcador de 1 kb Plus DNA Ladder. (1) *Primers* Chit_16246. (2) *Primers* Chit_ TEIX.

Os *primers* aqui chamados Chit_TEIX_F e Chit_TEIX_R foram previamente utilizados para amplificar o gene *MpChi* do cDNA da vassoura verde (*Theobroma cacao*) (TEIXEIRA et al., 2013). Os dados obtidos neste trabalho, portanto, demonstram a eficiência desses iniciadores para amplificar produtos de cDNA dessa cepa com tamanho um pouco inferior a 1000 pb.

Algumas tentativas de purificação do fragmento de maior peso molecular foram feitas utilizando os kits Purelink Quick Gel Extraction (Invitrogen) e Purificação de PCR Purelink (Invitrogen), mas sem êxito até o momento. Novas condições de amplificação para ambos os pares de primers poderão ser testadas com o objetivo de obter um fragmento único de 1000 pb.

A obtenção de RNA e conseqüentemente o cDNA com boa qualidade são passos necessários para obter uma estratégia de clonagem de uma sequência alvo em um vetor de expressão (DEMAIN et al., 2009). Com isso, com a obtenção de um fragmento único amplificado próximo a 1000 pb, com a

adição de sítios de enzimas de restrição compatíveis com vetores de expressão, após confirmação e análise da de sequência, poderá ser utilizado para clonagem e produção heteróloga.

Essa etapa molecular do trabalho descreveu com sucesso a padronização das etapas de cultivo do fungo, extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação da sequência codificante relativa a quitinases, a se confirmar por sequenciamento. Sugere-se no momento também o desenho de *primers* relativos às demais sequências codificantes de quitinases disponibilizadas pelo genoma de *M. pernicioso* que apresentem relação estrutural analisada por modelagem comparativa compatível com sua funcionalidade, feita no tópico a seguir.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GH-18 DO GENOMA

As 14 sequências de quitinases obtidas a partir do genoma foram caracterizadas *in silico*; a partir dos dados obtidos pelas ferramentas Prosite e ProtParam avaliou-se as características bioquímicas das sequências trabalhadas (tabela 4).

A partir da análise de todas as sequências do genoma no Prosite foi possível localizar os resíduos envolvidos no sítio catalítico, bem como suas posições, e os resíduos doadores de prótons para todas elas.

Para as sequências 10765, 11696, 15737, 1679, 1680 observa-se sítios catalíticos na posição em torno de 140 a 160. Os doadores de prótons estão nas respectivas posições: 155 (E), 148 (E), 150 (E), 161 (E) e 156 (E). As sequências 4357 e 997 possuem sítios catalíticos na mesma posição, 184-192. O doador de prótons (E) destas sequências encontra-se na posição 192. Já as sequências 10955 e 315 possuem sítio catalítico em posições mais diferentes, sendo elas 430-438 e 327-335, respectivamente, enquanto os respectivos doadores de prótons estão presentes nas posições 438 (E) e 355 (E). Em vista disso, pode-se destacar que a posição 140-160 do sítio catalítico ocorre com frequência nas sequências das quitinases apresentadas no presente trabalho.

Estudos realizados por Lu et al., (2002) com quitinase de *Manduca sexta* revelaram a essencialidade dos resíduos Glu146 equivalente ao Glu106 na

quitinase de *M. pernicioso*. Diante disso, dependendo da posição espacial dos resíduos catalíticos, a hidrólise ocorre por meio da retenção global ou inversão geral da configuração anomérica.

Os dados obtidos nesse trabalho indicaram como doador catalítico de prótons o aminoácido Glutamato (E) entre a posição 150 e 160 (Tabela 4), sugerindo que os aminoácidos aqui descritos estão dentro dos padrões descritos na literatura, refletindo similaridade com as quitinases de outros fungos.

O número de resíduos das sequências selecionadas foi registrado, identificando a posição dos domínios protéicos presentes e confirmando que todas as sequências das quitinases utilizadas pertencem a família 18 das Glicosil Hidrolases. Deste modo, devido a presença de domínios e reconhecimento dos aminoácidos do sítio catalítico em todas as sequências, estas se tornaram habilitadas para a modelagem comparativa.

Tabela 4. Caracterização Bioquímica da Sequência de 14 Quitinases do genoma de *M. pernicioso* pelas ferramentas Prosite e ProtParam

Família	Sequência	Sítio ativo (Prosite)			ProtParam	
		Posição	Resíduos	Doador de prótons	Nº de resíduos	Peso molecular (kDa)
GH18	10765	147 - 155	LDGVLDiE	155 (E)	485	51,35
GH18	10955	430 - 438	LDGIDFDwE	438 (E)	716	77,74
GH18	11696	140 - 148	LDGLDFDwE	148 (E)	462	49,97
GH18	15210	130 - 138	LDGLDVDyE	138 (E)	920	104,02
GH18	15579	225 - 233	LDGIDIDwE	233 (E)	492	53,65
GH18	15737	142 - 150	LDGIDFDwE	150 (E)	423	45,88
GH18	16246	129 - 137	LDGLDFDwE	137 (E)	403	42,95
GH18	1679	153 - 161	LDGIDVDyE	161 (E)	998	107,32
GH18	1680	148 - 156	LDGVLDyE	156 (E)	327	34,92
GH18	315	327 - 335	LDGIDIDfE	335 (E)	1327	142,57
GH18	4357	184 - 192	LDGVLDiE	192 (E)	495	51,77
GH18	5707	236 - 244	FDGVLDwE	244 (E)	1091	117,55
GH18	8805	242 - 250	FDGIDIDwE	250 (E)	576	63,75
GH18	997	184 - 192	FDGIDLfE	192 (E)	509	55,10

A partir da análise de todas as sequências do genoma no ProtParam observou-se que o peso molecular das sequências de proteínas variou de 34,92 kDa (1680) a 142,57 kDa (315).

Jaques et al., (2003) demonstraram que quitinases de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Coccidioides immitis* foram classificadas como quitinases fungo/bactéria, com massa molecular de aproximadamente 46-48 kDa. Já as quitinases fungo/planta apresentaram massa molecular de 83-97 kDa (JAQUES et al., 2003). As quitinases encontradas em fungos e em plantas pertencem a classe III, e as encontradas principalmente em bactérias, podendo também ocorrer em vírus pertencem a classe V (DUO-CHUAN, 2006).

Assim como há uma grande variação do número de quitinases que estão presentes nos diferentes fungos, o número de quitinases de cada subgrupo que compõem a família GH18 em um mesmo microrganismo também varia consideravelmente. Contudo, as quitinases do subgrupo A apresentam peso molecular entre 40-50 kDa e estão presentes em todos os fungos. Enquanto as quitinases do subgrupo B, encontradas em fungos, apresentam peso molecular bastante variável, de 30-90 kDa. As quitinases do grupo C, presente unicamente em fungos, são consideravelmente maiores que as outras com peso molecular maior que 100 kDa, entretanto parecem não estar presentes em basidiomicetos (SEIDL, 2008).

Galante et al., 2012 afirmaram que o fragmento parcial da sequência de quitinase modelada apresentou massa molecular de 21,62 kDa, refletindo similaridade com as quitinases de outros fungos (DUO-CHUAN, 2006).

Dessa forma, os valores encontrados para peso molecular das sequências indicam que todas sequências possuem similaridade com as quitinases encontradas em outros fungos. Deste modo, sugere-se que a maioria das sequências estão entre os subgrupos A e B, a sequência 1680 está presente no subgrupo B, e as sequências 15210, 1679, 315, 5707 se enquadram no subgrupo C.

5.6 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MOLDES

Após submissão ao servidor SWISS-MODEL das sequências das quitinases de *M. perniciosus* obtidas a partir do genoma, dois diferentes moldes foram selecionados para cada quitinase.

Para as 14 sequências selecionadas (Anexo 1) um molde foi escolhido para cada uma. Para isso, entre ambas as sequências (problema-molde),

priorizou-se um grau de identidade de pelo menos 30% (VERLI, 2014; PACHECO, 2009). Além disso, uma resolução da estrutura cristalográfica menor a 2,4 Å e a presença de ligante também foram parâmetros para filtragem (Tabela 5), para que na modelagem comparativa fossem contempladas as relações funcionais e estruturais entre essas enzimas e os modelos fossem gerados com menos imperfeições.

Avaliando os valores de qualidade dos moldes das sequências selecionadas pelo SWISS-MODEL, observa-se que os valores de identidade variaram entre 52,36% (1WNO) e 29,00% (3FY1). O molde 1WNO apresentou o maior percentual de identidade com a sequência 15210, além de 2,1 Å de valor de resolução e presença de ligante, indicando valores satisfatórios para a construção de um modelo por modelagem comparativa. Enquanto o molde 3FY1, apesar de apresentar 1,7 Å de valor de resolução e presença de ligantes, exibiu o menor valor de identidade com a sequência 15579, compreendendo menos de 30%. Quando duas enzimas compartilham identidade sequencial maior que 30% existe a dedução de que há ancestralidade comum entre elas (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003). Assim, a proteína de interesse não seria homóloga ao molde nas bases de dados de proteínas quando alinhada ao molde 3FY1, o que tornaria inviável os estudos de modelagem por homologia.

Tabela 5. Caracterização dos Moldes selecionados para Sequências alvo de Quitinases de *M. pernicioso*

Sequência do genoma	Moldes Selecionados (código PDB)	Identificação do molde	Identidade (%)	Resolução (Å)	Ligantes
10765	2UY4	Endoquitinase	46,27	1,8	1 x AZM
10955	5GZT	Quitinase	31,23	2,1	Não
11696	2A3C	Quitinase	35,03	2,1	2 x PNX
15210	1WNO	Quitinase	52,36	2,1	1 x MG, 1 x NDG
15579	3FY1	Quitinase ácida de Mammalia	29,00	1,7	1 x NAA, 1 x AMI, 1 x NA1
15737	4TXG	Quitinase	29,48	1,8	11 x CS
16264	3ARQ	Quitinase A	32,01	1,5	1 x DM5
1679	4TX8	Quitinase provável A	30,92	2,2	1 x MG, 1 x CA, 1 x NAG, 4 x FLC

1680	4HME	Quitinase 60	30,49	2,1	2 x NAG-NAG
315	5DEZ	Quitinase A	31,94	2,3	6 x NAG
4357	2UY4	Endoquitinase	47,31	1,8	1 x AZM
5707	4WJX	Quitotriosidase- 1	34,49	1,0	2 x TLA
8805	1HKK	Quitotriosidase- 1	42,73	1,8	2 x NAA-NAA, 2 x AMI, 2 x ZN
997	3G6M	Quitinase	49,48	1,6	2 x CFF

Além disso, de todos os moldes selecionados a partir das sequências analisadas apenas o 5GZT da sequência 10955 não apresentava ligante. O reconhecimento molecular entre o ligante e o alvo permite a seleção de moléculas com maior probabilidade de terem afinidade pelo sítio de ligação. Nessa abordagem, a presença do ligante é de suma importância, pois permite avaliar o sítio catalítico dos modelos gerados. Desse modo, foi possível selecionar moldes para 12 sequências (85,71%) dentro dos parâmetros recomendados.

Através da análise das sequências das proteínas obtidas foi possível identificar que todas as estruturas selecionadas foram elucidadas pelo mesmo método experimental, a técnica de Cristalografia por difração de Raios X, possuindo diferentes resoluções. Além disso, demonstrou-se que os moldes possuem origens diversas, podendo ser encontrados em diversos organismos, como fungos, bactérias, plantas, vírus e humanos, conforme descrito na tabela 6.

Tabela 6. Análise da classificação, da origem e do método de determinação da estrutura tridimensional dos moldes selecionados

Molde	Classificação	Organismo	Método
2UY4	Hidrolase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Difração de Raios X
5GZT	Hidrolase	<i>Paenibacillus sp.</i>	Difração de Raios X
2A3C	Hidrolase	<i>Neosartorya fumigata</i>	Difração de Raios X
1WNO	Hidrolase	<i>Neosartorya fumigata</i>	Difração de Raios X
3FY1	Hidrolase	<i>Homo sapiens</i>	Difração de Raios X

4TXG	Hidrolase	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Difração de Raios X
3ARQ	Hidrolase	<i>Vibrio harveyi</i>	Difração de Raios X
4TX8	Hidrolase	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Difração de Raios X
4HME	Hidrolase	<i>Moritella marina</i>	Difração de Raios X
5DEZ	Hidrolase	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>	Difração de Raios X
4WJX	Hidrolase	<i>Homo sapiens</i>	Difração de Raios X
1HKK	Hidrolase	<i>Homo sapiens</i>	Difração de Raios X
3G6M	Hidrolase/ Inibidor	<i>Bionectria ochroleuca</i>	Difração de Raios X

Do mesmo modo, foi possível identificar proteínas com domínios estruturais similares aos da sequencias em estudo, realizando uma busca pelos domínios de cada sequência de quitinase, pelo NCBI, confirmando que todas as sequencias das quitinases utilizadas pertencem a família 18 das Glicosil Hidrolases (Tabela 6). A existência das semelhanças entre as sequências e modelos selecionados sugere que é possível construir um modelo por homologia da quitinase de *M. perniciososa*.

5.7 DESCRIÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS GERADOS

5.7.1 Análise da qualidade global e local dos modelos gerados

A validação realizada no MolProbity gerou os gráficos de Ramachandran, considerando o percentual dos resíduos dentro das regiões energeticamente favoráveis. Para fornecer estimativas de qualidade absoluta globais e local, com base em um único modelo, foi utilizado o QMEAN, gerado pelo SWISS-MODEL. Desta forma, um estudo comparativo dos modelos mostra que estes apresentam algumas diferenças na qualidade estereoquímica, como demonstrado na tabela 7.

Tabela 7. Análise estereoquímica do gráfico de Ramachandran e dos valores de QMEAN dos modelos construídos de quitinases de *M. perniciososa*. Os modelos sublinhados estão dentro dos parâmetros de qualidade para ambas as análises.

Modelo	Resíduos em posições energeticamente favoráveis (%)	QMEAN
--------	---	-------

10765 (2UY4)	91,3	-6,34
<u>10955 (5GZT)</u>	96,5	-3,13
11696 (2A3C)	88,5	-0,76
<u>15210 (1WNO)</u>	95,8	-2,95
15579 (3FY1)	92,9	-6,15
15737 (4TXG)	88,4	-7,17
16246 (3ARQ)	85,8	-7,53
<u>1679 (4TX8)</u>	94,7	-4,19
1680 (4HME)	87,1	-7,32
<u>315 (5DEZ)</u>	97,1	0,87
<u>4357 (2UY4)</u>	93,1	-2,93
<u>5707 (4WJX)</u>	95,1	-3,61
8805 (1HKK)	89,9	-7,17
<u>997 (3G6M)</u>	97,2	-3,66

O Gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968) considera satisfatório um modelo que possui pelo menos 90% dos resíduos dentro das regiões energeticamente favoráveis (LASKOWSKI et al., 1994; VERLI, 2014). Em vista disso, os dados gerados demonstraram que dos 12 modelos construídos, 9 apresentam percentual indicado para análise da funcionalidade das enzimas.

Por sua vez, o QMEAN é uma função de pontuação composta com base em diferentes propriedades geométricas. Os índices de QMEAN -4 ou abaixo são uma indicação de modelos com muito baixa qualidade (BENKERT, KÜNZLI e SCHWEDE, 2009). Para os modelos avaliados pelo QMEAN, dos 12 modelos selecionados (Apêndice 2), 7 foram considerados modelos com boa qualidade para análise da funcionalidade das enzimas.

Dessa forma, quando comparados pelos valores de Ramachandran e QMEAN, os modelos 10955 (5GZT), 15210 (1WNO), 1679 (4TX8), 315 (5DEZ), 4357 (2UY4), 5707 (4WJX), 997 (3G6M) foram considerados satisfatórios para a predição e análise da estrutura 3D (tabela 7).

5.7.2 Análise estrutural dos modelos

Foram gerados 05 modelos a partir da seleção realizada baseada na identidade sequencial com o molde e qualidade dos modelos (Apendice 1).

Contudo, somente 01 modelo foi selecionado (Figura 9) com base no critério de visualização da imagem do melhor alinhamento entre moldes e sequências para avaliação da relação estrutural e funcional.

Uma notória proximidade filogenética pode ser percebida na análise dos moldes com identidade esperada comparada ao molde 3G6M, que se restringiu a espécies de fungos semelhantes. Na modelagem, contribuiu para que fossem contempladas as semelhanças estruturais entre as enzimas.

O modelo selecionado 997 (3G6M) (Figura 9), apresenta 49,48% de identidade sequencial com o molde, 97,2% de resíduos energeticamente favoráveis e QMean de -3,66.

Este modelo apresenta ainda um domínio catalítico com estrutura em forma de barril α/β . Foi possível verificar que o sítio catalítico está localizado em uma região de barril β no intervalo entre os resíduos 184-192. Como em outras quitinases, esse modelo tem o motivo DxxDxDxE na cadeia, com Glu192 como o resíduo catalítico no meio da extremidade aberta do barril (α/β).

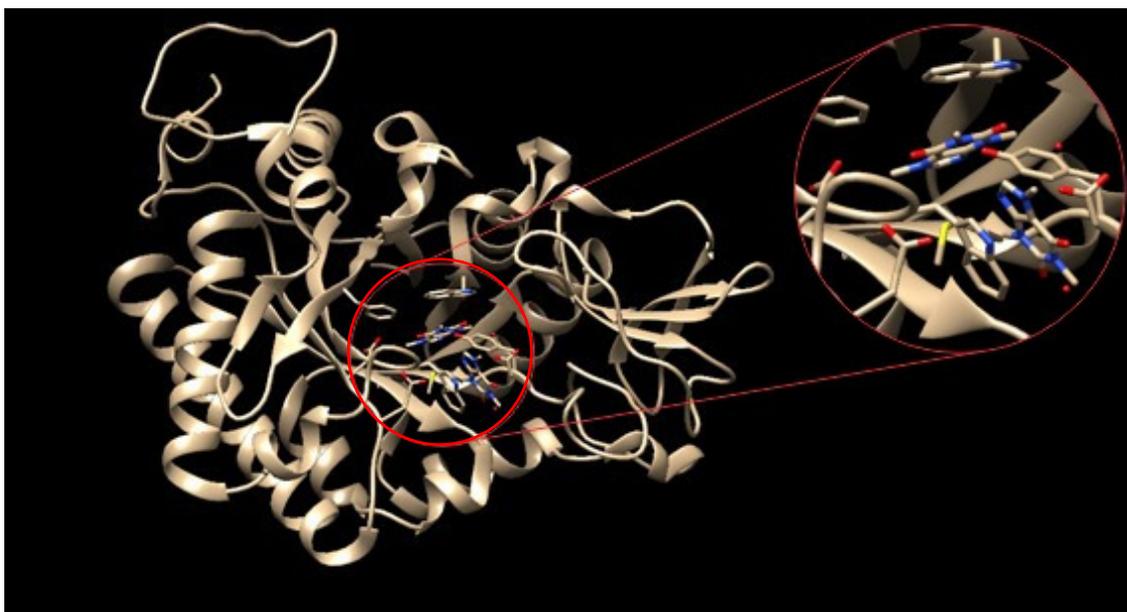


Figura 9. Modelagem Comparativa do modelo 997 (3G6M) gerado pelo MODELLER. Em destaque, o sítio ativo com a presença de 2 ligantes CFF (Cafeína). Fonte: Autor, 2018

Visto que a qualidade de um modelo criado por modelagem comparativa depende de um grande número de fatores, a partir de uma análise estrutural observou-se uma baixa qualidade do modelo gerado pelo MODELLER, devido à uma grande diferença entre o número de resíduos da proteína alvo e o molde utilizado (3G6M), gerando uma grande quantidade de loops na estrutura da

proteína modelada. Por outro lado, o modelo construído pelo servidor do SWISS MODEL, obteve melhores parâmetros de validação. (Figura 10).

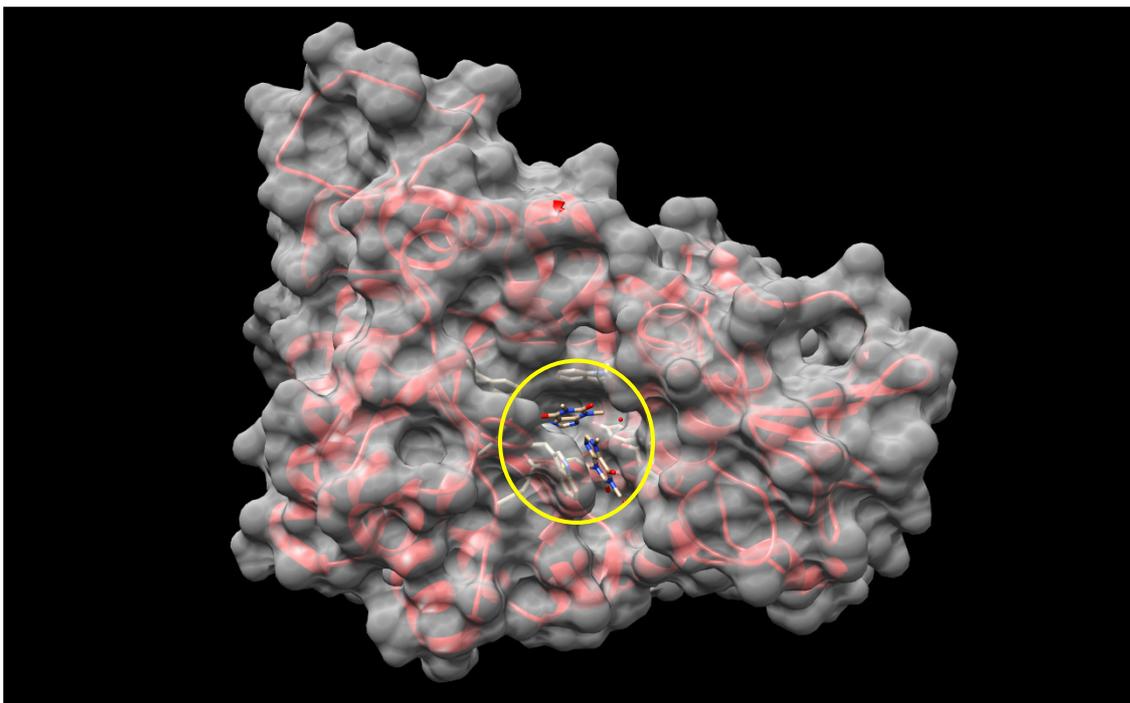


Figura 10. Modelagem Comparativa do modelo 997 (3G6M) gerado pelo SWISS MODEL. Em destaque os ligantes CFF (Cafeína). Fonte: Autor, 2018

A qualidade de um modelo pode ser avaliada através da validação, uma etapa que pode ser realizada em diferentes momentos a fim de se selecionar o melhor modelo, sendo esta crucial no processo de modelagem molecular comparativa. Deste modo, uma avaliação estereoquímica foi realizada neste modelo, através do gráfico de Ramachandran, indicando 94,5% de resíduos energeticamente favoráveis e QMean de -1,11 (Figura 11).

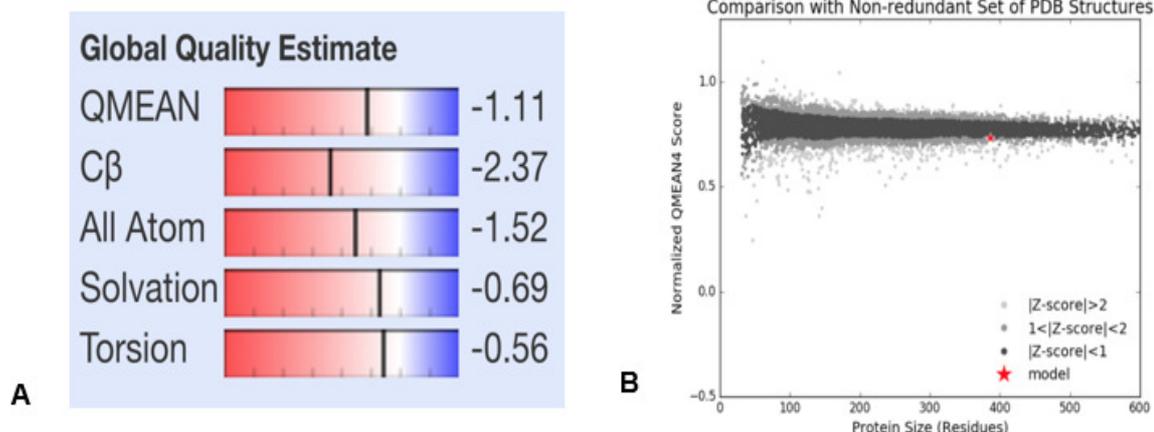


Figura 11. Estimativa da qualidade do modelo previsto pelo cálculo do QMean (A)- Z score (B) do Modelo 997 (3G6M) gerado pelo SWISS MODEL.

Devido a presença do ligante inibidor CFF (Figura 12) é possível fazer uma melhor avaliação do sítio catalítico deste modelo. Segundo Yang (2010), os resíduos de aminoácidos que passaram por uma mutagênese sítio-dirigida formaram ligações de hidrogênio com moléculas de cafeína, o que sugere que esses resíduos são importantes para a ligação do substrato e o processo hidrolítico.

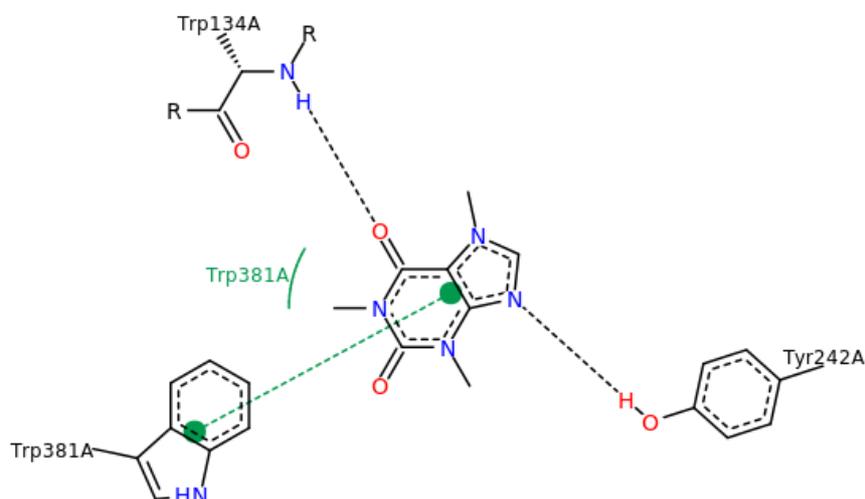


Figura 12. Imagem da posição do ligante CFF (Cafeína) no molde 3G6M. Fonte: Protein Data Bank, 2018

Nas quitinasases da família GH18 diferentes domínios são encontrados (Figura 13). Enquanto algumas quitinasases apresentam apenas o domínio GH18, outras apresentam uma composição de diferentes domínios. O domínio

GH18 contém as regiões conservadas DxxDxDxE e S/AxGG, as quais correspondem ao sítio catalítico e a região de ligação ao substrato, respectivamente (SEIDL, 2008).

O domínio catalítico das quitinases da família GH18 possui uma estrutura tridimensional caracterizada por um barril (β/α)₈, ou barril TIM (triose fosfato isomerase), com oito α -hélices e oito fitas β (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007) e domínios não catalíticos de ligação a quitina (SASAKI et al., 2002). Além disso, hidrolizam as pontes glicosídicas, produzindo fragmentos β -anoméricos do resíduo de GlcNAc que ocupa o subsítio -1 do sítio de ligação ao substrato da enzima (ISELI et al., 1996), e possuem sensibilidade a alosamidina.

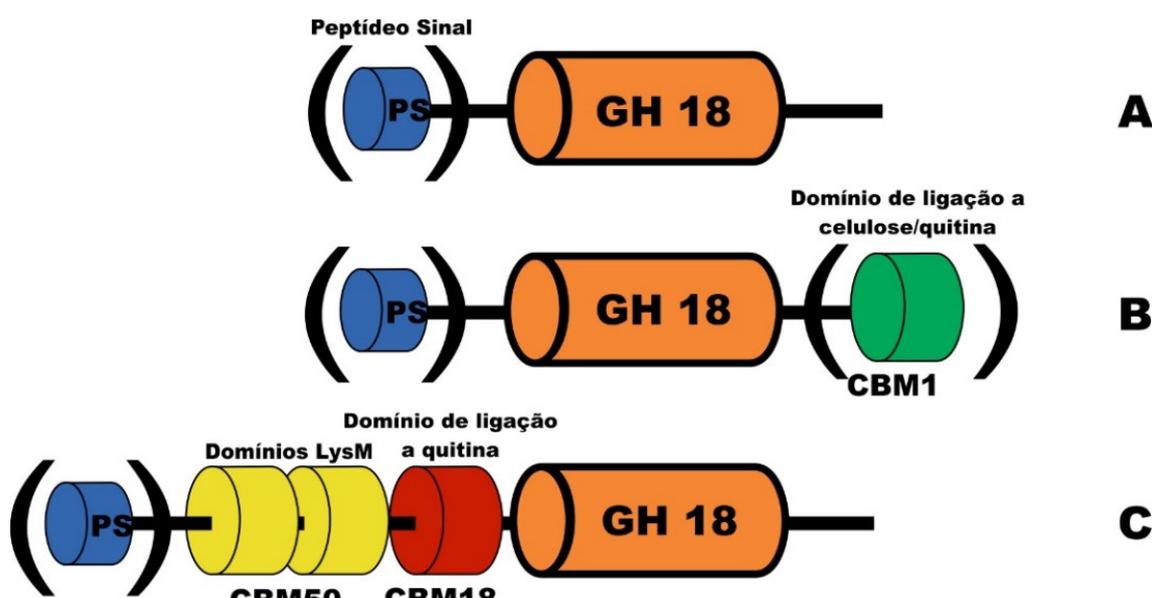


Figura 13. Representação esquemática dos domínios presentes em proteínas da família 18 das glicosil hidrolases. Subgrupos sugeridos por Seild et al., (2005). Presença de diferentes módulos caracterizam os subgrupos de quitinases. GH18- domínio catalítico das glicosil hidrolases da família 18; PS – Peptídeo sinal; CBM1 – domínio de ligação a celulose/quitina; CBM18 – domínio de ligação a quitina; CBM50- domínios peptideoglicanas/quitina ou domínios LysM. Os parênteses indicam que a presença de determinado domínio não é obrigatória. Fonte: Adaptado de JUNGES, 2014.

As quitinases dos subgrupos A e C apresentam o sítio de ligação ao substrato em formato de túnel, com profundidade, formando uma estrutura tridimensional indicando atividade de exoquitinase. As quitinases do subgrupo

B apresentam um sítio de ligação ao substrato mais aberto e pouco profundo, normalmente encontrado em endoquitinases (EIJSink et al., 2008).

De acordo com os resultados obtidos, dentre os 5 modelos selecionados para análise estrutural (Apendice 1), todos os modelos apresentam em suas estruturas domínios catalíticos em forma de barril α/β . Enquanto os sítios catalíticos desses modelos foram identificados em região de barril β . Segundo Hollis et al., (2000) o domínio catalítico das quitinases da família 18 apresenta uma estrutura em forma de α/β TIM BARRIL em *Coccidioides immitis*. Portanto, os modelos gerados neste trabalho refletem similaridade com quitinases da família 18 quando encontradas em fungos. Além disso, a presença de ligantes possibilitou uma melhor avaliação dos sítios catalíticos dos modelos, analisados através de um alinhamento estrutural.

5.7.3 Alinhamento estrutural

O alinhamento entre o molde 3G6M e o modelo 997 gerado pelo SWISS MODEL (Figura 14), realizado com o programa CHIMERA, apresentou 48,19% de identidade e o desvio (RMSD) da cadeia principal do modelo em relação ao molde foi de 0,276 Å.

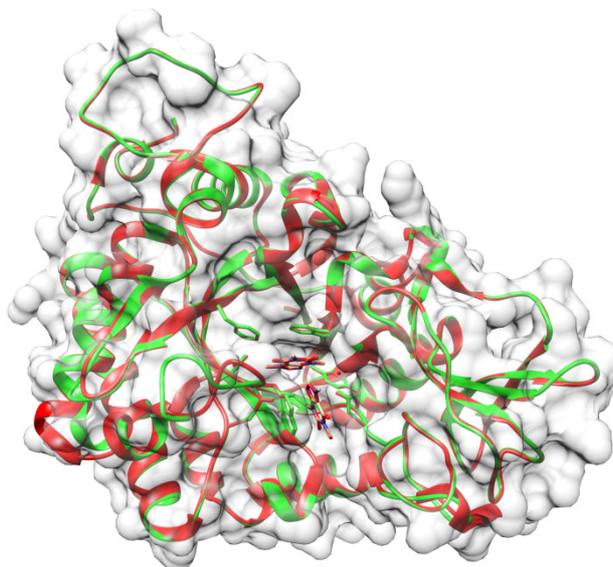


Figura 14. Alinhamento sequencial da Modelagem Comparativa do modelo 997 (3G6M) gerado pelo SWISS MODEL .

Nesse sentido, foi possível definir quais aminoácidos fazem parte do sítio ativo da enzima alvo, a partir da comparação estrutural com o molde 3G6M (Figura 15). A partir do alinhamento estrutural entre o modelo construído e o molde utilizado foi possível verificar no sítio ativo uma substituição da valina 189 no molde por uma leucina no modelo. Já na posição 191 encontramos uma Fenilalanina no molde no modelo um Triptofano (Yang et al., 2010). Nesse caso não deve haver prejuízo para o mecanismo catalítico já que as substituições incluem aminoácidos do mesmo grupo químico. Os demais aminoácidos do sítio ativo permaneceram inalterados.

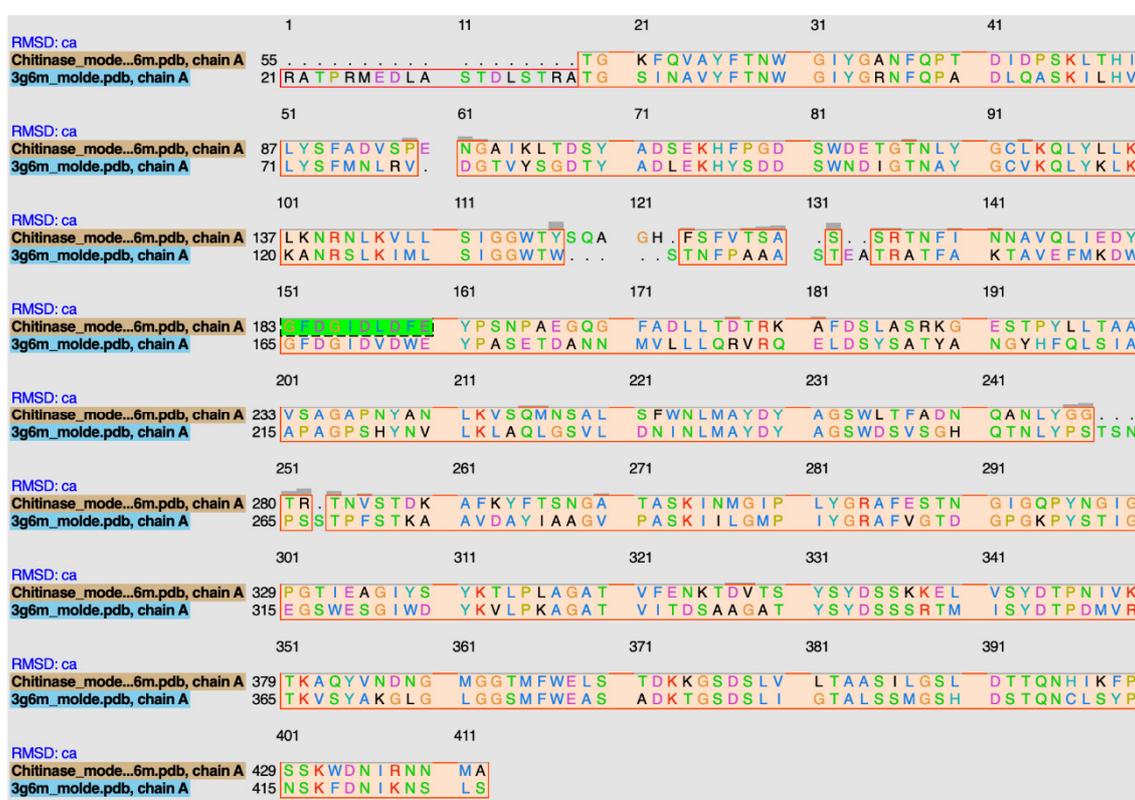


Figura 15. Alinhamento sequencial realizado pelo programa Chimera entre o molde e o modelo 997 (3G6M) do SWISS MODEL.

Uma estrutura 3D construída geralmente precisa ser refinada e induzida a uma conformação estável e aceitável. Para isso, o processo de refinamento conhecido como otimização geométrica por minimização de energia potencial é indicado para sua validação.

5.7.4 Minimização de Energia e Dinâmica Molecular

O processo de validação das moléculas construídas através de Modelagem por Homologia gerou dados através dos quais foi possível verificar a qualidade dessas moléculas antes e depois dos processos de refinamento e Dinâmica Molecular.

Nesse procedimento as coordenadas dos átomos são modificadas de forma a alterar a energia da estrutura para um valor mínimo, através da modificação de parâmetros geométricos, como comprimentos e ângulos de ligação, a fim de aproximá-los de valores determinados experimentalmente. A estrutura de mais baixa energia é considerada como o arranjo mais estável, e, por definição, de geometria otimizada (Insight II User Guide, 1995).

A validação do modelo, após refinamento e Dinâmica Molecular, utilizando o pacote de programas AMBER 14, demonstrou através de um gráfico que a conformação dessa molécula é energeticamente favorável, com energia total de $-2.5790E+05$ Kcal/Mol. Além disso, o valor de Qmean de -2.19, apesar de alterado após a dinâmica, é considerado satisfatório, mantendo um modelo de qualidade (Figura 16).

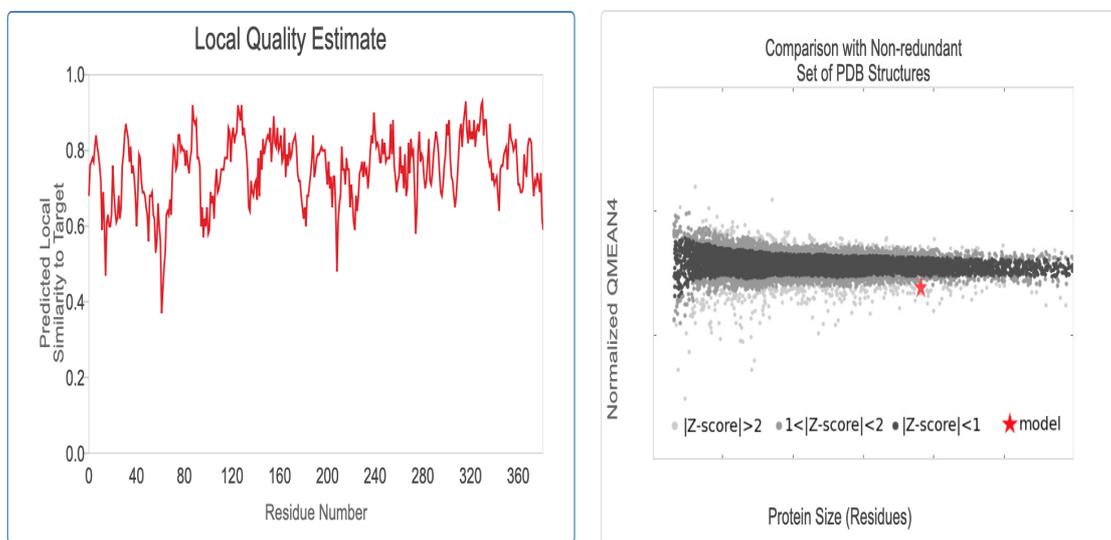


Figura 16. Estimativa da qualidade pelo cálculo do QMean do Modelo 997 (3G6M) gerado pelo SWISS MODEL após refinamento e Dinâmica Molecular.

Posteriormente, um novo alinhamento estrutural foi realizado indicando que as características se mantiveram (Figura 17), os aminoácidos do sítio ativo

permaneceram inalterados e o desvio (RMSD) da cadeia principal do modelo em relação ao molde aumentou para 1.103 Å.

RMSD: ca	1	11	21	31	41	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	1	TG	KFQVAYFTNW	GIYGANFQPT	DIDPSKLTHTI
molde_3g6m.pdb, chain A	21	RA T P R M E D L A	S T D L S T R A T G	S I N A V Y F T N W	G I Y G R N F Q P A	D L Q A S K I L H V
RMSD: ca	51	61	71	81	91	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	33	L Y S F A D V S P E	N G A I K L T D S Y	A D S E K H F P G D	S W D E T G T N L Y	G C L K Q L Y L L K
molde_3g6m.pdb, chain A	71	L Y S F M N L R V	D G T V Y S G D T Y	A D L E K H Y S D D	S W N D I G T N A Y	G C V K Q L Y K L K
RMSD: ca	101	111	121	131	141	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	83	L K N R N L K V L L	S I G G W T Y S Q A	G H . F S F V T S A	S . . . S R T N F I	N N A V Q L I E D Y
molde_3g6m.pdb, chain A	120	K A N R S L K I M L	S I G G W T W S T N F P A A A	S T E A T R A T F A	K T A V E F M K D W
RMSD: ca	151	161	171	181	191	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	129	G F D G T D V D W E	Y P S N P A E G Q G	F A D L L T D T R K	A F D S L A S R K G	E S T P Y L L T A A
molde_3g6m.pdb, chain A	165	G F D G T D V D W E	Y P A S E T D A N N	M V L L L Q R V R Q	E L D S Y S A T Y A	N G Y H F Q L S I A
RMSD: ca	201	211	221	231	241	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	179	V S A G A P N Y A N	L K V S Q M N S A L	S F W N L M A Y D Y	A G S W L T F A D N	Q A N L Y G G . . .
molde_3g6m.pdb, chain A	215	A P A G P S H Y N V	L K L A Q L G S V L	D N I N L M A Y D Y	A G S W D S V S G H	Q T N L Y P S T S N
RMSD: ca	251	261	271	281	291	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	226	T R . T N V S T D K	A F K Y F T S N G A	T A S K I N M G I P	L Y G R A F E S T N	G I G Q P Y N G I G
molde_3g6m.pdb, chain A	265	P S S T P F S T K A	A V D A Y I A A G V	P A S K I I L G M P	I Y G R A F V G T D	G P G K P Y S T I G
RMSD: ca	301	311	321	331	341	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	275	P G T I E A G I Y S	Y K T L P L A G A T	V F E N K T D V T S	Y S Y D S S K K E L	V S Y D T P N I V K
molde_3g6m.pdb, chain A	315	E G S W E S G I W D	Y K V L P K A G A T	V I T D S A A G A T	Y S Y D S S S R T M	I S Y D T P D M V R
RMSD: ca	351	361	371	381	391	
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	325	T K A Q Y V N D N G	M G G T M F W E L S	T D K K G S D S L V	L T A A S I L G S L	D T T Q N H I K F P
molde_3g6m.pdb, chain A	365	T K V S Y A K G L G	L G G S M F W E A S	A D K T G S D S L I	G T A L S S M G S H	D S T Q N C L S Y P
RMSD: ca	401	411				
Modelo_997_3g6m_Dinamica.pdb	375	S S K W D N I R N N	M A			
molde_3g6m.pdb, chain A	415	N S K F D N I K N S	L S			

Figura 17. Alinhamento estrutural realizado pelo programa Chimera entre o molde e o modelo 997 (3G6M) do SWISS MODEL, após refinamento e Dinâmica Molecular.

Ajustes para se obter uma correta conformação é indispensável para futuros estudos de prováveis ligantes/inibidores para essa molécula. Além disso, o valor de energia livre final do modelo após a dinâmica se apresentou dentro do esperado para moléculas biologicamente ativas, indicando que o processo de refinamento por minimização de energia e a Dinâmica Molecular encontraram conformações de mínimo provavelmente ativas biologicamente e com desvio entre o molde e modelo reduzidos. Portanto, a qualidade do modelo final, obtido após a dinâmica, permite inferir que este apresenta uma estrutura aceitável em níveis energéticos e conformacionais, quando comparados com estruturas proteicas do banco de dados PDB.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos na pesquisa, constou-se que as etapas de cultivo do fungo, extração de RNA e de síntese de cDNA por meio da extração de RNA mostram-se favoráveis para a detecção da expressão da enzima quitinase pelo fungo *M. pernicioso*. Com base no produto de *M. pernicioso* após a reação de PCR dos produtos de cDNA, foi possível verificar fragmentos menores ao referente à amplificação da região específica esperada, necessitando de novas padronizações quanto aos *primers* específicos a ser utilizados e condições de amplificação. A partir disso, realizou-se uma padronização das etapas que antecedem e propiciam a obtenção de um modelo tridimensional que apresente boa qualidade para análise funcional da enzima.

Em vista disso, foi possível concluir que o modelo 997 de enzima hipotético gerado tem características estruturais de quitinases fúngicas devido à similaridade observada entre os dados obtidos neste trabalho e os descritos em literatura. A determinação da estrutura tridimensional de quitinases de *M. pernicioso* através de modelagem comparativa demonstrou a obtenção de modelos com qualidade e que a sequência proteica analisada por alinhamento é favorável para a produção recombinante na forma ativa.

Como perspectivas futuras propõe-se a otimização das estruturas 3D e a simulação de dinâmica molecular dos modelos, para maior análise pontual das interações enzima-ligante; e a clonagem e produção recombinante das sequências proteicas de quitinases de *M. pernicioso* estruturalmente validadas nesse trabalho para estudos de aplicação biotecnológica, a partir das etapas padronizadas de obtenção e amplificação do produto específico de cDNA.

REFERÊNCIAS

AAM, B.B.; HEGGSET, E.B.; NORBERG, A.N.; SORLIE, M.; VÅRUM, K.M.; EIJSINK, V.G.H. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1482-1517, 2010.

AIME, M.C. e PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012-1022, 2005.

ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, BA.**

2002, 53f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n., p.27-34, 2007.

BARROS, N. M, et al. Fungos como agentes de controle de pragas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. p. 491- 531.

BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Web Server issue, p. W510–4, Jul. 2009.

BERMAN, H. et al. The Protein Data Bank, 1999. **International Tables for Crystallography**, Vol. F, Chapter 24.5, p. 675-684, 2006.

BIASINI, M. E. A. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Web Server issue, p. W252–8, Jul 2014.

BOISSEL, J.P., LEE, W.R., PRESNELL, S.R., COHEN, F.E. & BUNN, H.F. Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. **J. Biol. Chem.**, 268:15983-15993, 1993.

BOKMA E, VAN KONINGSVELD GA, JERONIMUS-STRATINGH M, AND BEINTEMA JJ. Hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, cleaves peptidoglycan between the C-1 of N-acetylglucosamine and C-4 of N-acetylmuramic acid and therefore is not a lysozyme. **FEBS Lett**. 1997 Jul 14;411(2-3):161-3.

BOKMA E, ROZEBOOM HJ, SIBBALD M, DIJKSTRA BW AND BEINTEMA JJ (2002) Expression and characterization of active site mutants of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Eur J Biochem** 269:893–901.

BRANDEAU, J.El cacao. Barcelona: Blume, 1992.

BRASIL. Ceplac. **Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira**. Cacao. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>>. Acesso em: 20 out, 2013.

CEPLAC. **A CEPLAC**. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/paginas/ceplac/ceplac.asp>. Acesso em: 22 de jul, 2011.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. Tradução Carla Dalmaz et al., 3ª Edição, Porto Alegre: Artmed, 2006, 544p.

CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 833–846, ago. 2013.

CHRISTODOULOU, E.; DUFFNER, F.; VORGIAS, C.E. Over expression, purification, and characterization of a thermostable chitinase (Chi40) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p. 97-105, 2001.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 9, p. 270-277, 1998.

COSTA, J. C. B. et al. Controle Biológico da Vassoura-de-bruxa do Cacaueiro na Bahia, Brasil. **Biocontrole de Doenças de Plantas: usos e perspectivas**, Jaguariúna: SP, 2009. 245-266.

COUTINHO, K.; MORGON, N. H. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1ª ed. São Paulo: Da Física, 2007. p.423-450

DA SILVEIRA, N. F. **Bioinformática Estrutural Aplicada ao Estudo de Proteínas Alvo do Genoma do Mycobacterium tuberculosis**. 2005, 124. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho/UNESP, 2005.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; TIWARI, R.P.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773–782, 2006.

DE CASTRO, E. et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server, p. W362-W365, 2006

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv** 2009, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DORN, MÁRCIO; NORBERTO DE SOUZA, O. Mining the Protein Data Bank with CReF to predict approximate 3-D structures of polypeptides. **International Journal of Data Mining and Bioinformatics**, 4(3): 281-299, 2010.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, p. 345-360, 2006

DURU, S. et al. Chitinases and lung diseases. **Tuberk Toraks**, Turkey, v. 61, n. 1, p.71-75, 2013.

EIJSINK V.G., VAAGE-KOLSTAD G., VARUM, K.M., HORN, S.J. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. **Trends Biotechnol** 26: 228-235, 2008.

ESWAR, N. E. A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current protocols in bioinformatics**, v. Chapter 5, p. Unit 5.6, Out 2006.

FANG, W; AZIMZADEH, P; ST LEGER, R.J. Strain improvement of fungal insecticides for controlling insect pests and vector-borne diseases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2012.

FUNKHOUSER, J. D.; ARONSON, N. N. JR. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evol Biol**, v. 7, n. 1, p. 96-112, 2007.

GALANTE, R. S. et al. Purification, characterization and structural determination of chitinases produced by *M. pernicioso*. **An Acad Bras Cienc.**, v. 84, n. 2, p. 469-86, 2012.

GAUVREAU, G. M. et al. Allergen bronchoprovocation and chitinases in allergic asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, p.149-151, 2013.

GAVALA, M. L. et al. Segmental allergen challenge enhances chitinase activity and levels of CCL18 in mild atopic asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, Madison, v. 43, n., p.187-197, 2012.

GOLDSMITH-FSCHMAN, S.; HONIG, B. Structural genomics: computacional methods for structure analyses. **Protein Science**. v. 12, p. 1813-1821, 2003.

GOMAA, E.Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potencial in antifungal biocontrol. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n.1, p. 103-111, 2012.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quím. Nova [online]**. v.30, n.1, p. 136-145, 2007.

GRAHAM, L.S.; STICKLEN, M.B. Plant chitinases. **Can J Bot**, v. 72, p. 1057-1083, 1994.

GRIFFITH, G. W. et al. Autecology and evolution of the witch' broom patogen (*Crinipellis pernicioso*) of cocoa. In: BLAKEMAN, J. P.; WILLIAMISON, B. **Ecology of Plant Pathogens**. Oxon: CAB International, 1994, p. 245-267.

GRIFFITH, G.W.; NICHOLSON, J. NENNINGER, A.; BIRCH, R.N.; HEDGER, J. Witches' broom andy frosty pods two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, p. 423-435, 2003

GUENTHER, B., ONRUST, R., ŠALI, A., O'DONNELL, M. & KURIYAN, J. Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* 91:335-345, 1997.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p.17-34, 2003.

HAMID, Rifat et al. Chitinases: An update. **J Pharm Bioallied Sci**, New Delhi, v. 5, n. 1, p.21-29, 2013.

HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 533–543, jan. 2012.

HENRISSAT B. Classification of chitinase modules. In: JOLLES, P.; MUZZARELLI, R. A. editors. **Chitin and Chitinases**. Switzerland: Burkhauser Basel, 1999. p. 137–56.

HINTZE, B. et al. Molprobit's ultimate rotamer-library distributions for model validation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 84, n. 9, p. 1177-1189, 2016.

HOLLIS, T., MONZINGO, A.F., BORTONE, K., ERNST, S.R. and ROBERTUS, J.D. (2000) The X-ray structure of a chitinase from the fungus pathogenic *Coccidioides immitis*. **Protein Sci.** 9, 544-551.

HORN, S.J.; SØRLIE, M.; VAAJE-KOLSTAD, G.; NORBERG, A.L.; SYSTAND, B.; VÅRUM, K.M.; EIJSINK, V.G.H. Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. ½, p. 39-53, 2006.

HOWARD, M.B.; EKBORG, N.A.; WEINER, R.M.; HUTCHESON, S.W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzyme. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 627-635, 2003.

HUANG, C.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **J Ind Microbial Biotechnol**, v.39, p. 383-399, 2012.

HUANG, L.; SHIZUME, A.; NOGAWA, M.; TAGUCHI, G.; SHIMOSAKA, M. Heterologous expression and functional characterization of a novel chitinase from the chitinolytic bacterium *Chitiniphilus shinanonensis*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 76, n. 3, p. 517-522, 2012.

ISELI, B.; ARMAND, S.; BOLLER, T.; NEUHAUS, J.M.; HENRISSAT, B. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. **FEBS Letters**, v. 382, p. 186-188, 1996.

JAQUES, A.K.; FUKAMIZO, T.; HALL, D.; BARTON, R.C.; ESCOTT, G.M.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C.A.; ADAMS, D.J. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. **Microbiology**, v. 149, n.10, p. 2931-2939, 2003.

JOHNSON, M. et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server, p. W5-W9, 2008.

JONES JD, DANGL JL. The plant immune system. **Nature** 444: 323-329, 2006.

JUNGES, Angela. **As quitinases de *Metarhizium anisopiae*: caracterização genômica e funcional**. 2014, 110f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

KARTHIK, N.; AKANKSHA, K.; PANDEY, A. Production, purification and properties of fungal chitinases--a review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 11, p. 1025– 1035, nov. 2014.

KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology, International Conference on Emerging Trends in Biotechnology**. v. 188, p. 195–201, jul. 2015.

KILARU, A. e HASENSTEIN, K. H. Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis pernicioso* on Interaction with Cacao Leaves. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, nº 1, p. 101-107, 2005.

LANA, T. G. **Caracterização Genética e Fisiológica de *Crinipellis pernicioso***. 2004, 90f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LASKOWSKI, R. A. E. A. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, Abr 1993.

LESK, A. M. **Introdução à Bioinformática**. Tradução de Ardala Elisa Breda Andrade et al. (LABIO/FACIN/PUCRS), 2ª Edição, Porto Alegre: Artmed, 2008, 384p.

LESK, A. M. **Introduction to Protein Architecture**. New York: Oxford University Press, 2001, 347p.

LOPES, M.A. **Estudo molecular do sistema quitinolítico de *Crinipellis pernicioso***. 2005, 64f. Dissertação (Mestre em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2005.

LU, Y; ZEN, K.-C.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K.J. Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Vol. 32, p. 1369-1382, 2002.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D., GERSTEIN, M. What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. **Methods of Information in Medicine**, 40(4): 346–358, 2001.

MARSHALL R, KOMBRINK A, MOTTERAM J, LOZA-REYES E, LUCAS J, HAMMOND-KOSACK KE, THOMMA BP, RUDD JJ. Analysis of two in planta

expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. **Plant Physiol** 156: 756-769, 2011.

MATROUDI, S.; ZAMANI, M.R.; MOTALLEBI, M. Molecular cloning of chitinase 33 (chit33) gene from *Trichoderma atroviride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 433-437, 2008.

MEINHARDT, L.W.; BELLATO, C.de M.; RINCONES, J.; AZEVEDO, R.A.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**. v. 52, p. 191-196, 2006.

MENTLAK TA, KOMBRINK A, SHINYA T, RYDER LS, OTOMO I, SAITOH H, TERAUCHI R, NISHIZAWA Y, SHIBUYA N, THOMMA BP, et al. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. **Plant Cell** 24: 322-335, 2012.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 176, p 1-15, 2006.

MODI, S., PAINE, M.F., SUTCLIFFE, M.J. LIAN, L.Y., PRIMROSE, W.U., WOLF, C.R. & ROBERTS, G.C. A model for human cytochrome P450 2D6 based on homology modeling and NMR studies of substrate binding. **Biochemistry** 35:4540-4550, 1996.

MONDEGO, J.M., CARAZZOLLE, M.F., COSTA, G.G., FORMIGHIERI, E.F., PARIZZI, L.P., RINCONES, J., COTOMACCI, C., CARRARO, D.M., CUNHA, A.F., CARRER, H., VIDAL, R.O., ESTRELA, R.C., GARCIA, O., THOMAZELLA, D.P., DE OLIVEIRA, B.V., PIRES, A.B., RIO, M.C., ARAUJO, M.R., DE MORAES, M.H., CASTRO, L.A., GRAMACHO, K.P., GONCALVES, M.S., NETO, J.P., NETO, A.G., BARBOSA, L.V., GUILTINAN, M.J., BAILEY, B.A., MEINHARDT, L.W., CASCARDO, J.C., AND PEREIRA, G.A.. A genome survey of *Moniliophthora pernicioso* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC.Genomics** 9: 548, 2008.

MUSE, R.B.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S.; HARDWICK, K. Effects of the fungus *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, v. 45, p. 145-154, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOTREDAME. T-Coffee Programa para alinhamento (global) múltiplo de seqüências nucleotídicas ou protéicas. 2000

ODJAKOVA, M.E HADJÜVANOVA, C. The complexity of pathogens defense in plants. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 27(1-2), p. 101-109, 2001.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Capítulo II: Vassoura-de-bruxa. In: CEPEC/CEPLAC; RUIZ, M. A. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. Ilhéus, BA: CEPLAC/ CEPEC/SEFIT, 2005. p. 15-33.

PACHECO, A. G. M. **Modelagem Molecular Comparativa e Estudos de Acoplamento Molecular da Enzima Lanosterol 14 α -Desmetilase do *Moniliophthora pernicioso***. 2009, 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana/BA. 2009.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 91, p. 9–17, jul. 2014.

PEREIRA, G. A. G. **O projeto genoma de *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da vassoura-de-bruxa**: Fundamentos e potencial contribuição, 2001. Disponível em: <http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>. Acesso em: 14 de Julho, 2017.

PEREIRA, J. L. et al., First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa- growing region of Brazil. **Tropical Agriculture**, v. 67, n. 2, p. 188-189, 1990.

PERRAKIS, A., TEWS, I., DAUTER, Z., OPPENHEIM, A. B., CHET, I., WILSON, K. S., VORGIAS, C. E. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. **Structure**, v. 2, p. 1169, 1994.

PETTERSEN, E. F. et al., UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–12, Out 2004.

PINHEIRO, A. A. F. **Estudos de Inibição e Modelagem por Homologia da Enzima BETA(1,3)-D-Glicano Sintase de *Moniliophthora pernicioso***. 2011, 109f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana/BA. 2011.

PRAKASH, DIVYA et al., Cloning, Expression and Characterization of Thermophilic and Alkalophilic N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces sp.* NK52 for the Targeted Production of N-acetylglucosamine. Proceedings Of The National Academy Of Sciences: Section B: **Biological Sciences**, India, v. 3, n. 83, p.431-437, 2013.

PURDY, L. H. Fungal Disease of Cacao, 2005. Disponível em: <http://www.cabi-commodities.org/Acc/ACCrc/PDFFiles/W-BPD/Ch1.pdf>. Acesso em: 25 abr 2017.

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34. p. 573-594, 1996.

RAMACHANDRAN, G.; SASISEKHARAN, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283-437, 1968.

RINCONES, J. et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycological Research**, p. 821-832, 2006.

RING, C.S., SUN, E., MCKERROW, J.H., LEE, G.K., ROSENTHAL, P.J., KUNTZ, I.D. & COHEN, F.E. Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:3583-3587, 1993.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, n. 1, p. 24-33, 2005.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Rev. bras. Bot**, São Paulo Apr, v. 2, n. 2, Apr/Jun 2004.

SALIM, José Augusto. **Aplicação de técnicas de reconhecimento de padrões usando os descritores estruturais de proteínas da base de dados do software STING para discriminação do sítio catalítico de enzimas**. 2015. 214f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Campinas, SP, 2015. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000947091>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2222 p., 2002.

SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein modelling in genomics. **Journal of Computational Physics**. n. 151, p. 388-401, 1998.

SANTOS FILHO, Osvaldo Andrade; ALENCASTRO, RB de. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

SANTOS, S. C. **Caracterização de Hidrofobinas do fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da doença vassoura-de-bruxa no cacauero**. 2005, 72f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz – Ilhéus. 2005.

SASAKI, C.; YOKOYAMA, A.; ITOH, Y.; HASHIMOTO, M.; WATANABE, T.; FUKAMIZO, T. Comparative study of the reaction mechanism of family 18

chitinases from plants and microbes. **J Biochem**, v. 131, n. 4, p. 557-564, 2002.

SCARPARI, L. M. MEINHARDT, L. W., MAZZAFERA, P., POMELLA, A. W. V., SCHIAVINATO, M. A., CASCARDO, J. C. M., PEREIRA, G. A. G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*. **Journal of Experimental Botany**. p. 1-13, 2005.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Metarhizium anisopliae enzymes and toxins. Toxicon, Highlights in Toxinology: Biodiversity in Toxins - **Tools for Biological Research and Drug Development**. v. 56, n. 7, p. 1267–1274, dez. 2010.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36–42, fev. 2008.

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. A complete survey of Trichoderma chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. **FEBS J**. v. 272, n. 22, p. 5923-5939, 2005.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SHAKHBAZAU, A.V.; KARTEL, N.A. Chitinases in bioengineering research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, n. 8, p. 881-889, 2008.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicios* em caucueiros. **Agrotrópica**, v.14, p. 28, 2002.

STERGIOPOULOS I, DE WIT PJ. Fungal effector proteins. **Annu Rev Phytopathol** 47: 233-263, 2009.

SOARES, E. S. Identificação e seleção de bactérias produtoras de quitinasas. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 30–38, jan. 2015.

TEIXEIRA P. J. P. L. et al., **The fungal pathogen *Moniliophthora pernicios* uses an inactivated chitinase to counteract cacao defenses**. 2013, 224. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia Unicamp. 2013.

TONG, WEI et al. CLONING, SEQUENCE ANALYSIS AND INDUCED EXPRESSION STUDIES OF A CHITINASE GENE M-CHITINASE FROM MULBERRY (*MORUS L.*). **International Journal Of Bioassays**, China, v. 4, n. 2, p.694-700, 2013.

VAAJE-KOLSTAD, G.; HORN, S.J.; van AALTEN, D.M.F.; SYNSTAD, B.; EIJSINK, V.G.H. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. **The Journal of Chemistry**, v. 280, n. 31, issue August n. 5, p 28492-28497, 2005.

VAKSER, I.A. Evaluation of GRAMM low-resolution docking methodology on the hemagglutinin-antibody complex. **Proteins** 1:226-230, 1997.

VERLI, H. (Ed.). **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular/** organizado por Hugo Verli. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014. 282 p.

VIEIRA, D. R.; VALLE, R. R. Indução de Resistência Sistêmica Para o Controle da Vassoura-De-Bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em Cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) dos Clones ICS 1 E CCN 51. 15ª Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau, San José, 2006.

WANG, S.-L.; HSIAO, W.-J.; CHANG, W.-T. Purification and characterization of a antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. **Journal Agricultural and Food chemistry**, v. 50, p. 2249-2255, 2002

WATSON, J. D.; BERRY, A. **DNA: o segredo da vida.** 1a. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2005

WU, G., FISER, A., TER KUILE, B., ŠALI, A. & MULLER, M. Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase. **Proc Natl Acad Sci USA** 96:6285-6290, 1999.

YAN, R.; HOU, J.; DING, D.; GUAN, W.; WANG, C.; WU, Z.; LI, M. In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 293–301, 2008.

Yang JK, Gan ZW, Lou ZY, Tao N, Mi QL, et al. Crystal structure and mutagenesis analysis of a chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine. *Microbiology* 156: 3566–3574 (2010).

ZHU, X.-F.; ZHOU, Y.; FENG, J.-L. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n. 11, p. 831-838, 2007.

ANEXO

Anexo 1. Sequencias proteicas em formato Fasta das Quitinases de *M. pernicioso*

>10765_g SCAF_37 26105 28405 1 (485 AA)

MRPTSLASSVLFRLTLAFDNSRYDNVAVYWGQNSYAGHSDTANFQKTLSTFYCQDNAIDVFPLAFLNTFF
 GPGGVPSINLANTCNPDNATFPGTNLPNCASLAADIKSCQAKGKVITLAQTIWNFLGGSSSTRPFGDVVF
 VAVLDGVDLDIEGGNSDHYTAFVKNIRSLASGASKKYVTAAPQCVPDGDALGGVLTNAQFDIAIVQVIIFSR
 ATCETKFLIQSISSIIHVVHLISPRQRVVMIVGLHVNAGLQNWVFGIWDNWARDTMSPNKNVKVYIGAPAS
 TSAAGSGYVSPDTLKTIAVQMRKSFPSFGVMLWDAQAYANSRYDLAIKNALVAAGGTGFTFPSCSAPT
 WTAGNNYPGNSEVDFGGYIWKSKWFSSSQPASPNPDGWSAISACSGAGSTPTTTTTAGPGSPTAGSCAG
 VAAWSSSTAVYTGGMATAVFNHLWTANWWTQGDTPGGSSGAWKDNGACTSLNSRFFKL

>10955_g SCAF_35 86282 89071 1 (716 AA)

MGKLLHRLHVQHSPPYFHVTVQMRIFLTLTIWFASLWLWYASAAEPPAEENPSLNHLICKPFGICEPCPSDAAS
 SFILNPKFCQPFGNRRMLMHCVNETTTSNPETHAPAAVLHDHPNQPHPQGETPAWESCGRIVDQERADFFE
 FVGCNVLFAGIAILAVLWRSKRMHALQTRQLAARIGRIRGSNVMRMRMLRLNMMACAFDTRIVFDTREMKALT
 DGDVGHCFIDQPREPFLGTSSSKPVTSPQSKPWEPRTSLLRGSVYKYYAIYSTHIKEVTLLLEGTKMYFHLLAAI
 FLTLTLFLTLVLSAPTCGLAPPKDTNVSSTSPSSHCSNLAADVALLTGWYPGWLGWLNQFPPQNISWSKYTALT
 FAFGVTTSSNGGISLDDVSTQVLPFVASAKEHASPPSCSYVATLMGEFFATQESRTAFVKTIVDLVSQYDLD
 GIDFDWEYPNKQIGICNQSPDDAANFLSFLQLRSDSVGSKLTLAAVGIAPFVGSQDGVPTTDDVSGFAKV
 LDHIGIMNYDVGWSWASVGNAPLDDTCAPTKAGSAVSAVKAWTDAGFPADQIALGVAAYGHSFHVAQT
 AALNAQGNALQLYPAFDKALQPHGDSDEGEAGVDQCGNPVPVGGIFNFWGLVDGGFLNQDGTADTQAGI
 VYRYDNCSQTPYVYNPTNQVMVSYDDATSFAAKGKWISENGLKGFAMWHVVLGDFDILLDAISEAMGVDV
 EQCSA

>11696_g SCAF_17 104958 106745 1 (462 AA)

MLALHVLVTSLLLDHICALETRSSSTAVNATILGDSKVSMAWYAGWHSSKFTLSDVSWSKYTHLAYAFVTTTP
 DVTRLISLEASDEELLPRFVQTAHQNNVKATLSIGGWTGSRHFSTNVGSAQNRKTKFVKTVVDVVQKYSLDGL
 DFDWEYPNRQGVGCNVISKEDTPNLSFLQELRKDPVGSNLTAAATSIQPNWNTDGVPSDDVSEFAQVLD
 FITIMNYDVWNSLSSRAGPNAPLNDTCVPTGNPRIEFGSNAVSSVKAWSNAGFPLNQIVLGPVAYGHFVVE
 RNQAFTDGSNTQLASYPANRQAEHLGDSWDGEGTDTCGAQVGPVGVNFWGLVEQGYLNPDGSVKSG
 VPFYDNCSETPIYDSTQTLISFDNVQSFTAKGNFIHSTGLRGFAIWEAGGDSNDILLDTILTSTANGDPN
 KLNSPSSSSNSASGTRVPKSVAYLSIALCAYSMYL

>15210_g SCAF_1 724190 727583 1 (920 AA)

MTRLNRIASFVNWGIYGRKYPPSLIPVDDLTHILYSFASINPETGEVQLSDKWADQEIHYDGDWTWDEEGNLL
 YGNLKALYNLKEHRHLKVMISIGGWSYSSSLHPVVVSPERRRKFVESAVALLEDYGLDGLDVDYEFQDD
 EQALGYVQLLKEALREALDEHARTKEIDYRFLLTIAAPCGSDNYNRLRISEMDQYLDLFWNMMAYDFAGSWDS
 VSGHQSNLYGGSACIHQTVAHYIDHGVAPSKIILGIPLYGRSFLETGPGASFGVSGGTWEAGVFDYRTP
 LPDSYVCHDEETKTSWYTNSTKEMISFDSEEVARWKGEWQIEIGLGGSMFWELSGDKGCDREDMEGGH
 GKDPQPGQSLVRVVKDAMGGDLASKENWLSYERSQFDNMRNVERYSSQAQRHCKTDRRRWLLRMTTPA
 YEPLPTNEDEQPLPKQKPRSVKRHIAYLAVFSIIAFVYKAGQWSVTQYLDSESTAASSQAPAQTVPADS
 KPTSTAGIPEAGSAENGTEIEQKASMPGKYSVGYFTNWGIYGRKFPPSLIPVQDLTHILYAFANVRADSGE
 VYLSDKWADQDIHYPGDSWNDQGNLYGNFKAIYKLLKANRHLKLLLSIGGWYSPSFHPIVVSAPARRKF
 VESSIALLEDYGLDGLDIDYEPQNDYQARGYVLLREMRALDQHARNKGADYRFLLTIAAPCGPDNYNLL
 RIKEMDKYLDLFWNMMAYDFAGSWDSVAGHQANLFGGPIVHTAITHYIKHGVAPPKVIYGIPLYGRSFMST
 EPGAPFNGIGPGSWEAGVYDYRTPPLPGSYTFRDDNAKATWYDYSKKEMISFDSEEAHWKGEWIRK
 MGLGGSMFWELSGDKGSEKDAEKGPQKDPQGRSLVRIVKDSMGGIDMHQKNWLRYEKSFQDNMRN
 GME

>15579_g SCAF_1 1548741 1550332 1 (492 AA)

MHPLSSSLYLASLAIVHCAAQNPSSTSLKPVIIAQDPPSRTHSTPFQNTAITNSNQTSSSDSSNHLSLFSFSS
NETRWTVFESDLTEKVFIAPVADSEDPDPSGSDGPDSSDVSASRVGPLVMAYYSDWLAQRLPPEEINYPLY
DLIDFAFALPTASFELEWDDNDSCPELLKLVHYAHAHGTVKVLSSIGGWTGSRYFSSAVENVNRQHFTDNI
LAFYKEFELDGIDIDWEYPGTKGNDGNQVSPVDSANFLAFLRLLRRALPHGAILTAAATALPFAGPDGRPMG
DVSSFARVLDWVLMINNYDTWGVSSPPGNAPLFDACGNSTQPPQSSAVAA YDAWTKAGFPASQLVLGLPTY
GYVMSSDAQQFRTRRELDQDPSVASRVVVKLSDDDGQEGTVSVRRMVEQALVVRDSQLVPAGGFTRY
WDHCSCTPFLRSRAGQVVPYDDTQSIAMKAEFTKKTGWKGVNFFDLEGDTSSYSLMMMAARKSLGR

>15737_g SCAF_1 1892995 1894575 1 (423 AA)

MLALAPLALLFSLTSSQAIRIGLDFSLKAKIQDSEKVAAWYAGWHSDEGFPLSSVPWDKYTYLTYSAEETT
EDTRLLTLNRSNPEVLVQFVEAAHEHGVALVSLGGWAGSRFFSTAVATSENRTTFVNTVSLVEKYSLDG
IDFDWEYPNNQGGICNTIANDTANFLLFLQELRQHPVGSQQLLTAATSITPFRDAEGNPGKDVSAFALLDY
IAVMNYDIWGSWSVGVGNAPLNDTCAAPENQQGSAVLAIQAWSAAGIPTSQILGVPYGHSTVNQATA
FKNGYDTELASYPAFNASVHQGDWDDDEPGDVCVGEQPYGGNFNFWSIIKAGYLNEDGTPKDGIPYRF
DECSQTAYVYDAERQLMISFDDAPSFTAKGKFIADMELAGFALWEAGGDYNSLLLSIRDAAAGFC

>16246_g SCAF_48 54711 56278 1 (403 AA)

MSWQYLLTISTLVPWAYGANVATAWFASWHANTGFPISVSWDKYTLTYAFAEETTPDVNALSNAVNGDN
SGAELLHDFVEAAHANGVKAASVIGGWTGSRWWSTAVGSAENRTAFVKLTDFAVENNLGDLDFWEYP
GNQGIVPEDTQNFSLFIQELREDSVGSKLILSAATATRPFDANGASIAADASAFKVLDFIIMNYDIWGPWSP
TVGNAPLDDSCAPSDAQVGSASVAVKAWTASGFPAEQIVLGVASVYGHSTFRVRSQDAFEDGSTNTLRANP
PFDAADRPSGDWDDPAGVDVCGVQQLPGGNFNFWGLINGGLDSSGNPTPGTPFRFDACSQTPYVYNT
STETMVSFDNADSFTAKGKFIANMGLAGFAMWEAGGDFNDILLDAIRSAAF

>1679_g SCAF_28 315186 318968 1 (998 AA)

MVAFFSAIGISFTFLGFLGRVYVYVNTTGTGFEGLDHQARDILARATPAAPHWVYTDTYAQGTNGPPPVS
SVTGFNVVCLSFLLLEGAWDKAYEWTTLTADERASIKSQYAAAGIKLVSVFVGFATDVPTSSNADPIATANKF
ADWVKQYNLDGIDVDYEDFNADAGNGKAESWLISFTKQLRTQLPQGGYILTHAPVAPWFSPGKFGGGAYL
TVHNSVGLIDWYNVQFYNQGTSEYTTCNGLLTTSSNTWPKSALFQIAASGVPLSKLVIGKPATVGDANNNG
YIDASTLATCLQTAKNQGWNGGAMAWQYPHAGSSWITSGRESQALSPSVRERVASRRGALPNTCHTCCS
FTANTEAKWVVSTAAIFHDPLDMNSDEESSTSIGAGKGGKAQDEPTERTPLLGSAGGSSSELDTTPSY
PRRNITRLLNVFLGTLTLCIVAFVIVALLTWSYVSRSTDLSPEDVLRHSVVFEGPHKVVIVLNTSWTDGMWVD
VEGRVGVDAGSVGVVNRDPDGGDGLFKNIWKSFGRWGIQELHEITVKTSTINITSQQDSTIVLASLDIPPLEI
PLTTDPPSDHSLHHRISTPVLIRPTHNTSAFIDFVRESWRLGHVAVRTEVANLDVQGGRRMHGSSWRGMLH
RTMNDVKTSLTMKIPLPGFPQPGKNTFPPSIADLITLCNFTLSTVSDYLMIDAVATVVDAPPNFALTTPSLP
FIVSLVNTSSPIVASVTSKPFNLTHPNITLDISGRVLPSTEVLPLLSTFISRYLTALSNIPIVISTPLIPDLEVDA
GFPPPNVRPRILRNVTIHDMKIKPGNTFLASGTVYGRVLPVGMNVEVDVKRVLDPDLVDFDGEVDPALSSSP
PPARPLDPLPEKAFGHIRPDDWLASRCVAVEPEDGDGATFAVTAKIVDVPLEVLPGRHQQEVSDFVQKVIIFG
KDGALAGILGSADVGLVQGLPLPGPEHGDGMVLSGLPFGKSVRIGKRNMFSDYWTRSTD

>1680_g SCAF_28 319999 321583 1 (327 AA)

MFALNLSVVLGFLALLGGASASPVDRIHSNTTGGSGVPHANIIPAAPRFVIYSDKFVSGITGPPPVEQVIGYV
FALSLLTEGAFDKASEWTLQSATERSRIKEEYAAAGIKLIVSLFGATDAPTSSGADPIKTANTMAAVWKQYD
LDGVDIDYEDFNAMNAGDGSAAETWLAEFTRQMRKHLKPGTYILTHAPVAPWFSPKFGGEAYLAIDSAVGD
LIDWYNVQFYNQGTMEYTTCNGLLIESSTWPHSSLWPHSSVPLDKLVIGKPATQGDAAANGFMSTSLLAT
CLESKAKGWSGGAMVWEFPNAAASWIAAVRSLAPFL

>315_g SCAF_18 58907 64643 1 (1327 AA)

MGTIARSFSLTCLLSTQILHVFADGCQTATVQPDSTCFDIYTRAGITAAQFASYNPGLDCSTLQLGQKVC
ISPGSLPSNSPGSPNGTCFEYVTQPNDCFAIATKFSITVDQIEEWNKNTWKWKGCSSLQVDFTMCVSPG
DPPPIPIPLGQCQPGQSEGNKTCPLNACCSAFGFCGLTDFCSTTTGNPCISNCGQPTLPCAPGRSERNIA
YYAGWGNRRRTCGTNVAPADVDWTGYTGVNFAFATISQGLQIQIADQDAPLLKELVAQKEKNPSMKVIALG
GWDFFSEMEPTRDLFSIMISTSANRATFISSVKDLLSTYGLDGIDIDFEYPSAIERGAPATDTPNLTAFFRELRA
GLPSAIVISCATPAGYWFLLKGFIDKIVENIDYLNMMSYDYHGQWDTNVTDAQSVTNPHSTLLDMETSALLYI
RAGIDLKSVNLGLAWYGRYHVADPSCVGYNCTMTGGGFPSCSITSGYLTQFEIDELLNNGISPKLDGPS
QTYWFNDQGSVTFDQDQDWTNAKENFASTRFCGGTFIWSVDQRTDNLGGGSGSGSAAAGHYTQITWN
PNPYPSSGARSTVTKARADGRRIRVVGCGITVQNGQDEVSLGAGTYLTVGSSPNIRLQSYAVGGRPQDGPVI
QEHIFELRYVDDFFGGVIRPVTGCTWIRDNFFSVTRDDGSNLGEALLDAIDTTANMVWADEPMNQAKSNVV
GDTRGTLAAPPQMQNVDAIEDFILDDDNIYNMEYFIRSMALGEYFGATSNIFFRSTARMQDLLSEVTPNTV
PDNTQSLPMIFNSWLRGVVSAYPNGCTVRANNIQQYYREHMELLADEEQVNVPTCFAYVNTYGRRLRVPFN
PSSFNYQLLPDAPRHRPCNVPGTTGTGVGFFVQGTFTTWTSTQQRVMGAGNTDFYALGSGARLSPSQRW
QAIDYSTLPGNTPSACANVYLLSDFVPTNAQPGIIANIAFQCGTATGRQRANFAFLVNLGQGLSCAKYDTGHP
GGTTQTVCAVNRQALDCAQASGGAPATIOMAFIP

>4357_g SCAF_10 470247 472563 1 (495 AA)

MALLSFLSFLSLLACSVMAYDNSRSDNLVVYVAIVDVLIMLALTTSPRTSYYGQNSYGATHSDTGNFQQRLS
 FYCQDDVINVFPLAFLHVFFGPGGLPEINLANTCANNVDNSVFPGLPNCQFMEQDIKTCQSKGKIVTSLG
 GATGAASFSSDAQAEQFADTVVNLFLGSSSTRPFGSAVLDGVDLDIEGGSSTGFAAFVRRIRSHANGAS
 KPYVYVTAAPQCFFPDAYLSPILNAVGVDAIVQFYNNYCSVASPGSFNFGDWDNWARDQAPNRRNVKIYIGA
 PASPTAGSGYVDANSLINLARQAKSQYSSFGGVMLWDASQAYANGRFDRVKNKIAGGGGATPTTTRTT
 ATTTTRTTTTGGGGGGSGGCSGAAAWSSGVAYAGGSQVTYNGHLWTAKWWWQADTPGGAAGVWTDN
 GACFAALTEPAQVSSTSAAEVTLSSDFESFTASASAVESKVTAMDAEATSAVDSDNSSETKSRRRVSRFFR
 F

>5707_g SCAF_234 18811 23287 1 (1091 AA)

MKTLFPALLAVLNLSLQVFAADPPADPFSCSPTQPCKIGCCGKNNVCGLGPDYCSAENCVSSCDQKSDCD
 PGWGSQWSANEKCPNLNVCCSKFGFCGTTTEEFCSNTVKRPSCSGNSATNRVVGYYEGWSTTRACDGMF
 PENIPLGTYTHLNYAFVDPKTFVAPMAELDKELYPRFTALKQVNPGLTWSIGGWSMNDPDQSTATTF
 SDLAGSADAQRFFSSLIQFMGTYGFDGVDIDWEYVPAPERSGKPTDYANYISFLKNLKNALGSSGHKYGL
 TLTIPISSYWMQHFDIVQMSIIDWFNVMSYDLHGTDWSTNPNYIGPVVNAHTNITEITNTLDLLWRNIDPKQ
 TVLGLGFYGRSFTLSDPSTHAGCPFSAGGNPGRCTASAGTLSYSEIQGVIAAGAKVTLDSDAKVKNVWVD
 TNQWVSYDDEETFMMKIDYANGLCLGGVMWAVSTDDRQGTAAARALNSATGRTEFIPRQLAVVPSAVGQ
 CIWGECEGKDCPSGLRAAQRSDGKNRGNAGIYTGCSGSQTRNYCCPSNNVPTCEWRGTAPFCKGKCHDG
 EVEVSSDTSATGSSCWVTGHKVLCCQETTTDSGIGSCHWEGSAPVCAAAAAGPLFYYASASCPADKPTKIT
 TGKEGAGGEQGCASKVFAARRKTPTMTPTVPGTKLEVAGLIGRLQSFPLTTNARESVMMAKRQLQRTSQN
 PAPLPYDNLCAVPDSLYLESEHGDEADASDYTEVYLFQDCFVSGEDDSEDPGSPGAPWEFKRRDLSVK
 NATEEYHELKVRGKSRQLAICGPGPVRTAKKNNLRASPYPTVKSLIDAGKLVISQAKPIGCAVAGLVTGSTKI
 PPSRYVTEHVTQLQSVKSFQAQSMIYGTLPGGGTMMKQGFIDFTKVFADAGGFFQRTWSSSLGVTTPAIGSTPEE
 TIYRVLGTSADTGNLQVFDKLNGLKAIWAGSKNIIGVDTYKGMAPLDRIKSFGNIVDFAYLNQKEVQDSLK
 ASYDGMLDGWTLFQNALKAQGLNYDVVGAYKDWNTAQFANMIQVATDFLNDKIPDEVYWASNQALQAH
 GKATVALAAQTLMNKGNLGGSIKIATGFIH

>8805_g SCAF_3 283128 285447 1 (576 AA)

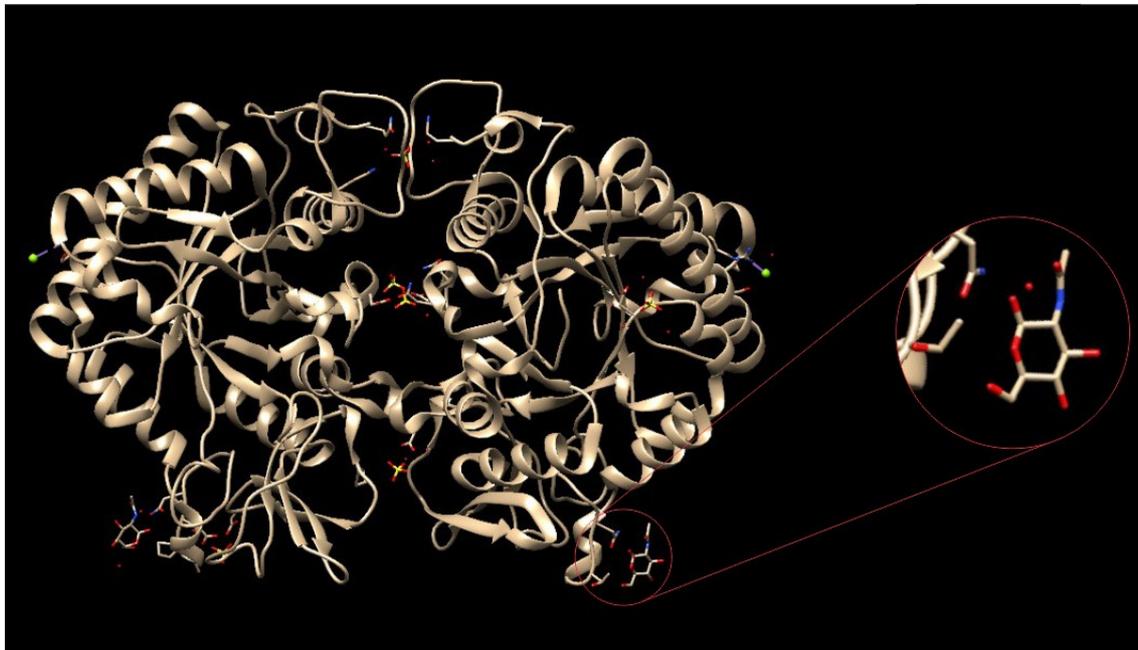
MRLPLLQIVFFVATAYSQSCGSQNNALCEKGCCSQYGFQCGTTADFLCTSKRCQSQCINDGPPPPPEGPE
 APEIDTSKLFRRPSSSTFANKELVGYFSNWAQYRGLDPSVPSCEKEKSFLPEHVRLASLPTSKRLIENISTQIN
 PFLYTHLNYAFVFMANNNSVIPHEYDDLDSIRFNKWKGLNPSVTTSFVSGGWSMNDGSPRYTGGIDYST
 FFSEMAASAAGRATFIDSCIAWARDLDFDGDIDWEYVGDPRGGGPADTENFTLLVKEMRDKVREEAASS
 GKRELLITVAAPADPDKFALIQGKAVSDYLDWYNLMTYDFYGNWDRMEAQAPIADTLQTGSQNLKVEKLG
 ANLPWFYVYVTSFSAIDMYLEAGVPANKINAGIPLYGRVWMTDDPSCTSPGCTGSAGVSGRCTAENGYL
 SYFEIKEIMDALEDQNMQLQTSVNFVFPQDGYMVFVFNQWVGFDDENSFQAKVDIINSRGLRGGMLWAVDLD
 TPESDLTRKLLSYQSCPRDGGWPATSADSEAELPCGLDSDPFEEVQTRKCNLTLWGSVDNASCKRQR
 PLSLAAQKQKVE

>997_g SCAF_6 625992 628185 1 (509 AA)

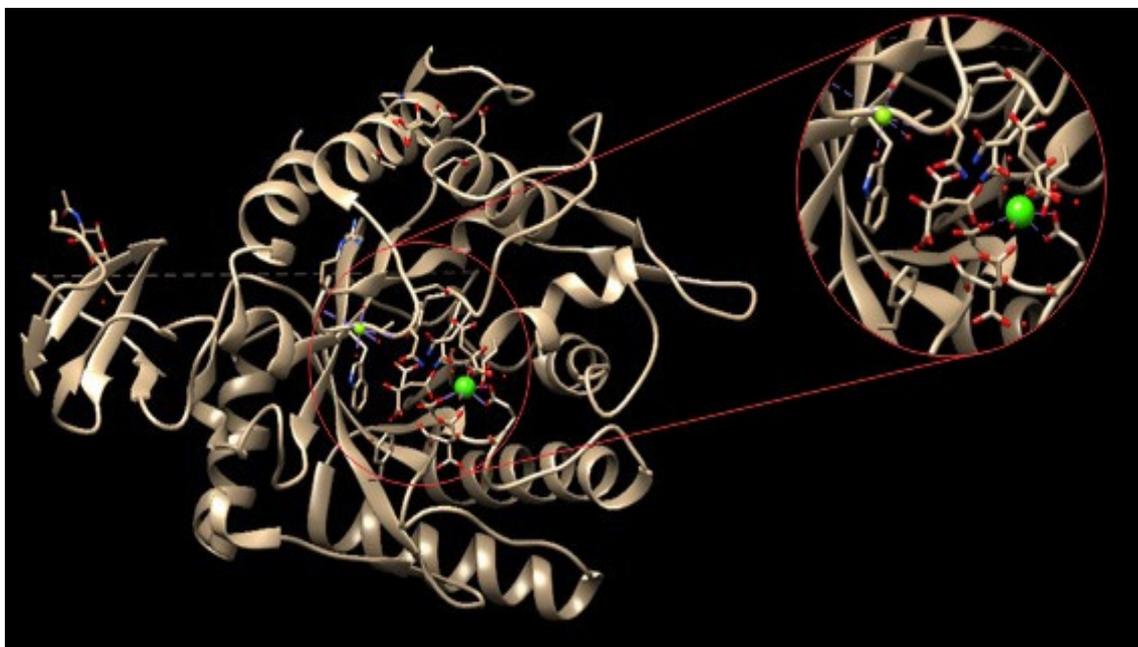
MVLGCFYRIFSLLSAACVLVQATQVMHRPDNYKDTPNFNIAVNPETKVIQKRATGKQVAYFTNWGIYGAN
 FQPTDIDPSKLTHILYSFADVSPENGAIKLTDSYADSEKHFPDGSWDETGTNLYGCLKQLYLLKLNKRNKLV
 LSIGGWYTSQAGHFSFVTSASSRTNFINNAVQLIEDYGFDDIDLDFEYPSNPAEGQGFADLLDTRKAFDSL
 ASRKGESTPYLLTAAVSAGAPNYANLKVSMNSALSFWNLMAYDYAGSWLTFADNQANLYGGTRTNVST
 DKAFKYFTSNGATASKINMGIPLYGRAFESTNGIGQPYNGIGPGTIEAGIYSYKTLPLAGATVFENKTDVTSY
 SYDSSKELVSYDTPNIVKTKAQYVNDNGMGGTWFELSTDKKGSDSLVLTAAASILGSLDTTQNHKFPSSK
 WDNIRNNMAGGGTSTTTAGGGGSGTGPSCSGVGAWNAATAYVGGQKVTYNGRLYTAKWWWQNETPG
 KADVWTDNGAC

APENDICE**Apêndice 1. Scripts dos Modelos gerados pelo Modeller**

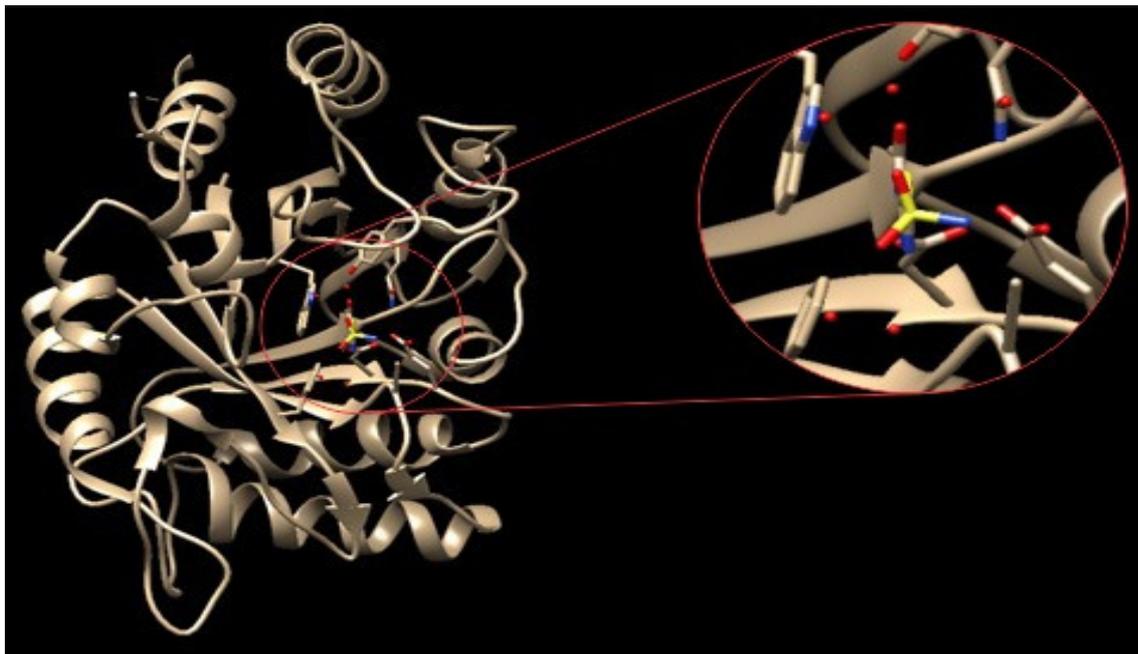
Modelo 15210 (1WNO)



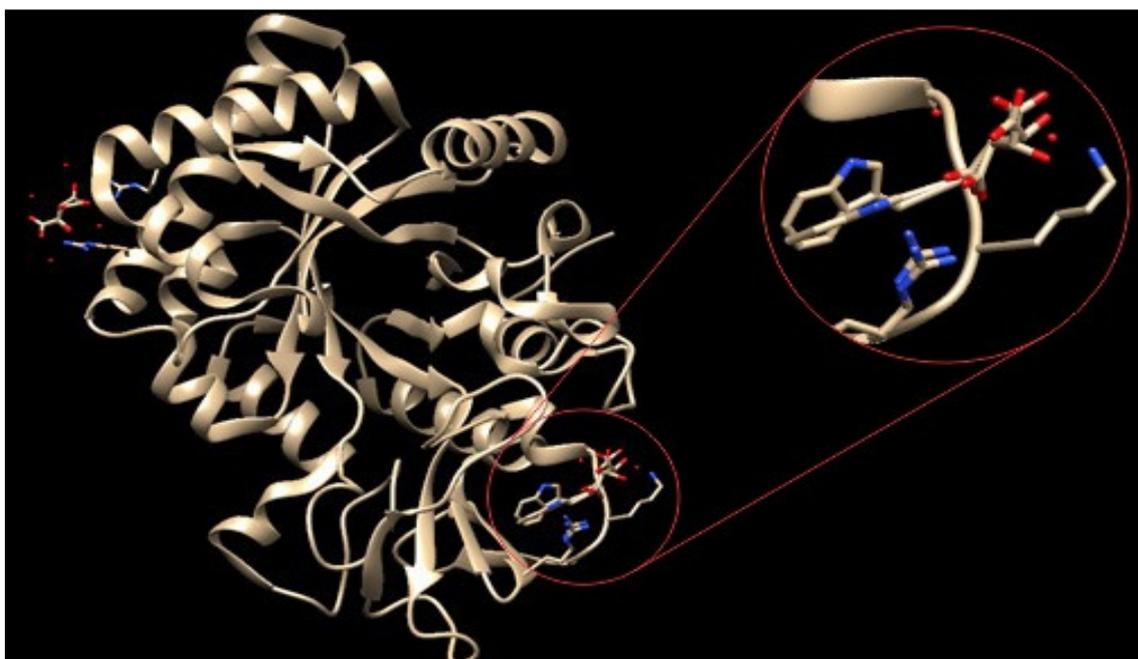
Modelo 1679 (4TX8)



Modelo 4357 (2UY4)

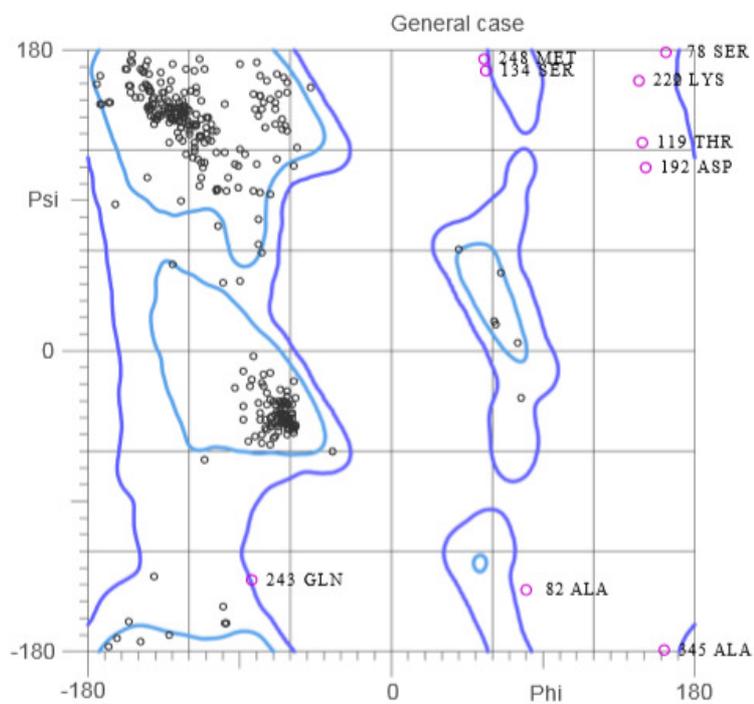


Modelo 5707 (4WJX)

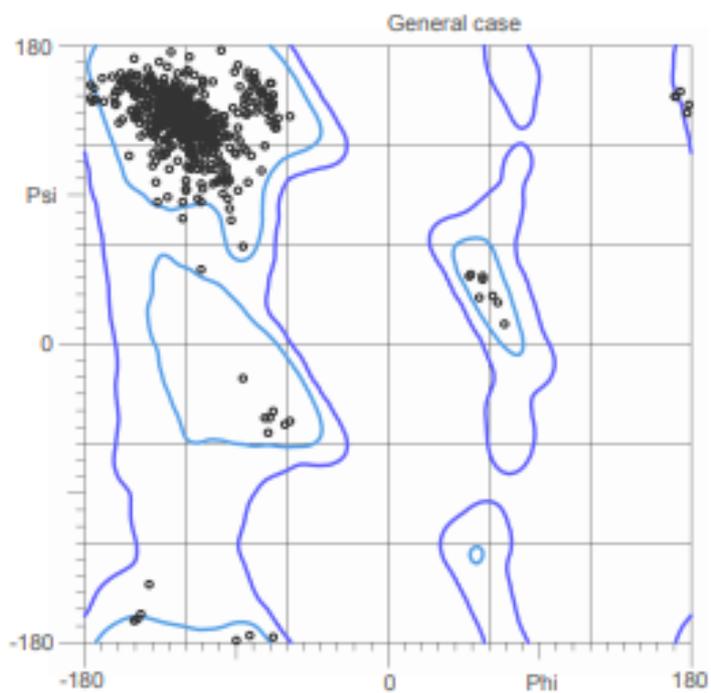


Apendice 2. Gráficos Ramachandran

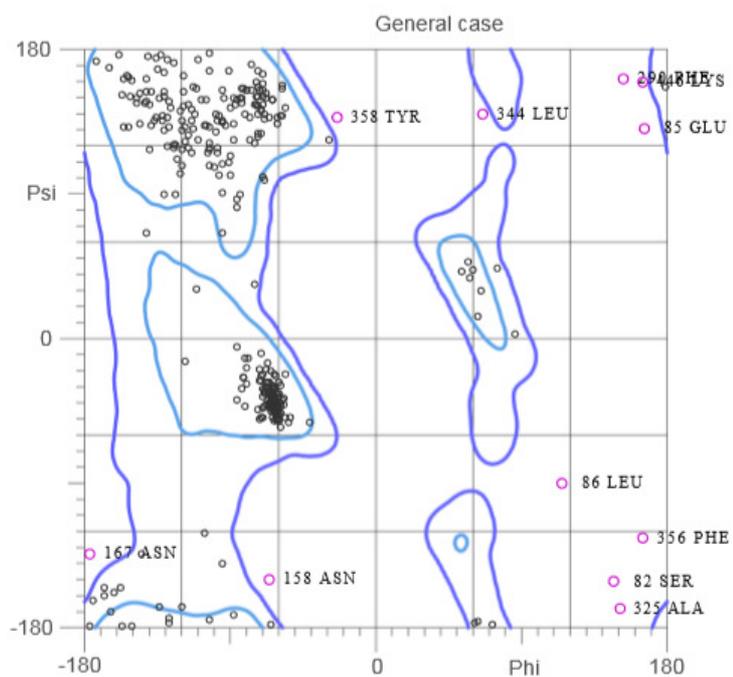
Modelo 10765 (2UY4)



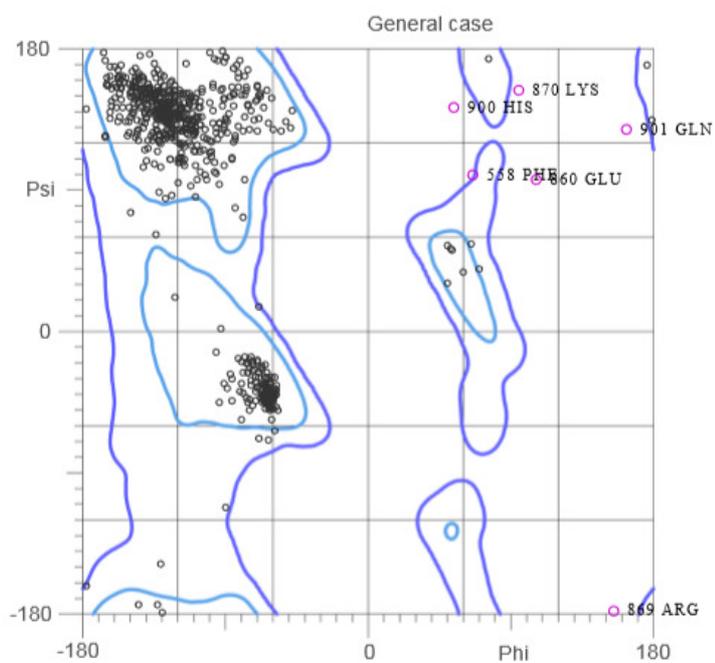
Modelo 10955 (5GZT)



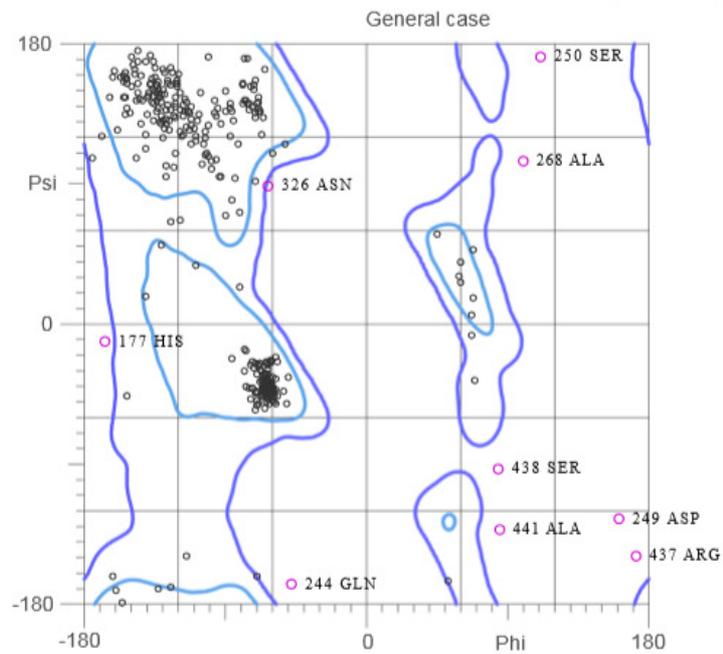
Modelo 11696 (2A3C)



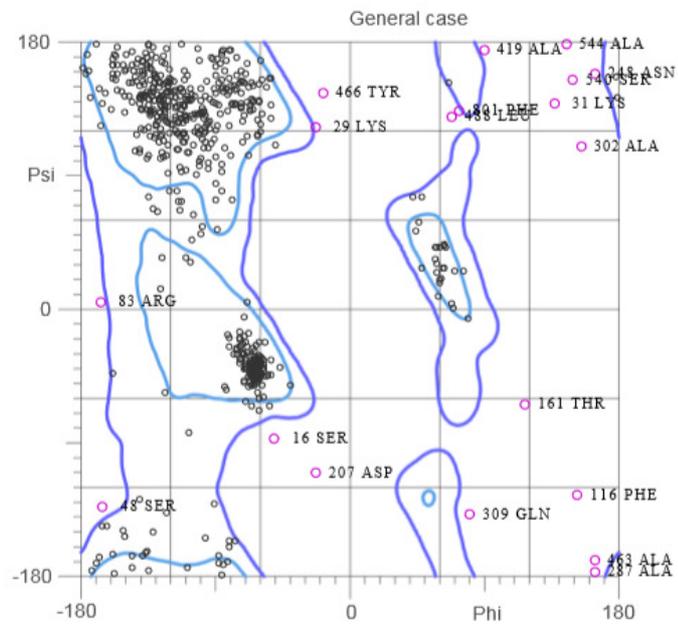
Modelo 15210 (1WNO)



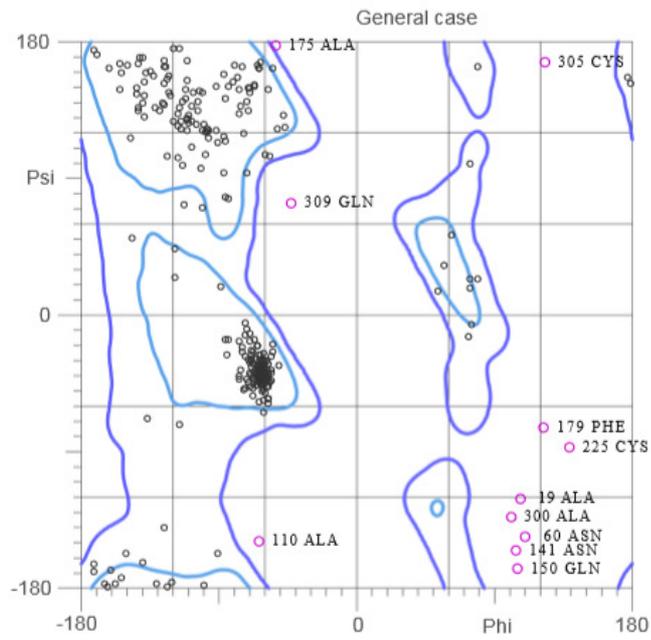
Modelo 15579 (3FY1)



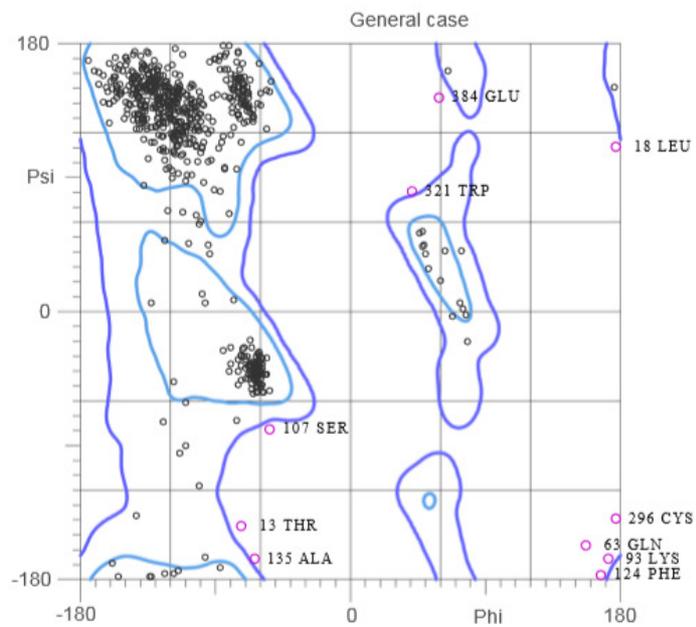
Modelo 15737 (4TXG)



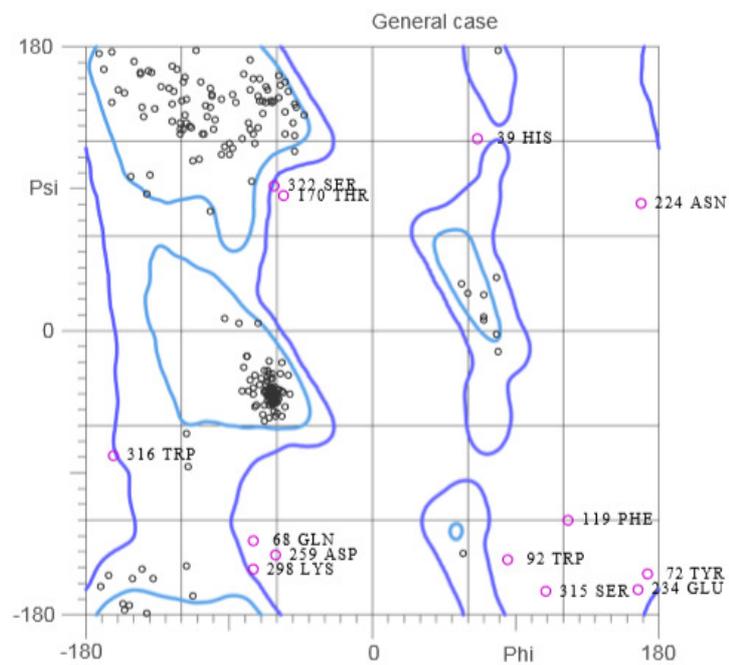
Modelo 16246 (3ARQ)



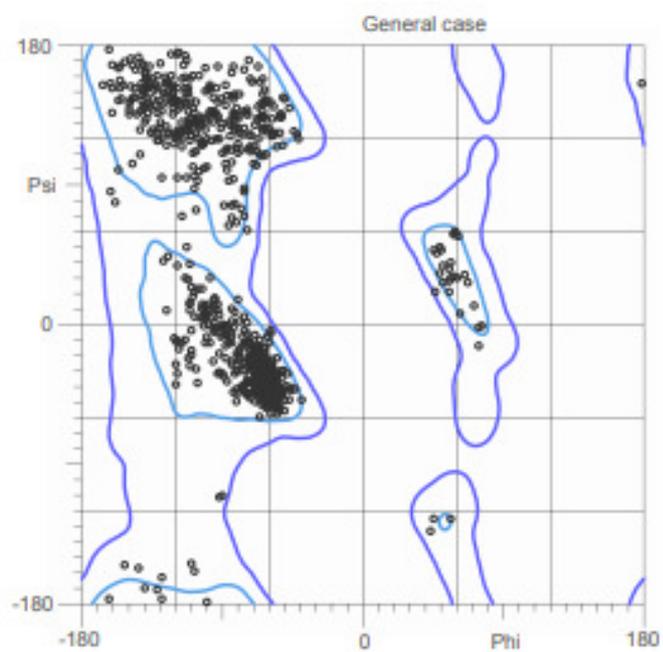
Modelo 1679 (4TX8)



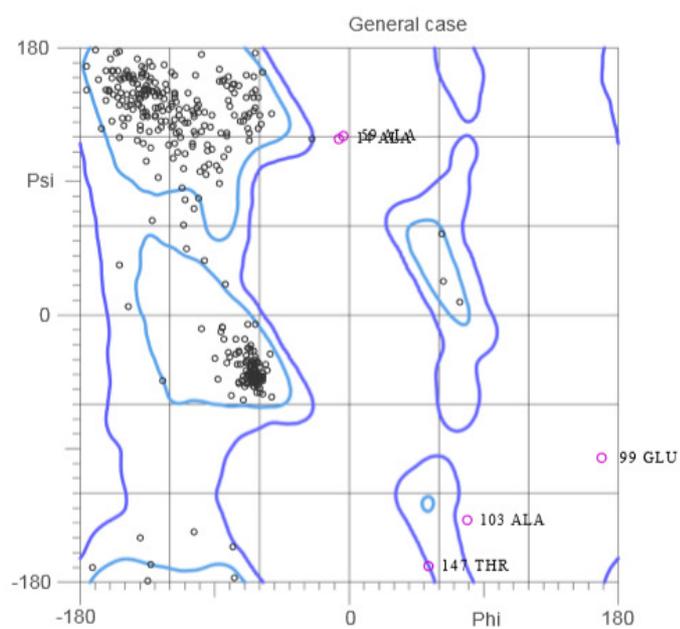
Modelo 1680 (4HME)



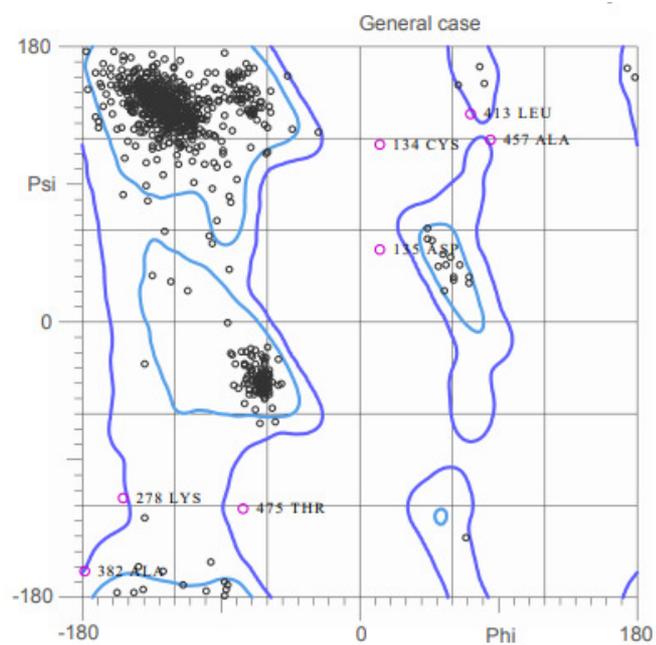
Modelo 315 (5DEZ)



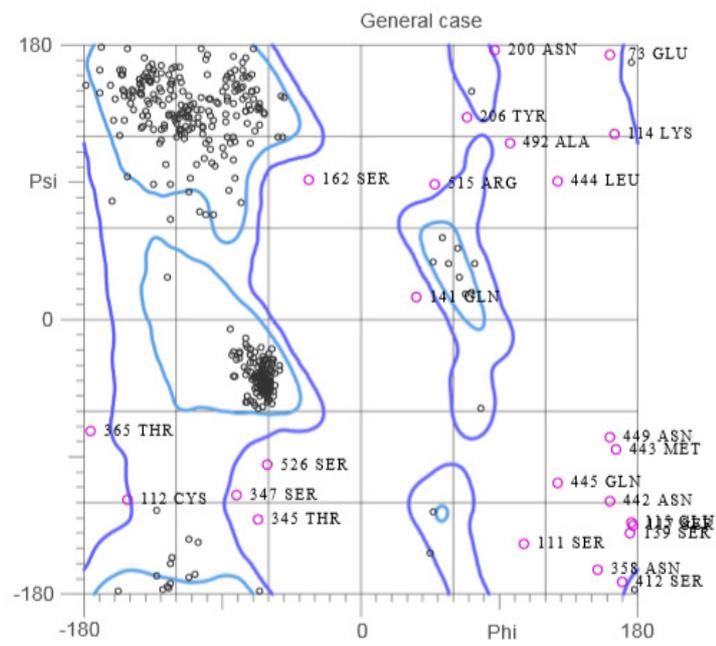
Modelo 4357 (2UY4)



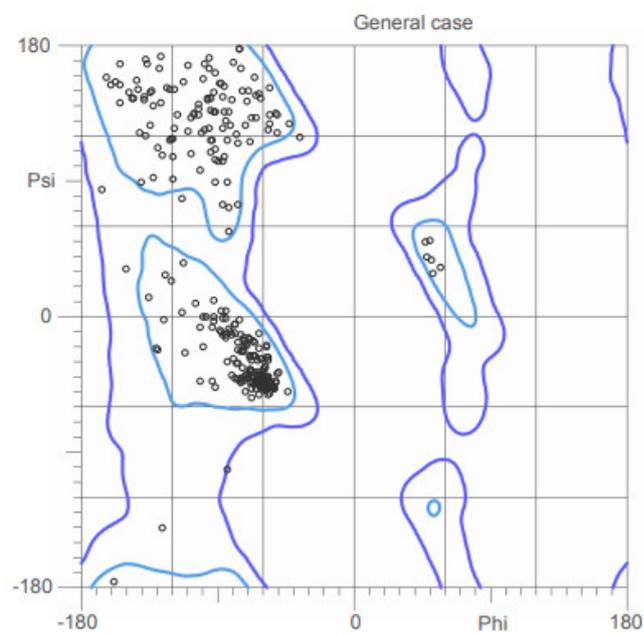
Modelo 5707 (4WJX)



Modelo 8805 (1HKK)

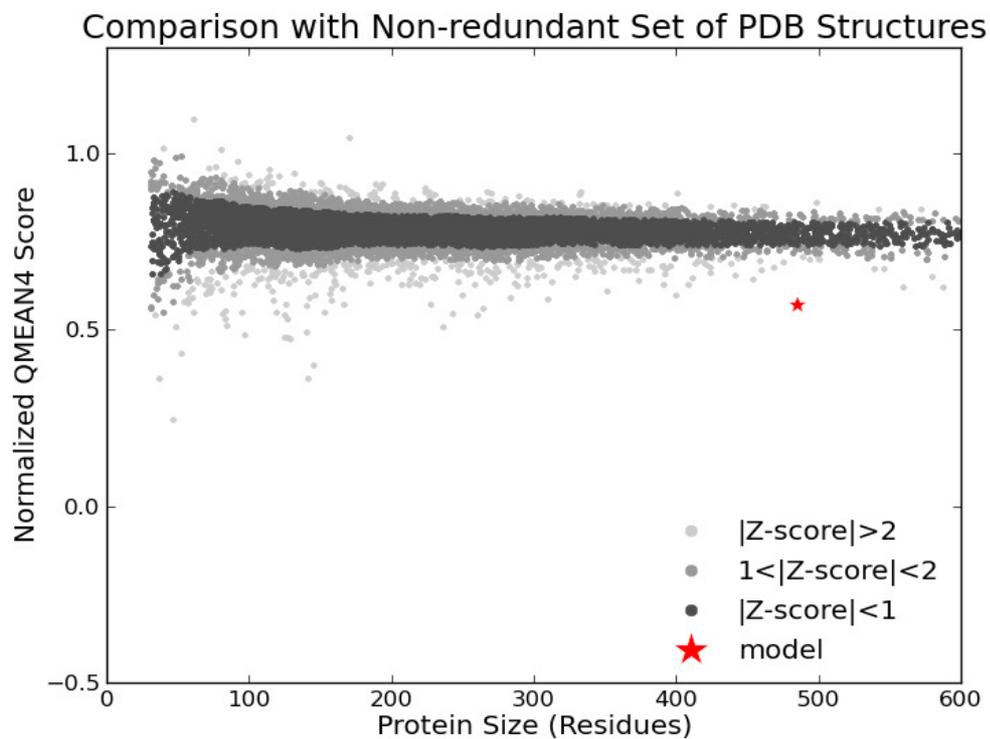


Modelo 997 (3G6M)

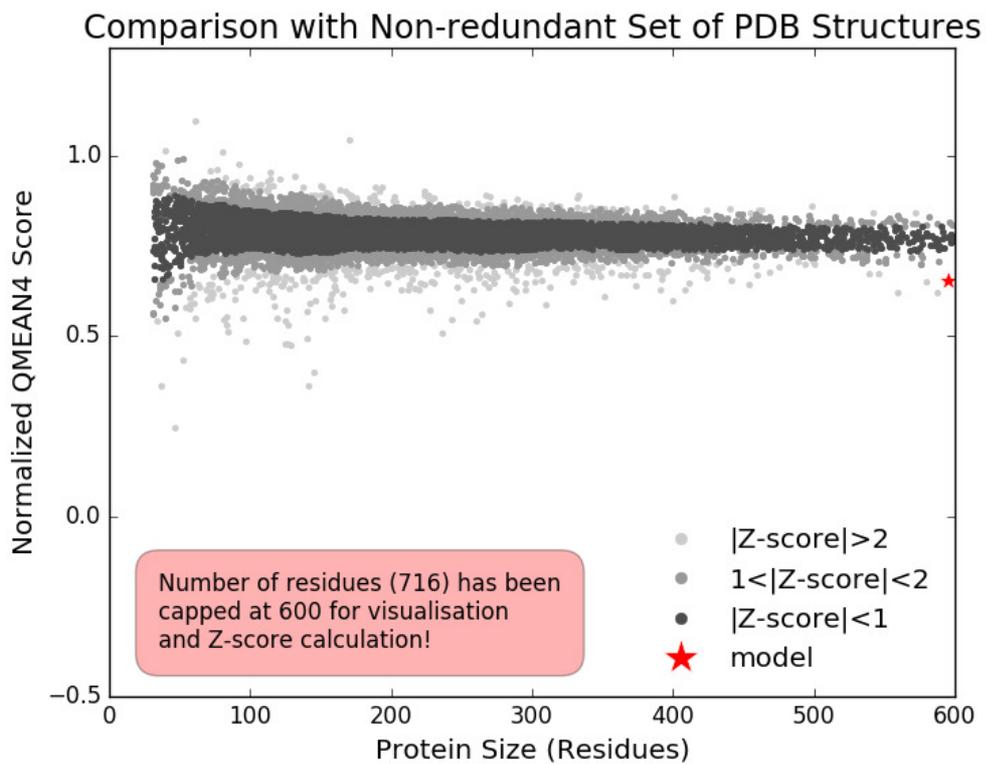


Apendice 3. Gráficos QMEAN

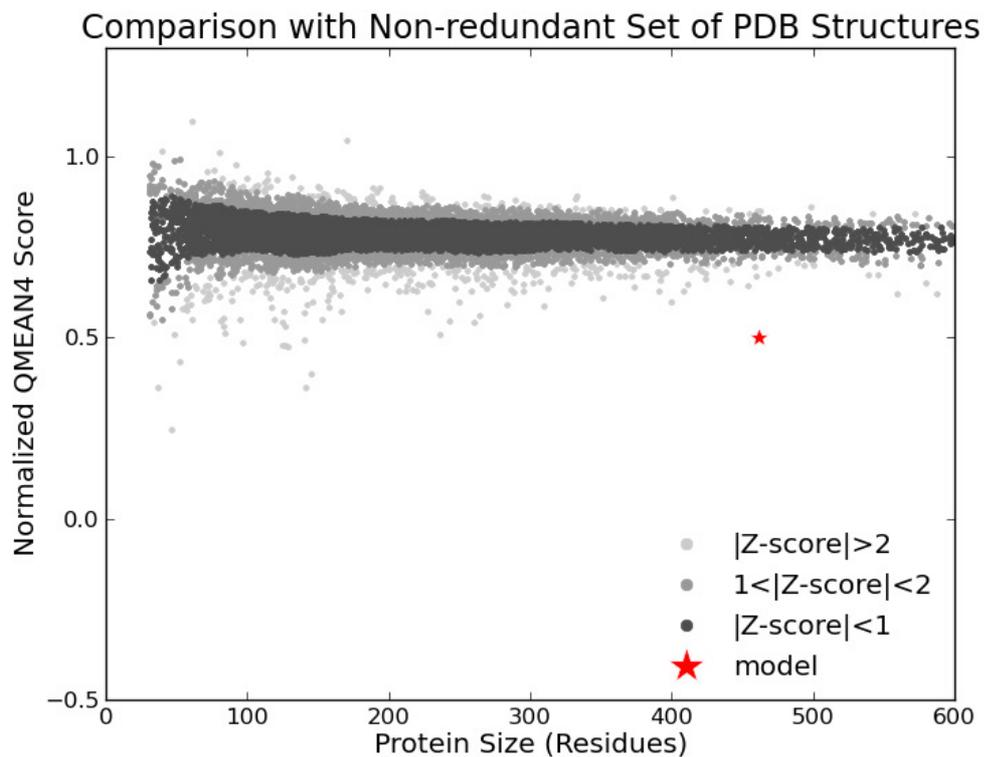
Modelo 10765 (2UY4)



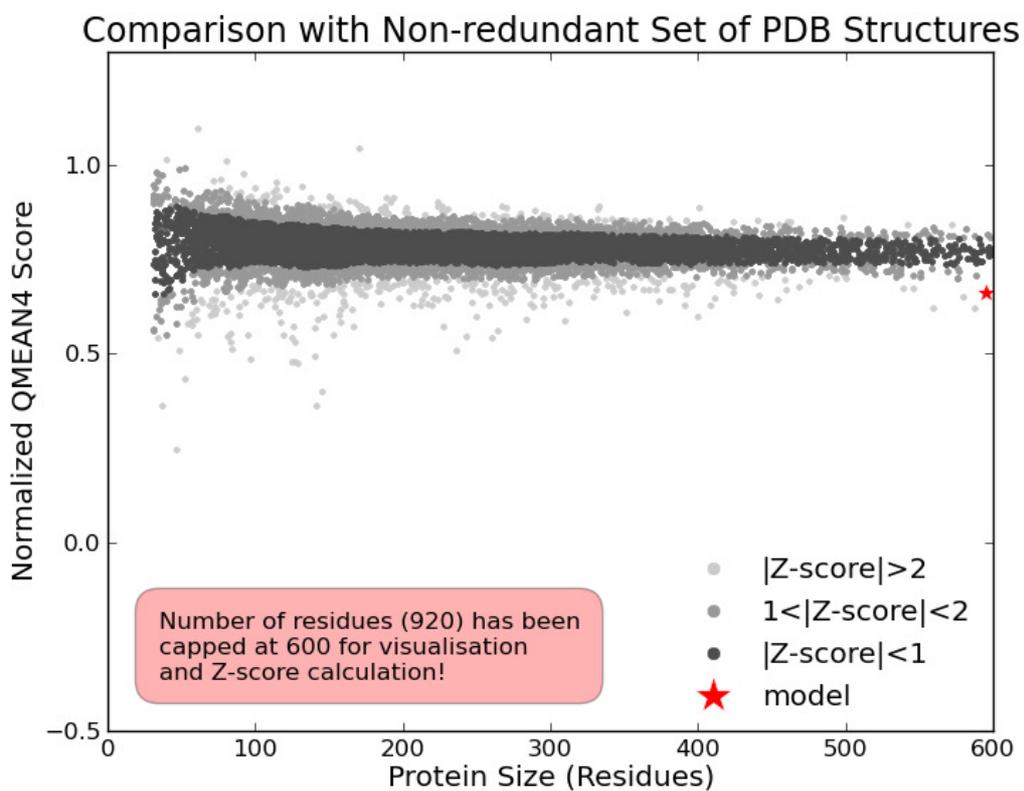
Modelo 10955 (5GZT)



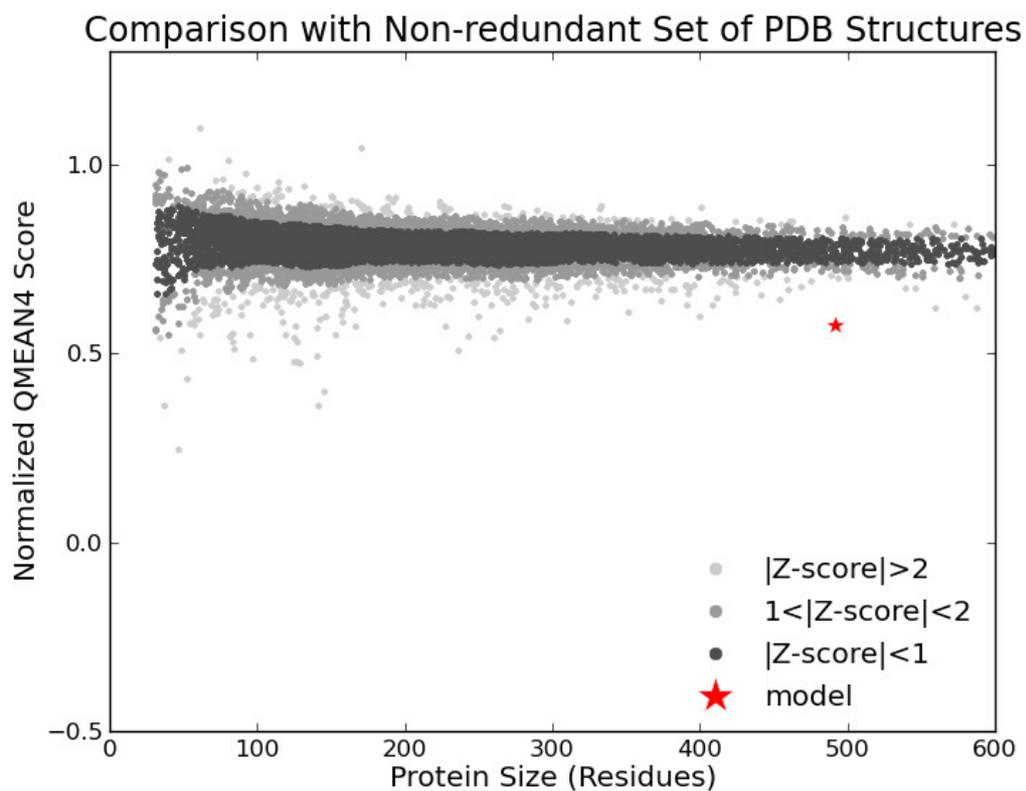
Modelo 11696 (2A3C)



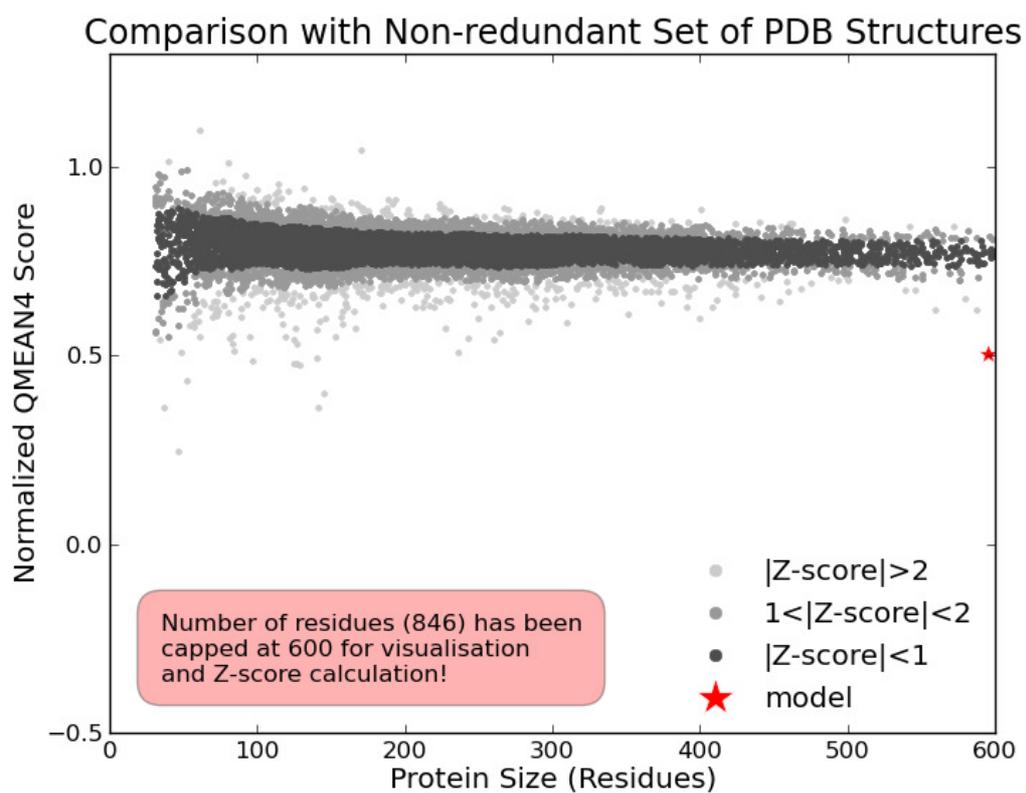
Modelo 15210 (1WNO)



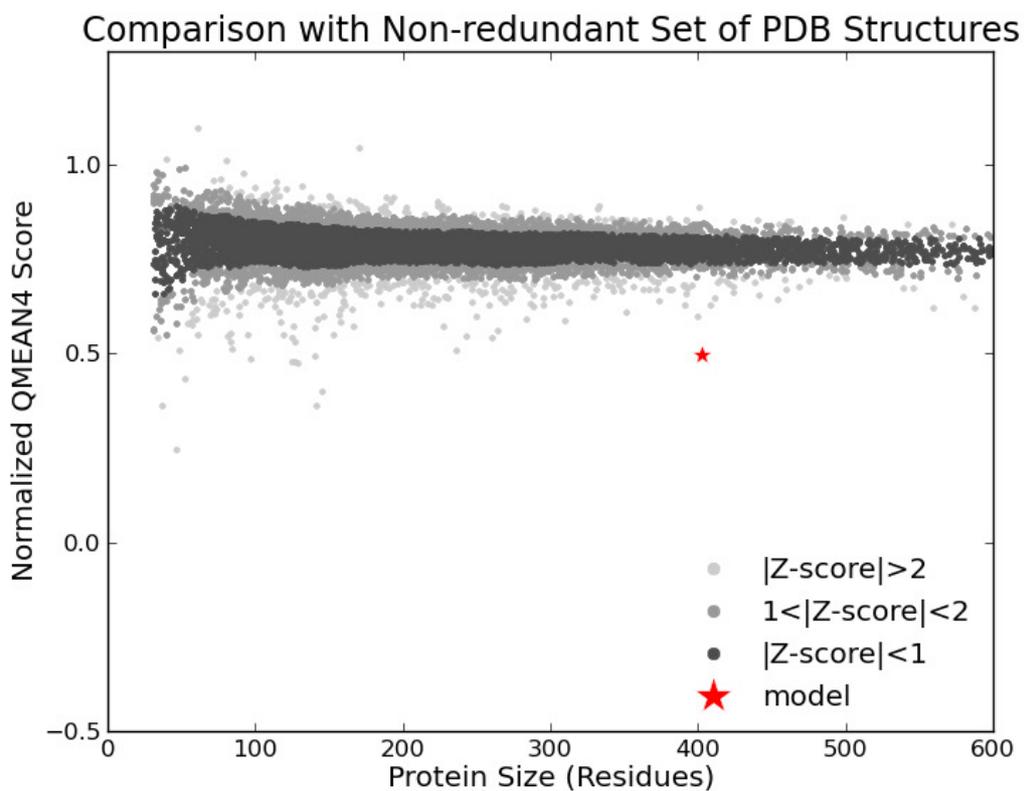
Modelo 15579 (3FY1)



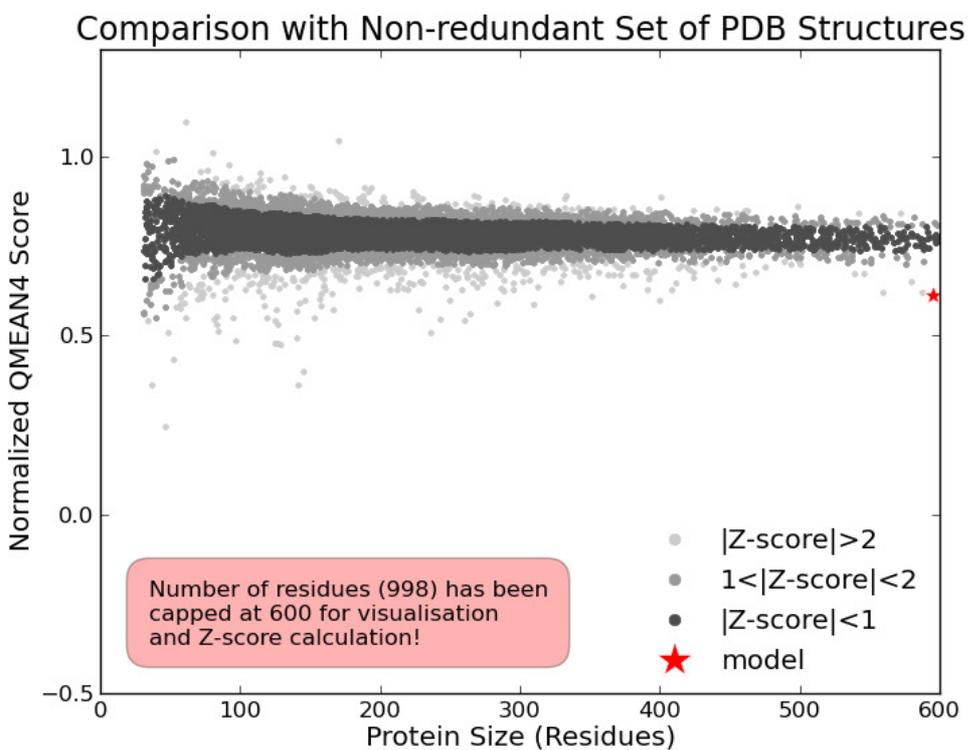
Modelo 15737 (4TXG)



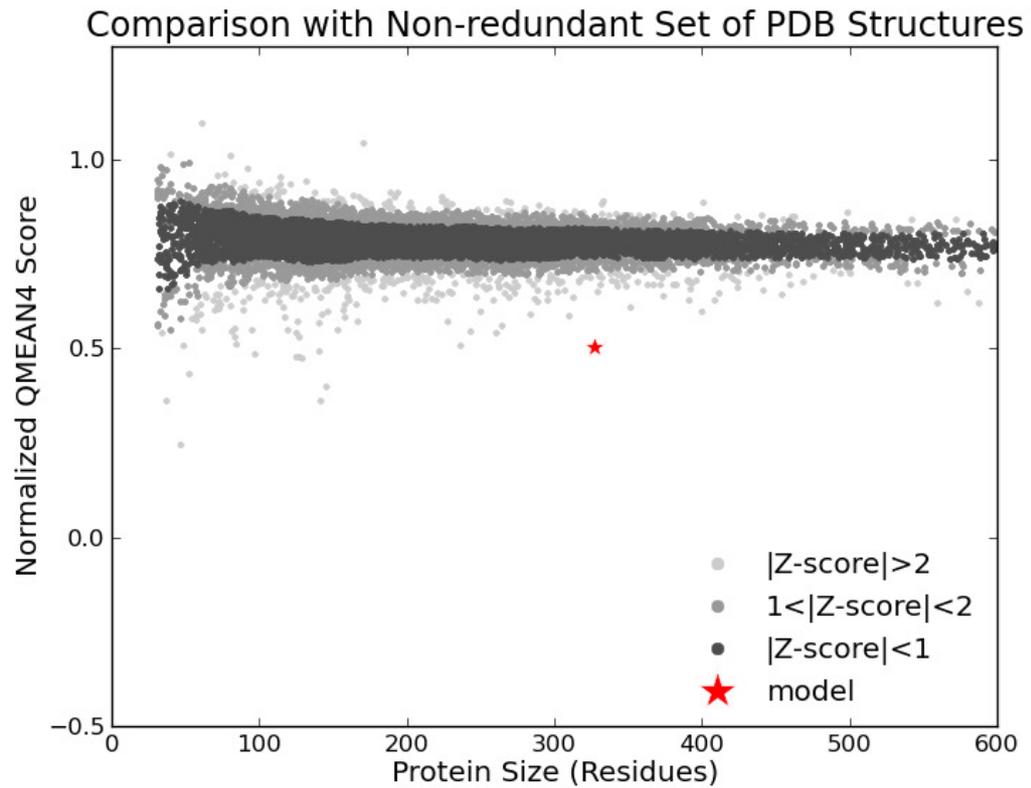
Modelo 16246 (3ARQ)



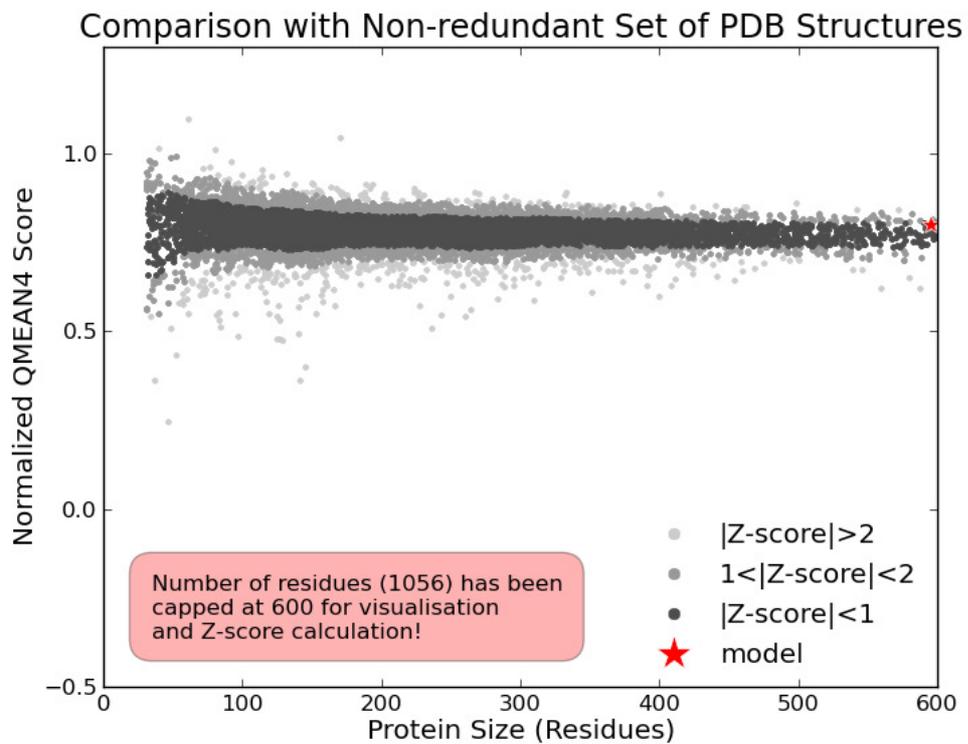
Modelo 1679 (4TX8)



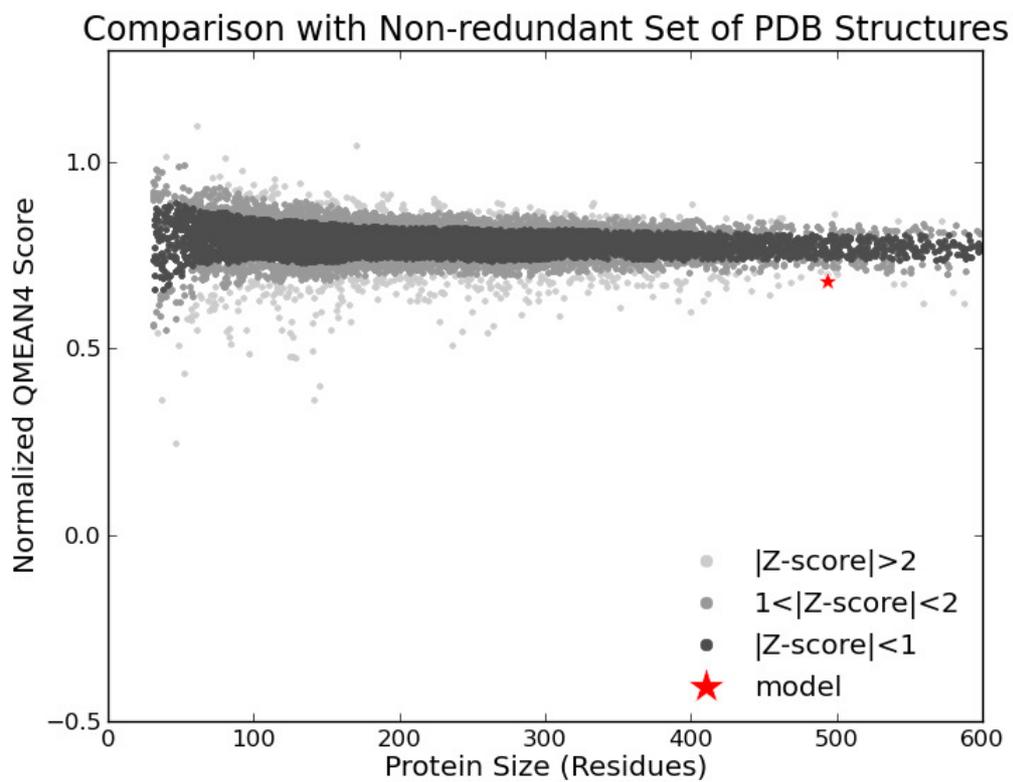
Modelo 1680 (4HME)



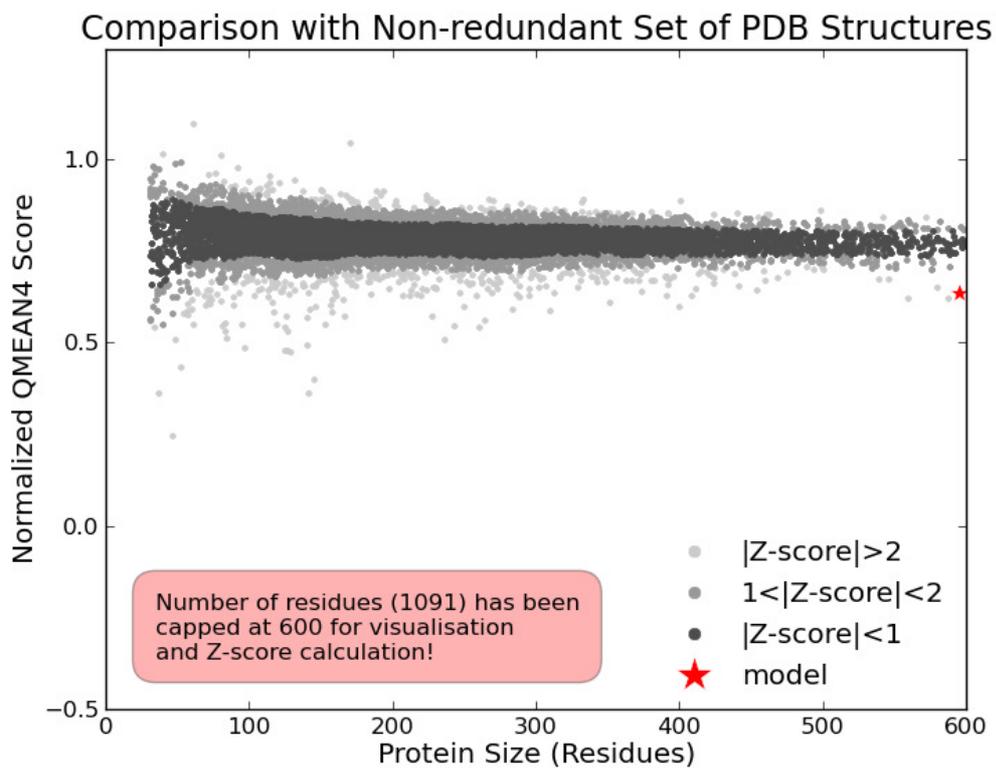
Modelo 315 (5DEZ)



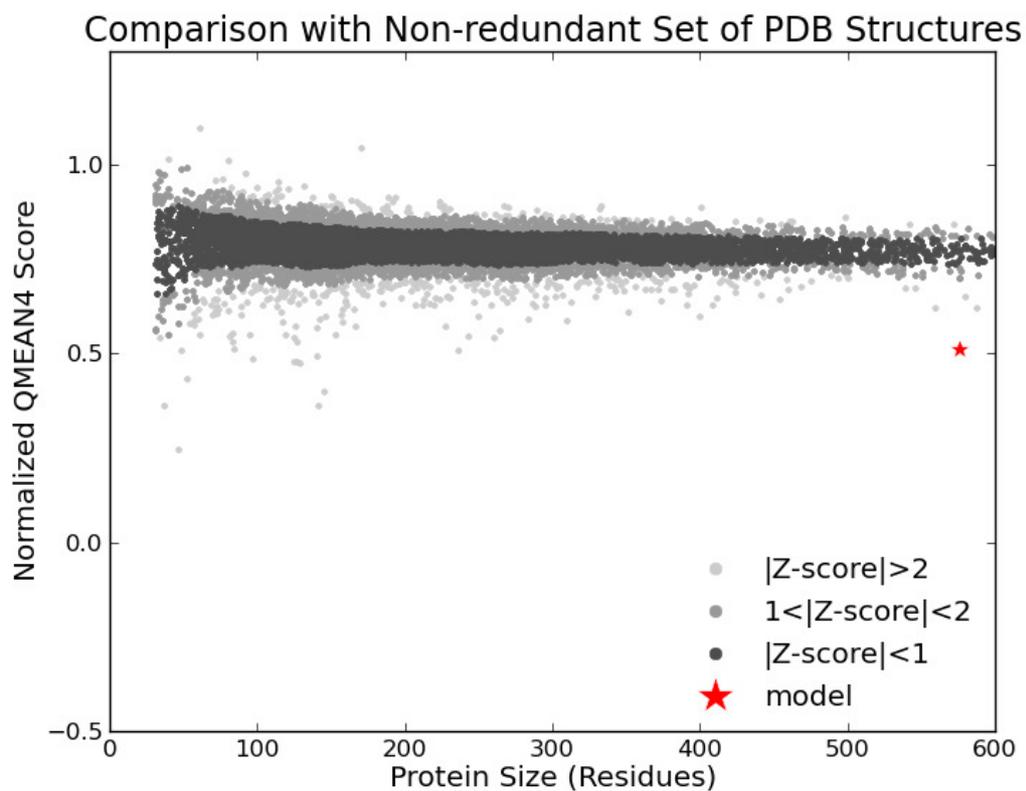
Modelo 4357 (2UY4)



Modelo 5707 (4WJX)



Modelo 8805 (1HKK)



Modelo 997 (3G6M)

