



Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

ANTÔNIO VIANA LOPES NETO

**ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE UMA QUITINASE RECOMBINANTE DO
FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.)] CONTRA *Lasiodiplodia
theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.), AGENTE CAUSAL DA RESINOSE DO
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.)**

FORTALEZA- CE

2014

ANTÔNIO VIANA LOPES NETO

**ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE UMA QUITINASE RECOMBINANTE DE
FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.)] CONTRA *Lasiodiplodia
theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.), AGENTE CAUSAL DA RESINOSE DO
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.)**

**Dissertação apresentada como pré-
requisito para a obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica, área de
concentração Bioquímica Vegetal na
Universidade Federal do Ceará.**

Orientador: Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Co-Orientadora: Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva

FORTALEZA- CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

L85a

Lopes Neto, Antônio Viana.

Atividade fungistática de uma quitinase recombinante do feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.)] contra *Lasiodiplodia theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.), agente causal da resinose do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) / Antônio Viana Lopes Neto. – 2014. 57 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Bioquímica.

Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

Coorientação: Prof. Dr. Christiana de Fátima Bruce da Silva.

1. *Pichia pastoris*. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Quitinase. I. Título.

CDD 574.192

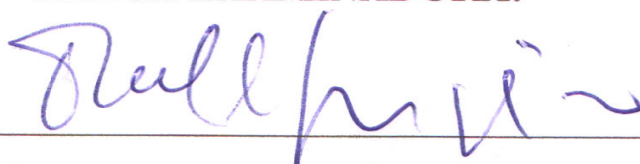
ANTÔNIO VIANA LOPES NETO

**ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE UMA QUITINASE RECOMBINANTE DE
FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.)] CONTRA *Lasiodiplodia
theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.), AGENTE CAUSAL DA RESINOSE DO
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.)**

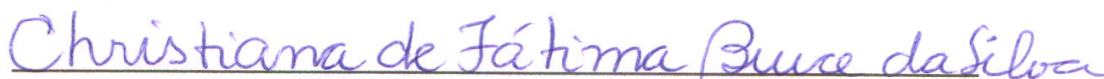
Dissertação apresentada como pré-
requisito para a obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica, área de
concentração Bioquímica Vegetal na
Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em 18/ 09/ 2014.

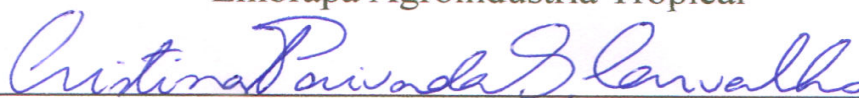
BANCA EXAMINADORA:



Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará



Dra. Christiana de Fátima Bruce Silva (Co-Orientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical



Professora Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pelo constante apoio e confiança durante a realização desta dissertação.

À Dr. Christiana Bruce pela amizade, acolhida, paciência e incentivo durante a realização desta dissertação.

À Professora Dr. Cristina Paiva por sua cordial atenção, apoio e disponibilidade em ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular por ajuda e companheirismo, sintam-se todos abraçados.

Ao Dr. Edvar Monteiro por toda ajuda e companheirismo.

Ao Professor Dr. Emanuel Jereissati por toda ajuda e incentivo.

Aos que compõe o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, meu muito obrigado por tudo.

À Cecília Rocha e aos que compõe o Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL), obrigado.

À Freddy Davi, Iara e Aline Kelly e demais componentes do Laboratório de Proteínas de Defesa Vegetal, obrigado.

Aos professores da Pós-graduação em Bioquímica da UFC.

Aos Professores do Laboratório de Citogenética: Dra. Aparecida; Dr. Itayguara e Dr. Cristiano.

À todos os colegas do mestrado pela amizade, discussões e companheirismo.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Aos meus tios Eumar e Rosemar por toda dedicação e acolhida e Lúcia por todo apoio.

Aos meus primos: Eumar Júnior, Rómulo, André e Cézanne obrigado por tudo.

Aos meus irmãos por todo incentivo.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Agroindústria Tropical.

À coordenação e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

À Secretaria Municipal de Jardim-CE pela licença concedida para estudos.

À Raimunda Nonato Fontenele (*in memoriam*) e
Eponina Leite Marinho (*in memoriam*). Dedicó.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade biológica de uma quitinase recombinante (rVuChi) de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) contra o fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae*. A proteína recombinante foi expressa em *Pichia pastoris*, coletada e purificada após 72h de indução, utilizando cromatografia de afinidade em matriz de quitina. A quitinase foi eluída a partir da cromatografia de afinidade com ácido acético a 0,1 M. Ensaio enzimático foi realizado contra o substrato sintético (quitina coloidal), a fim de determinar a atividade da proteína recombinante purificada. A quitinase apresentou atividade específica de 5.637,32 U/mg de proteína. Testes biológicos foram realizados. Nestes testes três diferentes isolados de *L. theobromae*, identificados como CNPAT CCJ-127, CNPAT CCJ-166 e CNPAT CCJ-184, foram utilizados e os experimentos foram realizados em triplicata. Os isolados fúngicos foram obtidos da coleção de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE, Brasil). Em todos os ensaios biológicos o fungicida Carbomax 500 SC® (Carbendazim), a uma concentração de 2 mL/L, e água destilada estéril foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. Um total de 50, 100 e 300 µg de quitinase recombinante (rVuChi) foi utilizado em todos os testes. O primeiro ensaio foi baseado na metodologia de difusão em disco de papel de filtro em que foram investigados os efeitos da proteína sobre o crescimento do micélio, bem como a formação de halo de inibição sobre o crescimento micelial do fungo. O segundo ensaio foi baseado no ensaio de difusão em ágar. Fotografias foram usadas para registrar as observações. A quitinase rVuChi mostrou efeito fungistático variando de moderado a forte sobre o crescimento micelial de todos os isolados de *L. theobromae*, particularmente quando usada nas doses de 100 e 300 µg, no ensaio de difusão em disco. CNPAT CCJ-127 foi o isolado mais resistente à ação fungistática de rVuChi, como observado pelo menor impacto da proteína em seu crescimento micelial. No teste de difusão em ágar a quantidade de 300 µg foi a mais efetiva, da mesma forma como observado para o de difusão em disco de papel de filtro. Além disso, o efeito da proteína foi mais pronunciado nos isolados CNPAT CCJ-166 e CNPAT CCJ-184 e menos impactante no isolado CNPAT CCJ-127. A quitinase recombinante rVuChi mostrou ser um inibidor do crescimento micelial de três diferentes isolados de *L. theobromae*. Os efeitos fungistáticos da proteína aqui descritos podem ser devido à sua capacidade de degradar quitina, um biopolímero estrutural que faz parte da parede celular de vários fungos fitopatogênicos, incluindo *L. theobromae*. Entretanto, mais estudos precisam ser conduzidos para revelar os possíveis mecanismos de ação de rVuChi sobre *L. theobromae*.

Palavras-chaves: rVuChi, *Pichia pastoris*, fungo fitopatogênico.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the biological activity of a recombinant chitinase (rVuChi) from cowpea (*Vigna unguiculata*) against the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. The recombinant protein was expressed in *Pichia pastoris*, collected and purified after 72h of induction, using a chitin affinity chromatography. The chitinase was eluted from the affinity chromatography using 0.1 M acetic acid. Enzymatic assay was performed against the synthetic substrate (colloidal chitin) in order to determine the activity of the purified recombinant protein. The chitinase displayed a specific activity of 5,637.32 U/mg of protein. Biological tests were performed. In these tests three different isolates of *L. theobromae*, identified as CNPAT CCJ-127, CNPAT CCJ-166 and CNPAT CCJ-184, were used and the experiments were performed on triplicate. The fungal isolates were obtained from the collection of work from the laboratory of plant pathology from the Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE, Brasil). In all biological assays the fungicide Carbomax 500 SC® (Carbendazim) at a concentration of 2 mL/L and sterile distilled water were used as positive and negative controls, respectively. A total of 50, 100 and 300 µg of recombinant chitinase (rVuChi) was used in all tests. The first test was based on the disk diffusion methodology using filter paper in which the effects of the protein on the mycelium growth, as well as the formation of an inhibition zone on the fungal hyphae were investigated. The second test was based on the diffusion assay in agar. Photographs were used to register the observations. The rVuChi showed moderate to strong fungistatic activities on the mycelial growth of all *L. theobromae* isolates when used at 100 and 300 µg in the disk diffusion assay. CNPAT CCJ-127 was the most resistant specimen to the rVuChi fungistatic action, as observed by the lower impact of the protein on its mycelial growth. In the agar diffusion test the amount of 300 µg was the most effective, as observed in the disk diffusion test. In addition, the effect of the protein was most pronounced on the isolates CNPAT CCJ-166 and CNPAT CCJ-184 and less impacting on CNPAT CCJ-127. The recombinant chitinase rVuChi showed to be an inhibitor of the mycelial growth of three *L. theobromae* isolates. The fungistatic effects of the protein described here may be due to its ability to degrade chitin, a structural biopolymer that makes part of the cell wall of several phytopathogenic fungi, including *L. theobromae*. Once this is only a scientific speculation, more studies need to be made to definitely reveal the mechanism of action of rVuChi on *L. theobromae*.

Key-words: rVuChi, *Pichia pastoris*, fungo fitopatogênico.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Sintomas da resinose em caule de cajueiro.....	21
Figura 2	Estrutura esquemática de um quitinase classe I.....	24
Figura 3	Modelo de mecanismo de defesa de planta e indução de resistência. 26	
Figura 4	Imagem ilustrando teste biológico qualitativo.....	35
Figura 5	Purificação de rVuChi por cromatografia de afinidade matriz de quitina.....	37
Figura 6	Cromatograma de rVuChi em matriz de Quitina.....	37
Figura 7	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-127), com 48 h após início dos testes.....	41
Figura 8	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-127), com 72 h após início dos testes.....	41
Figura 9	Médias do crescimento da área micelial com 24, 48 e 72 h após início dos testes com o isolado CNPAT CCJ-127.....	42
Figura 10	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-166), com 48 h após o início dos testes.....	43
Figura 11	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-166), com 72 h após o início dos testes.....	43
Figura 12	Médias do crescimento da área micelial com 24, 48 e 72 h após início dos testes do isolado CNPAT CCJ-166.....	44
Figura 13	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-184), com 48 h após o início dos testes.....	45
Figura 14	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-184), com 72 h após o início dos testes.....	45
Figura 15	Médias do crescimento da área micelial com 24, 48 e 72 h após início dos testes do isolado CNPAT CCJ-184.....	46
Figura 16	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-127), com 48 H após o início dos testes.....	48
Figura 17	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-166), com 72 H após o início dos testes.....	48

Figura 18	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-184), com 72 H após o início dos testes.....	49
Figura 19	Crescimento micelial de <i>L. theobromae</i> (isolado CNPAT CCJ-127), com 72 H para confirmação da ação fungistática.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados referentes a Atividade Total, Específica e das concentrações usadas nos testes <i>in vitro</i>	38
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ACC	Amendoa da Castanha do Caju
BMGY	Meio de inóculo para expressão do gene da quitinase (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6, YNB 1,34%, metanol 1%, biotina 0,00004%)
BMMY	Meio de pr-inóculo para expressão do gene da quitinase (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6, YNB 1,34%, glicerol 1%, biotina 0,00004%)
CNPAT	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical
DO₆₀₀	Densidade ptica a 600 nanmetros
DMAB	Para-Dimetilbenzaldeido
LCC	Liquido da castanha do caju
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
YNB	Base de Nitrogênio para levedura

SUMÁRIO

Resumo	VIII
Abstract	IX
Lista de figuras	X
Lista de tabelas	XII
Lista de Siglas e Abreviaturas	XIII
1. Introdução	16
2. Referencial teórico	
2.1 A cultura do cajueiro.....	18
2.2. Resinose ocasionada pelo fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> Pat. (Griff. e Maubl.).....	19
2.3 Quitinases, Quitina e Defesa de Plantas.....	21
2.4 Proteínas heterólogas.....	25
3. Objetivos	27
4. Materiais	28
4.1 Células de Leveduras.....	28
4.2 Fungos.....	28
4.3 Reagentes e outros materiais.....	28
5. Métodos	29
5.1 Indução da expressão da proteína recombinante rVuChi em <i>P. pastoris</i>	29
5.2 Precipitação com Sulfato de Amônio.....	29
5.3 Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina.....	30
5.4 Dosagem de Proteínas.....	30
5.5 Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes com SDS (SDS-PAGE)	30
5.6 Atividade quitinásica	31
5.7 Atividades biológicas contra <i>L. theobromae</i>	32
5.7.1 Atividade de difusão em disco de papel de filtro.....	32
5.7.2 Atividade de difusão em ágar	33

6. Resultados	
6.1 Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina.....	35
6.2 Atividade quitinásica.....	35
6.3 Atividades biológicas contra <i>L. theobromae</i>	38
6.3.1 Atividade de difusão em disco de papel de filtro (teste qualitativo).....	38
6.3.2 Atividade de difusão em ágar (teste quantitativo).....	46
7. Discussões	49
8. Conclusões	52
9. Referências	53

1. Introdução

O Brasil, segundo dados da FAO (2012) está na listagem dos maiores produtores de castanhas de caju e conseqüentemente do fruto e seus derivados (sucos, doces, etc.) (ALVES et al., 2013). A cultura do cajueiro apresenta grande importância econômica principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. O Estado do Ceará se destaca por ser responsável por mais de 50% das exportações de amêndoas de castanha do caju, segundo dados do Sindicato das Indústrias de Beneficiamento de Castanha de Caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará (SindiCaju, 2013). Dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) também para o ano de 2013 (BELCHIOR; BRASILEIRO, 2013) demonstram o quão é importante a cultura do caju para o Ceará e Estados vizinhos. Durante o período de 2000 a 2005, o Estado do Ceará, alcançou o patamar de US\$ 150 milhões com o comércio de amêndoas de castanha do caju (ACC) (FRANÇA et al., 2008). Já em 2008, o Ceará exportou o montante de US\$ 146 milhões de dólares sendo a castanha de caju o principal produto da exportação (SindiCaju, 2008). No ano de 2013, o SindiCaju apontou uma exportação total de US\$ 17 212.375 milhões de dólares. E no mesmo ano o Ceará foi único Estado do Nordeste a exportar LCC (líquido da castanha do caju), produto muito utilizado como combustível.

As indústrias de beneficiamento da castanha localizadas no estado do Ceará, detêm cerca de 70% da capacidade instalada da região nordestina. Somente a agroindústria processadora de castanha de caju no Ceará emprega cerca de 20 mil pessoas, além de proporcionar 280 mil postos de trabalho no campo (ELAINE et al., 2009). Dados atuais do SindiCaju apontam para mais 300 mil empregos em toda região Nordeste.

Com o cultivo intensivo do cajueiro na região Nordeste do Brasil, alguns problemas vêm despontando, dentre os quais as doenças de origem fúngica. A doença que vem merecendo destaque, por ocasionar grandes danos e perdas na cultura é a resinose ocasionada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.).

A resinose é uma doença de difícil manejo, principalmente devido as características ecológicas intrínsecas do fungo, bem como, devido a sua grande variedade de hospedeiros (LIMA et al., 2013). Os danos ocasionados pela doença resultam na redução da produção. As plantas apresentam um bloqueio do transporte de água, nutrientes e seiva elaborada, nos estádios iniciais da infecção. Ocorre também redução do estande do pomar, decorrente da morte de plantas. Além disso, acontece a interferência deletéria na atividade fotossintética das plantas (CARDOSO et al., 2010). A adoção única

do controle químico não é o suficiente para o manejo eficiente e racional da enfermidade (PEREIRA et al., 2006; SAJITHA; FLORENCE, 2013).

Adicionalmente, o patógeno apresenta variações nas características morfológicas e no crescimento micelial, esporulação e patogenicidade, sendo necessário o entendimento dessas características, para tentar reduzir os prejuízos causados pelo patógeno em diversas culturas (PEREIRA et al., 2006). Dentro desse contexto é interessante, a busca por métodos alternativos para o controle dessa doença. Um dos métodos alternativos que poderiam ser inseridos para o manejo da enfermidade é a utilização de proteínas recombinantes, bem como outros produtos biotecnológicos que apresentam atividade fungistática e/ou fungicida ou indutora de resistência.

2. Referencial Teórico

2.1 A cultura do cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta tipicamente de clima tropical sendo sua origem atribuída ao Nordeste Brasileiro (CIPRIANO, 2014; BARROS et al., 1993). Pertencente à família Anacardiaceae tem como característica ser uma planta perene, porte médio com caule tortuoso e bastante ramificado (CIPRIANO, 2014; BARROS et al., 1993). Com relação a reprodução apresentam as flores masculinas e femininas na mesma planta, mas preferencialmente, ocorre fecundação cruzada (BARROS et al., 1993). Possui um pedúnculo superdesenvolvido e bastante utilizado na alimentação e muitas vezes confundido com o fruto, sendo na verdade um pedúnculo floral que varia de coloração entre o amarelo e o vermelho (ELAINE et al., 2009). O fruto propriamente dito do cajueiro, chamado de castanha de caju, é um aquênio de comprimento e largura variável, casca coriácea lisa, mesocarpo alveolado, repleto de um líquido escuro quase preto, cáustico e inflamável, chamado de LCC. Na parte mais interna da castanha está localizada a amêndoa, constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, que compõem a parte comestível do fruto, revestida por uma película em tons avermelhado (ELAINE et al., 2009).

Atualmente, a planta está disseminada em diversos países como Índia, Moçambique, Tanzânia, Quênia e mais recentemente Vietnã, Indonésia e Tailândia (ELAINE et al., 2009). No Brasil, 95% da área ocupada por esta cultura está situada na região Nordeste, onde se atribui a natividade da espécie (CIPRIANO, 2014). Existem dois tipos de cajueiro, o comum e anão, classificados conforme o porte (CRISÓSTOMO et al., 2002). No melhoramento clonal, os clones de cajueiro anão estão tendo destaque e importância devido aos resultados apresentados na região do semiárido nordestino, tais como, uniformidade da castanha, pedúnculo, produção, precocidade da colheita, facilidade no manuseio e condução dos pomares (CIPRIANO, 2014). Apesar do melhoramento agregar grande valor econômico na venda do produto, muitas vezes, não é suficiente para suprir a planta contra o ataque de patógenos, principalmente os fúngicos.

2.2 Resinose ocasionada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.)

As plantas representam a principal fonte de alimentos para humanidade e uma infinidade de agentes fitopatogênicos causam perdas no rendimento da colheita todos os anos (SARMA et al., 2012).

A resinose é considerada uma das principais doenças existentes no Nordeste Brasileiro (ALVES et al., 2013) responsável por essas perdas e danos nas colheitas. A enfermidade foi descrita por Freire (1991) em plantações de cajueiro no estado do Ceará (FREIRE et al., 2002). O patógeno responsável pela doença apresenta grande capacidade de colonizar tecidos vegetais, sem sintomas aparentemente perceptíveis (CARDOSO et al., 2009). Segundo Cardoso (2000) algumas medidas de controle podem ser utilizadas para o manejo da doença, como a poda dos brotos afetados e pulverização com fungicidas (FREIRE et al., 2002). A alta incidência de infecções em cajueiros ocorre principalmente devido a estresses, nas quais as plantas estão submetidas (LIMA et al., 2013; ALVES et al., 2013; CARDOSO et al., 2006). As infecções de *L. theobromae* sobre uma gama de frutíferas, tipicamente tropicais (mangueira, coqueiro, cajueiro) é bastante reportado (LIMA et al., 2012).

Os primeiros sintomas da resinose geralmente ocorrem após a primeira safra comercial do cajueiro, cerca de 24 a 36 meses após o plantio (CARDOSO et al., 2006). Os principais sintomas da doença são o intumescimento do caule (troncos lenhosos), ocasionando rachaduras e liberação de exsudato (LIMA et al., 2013; ALVES et al., 2013). A exsudação da goma, amarelecimento e queda das folhas são os sintomas mais visíveis da doença.

L. theobromae [*Botryodiplodia theobromae* (Pat.)] é o agente causal da enfermidade e segundo as classificações é considerado um estado assexuado de *Botryosphaeria rhodina* (Berk; Curtis) Arx. (Punithalingam, 1976). O termo *Lasiodiplodia* é um nome genérico a ser adotado para este patógeno em substituição a *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) (LIMA et al., 2012). As características de *L. theobromae* em meio de cultura são muito variáveis e podem apresentar diferenças na coloração das colônias e velocidade de crescimento micelial, de acordo com o isolado testado (Halfeld-Vieira et al., 2007. Pereira et al. (2006), trabalhando com isolados de *L. theobromae* de diversos hospedeiros, coletados em diferentes municípios do estado do Maranhão, observaram uma grande variação no crescimento e na produção de estruturas reprodutivas deste patógeno. Lima et al. (2010) observaram diferenças significativas no

crescimento micelial entre isolados do fungo, patogênicos a diferentes frutíferas tropicais dos estados do Ceará e Piauí (LIMA et al., 2012). Pereira (2006) realizando estudo de patogenicidade de isolados de diferentes frutíferas constatou que aqueles isolados que formaram estruturas reprodutivas comportaram-se como os menos agressivos.

Devido a estas distinções nas características fisiológicas, morfológicas e patogênicas torna-se importante o estudo desse patógeno, bem como o seu manejo para a redução dos danos e perdas nos pomares de frutíferas.

Figura 1: Sintoma típico da resinose em caule de cajueiro.



Foto: Christiana Bruce.

2.3 Quitinases, Quitina e Defesa de Plantas

Quitinases [EC 3.2.1.14] são enzimas que desempenham um papel inicial na biodegradação da quitina (PARK; PAEK; JEONG, 2012; HUANG et al., 2012; LOBO et al., 2013; HARA et al., 2013). Realizam a catálise de ligações β -1,4 da quitina liberando resíduos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) (SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007) (KOLOSOVA; BREUIL; BOHLMANN, 2014). As quitinases possuem domínios que são característicos de enzimas do tipo glicosídeos hidrolases (GH). A sua nomenclatura e classificação baseia-se na especificidade com relação ao substrato e algumas vezes em relação ao mecanismo de ação molecular (HENRISSAT; VEGETALES; GRENOBLE, 1991).

Nas classificações das quitinases, as de origem vegetal estão incluídas principalmente na classe I (YANG et al., 2011). As quitinases da classe I possuem um domínio N-terminal rico em cisteína (domínio de ligação a carboidrato-CBD) e um domínio C-terminal catalítico (CatD) (YANG et al., 2011; SARMA et al., 2012) (figura 2). Enquanto a classificação baseada na sequência de aminoácidos utiliza métodos algorítmicos para atribuir sequências específicas para várias famílias (HENRISSAT; VEGETALES; GRENOBLE, 1991). As glicosídeos-hidrolases foram classificadas em mais de 100 famílias (HENRISSAT; VEGETALES; GRENOBLE, 1991). Cada família GH (Glicosídeo-Hidrolases) contém proteínas que são relacionadas pela sequência e pelo “folding” (dobramento). Dentro de uma mesma família o mesmo mecanismo molecular é usado, ou seja, é conservado dentro de uma família de GH. A família GH 19 possui uma grande quantidade de α hélices, compartilhando alguma semelhança estrutural com quitosanases e lisozimas (SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007). As GH 19 são encontradas principalmente em plantas (classes I, III e IV), mas algumas são encontradas em bactérias. A quitinase rVuChi, por exemplo, é classificada como uma quitinase GH 19 (classe I), com base na homologia da sequência com outras quitinases (CORREIA, 2007; LANDIM, 2011).

Com relação ao modo de ação das quitinases elas podem ser endo ou exo quitinases. O tipo de ação da exoquitinase é através da hidrólise da quitina em oligossacarídeos compostos principalmente N,N'-diacetilquitobiose (GlcNAc)₂ (HUANG et al., 2012) e enquanto as endoquitinases geram oligômeros de maior tamanho.

As quitinases, em geral possuem uma ampla gama de pH ótimo (pH 4 – 9) e são estáveis na temperatura de até 60 °C (YANG et al., 2011) (SARMA et al., 2012). A proteína rVuChi por ser uma quitinase tipicamente de classe I (CORREIA, 2007; LANDIM, 2011) possui um tamanho médio comum a todas quitinases desse grupo por volta de 32 kDa. Resultados obtidos com tamanhos semelhantes foram reportados por Wang et al. (2005); S. Y. Wang, Zhou, Shao, Lu, & Rao, (2008); Yang et al. (2011). A faixa de tamanho obtida por esses autores condiz com o tamanho obtido por Landim (2011) por cromatografia de exclusão molecular e por espectrometria de massas.

Testes, com as mais diversas quitinases tem sido relatado na literatura, principalmente com potencial fungistático ou até mesmo fungicida. Não apenas quitinases de plantas superiores tem sido relatada com potencial antimicrobiano. Este potencial tem sido constatado também em bactérias (BABASHPOUR et al., 2012) (MANJEET et al., 2013) e briófitas (TAIRA et al., 2011). Entretanto, pouco é conhecido sobre o potencial que as plantas, bem como os microrganismos têm ainda a oferecer.

As quitinases são expressas principalmente durante a interação da planta-patógeno. Entretanto, também são expressas em certos tecidos durante o desenvolvimento (SINGH, KIRUBAKARAN, SAKTHIVEL, 2007 e KOLOSOVA, BREUIL e BOHLMANN, 2014). Estas enzimas são muito importantes para o metabolismo de muitos microrganismos (fungos e bactérias), insetos e nematóides (HUANG et al., 2012, JIANG et al., 2013 e KUDDUS e AHMAD, 2013). Segundo Park, Paek e Jeong (2012) muitas quitinases são importantes na digestão e degradação da cutícula antiga em insetos após a embriogênese. Dessa forma, o uso de quitinases torna-se bastante interessante contra espécies de insetos, tendo a cutícula um bom alvo em potencial.

A quitina é um dos açúcares mais abundantes e um dos principais componentes de exoesqueletos de artrópodes, parede celular de fungos e ovos de nematoides (PARK; PAEK; JEONG, 2012; JIANG et al., 2013). O estudo de enzimas com capacidade de hidrolisar este polímero torna-se muito importante. A quitina é um polissacarídeo linear que apresenta ligações β -1,4 entre resíduos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) (HUANG et al., 2012). A quitosana é um derivado desacetilado da quitina, sendo bastante interessante devido as suas propriedades biológicas e diversos usos na área de saúde, alimentação, agricultura, química e indústrias de engenharia ambiental (HUANG et al., 2012).

A quitina é também estruturalmente semelhante à celulose, com exceção da hidroxila (-OH) no grupo C₂ na celulose é substituído por um grupo de acetamida (NHCOCH₃) (WANG et al., 2009).

Os oligômeros de GlcNAc provenientes de quitina têm atividades biológicas úteis, tais como imuno-estimulação e indução de respostas de defesa vegetal (HUANG et al., 2012). Mais de 10¹¹ toneladas de quitina são sintetizadas, anualmente, nas suas diversas formas, constituindo a mais abundante biomassa ao lado de celulose (HUANG et al., 2012). Dessa forma, tornam-se interessantes estudos com enzimas que degradem este polímero e, assim, promovem a reciclagem desse material e, também, a produção de substratos das mais diversas utilidades.

Figura 2: Estrutura esquemática de um quitinase classe I.



Legenda: CBD – domínio de ligação a carboidratos (quitina). A representação esquemática foi modificada. Fonte: (SÁNCHEZ-MONGE et al., 2000)(Adaptado).

Durante o desenvolvimento, as plantas são expostas a muitos patógenos incluindo fungos e bactérias (WANG et al., 2012). Assim, as plantas acabaram desenvolvendo uma diversidade de mecanismos de defesa contra esses patógenos. Alguns destes mecanismos são constitutivos, enquanto outros são induzidos pela ocorrência do ataque por patógenos (SARMA et al., 2012). Assim, uma grande variedade de plantas produzem várias proteínas relacionadas a patogênese (PR proteínas), a exemplo das quitinases (WANG et al., 2012; YANG et al., 2011; SINGH et al., 2007) (figura 3).

Assim, as quitinases desempenham um papel importante no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos, principalmente os fúngicos (SARMA et al., 2012; YANG et al., 2011). A expressão dessas quitinases é induzida principalmente por agentes patogênicos ou substâncias químicas exógenas. As próprias quitinases liberam indutores oligossacarídeos de GlcNAc, que atuam como indutores de defesa (YANG et al., 2011). Uma variedade de fatores de estresse: ferimentos, seca, frio, ozônio, metais pesados, salinidade excessiva e luz UV, além de fitohormônios, tais como etileno, ácido jasmônico, ácido salicílico, auxina e citocinina (BOLLER et al., 1983) (SARMA et al., 2012) provocam a produção de quitinases e outras proteínas. As proteínas antifúngicas são estruturalmente diversas e compreendem as glucanases, quitinases, inibidores de protease, dentre outras proteínas.

Os mecanismos de resistência induzido podem ser explorado como uma importante ferramenta para o controle de doenças e para minimizar a quantidade de inseticidas e fungicidas ao ser humano e o meio ambiente (WAR et al., 2012). Além das quitinases possuírem um grande potencial para o controle alternativo de doenças de plantas (HERRERA-ESTRELLA; CHET, 1999) estas são uma alternativa ao uso de pesticidas perigosos a saúde e ao meio ambiente (WAR et al., 2012).

A maioria dos fungos possuem a quitina em sua estrutura (ascomicetos, basideomicetos) (PASSARINHO; DE VRIES, 2002). As quitinases classes I, grupo em que rVuChi faz parte, são incluídas nesse grupo com potencial na defesa de planta e indutora de resistência. Além do potencial controle de patógenos os oligossacarídeos de GlcNAc gerados pela degradação de quitina têm o potencial para ser usado como agentes antibacterianos, de indutores de lisozima e realçadores do sistema imune (WEN, 2002 *apud* BABASHPOUR et al., 2012). Dessa forma as quitinases têm se tornado um importante objeto de estudo para o combate e imunização de plantas contra diversos patógenos, e uma ótima ferramenta biotecnológica na reciclagem de resíduos de quitina

gerado por indústrias pesqueiras.

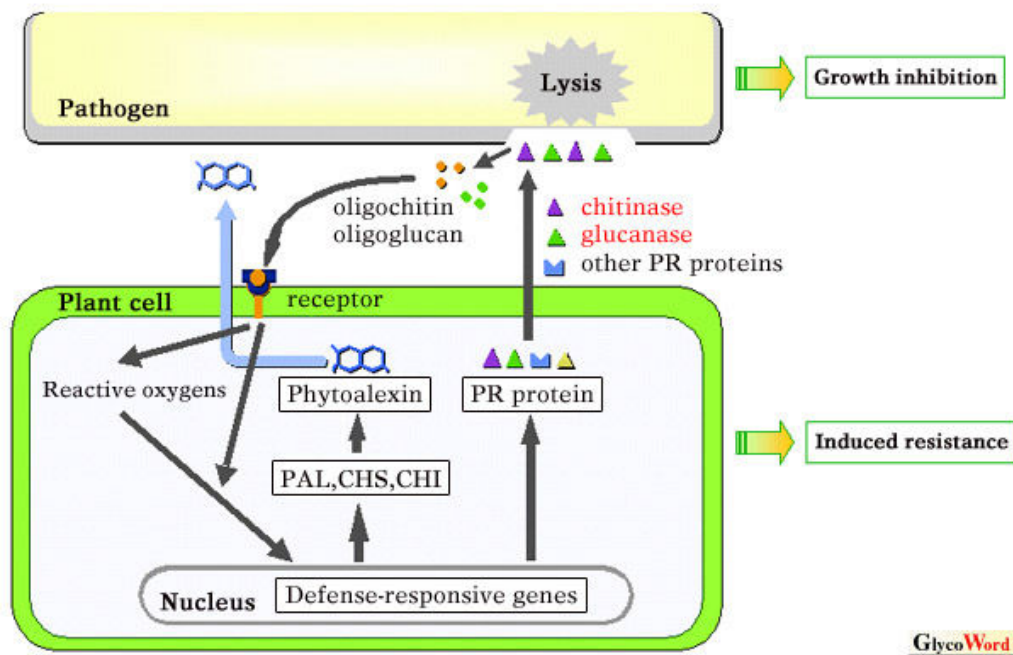
2.4 Proteínas heterólogas

Sistemas biotecnológicos, como a expressão heteróloga, foi estabelecido como uma ferramenta altamente eficiente para o desenvolvimento de bioprocessos nos últimos anos (GRAF et al., 2009). Em 2004, o mercado global de proteínas terapêuticas recombinantes foi avaliado em US\$ 44 bilhões e é esperado para chegar a 70 bilhões até o final de 2010 (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012). Esse crescimento se dá devido à grande aplicabilidade de processos metabólicos como a síntese e secreção protéica. Esse impulso se deu pelo crescimento exponencial da procura mundial de proteínas heterólogas e seus bioprodutos e, também, ao desenvolvimento de sistemas de produção economicamente viável e de alto rendimento. Tudo isso ocorreu devido aos avanços da biologia molecular e engenharia genética que ocorreram a partir do ano de 1970 (PAVLOU; REICHERT, 2004).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* se tornou uma das leveduras mais amplamente estudadas, desde seu desenvolvimento na década de 70, como declaradamente é um dos sistemas mais versáteis e úteis para a expressão de proteínas heterólogas (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012). O genoma de *P. pastoris* é relativamente simples de manipular e *kits* de expressão são comercializados mundialmente (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012). As proteínas heterólogas expressas são secretadas (devido a peptídeos sinais de secreção) tendo um valor de 80% das proteínas secretadas e mais de 30% do total de proteínas da levedura (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

E muitas dessas proteínas produzidas desde a década de 80 até o presente são de grande utilidade, seja na prática clínica, na indústria, alimentação e demais usos (PAVLOU; REICHERT, 2004; GRAF et al., 2009). As proteínas heterólogas expressas ativas com atividades biológicas relevantes são muito citadas na literatura (KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007; LIU et al., 2011; ISHISAKI et al., 2012; MASHKANI et al., 2013).

Figura 3: Modelo de mecanismo de defesa de planta e indução de resistência.



Legenda: Indução da expressão de genes de proteínas relacionadas a patogêneses em uma célula vegetal ocasionada pela presença de patógenos.

Fonte: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycobiology/PS-A04E.html>

3. Objetivo

Avaliar a ação biológica da quitinase recombinante (rVuChi) frente ao fungo *Lasiodiplodia theobromae*, causador da resinose do cajueiro.

4. Materiais

4.1 Células de Leveduras

A levedura *Pichia pastoris*, estirpe KM71H (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) transformada com o cassete de expressão pPICZ α A::VuChi (Landim, 2011) foi utilizada para a produção da quitinase rVuChi.

4.2 Fungo

O fungo utilizado foi o *Lasiodiplodia theobromae* (isolados CNPAT CCJ-166; CNPAT CCJ-184 e CNPAT CCJ-127) obtido da coleção de trabalho do Laboratório de Fitopatologia, da Embrapa Agroindústria Tropical.

4.3. Reagentes e outros materiais

O marcador de massa molecular de proteínas, usado na eletroferese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi o *Low Molecular Weight* (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, USA).

Os meios de cultura (YPD – Ágar, YPDS – Ágar, BMGY e BMMY) e o antibiótico Zeocina foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies (USA). O meio BDA (batata dextrose ágar) foi obtido da Difco (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Espanha) e o fungicida Carbomax 500 SC® (Carbendazim) da Sinon Corporation®.

Os demais reagentes utilizados neste trabalho apresentam grau analítico e foram adquiridos de empresas locais.

5. Métodos

5.1 Indução da expressão da proteína recombinante rVuChi em *P. pastoris*

A indução da expressão da proteína recombinante rVuChi em *P. pastoris* foi realizada segundo protocolo descrito por Landim (2011).

Células de *Pichia pastoris*, estirpe KM71H, transformadas com o cassete de expressão pPICZ α A::VuChi foram inoculadas em meio YPDS-ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glucose 2%, sorbitol 1M, ágar 2%) contendo zeocina 500 μ g/mL e incubadas a 30 °C por 96 h. Após este período uma colônia isolada foi inoculada em meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6, YNB 1,34%, glicerol 1%, biotina 0,00004%) contendo zeocina 500 μ g/mL. A cultura foi incubada a 30 °C, 180 rpm, até atingir um DO₆₀₀ entre 8 e 12. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (3000 \times g por 5 min a 4 °C) e ressuspensas em água ultrapura estéril (Milli-Q) de tal modo que a suspensão atingisse uma DO₆₀₀ de 1. Esta suspensão foi inoculada em meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6, YNB 1,34%, metanol 1%, biotina 0,00004%) e mantida a 17°C sob agitação de 180 rpm por 72 h. Metanol P.A para uma concentração final de 1 % foi adicionado a cada 24 h para indução da expressão da quitinase recombinante. Uma vez que o vetor de expressão pPICZ α A possui um fator de secreção para proteínas recombinantes, o meio livre de células foi centrifugado a 3000 \times g por 5 min a 4 °C para coleta de rVuChi. Posteriormente este meio foi dialisado contra água destilada e submetido a precipitação com sulfato de amônio.

5.2 Precipitação com Sulfato de Amônio

Sulfato de amônio foi utilizado para uma saturação final de 95%, a fim de concentrar rVuChi no meio de cultura. Após adição do sal, o meio foi deixado em repouso por 16 h a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 12.000 \times g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 60 mL de água ultrapura estéril. O material foi dialisado exaustivamente contra água ultra pura estéril para remoção do sal. A amostra concentrada foi denominada fração F95.

5.3 Cromatografia de Afinidade em Matriz de Quitina

A purificação de rVuChi foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em matriz de quitina, de acordo com o protocolo descrito por Peumans, Ley, & Broekaert (1984), com modificações, usando quitina comercial (Sigma, ST Louis, MO).

A coluna de quitina (47 mL) foi previamente equilibrada com o tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 contendo NaCl 1M (tampão de equilíbrio). A amostra F95 foi dialisada contra o tampão de equilíbrio e colocada em contato com a matriz por 16 h à temperatura de 24 °C. Tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 foi inicialmente utilizado para remoção das proteínas não retidas. A quitinase recombinante foi eluída por meio da adição de ácido acético 100 mM. As leituras das absorbâncias dos picos eluídos foram realizadas em espectrofotômetro Genesys 10 UV Scanning (Thermo Fischer Scientific - Waltham, MA, USA) no comprimento de onda de 280 nm. Ao final da cromatografia a matriz foi lavada com solução de ácido acético 500 mM.

Os picos obtidos PI (não retido) e PII (retido) foram dialisados contra água ultra pura estéril. Após terminada a diálise os picos I e II foram preparados para SDS-PAGE (15%) e ensaio enzimático.

5.4 Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas solúveis totais dos picos cromatográficos foi realizada segundo metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) para construção de uma curva padrão. As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, contendo SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001% e aquecidas a 100°C por 10 minutos.

As eletroforeses foram realizadas segundo Laemmli (1970), utilizando um sistema de eletroforese vertical Dual Gel Caster (Hoefer, São Francisco). As corridas foram realizadas a 70 V (durante a etapa de empacotamento das proteínas) e 120 V (durante a etapa de separação).

Ao final da corrida eletroforética as proteínas foram visualizadas por meio de

incubação dos géis em solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,2% (m/v), preparado em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e descorados com solução de isopropanol 12,5% (v/v) e ácido acético 10%.

5.6 Atividade quitinásica

O ensaio de atividade quitinásica foi realizado contra quitina coloidal, segundo metodologia descrita por Boller et al. (1983).

As amostras testadas para verificação de atividade quitinásica (250 μ L) foram incubadas com 250 μ L de quitina coloidal à temperatura de 37 °C por 1 h, sob agitação. Como controle negativo foram utilizados 250 μ L de quitina coloidal incubados com 250 μ L de água destilada, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após incubação as misturas reacionais foram aquecidas a 100 °C por 8 min e, em seguida, deixadas em repouso à temperatura ambiente, por 5 min. Os tubos contendo as misturas foram centrifugados a 13.000 \times g por 20 min. Os sobrenadantes (300 μ L) foram coletados, transferidos para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) novos e acrescidos de 10 μ L de β -glucuronidase (1:10). As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 1 h, sob agitação. Terminada esta incubação foi realizado aquecimento a 100 °C por 6 min, seguido de repouso dos tubos por 5 min, à temperatura ambiente. Ao final, 100 μ L de tetraborato de potássio (0,6 M) e 190 μ L de tampão acetato de sódio (0,05 M) a pH 5,2 foram adicionados aos tubos que foram novamente aquecidos a 100 °C por 6 min. Terminado este aquecimento os tubos foram esfriados em gelo por 5 min e, em seguida, 1 mL de uma solução de ácido acético P.A. e DMAB 2x (1:1) foi adicionado. Estes tubos foram incubados a 37 °C por 20 min. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 585 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de causar a liberação de 1 nmol de N-acetil-D-Glicosamina (GlcNAc) a 37 °C em 1 h de reação sob as condições acima descritas.

5.7 Atividades biológicas contra *L. theobromae*

5.7.1 Atividade de difusão em disco de papel de filtro

O ensaio de difusão em disco foi adaptado de Bomfim (2010). O objetivo desse experimento foi observar a formação de halos de inibição do crescimento micelial de *L. theobromae*, através da utilização da quitinase recombinante.

Os isolados de *L. theobromae* utilizados foram repicados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), na concentração de 39 g/L e mantidos em sala de incubação na temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 10 h de claro e 14 h de escuro, por 7 dias. Depois deste período os isolados foram repicados para novas placas contendo 20 mL de BDA.

Neste ensaio foram utilizados discos de papel de filtro (tipo Whatman) com diâmetro de 10 mm onde foram aplicados os seguintes tratamentos: rVuChi filtrada em membrana de ultrafiltração (0,22 µm), nas doses de 50, 100 e 300 microgramas (WANG et al., 2005; WANG et al., 2009), , água destilada estéril (controle negativo) e o fungicida Carbendazim® estéril (controle positivo), na concentração de 2 mL/L (v/v). Discos da cultura fúngica (10 mm de diâmetro) foram dispostos equidistantes dos discos contendo os tratamentos testes (Figura 4).

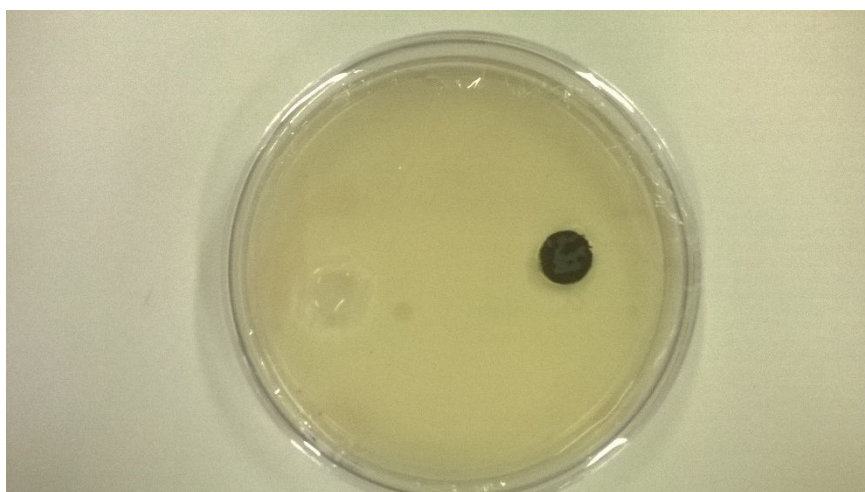
O experimento foi conduzido em incubadora do tipo BOD, à temperatura de 28°C e 33% de umidade relativa. A verificação do efeito dos tratamentos sobre o crescimento micelial foi realizada pela medição do crescimento micelial em dois sentidos diametralmente opostos (denominados "a" e "b"), com auxílio de um Paquímetro (King Tools®). A medição foi realizada a cada 24 horas até que, em uma das placas contendo o controle negativo, o crescimento micelial do fungo atingisse a borda da placa de Petri. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado com cinco repetições sendo cada repetição constituída de uma placa contendo os isolados e os tratamentos testes.

A fim de verificar a verdadeira ação (fungistática ou fungicida) de rVuChi sobre *L. theobromae* foi realizado um experimento repicando o isolado CNPAT CCJ-127, após o término do experimento de difusão em disco de papel de filtro. Deste isolado foi retirado um disco de fungo da borda do micélio com 6,5 mm de diâmetro de todos os tratamentos a fim de verificar ação de rVuChi. Os discos da cultura foram repicados para placas com meio BDA por 72 h a uma temperatura de 28 °C com fotoperíodo de 10 h de claro e 14 h de escuro. Passadas as 72 h, foi avaliado a ocorrência do crescimento micelial.

5.7.2 Atividade de difusão em ágar

Os mesmos tratamentos e isolados de *L. theobromae* utilizados no experimento anterior foram utilizados neste teste. Neste tipo de ensaio os tratamentos testes foram espalhados e difundidos no ágar já solidificado antes da repicagem do fungo (SCHWALBE; STEELE-MOORE; GOODWIN, 2007). Os tratamentos foram espalhados em meio já solidificado, com o auxílio da alça de Drigalsk. Após esse procedimento, discos de fungo dos diferentes isolados testados, com 6,5 mm de diâmetro, foram inseridos no centro de cada placa de Petri. As avaliações do experimento foram realizadas conforme descrito no item 5.7.1.

Figura 4: Imagem ilustrando teste biológico qualitativo.



Legenda: Imagem mostrando a disposição do disco do fungo *L. theobromae* (direita) e o disco do tratamento a ser testado (esquerda) em meio BDA. Fonte: próprio autor.

6. Resultados

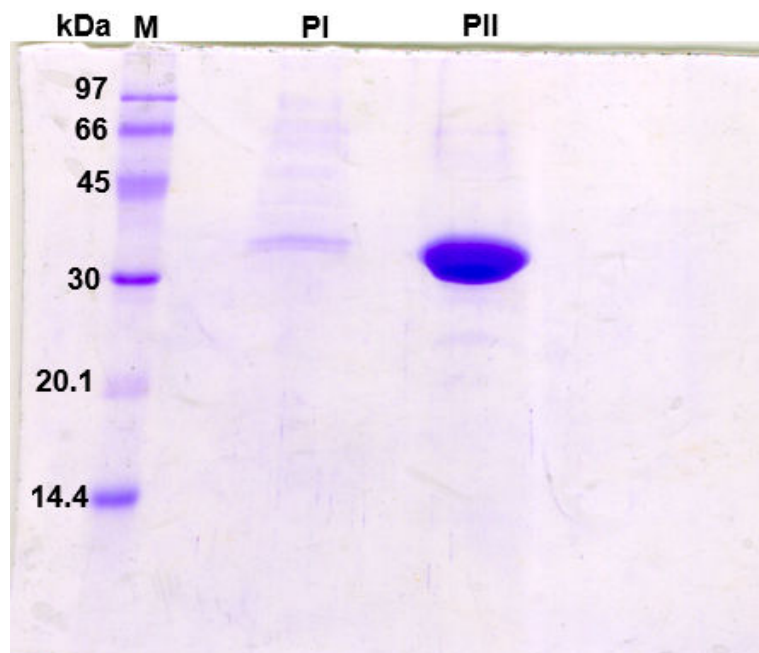
6.1 Purificação de rVuChi por Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade em matriz de quitina resultou no aparecimento de dois picos (Figura 5). O primeiro correspondeu ao “pool” de proteínas que não interagiu com a matriz (PI - pico não retido) e o segundo (PII - pico retido) correspondeu à quitinase recombinante rVuChi, a qual foi capaz de interagir com a matriz de quitina, conforme no cromatograma (Figura 5). A proteína foi eluída com 100 mM de ácido acético e purificada por homogeneidade. A massa molecular aparente de rVuChi foi de 32,14 kDa (Figura 6), de acordo com o estimado pelo programa E-Capt® versão 14.1 para Windows. Os picos I e II obtidos da cromatografia em quitina tiveram as seguintes concentrações: 0,121 mg/mL e 0,44 mg/mL, respectivamente.

6.2 Atividade quitinásica

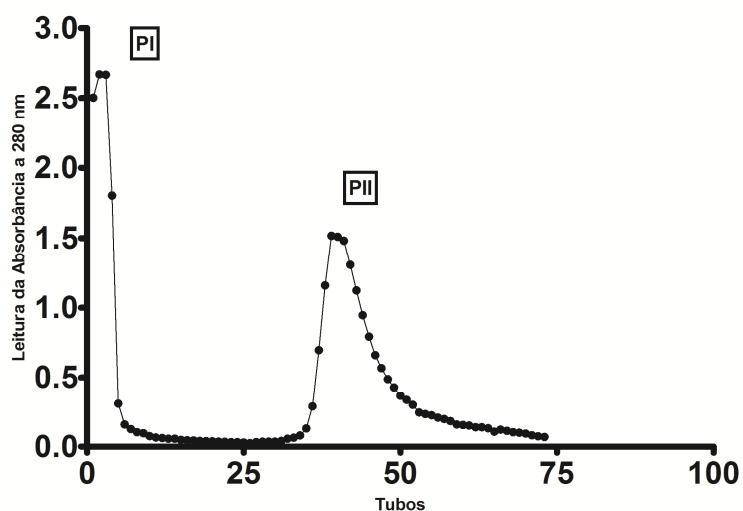
A atividade total e específica do Pico II (da cromatografia por afinidade) usado nos ensaios biológicos teve os valores de 6764,84 U e 5637,32 U/mgP, respectivamente. Foi determinado os valores de unidades enzimáticas a serem usadas nos ensaios biológicos (tabela 1).

Figura 5: Purificação de rVuChi por cromatografia de afinidade em matriz de quitina.



Legenda: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) evidenciando a purificação da quitinase recombinante de feijão-de-corda, rVuChi. M - marcador de massa molecular, *Low Molecular Weight* (GE Healthcare); PI: pico não retido da cromatografia de afinidade em matriz de quitina, PII: pico retido (rVuChi pura). A proteína recombinante foi eluída da matriz de quitina utilizando-se ácido acético 0,1 M e apresentou massa molecular aparente de 32,14 kDa.

Figura 6: Cromatograma de rVuChi em matriz de Quitina.



Legenda: PI: pico não retido, originado da simples lavagem da matriz com tampão de equilíbrio, acetato de sódio 50 mM, pH 5,2. PII: pico retido eluído com ácido acético 0,1M.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Tabela 1: Dados referentes a Atividade Total, Específica e das concentrações usadas nos testes *in vitro*

	Atividade Total	Atividade Específica	50 microgramas	100 microgramas	300 microgramas
rVuChi	6.764,84 U	5.637,32 U/mgP	281,86 U	563,732 U	1.691,96

**Legenda: U= 1 nmol de N-acetil-D-Glicosamina (GlcNac) liberado a 37 °C em 1 h.
U/mgP= unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína.**

6.2 Atividades biológicas contra *L. theobromae*

6.2.1 Atividade de difusão em disco de papel de filtro

Analisando os resultados obtidos para o isolado CNPAT CCJ-127, foi possível observar um crescimento bem mais rápido em meio de cultura comparado com os outros isolados nas mesmas condições. Não foi observada a formação de nenhuma estrutura reprodutiva durante o período de avaliação do experimento.

Com 48 h (figura 7) o crescimento foi significativamente reduzido, quando comparado com o controle negativo. As doses de 100 e 300 microgramas se mostraram mais eficientes na inibição do crescimento micelial. O crescimento micelial do controle negativo atingiu a borda da placa após 72 h de incubação (figura 8). De modo semelhante, a placa com rVuChi (50 µg) já apresentava o crescimento fúngico envolvendo o disco de proteína. Entretanto, nas doses de 100 e 300 µg foi possível observar uma inibição mais eficiente no crescimento micelial, sendo mais acentuado na placa contendo a dose de 300 µg. O controle positivo mostrou forte ação fungicida.

Nas medições das áreas de crescimento micelial, durante os tempos de 24, 48 e 72 h de incubação, foi possível perceber uma tendência de crescimento micelial linear para aqueles isolados que foram incubados com água destilada (controle negativo), ao longo do tempo. Já o fungicida e rVuChi (300 µg) mostraram-se eficientes na inibição do crescimento micelial (figura 9).

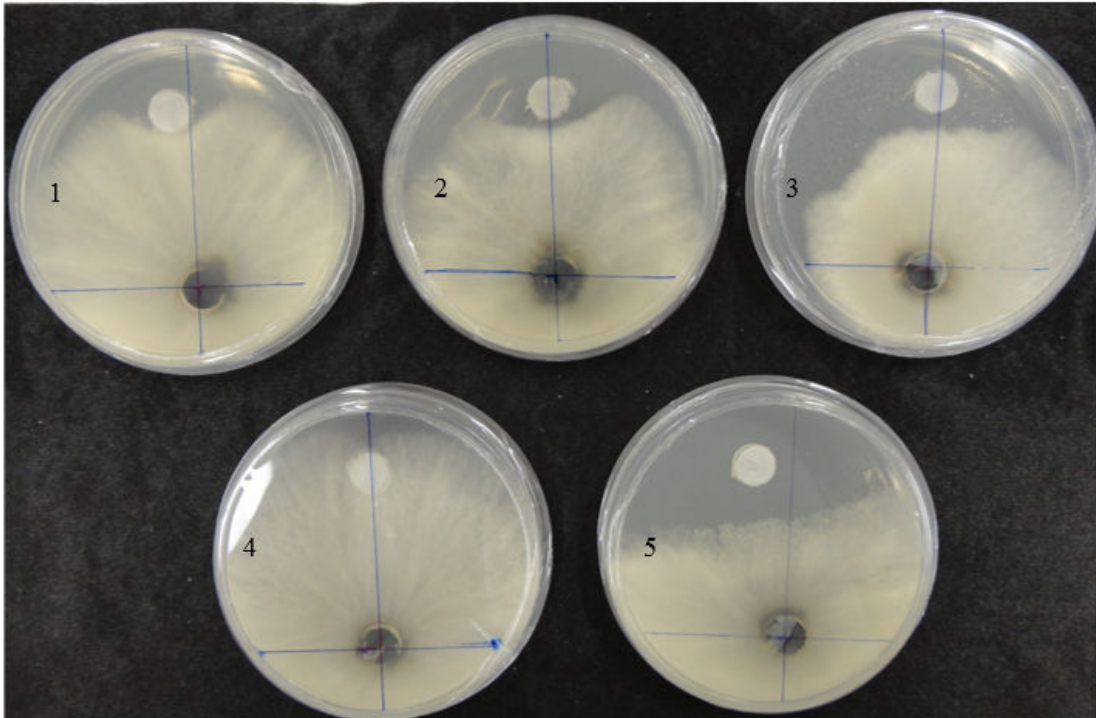
A quitinase nas doses de 100 e 300 µg apresentou forte inibição do crescimento micelial, sobre o isolado CNPAT CCJ 166 nos períodos de 48 e 72 h de incubação (figura 10 e 11). Este mesmo isolado demonstrou ser menos agressivo, quando se observou seu crescimento micelial, em meio de cultura, quando comparado com os outros isolados. Como esperado o fungicida exerceu seu papel sobre este isolado, quando comparado com o isolado CNPAT CCJ-127. Concluiu-se que o isolado CNPAT CCJ-166 é menos agressivo em condições de cultivo em placa de Petri, contendo apenas meio BDA, comparado com os outros isolados.

O efeito fungistático também pôde ser evidenciado nas médias das áreas de crescimento micelial formadas (figura 12). A quitinase rVuChi teve ação mais eficaz na inibição do crescimento micelial do isolado CNPAT CCJ-166 do que no isolado CNPAT CCJ-127.

Para o isolado CNPAT CCJ 184 também foi observado efeito fungistático sobre o crescimento micelial, com 48 e 72 horas de incubação (figura 13 e 14). Nas condições do bioensaio o isolado teve uma agressividade intermediária, quando comparado com os outros isolados. O crescimento micelial mostrou-se maior que aquele evidenciado para o isolado CNPAT CCJ-166 e menor que o de CNPAT CCJ-127. Com 72 h foi possível verificar o efeito de rVuChi sobre o crescimento micelial do isolado. Os tratamentos com 50 µg e 100 µg apresentaram ação semelhante sobre o crescimento micelial, enquanto a dose de 300 µg teve um melhor efeito inibidor, de acordo com as medições da área de crescimento micelial e com a análise visual das fotografias. Como esperado o fungicida exerceu fortemente sua ação sobre o isolado (figura 15).

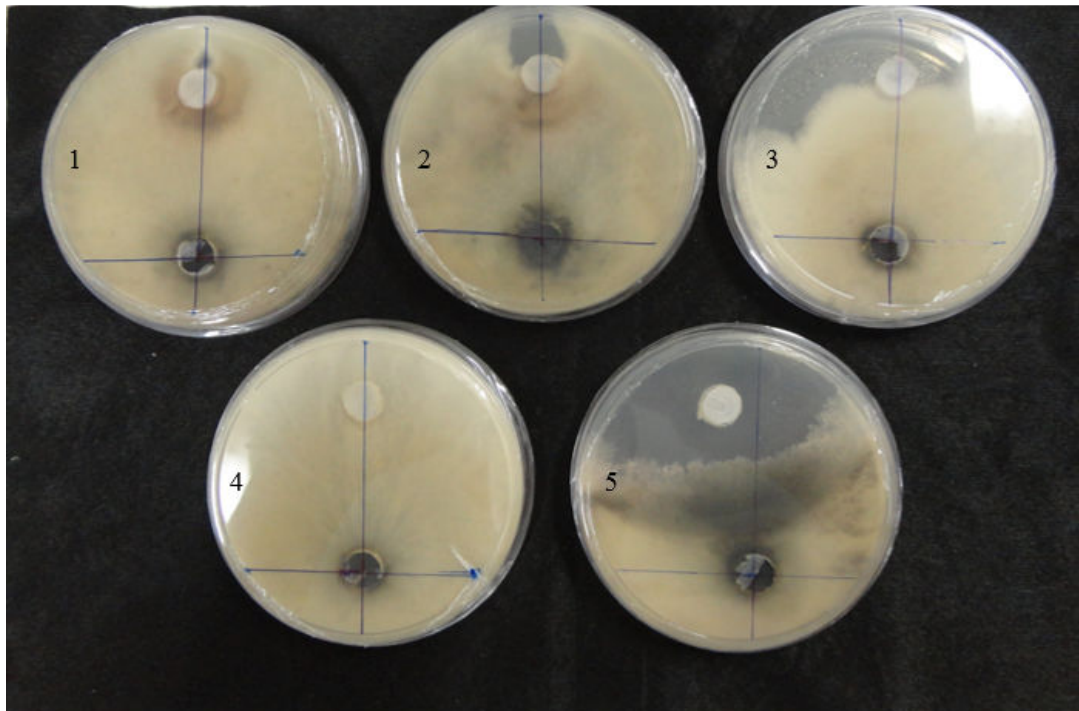
No experimento, em que os discos de fungos oriundos de todos os tratamentos do isolado CNPAT CCJ- 127 foram repicados para novas placas, a fim de se comprovar qual o efeito dos tratamentos (fungicida ou fungistático), apenas o controle positivo teve atividade fungicida. Dessa forma, o fungo perdeu sua capacidade de crescimento micelial, quando repicado para novas placas. Após o período de incubação de 72 h o crescimento micelial foi retomado normalmente, excetuando-se o controle positivo (figura 19). A cultura apresentou características de crescimento cotonoso e coloração esbranquiçada. A coloração branca do micélio normalmente pode indicar, uma característica de cultura jovem. Com o passar do tempo de incubação, as culturas poderão ficar mais escuras (PEREIRA et al., 2006). Portanto, pode-se inferir que rVuChi apresentou ação fungistática, sobre o isolado CNPAT CCJ- 127 de *L. theobromae*.

Figura 7: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-127) com 48 h após início dos testes.



Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- água destilada estéril e 5- Carbendazim (2 mL/L). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-127) com 72 h após início dos testes.



Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- água destilada estéril e 5- Carbendazim (2 mL/L). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9: Médias do crescimento da área micelial com 24, 48 e 72 h após início dos testes com o isolado CNPAT CCJ-127.

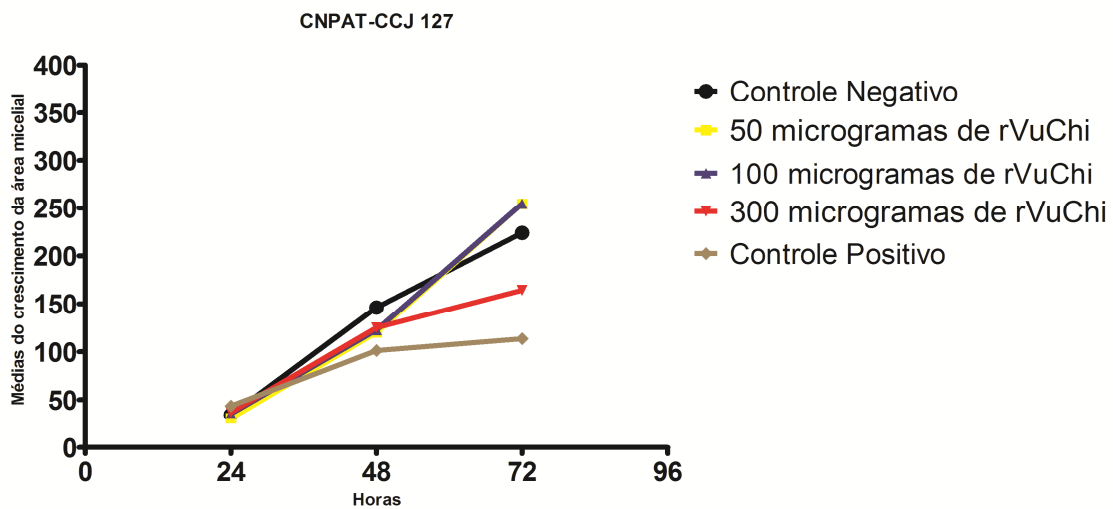
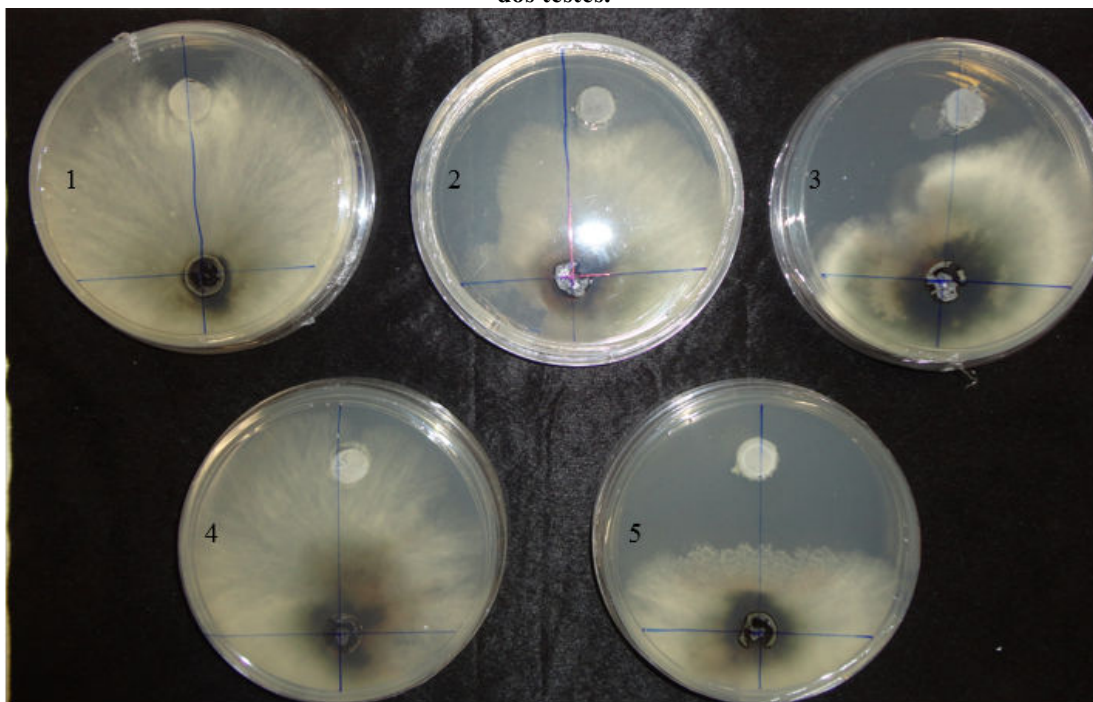
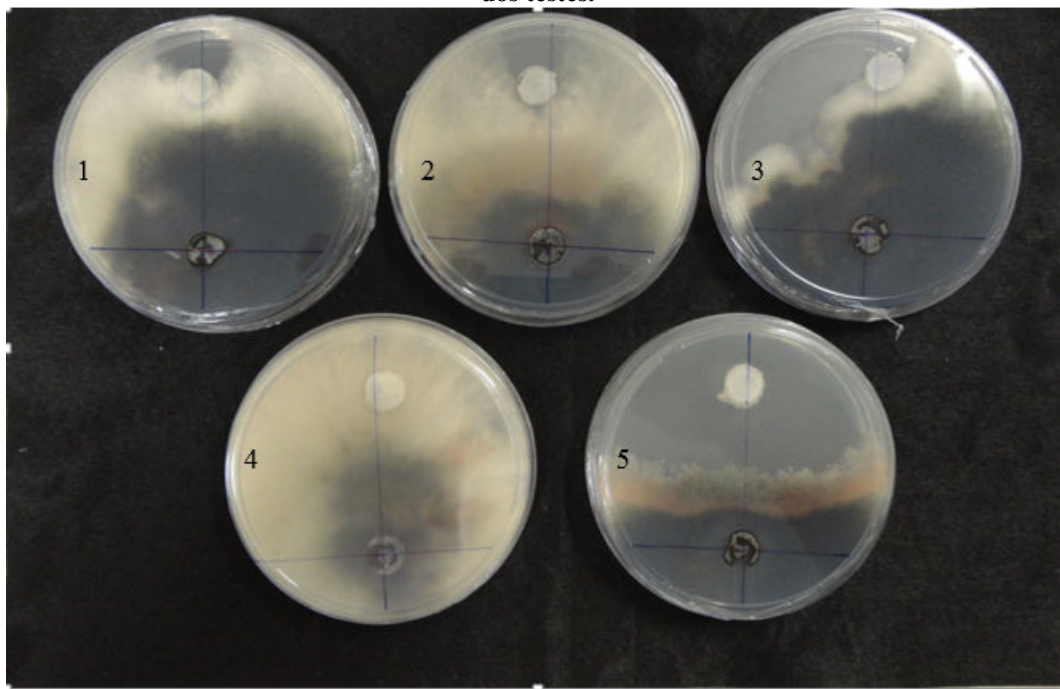


Figura 10: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-166) com 48 h após o início dos testes.



Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- água destilada autoclavada e 5- Carbendazim (2 mL/L). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-166) com 72 h após o início dos testes.



Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- água destilada autoclavada e 5- Carbendazim (2 mL/L). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12: Médias do crescimento da área micelial com 24, 48 e 72 h após início dos testes do isolado CNPAT CCJ-166.

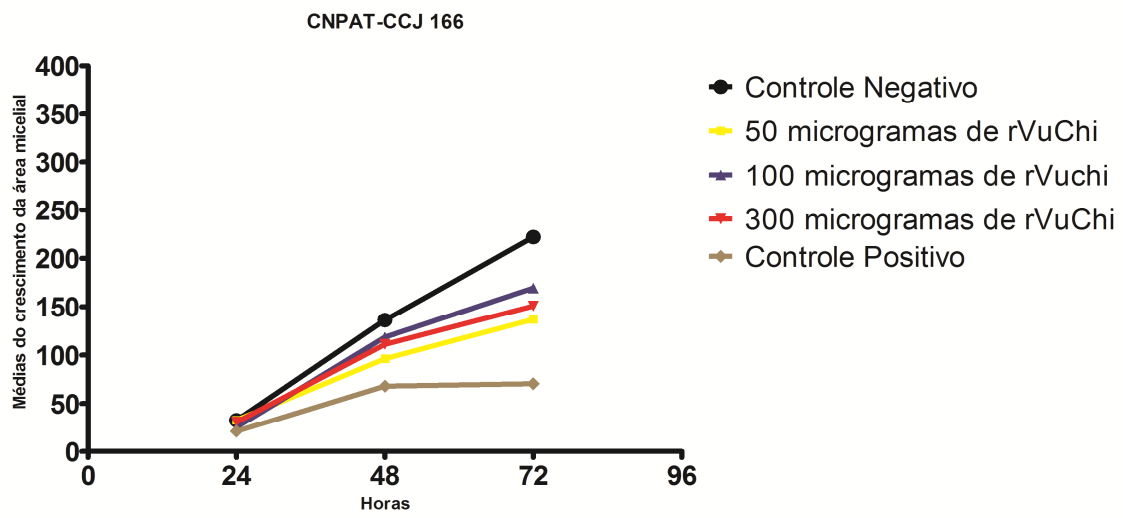
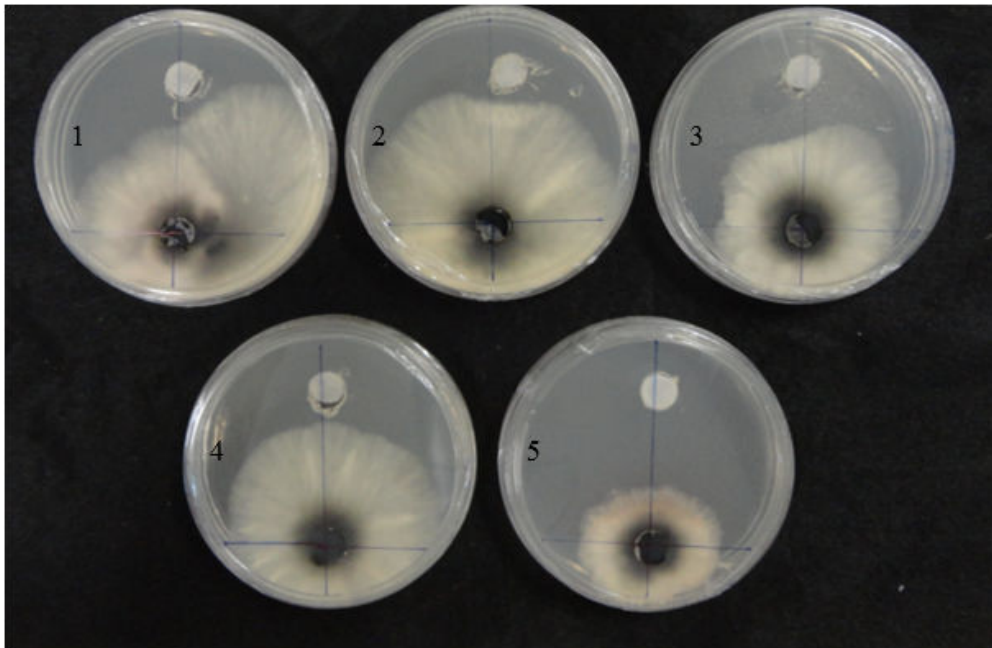
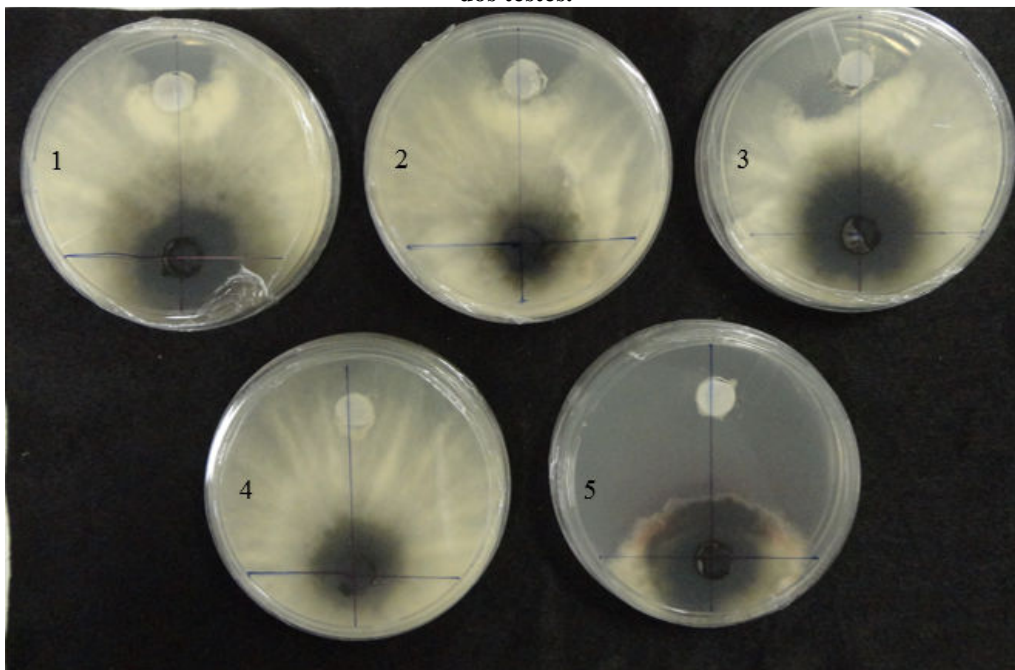


Figura 13: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-184) com 48 h após o início dos testes.



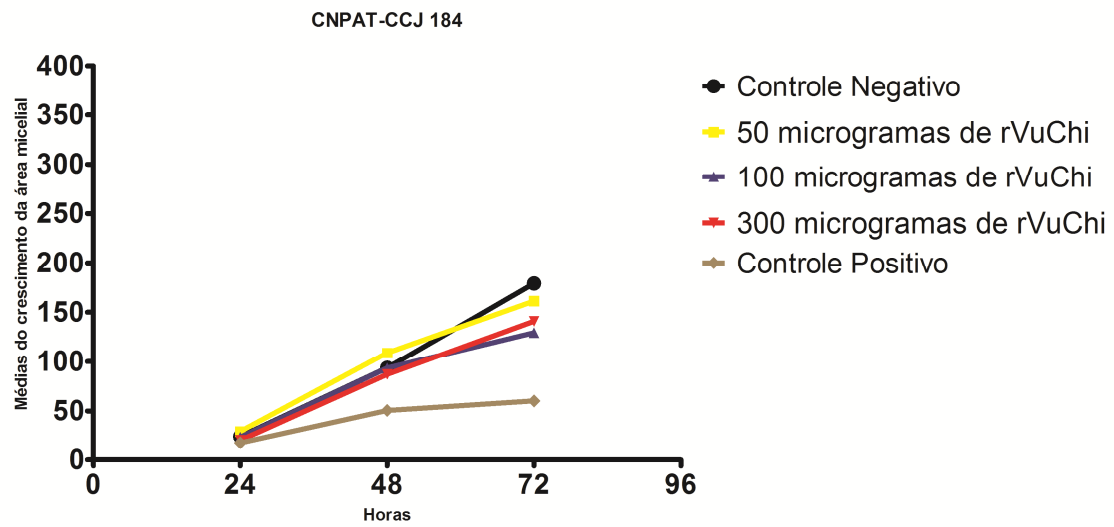
Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- água destilada autoclavada e 5- Carbendazim (2 mL/L). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-184) com 72 h após o início dos testes.



Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- água destilada autoclavada e 5- Carbendazim (2mL/L). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15: Médias do crescimento da área micelial com 24, 48 e 72 h após início dos testes do isolado CNPAT CCJ-184.



6.2.2 Atividade de difusão em ágar

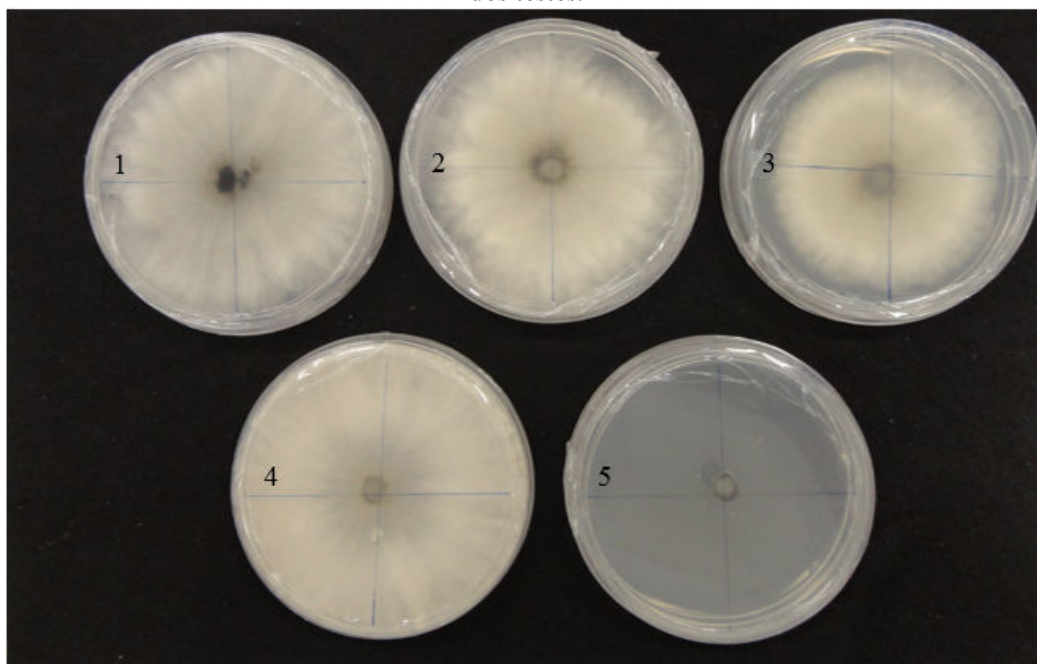
Os resultados obtidos do experimento por difusão em ágar validaram os dados obtidos dos testes de inibição de crescimento micelial por difusão em disco, confirmando assim, a ação fungistática de rVuChi contra o isolado CNPAT CCJ- 127 de *L. theobromae*.

O isolado CNPAT CCJ-127, como em resultados anteriores, apresentou-se mais agressivo tendo um crescimento mais rápido que os demais. Isto pode ser observado já com 48 h de experimento (Figura 16). A dose de 300 µg apresentou ação fungistática mais eficiente que as demais. O fungicida impediu completamente o crescimento micelial do fungo.

Com relação ao isolado CNPAT CCJ-166 todas as doses testadas de rVuChi, bem como o fungicida, impediram o crescimento do fungo, mesmo após 72 h do início do experimento (figura 17).

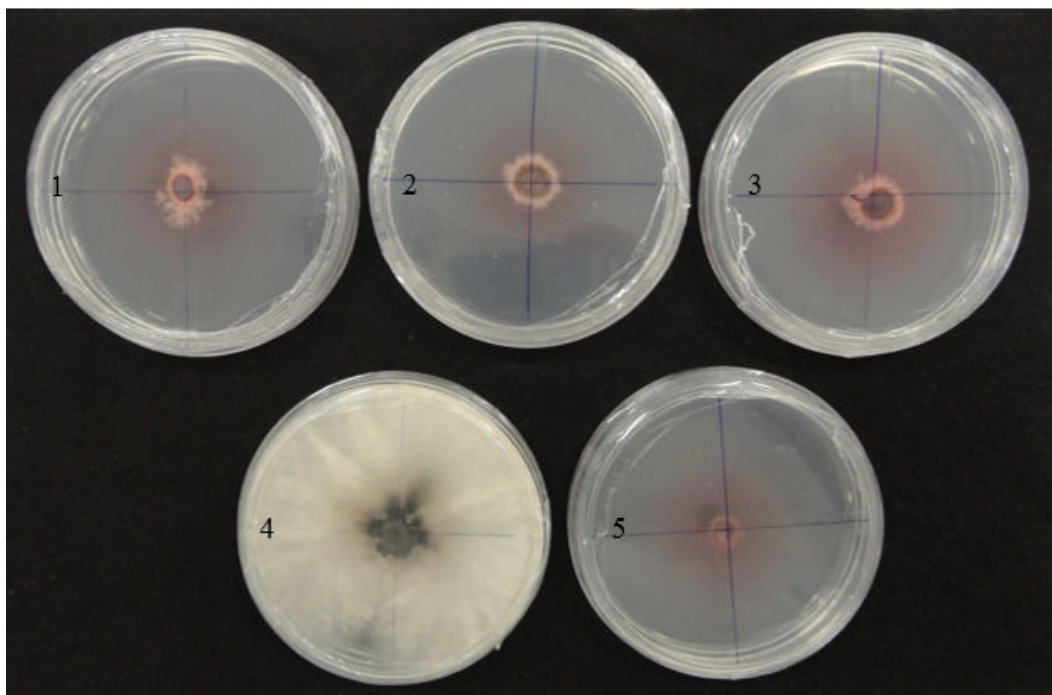
O isolado CNPAT CCJ-184 teve seu crescimento inibido até as 72 h, enquanto que, no controle negativo (água), o fungo cresceu tomando toda a área da placa. As três doses testadas de rVuChi tiveram efeito fungistático sendo este mais evidente nas doses de 100 e 300 microgramas de proteínas (Figura 18).

Figura 16: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-127) com 48 H após o início dos testes.



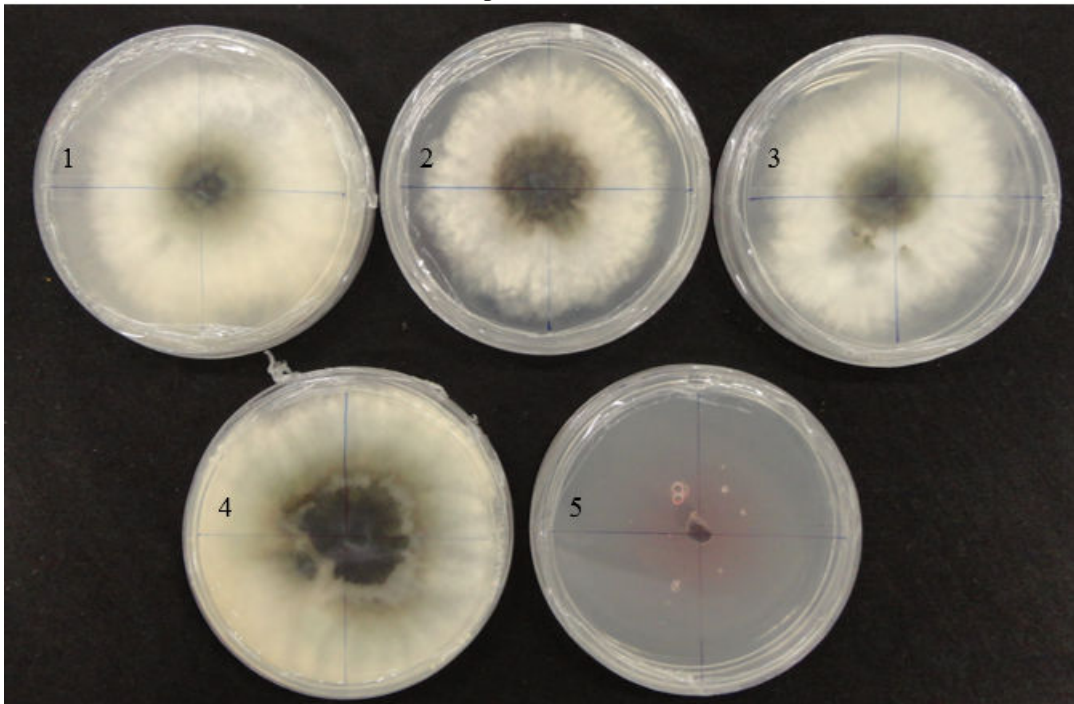
Legenda: 1- 50 μg ; 2- 100 μg ; 3- 300 μg de rVuChi; 4- água destilada autoclavada e 5- Carbendazim 2mL/L. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-166) com 72 H após o início dos testes.



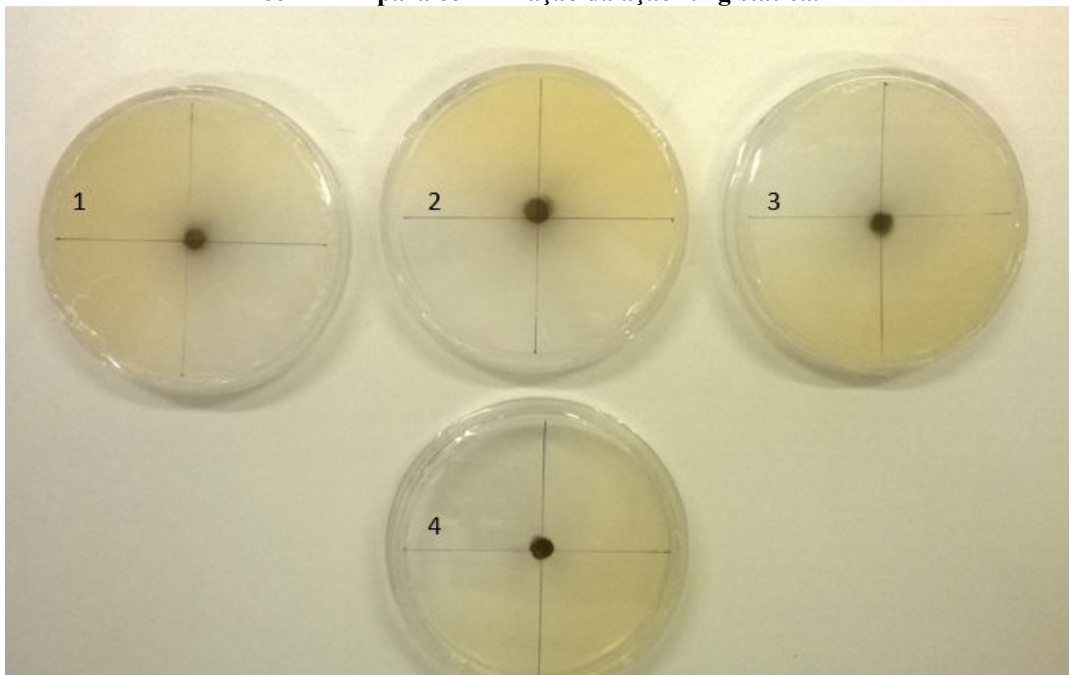
Legenda: 1- 50 μg ; 2- 100 μg ; 3- 300 μg de rVuChi; 4- água destilada autoclavada e 5- Carbendazim 2mL/L. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-184) com 72 H após o início dos testes.



Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- água destilada autoclavada e 5- Carbendazim 2mL/L. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19: Crescimento micelial de *L. theobromae* (isolado CNPAT CCJ-127) com 72 H para confirmação da ação fungistática.



Legenda: 1- 50 µg; 2- 100 µg; 3- 300 µg de rVuChi; 4- Carbendazim 2mL/L. Fonte: Elaborada pelo autor.

6. Discussão

As quitinases, durante a última década, tem recebido maior atenção em todo o mundo devido sua ampla gama de aplicações. A rVuChi usada nos testes de atividade biológica deste trabalho, mostrou efeito fungistático sobre um isolado do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal da resinose do cajueiro. Apesar de apenas uma espécie de fungo fitopatogênico ter sido avaliada, estes resultados sugerem uma possível aplicação futura desta quitinase no controle de fitopatógenos, representando assim, mais uma alternativa para o manejo da enfermidade (HERRERA-ESTRELLA; CHET, 1999). Trabalhos tem demonstrado ação eficaz de quitinases, não apenas contra fitopatógenos, mas também contra patógenos de animais (WANG et al., 2012; LIU et al., 2011). Além disso, estas enzimas apresentam potencial como agentes, no controle alternativo para muitos patógenos fúngicos encontrados nos alimentos, o que as torna potenciais agentes conservantes (GOMAA, 2012).

Kawase et al. (2006), trabalhando com duas quitinases, uma da família GH18 e outra da GH19, de *Streptomyces coelicolor* A3(2) observou o melhor desempenho da quitinase GH19 quanto à sua atividade inibitória sobre o crescimento micelial dos fungos *Trichoderma reesei*, *T. viride* e *Mucor javanicus*. Estes resultados corroboram os observados com a rVuChi, que também pertence à família GH19. O trabalho de Kawase et al. (2006) também reportou o efeito sinérgico entre as duas quitinases.

Kirubakaran e Sakthivel (2007) testando uma quitinase de classe I de cevada contra o fungo fitopatogênico *Pseudocercospora theae* obteve halos de inibição bem promissores. As imagens de microscopia demonstraram deformações na parede celular do fungo (lise e fragmentação). Resultados semelhantes foram obtidos contra *Botrytis cinerea*. A rVuChi também levou à formação de visíveis halos de inibição e impediu o crescimento micelial. As causas desses efeitos podem ter sido as mesmas sugeridas por Kirubakaran e Sakthivel (2007), partindo do princípio de que os fungos fitopatogênicos em estudo possuem quitina na parede celular (QUECINE et al., 2008). As doses de quitinases utilizadas no trabalho de Kirubakaran e Sakthivel (2007) foram as mesmas usadas nos ensaios biológicos aqui realizados, ou seja, 100 e 300 microgramas de enzima. Importante, porém, salientar que maiores quantidades de unidades enzimáticas foram utilizadas para rVuChi. No presente trabalho foram utilizadas 563,732 U (100 µg) e 1.691,96 (300 µg). Outro estudo conduzido por Sajitha e Florence (2013) com extrato bruto (secretoma) de *Streptomyces* sp. SA18 testado contra *L. theobromae* mostrou por

meio de microscopia de luz a presença de hifas anormais com grandes vacúolos e visível deformação. Diante dos dados descritos na literatura, e de posse dos resultados obtidos no presente estudo conclui-se que há atividade de rVuChi sobre quitina coloidal. Sobre os isolados de *L. theobromae* esta atividade ocorre pela degradação da quitina presente na parede celular das hifas do fungo. Além disso, foi demonstrado que o ápice da hifa de determinados fungos é tipicamente sensível a quitinases e HCl diluído (GOMES et al., 2000). As extremidades das hifas, portanto, poderiam ser um local a partir do qual seria iniciada a ação inibitória de rVuChi, sobre o crescimento micelial de *L. theobromae*.

As quitinases (2% em 50 mL de meio BD) de duas espécies de *Bacillus* causaram boa inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, e *A. terreus*. O efeito inibitório foi realizado por análise de peso seco do micélio após 120 h (GOMAA, 2012). A rVuChi usada no método de diluição em ágar causou inibição do crescimento micelial do isolado mais agressivo por até 48 h e no isolado CNPAT CCJ-166 por mais de 120 h. Demonstrando mais uma vez o efeito fungistático de rVuChi sobre os isolados em estudo.

Uma quitinase de *Serratia marscescens* causou inibição no crescimento micelial de *Fusarium graminearum*, *Bipolaris* sp., *Alternaria raphani*, *A. brassicicola*, e *Rhizoctonia solani* (Babashpour et al., 2012). Entretanto, estudos prévios realizados com rVuChi não evidenciaram ação inibitória sobre *F. solani*, *F. oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (LANDIM, 2011). Já que rVuChi mostrou ação fungistática contra isolados de *L. theobromae*, cuja parede celular é composta de quitina, mas não teve efeito sobre *F. solani*, *F. oxysporum* e *R. solani* no trabalho de Landim (2011) e sabendo que estes fungos também são portadores de quitina em sua parede celular, surge a seguinte dúvida o porquê deste efeito inibitório sobre *L. theobromae*. O trabalho de Van Den Burg et al., (2006) mostrou que a parede celular do fungo *Cladosporium fulvum* é revestida por uma lectina (AVR4) de ligação a quitina de invertebrado (CBM14) gerando uma espécie de "blindagem" que a torna inacessível (MALINOVSKY; FANGEL; WILLATS, 2014). É possível especular, diante deste achado, que as paredes celulares daqueles fungos, cujo nenhum efeito foi observado, possam possuir quitina em uma forma pouco acessível para rVuChi. Foi relatado que essa mesma lectina tem afinidade pela parede celular de *T. viride* e *F. solani* f. sp. *phaseoli* (VAN DEN BURG et al., 2006), protegendo-os da ação de quitinases.

Adicionalmente, verifica-se também, que uma proteína de pequena massa molecular denominada de "Finotin" obtida a partir sementes de *Clitoria ternatea* (L.) teve

também ação inibitória sobre o crescimento micelial do fungo causador da resinose (KELEMU; CARDONA; SEGURA, 2004). E, do mesmo modo rVuChi gerou a formação de halos de inibição bem visíveis. Este trabalho demonstrou que, existem muitas proteínas relacionadas a patogênese (PR proteínas), não apenas quitinases, as quais agem em conjunto contra este patógeno.

A eficácia das quitinases contra diferentes patógenos e a existência de inibidores de quitinases microbianas (VAN DEN BURG et al., 2006) levam à hipótese de que as quitinases podem coevoluir com fungos em resposta a variação nas defesas do patógeno contra essas enzimas (SIVAJI et al., 2014). Um importante modelo de evolução e diversificação das quitinases são as duplicações (repetições internas) de genes de quitinases, que geram diversidades estruturais e funcionais, desempenhando um papel na evolução em todos os organismos (SIVAJI et al., 2014). De um modo geral a interação entre hospedeiros e patógenos é uma importante força que molda a diversidade nos organismos (BISHOP; DEAN; MITCHELL-OLDS, 2000). Muitos desses genes codificam para PR proteínas, que estão relacionadas com a defesa de plantas, e que, possuem uma grande diversificação adaptativa (BISHOP; DEAN; MITCHELL-OLDS, 2000). E rVuChi, pode sim ser codificada, por esse grupo de genes que estão em constante mudanças e diversificação, bem adaptados ao combate contra os patógenos mais recorrentes nas plantas.

Os testes com rVuChi são os primeiros a utilizar uma quitinase recombinante contra o fungo *L. theobromae*, e apesar das especulações sobre o possível mecanismo de ação acima proposto, estudos mais detalhados necessitam ser realizados, a fim de se validar ou não tais proposições. Experimentos incluindo microscopia podem desvendar como a rVuChi age contra a parede celular ou outras estruturas do fungo *L. theobromae*. E assim, verificar de qual modo a quitinase está causando a inibição no crescimento do fungo e, com isso melhor compreender a interação quitinase e quitina em organismos vivos.

Com isso, as quitinases podem ser melhor compreendidas e, assim, identificar melhor as suas aplicabilidades e seu uso biotecnológico.

7. Conclusão

A quitinase recombinante de feijão-de-corda rVuChi foi expressa de forma ativa em *Pichia pastoris*, como verificado pelos testes de atividade quitinolítica *in vitro*, e apresentou efeito fungistático sobre o crescimento micelial de um isolado do fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae*.

8. Referências

ALVES, E. A. et al. Interação das condições edafoclimáticas com a resinose do cajueiro. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.9, N.16; p. 1320–1345, 2013.

BABASHPOUR, S. et al. Characterization of a chitinase (Chit62) from *Serratia marcescens* B4A and its efficacy as a bioshield against plant fungal pathogens. **Biochemical genetics**, v. 50, n. 9-10, p. 722–35.

BARROS, L. DE M. et al. Recomendações Técnicas para a Cultura do Cajueiro-anão-precoce. **EMBRAPA-CNPAT**, 1993. 65p.

BELCHIOR, M.; BRASILEIRO, I. Levantamento sistemático da produção agrícola. **IBGE**, 2013.

BISHOP, J. G.; DEAN, A M.; MITCHELL-OLDS, T. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5322–7.

BOLLER, T. et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. **Planta**, v. 157, n. 1, p. 22–31, 1983.

CARDOSO, J. E. et al. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, v. 25, n. 8, p. 855–859, 2006.

CARDOSO, J. E. et al. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.262-266, 2009.

CARDOSO, J. E. et al. Método de avaliação da resistência de clones de cajueiro à resinose. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.4, p.329-333, 2010

CIPRIANO, A. K. 2014. 137 f. **A Interação do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) com o fungo *Lasiodiplodia theobromae* reprograma a expressão de proteínas no caule, sítio de infecção do patógeno**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 344–349, 2011.

CORREIA, T. O. 2007. 91 f. **Quitinase de classe I de feijão de corda (*Vigna unguiculata*): Estudo preliminar do gene, Clonagem, Expressão E Purificação em *Escherichia coli* BL21(Y) DE3 e Determinação da Estrutura através da modelagem por homologia**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

DING, F. et al. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 6, n. 16, p. 9477–93, 2014.

ELAINE, S. et al. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 732–741, 2009.

FRANÇA, F. M. C. et al. Agronegócio do caju no Ceará: cenário atual e propostas inovadoras. Fortaleza: **FIEC**, 2008.

FREIRE, F. C. et al. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, n. 6, p. 489–494, 2002.

FUKAMIZO, T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. **Current protein Crop Protection & peptide science**, v. 1, n. 1, p. 105–24, 2000.

GOMAA, E. Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 50, n. 1, p. 103–11, 2012.

GOMES, R. C. et al. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in applied microbiology**, v. 30, n. 2, p. 146–50, 2000.

GRAF, A. et al. Yeast systems biotechnology for the production of heterologous proteins. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 3, p. 335–48, maio 2009.

HARA, M. et al. Involvement of Gln 679, in addition to Trp 687, in chitin-binding activity of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of biochemistry**, v. 154, n. 2, p. 185–93, 2013.

HENRISSAT, B.; VEGETALES, M.; GRENOBLE, F.-. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. **Biochem. J.**, v. 280, p. 309–316, 1991.

HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I. Chitinases in biological control. **Exs**, v. 87, p. 171–84, 1999.

HUANG, L. et al. Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 293–9, 2012.

JIANG, C. et al. Cloning and expression analysis of chitinase genes from *Populus canadensis*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, n. 3, p. 396–403, 2013.

KELEMU, S.; CARDONA, C.; SEGURA, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 42, n. 11, p. 867–73, 2004.

- KOLOSOVA, N.; BREUIL, C.; BOHLMANN, J. Cloning and characterization of chitinases from interior spruce and lodgepole pine. **Phytochemistry**, v. 101, p. 32–9, 2014.
- KUDDUS, M.; AHMAD, I. Z. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2013.
- LANDIM, P. G. 2011. 156 f. **Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão de corda com atividade antifúngica**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- LIMA, J. S. et al. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, V. 6, N.1, pág. 10, 2012. p. 10–16, 2012.
- LIMA, J. S. et al. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 2, p. 81-88, 2013.
- LIU, Y. et al. A Chitinase from *Aeromonas veronii* CD3 with the potential to control myxozoan disease. **PLoS one**, v. 6, n. 12, p. e29091, 2011.
- LOBO, M. D. et al. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 46, 2013.
- LODHI, G. et al. Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications. **BioMed research international**, v. 2014, p. 654913, 2014.
- MALINOVSKY, F. G.; FANGEL, J. U.; WILLATS, W. G. T. The role of the cell wall in plant immunity. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. May, p. 178, 2014.
- MANJEET, K. et al. Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases. **Microbiological research**, v. 168, n. 7, p. 461–8, 25 2013.
- PARK, H. Y.; PAEK, A.; JEONG, S. E. Functional expression and structural characterization of ORF cDNA encoding chitinase of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, n. 1, p. 45–50, 2012.
- PASSARINHO, P. A; DE VRIES, S. C. *Arabidopsis* Chitinases: a Genomic Survey. **The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists**, v. 1, p. e0023, 2002.
- PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1513–9, 2004.

- PEREIRA, A. L. et al. Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, 2006.
- POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, 2012.
- QUECINE, M. C. et al. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 6, p. 486–91, 2008.
- SAJITHA, K. L.; FLORENCE, E. J. M. Effects of *streptomyces sp* on growth of rubberwood sapstain fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 25, n. 3, p. 393–399, 2013.
- SALAH, R. et al. Anticancer activity of chemically prepared shrimp low molecular weight chitin evaluation with the human monocyte leukaemia cell line, THP-1. **International journal of biological macromolecules**, v. 52, p. 333–9, 2013.
- SARMA, K. et al. A comparative proteomic approach to analyse structure, function and evolution of rice chitinases: a step towards increasing plant fungal resistance. **Journal of molecular modeling**, v. 18, n. 11, p. 4761–80, 2012.
- SINGH, A.; KIRUBAKARAN, S. I.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein expression and purification**, v. 56, n. 1, p. 100, 2007.
- SIVAJI, M. et al. Detection, characterization and evolution of internal repeats in Chitinases of known 3-D structure. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91915, 2014.
- TAIRA, T. et al. Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*). **Glycobiology**, v. 21, n. 5, p. 644–54, 2011.
- TANABE, S. et al. Induction of Resistance against Rice Blast Fungus in Rice Plants Treated with a Potent Elicitor, N -Acetylchitoooligosaccharide. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 7, p. 1599–1605, 2014.
- UDAYA PRAKASH, N. A et al. Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. **Journal of molecular evolution**, v. 70, n. 5, p. 466–78, 2010.
- VAN DEN BURG, H. A et al. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n. 12, p. 1420–30, 2006.
- WANG, S. et al. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. **Protein expression and purification**, v. 40, n. 2, p. 230–6, 2005.
- WANG, S. et al. Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 313–21, 2009.

WANG, S. et al. A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 116–122, 2012.

WANG, S. Y. et al. A thermostable chitinase with chitin-binding activity from *Phaseolus limensis*. **Journal of food science**, v. 73, n. 6, p. C452–7, 2008.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306–20, 2012.

YANG, H. et al. Chitinase III in pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.): a high-capacity calcium-binding protein in amyloplasts. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 68, n. 5, p. 765–76, 2011.