



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**SIMONE TORRES DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE DUAS QUITINASES RECOMBINANTES  
DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) DAS CLASSES IV E VI COM  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

**FORTALEZA**

**2020**

SIMONE TORRES DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE DUAS QUITINASES RECOMBINANTES DO  
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) DAS CLASSES IV E VI COM ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O51c Oliveira, Simone Torres de.  
Caracterização bioquímica de duas quitinases recombinantes do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) das classes IV e VI com atividade antifúngica / Simone Torres de Oliveira. – 2020.  
180 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. Quitinases. 2. *Anacardium occidentale*. 3. Atividade antifúngica. I. Título.

CDD 572

---

SIMONE TORRES DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE DUAS QUITINASES RECOMBINANTES DO  
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.) DAS CLASSES IV E VI COM ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 30/01/2020

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Dra. Celli Rodrigues Muniz  
Embrapa Agroindústria Tropical

A Deus.

A minha família.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força que me permitiu enfrentar todos os desafios desta caminhada.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade, infraestrutura e suporte concedido na realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na obtenção de material. O presente trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela excepcionalidade e competência com que orientou a realização deste trabalho, pelas análises de filogenia e bioinformática realizadas e pela oportunidade de aprendizagem que proporcionou a mim.

Às pesquisadoras Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva e Dra. Celli Rodrigues Muniz da Embrapa Agroindústria tropical e aos professores da UFC Dr. Celso Shiniti Nagano, Dr. Rômulo Farias Carneiro e Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior pela contribuição na realização de experimentos em seus respectivos laboratórios.

Aos professores Dr. Cristiano Souza Lima, Dr. Rômulo Farias Carneiro, Dra. Suelen Carneiro de Medeiros e Dra. Marina Duarte Pinto Lobo, à Dra. Celli Rodrigues Muniz e ao Dr. José Edvar Monteiro Júnior pela contribuição na avaliação deste trabalho.

Aos professores Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha e Dr. Victor Alves Carneiro por acreditarem no meu potencial para desenvolver este projeto.

À todos os integrantes do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM), com quem convivi durante o doutorado, pela ajuda e conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, Antônio e Ana, por acreditarem nos meus sonhos e, principalmente, por não permitirem que eu desistisse de realizá-los. Pelo apoio em mais esta batalha.

Aos meus irmãos, Ailton, Tiago (*in memoriam*), Paulo, Lucas e Ana Paula, pelo companheirismo de sempre.

À minha filha Poliana, em especial, que dividiu comigo o vazio dos dias ausentes, por ter se tornado a minha maior torcida, além da minha maior motivação.

Ao Bosco, meu companheiro, pelo incentivo e apoio em mais esta trajetória, por dividir comigo os momentos de felicidades e os de incertezas desta fase final do doutorado.

Aos amigos/compadres Francidalva e Valcenildo, por compartilharem comigo as alegrias e dificuldades da minha vida. Aos amigos/vizinhos Márcia, Suellen, Jozineudo e Clécio, pela acolhida e pelos cafés, momentos de desabafo, alívio e conforto.

“(…) a Ciência não é uma atividade de um sujeito isolado, mas resultado de um pensamento coerente com as forças que movem o universo.” (PONCZEK, 2009, p. 110).

## RESUMO

Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações covalentes  $\beta$ -(1,4) entre os resíduos de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc) que constituem a quitina. O polissacarídeo quitina, sendo um componente estrutural da parede celular de fungos, conduziu ao interesse pelas quitinases, no sentido de desenvolver produtos antifúngicos. Duas quitinases da família GH19 foram identificadas no transcriptoma de sementes do cajueiro anão-precoce CCP 76, *AoChi4849* e *AoChi5472*. Uma análise inicial dessas quitinases revelou que um resíduo de glutamato (Glu), essencial à catálise enzimática, foi substituído por um resíduo de lisina (Lys) na *AoChi5472*. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a funcionalidade destas quitinases com relação a capacidade de degradar a quitina e combater patógenos fúngicos e bactérias. Análises *in silico* demonstraram que *AoChi4849* pertence à classe IV das quitinases GH19 e *AoChi5472* à classe VI. Notavelmente, todos os representantes da classe VI também apresentam a mutação Glu→Lys no sítio catalítico. Análise de *docking* molecular realizada com o domínio catalítico da *AoChi5472* e (GlcNAc)<sub>4</sub> indicou a presença de ligações favoráveis para a catálise entre o resíduo Lys e o substrato. As quitinases recombinantes produzidas em *Pichia pastoris* KM71H foram purificadas, exibindo massas moleculares aparentes de 35 e 45 kDa, respectivamente, para *rAoChi4849* e *rAoChi5472*. A identidade dessas proteínas foi confirmada por espectrometria de massas, que produziu peptídeos que cobriram 41,6% e 47,0% das suas estruturas primárias. A caracterização *in vitro* mostrou que a *rAoChi4849* e *rAoChi5472* possuem atividade quitinolítica sobre quitina coloidal e insolúvel, o que comprovou a funcionalidade da Lys como aminoácido catalítico e, conseqüentemente, a funcionalidade das quitinases. As condições ideais para a atividade enzimática foram estabelecidas em pH 5 e 6 e temperatura de 30 e 40 °C para a *rAoChi4849* e *rAoChi572*, respectivamente. Ambas apresentam estabilidade em relação a variação de pH, podendo retomar a conformação funcional após serem submetidas a valores de pH extremos e a temperatura de 60 °C. A atividade das quitinases é inibida completamente na presença de íons Hg<sup>2+</sup>, de SDS, e de  $\beta$ -mercaptoetanol, e gradativamente na presença de EDTA, DTT e NaCl. Análises de dicroísmo circular indicam a *T<sub>m</sub>* de 77,3 °C para a *rAoChi4849* e de 58,01 °C para a *rAoChi5472*. O perfil catalítico sobre a quitina coloidal revelou a presença de GlcNAc, (GlcNAc)<sub>2</sub>, (GlcNAc)<sub>3</sub> e (GlcNAc)<sub>4</sub>, o que indica ação endo e exoquitinásica. O *V<sub>max</sub>* determinado para a *rAoChi4849* foi de 64,7 nmol.min.mg<sup>-1</sup> e para a *rAoChi5472* foi de 3,2 nmol.min.mg<sup>-1</sup>, sendo a eficiência catalítica da *rAoChi4849* (4,7 nmol.mim.mg<sup>-1</sup>) 7 vezes maior que a eficiência catalítica da *rAoChi5472* (0,67 nmol.mim.mg<sup>-1</sup>). Atividade antifúngica sobre fungos fitopatogênicos e cepas



de *Candida* foi apresentada pelas duas quitinases, mas nenhuma apresentou atividade antibacteriana. Análise de MEV evidenciou os danos causados pela rAoChi5472 ao micélio de um isolado de *Lasiodiplodia* sp., semelhante à ação do antifúngico comercial carbendazim. Este trabalho evidenciou um novo modo de ação das quitinases, onde um resíduo de Lys atua como doador de prótons na catálise, e mostrou que as quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 constituem proteínas de interesse para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

**Palavras-chave:** quitinases; *Anacardium occidentale*; atividade antifúngica.

## ABSTRACT

Chitinases are enzymes capable of hydrolyzing the  $\beta$ -(1,4) covalent bonds between the *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine (GlcNAc) residues that make up chitin. The polysaccharide chitin, being a structural component of the fungal cell wall, led to an interest in enzymes that degrade chitin, in order to develop antifungal products. Two chitinases of the GH19 family were identified in the CCP 76 dwarf cashew seed transcriptome, *AoChi4849* and *AoChi5472*. An initial analysis of these chitinases revealed that a glutamate (Glu) residue, essential for enzymatic catalysis, was replaced by a lysine (Lys) residue in *AoChi5472*. Thus, the objective of this work was to verify the functionality of these chitinases with respect to the ability to degrade chitin and inhibit fungal pathogens and bacteria. *In silico* analyzes showed that *AoChi4849* belongs to class IV of chitinases GH19 and *AoChi5472* to class VI. Notably, all class VI representatives also have the Glu $\rightarrow$ Lys mutation at the catalytic site. Molecular docking analysis performed with the catalytic domain of *AoChi5472* and (GlcNAc)<sub>4</sub> indicated the presence of favorable connections for the catalysis between the Lys residue and the substrate. The recombinant chitinases produced in *Pichia pastoris* KM71H were purified with an apparent molecular weight of 35 and 45 kDa, respectively, for *rAoChi4849* and *rAoChi5472*, which were identified by mass spectrometry with 41.6% and 47.0% coverage. The *in vitro* characterization showed that *rAoChi4849* and *rAoChi5472* shows chitinolytic activity on colloidal and insoluble chitin, which proved the functionality of Lys as a catalytic amino acid and, consequently, the functionality of chitinases. The ideal conditions for enzymatic activity were established at pH 5 and 6 and temperature of 30 and 40 °C for *rAoChi4849* and *rAoChi572*, respectively. Both have stability in relation to the pH variation, being able to resume functional conformation after being subjected to extremes pH and a temperature of 60 °C. Chitinase activity is completely inhibited in the presence of Hg<sup>2+</sup> ions, SDS, and  $\beta$ -mercaptoethanol and gradually in the presence of EDTA, DTT and NaCl. CD analyzes indicate a T<sub>m</sub> of 77.3 °C for *rAoChi4849* and 58.01°C for *rAoChi5472*. The catalytic profile on colloidal chitin revealed the presence of GlcNAc, (GlcNAc)<sub>2</sub>, (GlcNAc)<sub>3</sub> and (GlcNAc)<sub>4</sub> which indicates endo and exochitinase action. The V<sub>max</sub> presented by *rAoChi4849* was 64.7 nmol.min.mg<sup>-1</sup> and by *rAoChi5472* of 3.2 nmol.min.mg<sup>-1</sup>, with the catalytic efficiency of *rAoChi4849* (4.7 nmol.mL.mg<sup>-1</sup>) 7 times greater than the efficiency catalytic analysis of *rAoChi5472* (0.67 nmol.mim.mg<sup>-1</sup>). Antifungal activity on phytopathogenic fungi and *Candida* strains was shown by the two chitinases, but none showed antibacterial activity. SEM analysis of the antifungal action of *rAoChi5472* on an isolate of *Lasiodiplodia* sp. showed the damage caused to the fungal mycelium by the protein, similar

to the action of the commercial antifungal carbendazim. This work highlights a new mode of action of chitinases, in which a Lys residue acts as the proton donor in catalysis, and showed that the chitinases rAoChi4849 and rAoChi5472 constitute proteins of interest for the development of new antifungal agents.

**Keywords:** chitinases; *Anacardium occidentale*; antifungal activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura primária da quitina.....	24
Figura 2 – Representação do mecanismo catalítico das quitinases GH18 e GH19.....	29
Figura 3 – Cultivo do cajueiro anão-precoce CCP 76 em casa de vegetação.....	54
Figura 4 – Esquema de montagem dos ensaios de atividade antifúngica das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> .....	76
Figura 5 – Predição do peptídeo sinal na sequência primária da <i>AoChi4849</i> .....	79
Figura 6 – Predição do peptídeo sinal na sequência primária da <i>AoChi5472</i> .....	80
Figura 7 – Representação dos domínios conservados na <i>AoChi4849</i> e <i>AoChi5472</i> .....	81
Figura 8 – Representação dos domínios conservados na sequência primária da <i>AoChi4849</i> e da <i>AoChi5472</i> .....	81
Figura 9 – Alinhamento múltiplo entre o ChtBD da <i>AoChi4849</i> e ChtBDs com estrutura 3D conhecida.....	82
Figura 10 – Alinhamento múltiplo entre o CatD das quitinases <i>AoChi4849</i> e <i>AoChi5472</i> com o CatD de proteínas com estrutura 3D conhecida.....	84
Figura 11 – Árvore de máxima verossimilhança mostrando a relação filogenética das quitinases <i>AoChi4849</i> e <i>AoChi5472</i> com quitinases de plantas representativas das classes I, II, IV, VI e VII.....	86
Figura 12 – Alinhamento de um trecho da sequência de aminoácidos do domínio catalítico da <i>AoChi5472</i> com sequências de aminoácidos de quitinases de plantas representantes da classe VI.....	87
Figura 13 – Alinhamento da sequência de aminoácidos do CatD de <i>AoChi5472</i> com sequências de aminoácidos de outras quitinases GH19 de plantas.....	88
Figura 14 – Gráfico de Ramachandran obtido na validação do modelo tridimensional do domínio GH19 da quitinase do cajueiro <i>AoChi5472</i> .....	90
Figura 15 – Modelo molecular tridimensional do domínio GH19 da <i>AoChi5472</i> e sua interação com (GlcNAc) <sub>4</sub> .....	92
Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose das amostras de gDNA e RNA total obtidos	

de folhas de cajueiro anão-precoce CCP76.....	93
Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose de amostras do RNA total, obtidas de folhas de cajueiro anão-precoce CCP76, não tratado e tratado com DNase.....	94
Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos das PCRs realizadas com os iniciadores ChiAnao4849F/ChiAnao4849R e ChiAnao5472F/ChiAnao5472R em gradiente de temperatura de anelamento.....	95
Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto das PCRs realizadas com gDNA, cDNA e os iniciadores ChiAnao4849F/ChiAnao4849R e ChiAnao5472F/ChiAnao5472R.....	96
Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão realizada com <i>EcoRI</i> para confirmar a clonagem da ORF <i>AoChi4849</i> no vetor pGEM-T Easy.....	98
Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão realizada com <i>EcoRI</i> para confirmar a clonagem da ORF <i>AoChi5472</i> no vetor pGEM-T Easy.....	98
Figura 22 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da <i>AoChi4849</i> com as sequências de aminoácidos deduzidas do DNA plasmidial pGEM-T Easy + <i>AoChi4849</i> sequenciado a partir de 12 clones de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	100
Figura 23 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da <i>AoChi5472</i> com as sequências de aminoácidos deduzidas do DNA plasmidial pGEM-T Easy + <i>AoChi5472</i> sequenciado a partir de 12 clones de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	102
Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão realizada com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> para confirmar a subclonagem das ORFs <i>AoChi4849</i> e <i>AoChi5472</i> no vetor pPICZ $\alpha$ A.....	105
Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto das PCRs realizadas com os iniciadores 5'-AOX1/3'-AOX1 e gDNA obtido de clones de <i>P. pastoris</i> KM71H transformados com pPICZ $\alpha$ A recombinante e íntegro.....	106
Figura 26 – Perfil do crescimento celular dos clones de <i>P. pastoris</i> KM71H transformados com os plasmídeos recombinantes pPICZ $\alpha$ A + <i>AoChi4849</i> e	

pPICZ $\alpha$ A + <i>AoChi5472</i> e com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A íntegro durante a indução piloto de 144 h.....	107
Figura 27 – Análise em gel de SDS-PAGE da indução piloto da expressão das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> em seis clones de <i>P. pastoris</i> KM71H.....	109
Figura 28 – Perfil da produção de proteínas totais solúveis e atividade quitinásica nos clones 6 de <i>P. pastoris</i> KM71H transformados para expressão da <i>rAoChi4849</i> e da <i>rAoChi5472</i> em comparação com o clone de <i>P. pastoris</i> KM71H transformado com pPICZ $\alpha$ A íntegro.....	110
Figura 29 – Purificação e identificação da quitinase recombinante <i>rAoChi4849</i> produzida em <i>P. pastoris</i> KM71H.....	112
Figura 30 – Purificação e identificação da quitinase recombinante <i>rAoChi5472</i> produzida em <i>P. pastoris</i> KM71H.....	114
Figura 31 – Atividade das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> com diferentes tipos de substratos.....	118
Figura 32 – Atividade das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> na presença e ausência da enzima $\beta$ -glucuronidase.....	119
Figura 33 – Efeito da variação do pH na atividade enzimática e na estrutura secundária das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> .....	120
Figura 34 – Efeito da variação da temperatura na atividade enzimática e estrutura secundária das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> .....	122
Figura 35 – Curva de desnaturação térmica das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> na faixa de 20 a 95 °C. ....	124
Figura 36 – Efeito de íons metálicos na atividade enzimática das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> .....	125
Figura 37 – Efeito de agentes químicos quelantes, redutores e desnaturantes na atividade enzimática das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> .....	127
Figura 38 – Efeito do NaCl na atividade enzimática das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> .....	127
Figura 39 – Comportamento cinético das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> com o	

substrato quitina coloidal.....	128
Figura 40 – Perfil da produção de oligômeros de GlcNAc pela ação das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> sobre quitina coloidal.....	131
Figura 41 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi4849</i> sobre isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.....	133
Figura 42 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi4849</i> sobre isolados de <i>Fusarium</i> spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.....	135
Figura 43 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi5472</i> sobre isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.....	136
Figura 44 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi5472</i> sobre isolados de <i>Fusarium</i> spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.....	138
Figura 45 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi4849</i> sobre isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.....	139
Figura 46 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi4849</i> sobre isolados de <i>Fusarium</i> spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.....	141
Figura 47 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi5472</i> sobre isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.....	142
Figura 48 – Atividade antifúngica da <i>rAoChi5472</i> sobre isolados de <i>Fusarium</i> spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.....	144
Figura 49 – Microscopia Eletrônica de Varredura de <i>Lasiodiplodia</i> sp. BAN 7 cultivado na presença da quitinase <i>rAoChi5472</i> e dos controles água e carbendazim...	147

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas clínicas de leveduras do gênero <i>Candida</i> utilizadas nos ensaios de atividade antifúngica.....	50
Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores projetados para amplificação das ORFs <i>AoChi4849</i> e <i>AoChi5472</i> .....	54
Tabela 3 – Etapas de purificação das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> por cromatografia de afinidade em matriz de Ni- <i>Sepharose 6 Fast Flow</i> <sup>1</sup> .....	116
Tabela 4 – Parâmetros cinéticos das quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> com o substrato quitina coloidal.....	129
Tabela 5 – Valores de CIM obtidos para as quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> sobre cepas de <i>Candida</i> spp.....	150
Tabela 6 – Valores de CIM obtidos para as quitinases <i>rAoChi4849</i> e <i>rAoChi5472</i> sobre cepas de <i>S. aureus</i> .....	151



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AoChi4849	Quitinase do cajueiro ( <i>A. occidentale</i> ) referente ao <i>locus</i> 4849
AoChi5472	Quitinase do cajueiro ( <i>A. occidentale</i> ) referente ao <i>locus</i> 5472
BDA	Batata Dextrose Ágar
BMGY	Do inglês <i>Buffered Complex Glycerol Medium</i>
BMMY	Do inglês <i>Buffered Complex Methanol Medium</i>
CatD	Domínio catalítico
CD	Do inglês <i>Circular Dichroism</i>
cDNA	DNA complementar
ChtBD	Domínio de ligação à quitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Do inglês <i>Clinical e Laboratory Standards Institute</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CTE	Do inglês <i>C-terminal extension</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
gDNA	DNA genômico
GH	Glicosil-hidrolases
GH18	Glicosil-hidrolases da família 18
GH19	Glicosil-hidrolases da família 19
GlcNAc	<i>N</i> -acetil- $\beta$ -D-glucosamina
IPTG	Iisopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
kDa	Quilodalton
LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas

LB	Caldo Luria Bertani
LCC	Líquido da Casca da Castanha do caju
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mgP	mg de proteína
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
Mut <sup>S</sup>	Do inglês <i>Methanol utilization slow</i>
Mut <sup>+</sup>	Do inglês <i>Methanol utilizing plus</i>
Mut <sup>-</sup>	Do inglês <i>Methanol utilizing minus</i>
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-terminal	Amino-terminal
ORF	Do inglês <i>open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	Do inglês <i>Protein Data Bank</i> ,
PLCs	Do inglês <i>chitinase-like proteins</i>
PR proteína	Proteína (s) relacionada (s) à patogenicidade
rAoChi4849	AoChi4849 recombinante
rAoChi5472	AoChi5472 recombinante
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
T <sub>m</sub>	Do inglês <i>Melting temperature</i>
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo
YNB	Do inglês <i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	Do inglês <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
YPDS	Do inglês <i>Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\alpha/\beta$	Símbolo grego alfa/Símbolo grego beta
g	Gravitacional
°C	Graus Celsius
< / >	Menos que / Maior que
h(s)	Hora (s)
min	Minuto (s)
nm	Nanômetro
s	Segundo (s)
mL	Mililitros
$\mu$ L	Microlitros
g	Gramas (s)
mg	Miligramas (s)
$\mu$ g	Microgramas (s)
ng	Nanogramas (s)
w/v	Relação entre massa e volume
v/v	Relação entre volume e volume
Hg <sup>2+</sup>	Íon mercúrio II
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
U	Unidade
Ala/A	Aminoácido Alanina
Asn/N	Aminoácido asparagina
Asp/D	Aminoácido Aspartato
Cys/C	Aminoácido Cisteína
Glu/E	Aminoácido Glutamato
Glv/G	Aminoácido Glicina
Lys/K	Aminoácido Lisina
Pro/P	Aminoácido Prolina
Ser/S	Aminoácido Serina
Thr/T	Aminoácido Treonina
Tyr/Y	Tirosina

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.2	Quitina e enzimas quitinolíticas .....	24
2.3	Quitinases .....	26
2.4	Quitinases de plantas .....	30
2.5	O cajueiro .....	33
2.6	Principais doenças que acometem o cajueiro .....	36
2.7	Ocorrência de quitinases no cajueiro .....	38
2.8	Sistemas de expressão heteróloga de proteínas .....	39
2.8.1	<i>Expressão heteróloga em Escherichia coli</i> .....	40
2.8.2	<i>Expressão heteróloga em Pichia pastoris</i> .....	42
2.9	Ação antifúngica de quitinases vegetais obtidas por expressão heteróloga .....	44
2.10	Quitinases vegetais com ação antibacteriana .....	45
3	HIPÓTESE .....	47
4	OBJETIVOS .....	48
4.1	Objetivo geral .....	48
4.2	Objetivos específicos .....	48
5	MATERIAIS .....	49
5.1	Bactérias, leveduras e fungos filamentosos .....	49
5.2	Enzimas e plasmídeos .....	50
5.3	Reagentes e outros materiais .....	51
6	MÉTODOS .....	52
6.1	Análises <i>in silico</i> da sequência de aminoácidos deduzida das ORFs <i>AoChi4849</i> e <i>AoChi5472</i> .....	52
6.2	Construção e obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores para as ORFs <i>AoChi4849</i> e <i>AoChi5472</i> .....	53
6.3	Obtenção de ácidos nucleicos do cajueiro anão-precoce CCP 76 .....	54
6.3.1	<i>Plantio do cajueiro</i> .....	54
6.3.2	<i>Extração de ácidos nucleicos</i> .....	55
6.3.3	<i>Quantificação dos ácidos nucleicos</i> .....	56

6.3.4	<i>Eletrforese em gel de agarose</i> .....	56
6.3.5	<i>Tratamento da amostra de RNA total com DNase</i> .....	57
6.3.6	<i>Obtenção de cDNA</i> .....	57
6.4	<i>Amplificação das sequências codificadoras das quitinases AoChi4849 e AoChi5472</i> .....	58
6.5	<i>Clonagem das ORFs AoChi4849 e AoChi5472 no vetor pGEM-T Easy</i> ....	58
6.5.1	<i>Obtenção dos vetores recombinantes e transformação de E. coli DH5<math>\alpha</math></i> .....	58
6.5.2	<i>Confirmação da clonagem</i> .....	59
6.5.3	<i>Sequenciamento do DNA plasmidial</i> .....	60
6.6	<i>Subclonagem das ORFs AoChi4849 e AoChi5472 no vetor pPICZ<math>\alpha</math>A</i> .....	60
6.6.1	<i>Obtenção dos vetores recombinantes</i> .....	60
6.6.2	<i>Confirmação da subclonagem</i> .....	61
6.7	<i>Transformação de células de Pichia pastoris KM71H com os vetores pPICZ<math>\alpha</math>A + AoChi4849 e pPICZ<math>\alpha</math>A + AoChi5472</i> .....	61
6.7.1	<i>Preparação de células eletrocompetentes de P. pastoris KM71H</i> .....	61
6.7.2	<i>Linearização dos plasmídeos pPICZ<math>\alpha</math>A recombinantes e íntegro</i> .....	62
6.7.3	<i>Transformação de P. pastoris KM71H com pPICZ<math>\alpha</math>A recombinante e íntegro</i> .....	63
6.7.4	<i>Confirmação da transformação de P. pastoris KM71H</i> .....	64
6.8	<i>Produção das quitinases AoChi4849 e AoChi5472 em P. pastoris KM71H</i> .....	65
6.9	<i>Dosagem de proteínas totais solúveis</i> .....	66
6.10	<i>Eletrforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e agente redutor (SDS-PAGE)</i> .....	66
6.11	<i>Ensaio enzimático para determinação de atividade quitinásica</i> .....	67
6.12	<i>Purificação das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472</i> .....	68
6.12.1	<i>Fracionamento das proteínas com sulfato de amônio</i> .....	68
6.12.2	<i>Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado</i> .....	69
6.13	<i>Identificação das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 por espectrometria de massas</i> .....	69
6.14	<i>Caracterização bioquímica das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472</i> ....	70
6.14.1	<i>Atividade quitinásica com diferentes substratos</i> .....	70
6.14.2	<i>Atividade quitinásica na presença e ausência de <math>\beta</math>-glucuronidase</i> .....	70

6.14.3	<i>Efeito do pH na atividade quitinásica</i> .....	71
6.14.4	<i>Efeito da temperatura na atividade quitinásica</i> .....	71
6.14.5	<i>Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade quitinásica</i> .....	72
6.14.6	<i>Análise por Dicroísmo Circular</i> .....	72
6.14.7	<i>Cinética enzimática</i> .....	73
6.14.8	<i>Perfil da produção de oligômeros</i> .....	74
6.15	<b>Atividade biológica das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472</b> .....	74
6.15.1	<i>Atividade sobre o crescimento micelial de fungos filamentosos fitopatogênicos</i> .....	74
6.15.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	76
6.15.3	<i>Atividade com fungos leveduriformes do gênero Candida</i> .....	77
6.15.4	<i>Atividade com cepas de Bactérias</i> .....	78
6.16	<b>Análise estatística</b> .....	78
7	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	79
7.1	<i>Análise in silico da sequência de aminoácidos das quitinases AoChi4849 e AoChi5472</i> .....	79
7.1.1	<i>Predição de peptídeo sinal</i> .....	79
7.1.2	<i>Predição de domínios</i> .....	80
7.1.3	<i>Análise filogenética, modelagem e docking molecular</i> .....	85
7.2	<b>Obtenção de ácidos nucleicos do cajueiro anão-precoce CCP 76</b> .....	93
7.3	<b>Amplificação das sequências codificadoras das quitinases rAoChi4849 e rAoChi547</b> .....	94
7.4	<b>Clonagem das ORFs AoChi4849 e AoChi5472 no vetor pGEM-T Easy</b> ....	97
7.4.1	<i>Sequenciamento do DNA plasmidial</i> .....	99
7.5	<b>Subclonagem das ORFs AoChi4849 e AoChi5472 no vetor pPICZαA</b> .....	104
7.6	<b>Confirmação da transformação de células de <i>Pichia pastoris</i> KM71H com os vetores pPICZαA + AoChi4849 e pPICZαA + AoChi5472</b> .....	105
7.7	<b>Produção das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 em <i>P. pastoris</i> KM71H</b> .....	106
7.8	<b>Purificação e Identificação das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472</b> .....	110
7.9	<b>Caracterização bioquímica das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472</b> .....	117
7.9.1	<i>Atividade quitinásica com diferentes substratos</i> .....	117
7.9.2	<i>Atividade quitinásica na presença e ausência de β-glucuronidase</i> .....	118

7.9.3	<i>Efeito do pH na atividade quitinásica</i> .....	119
7.9.4	<i>Efeito da temperatura na atividade quitinásica</i> .....	122
7.9.5	<i>Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade quitinásica</i> .....	124
7.9.6	<i>Cinética enzimática</i> .....	128
7.9.7	<i>Perfil da produção de oligômeros</i> .....	129
7.10	<b>Atividade biológica das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472</b> .....	131
7.10.1	<i>Atividade sobre o crescimento micelial de fungos filamentosos fitopatogênicos</i> .....	131
7.10.2	<i>Atividade contra fungos leveduriformes do gênero Candida</i> .....	149
7.10.3	<i>Atividade contra cepas de bactérias</i> .....	150
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	152
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	153
	<b>APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS QUE CODIFICAM DUAS QUITINASES GH19 NO CAJUEIRO ANÃO-PRÉCOCE CCP 76</b> .....	174
	<b>APÊNDICE B – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DAS ORFs AoChi4849 E AoChi5472</b> .....	175
	<b>APÊNDICE C – SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDAS DAS ORFs AoChi4849 E AoChi5472</b> .....	176
	<b>APÊNDICE D – SEQUÊNCIA PUTATIVA DO AMPLICON GERADO NA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DAS ORFs AoChi4849 E AoChi5472 SEM A REGIÃO CODIFICADORA DO PEPTÍDEO SINAL</b> .....	177
	<b>APÊNDICE E – SEQUÊNCIA PUTATIVA DAS QUITINASES AoChi4849 E AoChi5472 RECOMBINANTES PRODUZIDAS EM <i>P. pastoris</i> KM71H</b> .....	178
	<b>ANEXO A – MAPA CIRCULAR DO VETOR pGEM-T Easy COM DETALHES DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO E DO SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM</b> .....	179
	<b>ANEXO B – MAPA CIRCULAR DO VETOR pPICZαA COM DETALHES DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO E DO SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM</b> .....	180

## 1 INTRODUÇÃO

A quitina é um homopolímero linear e insolúvel em meio aquoso, formado por unidades de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc) unidas por ligações *O*-glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4) (CHEN; SHEN; LIU, 2010; CRINI, 2019). Este polímero é um componente estrutural de muitos organismos, representando um importante elemento da parede celular de fungos (GOW; LATGE; MUNRO, 2017). A quitina ocorre em três diferentes formas cristalinas, a  $\alpha$ -quitina, a  $\beta$ -quitina e a  $\gamma$ -quitina, que diferem quanto a orientação e o empacotamento das cadeias moleculares (CAMPANA-FILHO et al., 2007; KAYA et al., 2017).

A degradação enzimática da quitina é realizada por enzimas quitinolíticas, dentre elas, as quitinases (EC 3.2.1.14), que clivam as ligações covalentes  $\beta$ -(1,4) entre os resíduos de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina das cadeias que constituem a quitina. Essas enzimas estão presentes em organismos dos três domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* e pertencem às famílias GH18 e GH19 das glicosídeo hidrolases (GHs), as quais diferem na sequência de aminoácidos, na estrutura tridimensional e no mecanismo enzimático, o que sugere terem evoluído de ancestrais diferentes (RATHORE; GUPTA, 2015).

As quitinases GH18 apresentam estrutura tridimensional do tipo  $(\beta/\alpha)_8$  com oito hélices-alfa e oito folhas-beta (TERWISSCHA VAN SCHELTINGA et al., 1994) e são representadas por quitinases de *Archaea* (NISHITANI et al., 2018), vírus (HIRAMATSU et al., 2000), bactérias, fungos, animais e de certas plantas (ADRANGI; FARAMARZI, 2013). Já as quitinases GH19 apresenta um elevado conteúdo de  $\alpha$ -hélice (HOLM; SANDER, 1994) e compreendem quitinases de plantas, nematoides e de bactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Vibrio* (UDAYA PRAKASH et al., 2010; GENG et al., 2002; KUMAR et al., 2019; HONDA; TANIGUCHI; KITAOKA, 2008).

O mecanismo de ação das quitinases ocorre via catálise ácida onde um resíduo do aminoácido glutamato (Glu/E) atua como doador de prótons e é essencial à catálise (DAVIES; HENRISSAT, 1995; FUKAMIZO, 2000). Nas plantas, as quitinases apresentam grande diversidade genética e funcional, participando, sobretudo dos mecanismos de defesa contra ataques fúngicos (GAO; ZHAO, 2017). Quitinases de plantas estão classificadas em 7 classes diferentes (Classes I – VI), sendo as classes III e V pertencente à família GH18 e as classes I, II, IV, VI e VII pertencente à família GH19. Estruturalmente, o domínio catalítico das quitinases GH19 apresenta dois resíduos de Glu conservados, onde um resíduo age como ácido, doando um próton na reação, e o outro age como base, ativando uma molécula de água para o ataque nucleofílico (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).



O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma espécie nativa da América tropical, encontrada em quase todas as regiões tropicais do mundo. O Brasil é considerado o provável centro de origem desta espécie, que está presente em praticamente todos os estados brasileiros, porém melhor adaptada às condições climáticas do litoral nordestino (BARROS et al., 1993; ARAUJO, 2015). O cajueiro apresenta várias aplicabilidade, incluindo o uso como alimento (PAIVA; GARRUTTI; SILVA NETO, 2000), insumo para produção de etanol (ROCHA et al., 2011) e uso como planta medicinal (SALEHI et al., 2019).

Proteínas importantes do metabolismo de *A. occidentale* têm sido identificadas e depositadas no banco de dados UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), e atualmente somam 111. A ocorrência de quitinases no cajueiro foi reportada inicialmente por Marques e Xavier-Filho (1991) na goma exsudada da árvore, os quais relacionaram a presença dessas proteínas com os mecanismos de defesa da planta contra agentes fitopatogênicos. Alves Filho (2013) identificou 10 sequências referentes à quitinases GH19 no transcriptoma de sementes do cajueiro anão-precoce CCP 76 e Aragão (2015) mostrou que 2 dessas quitinases, *locus* 4849 e 5472, apresentam maior identidade com sequências de quitinases depositadas no *Genbank* do NCBI. Para melhor identificação, as duas quitinases foram nomeadas *AoChi4849* e *AoChi5472*.

Uma análise inicial das sequências de aminoácidos dessas quitinases constatou que na *AoChi5472* o resíduo do aminoácido ácido Glu, essencial à catálise, foi substituído pelo resíduo de aminoácido básico Lys, em situação semelhante ao que ocorre nas quitinases de classe VI, caracterizadas como proteínas semelhantes à quitinase (PLCs), ao que tudo indica, sem atividade quitinolítica (ZHONG et al., 2002; HOSSAIN et al., 2010; ZHANG et al., 2004). Dessa forma, ao contrário das quitinases que atuam na defesa contra patógenos, essas proteínas desempenham funções no crescimento e desenvolvimento da planta (KESARI et al., 2015).

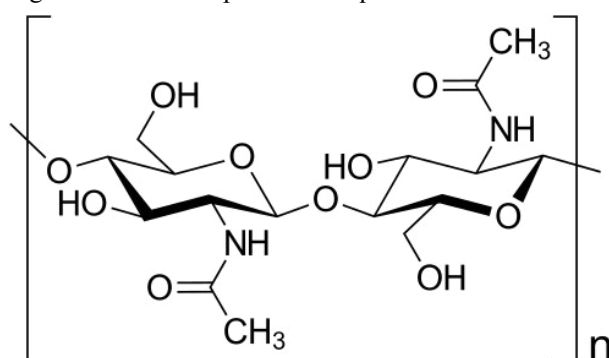
As quitinases, em virtude da capacidade de degradarem a quitina da parede celular de fungos, apresentam grande potencial de aplicação como agente antifúngico (KIM; JE, 2010; BANANI et al., 2015). Dessa forma, muitas quitinases vegetais têm sido obtidas por expressão heteróloga e geralmente apresentam amplo espectro de ação antifúngica (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007; YAN et al., 2008; AKOND et al., 2014). Além disso, algumas quitinases possuem atividade lisozima, degradando o componente peptidoglicano da parede celular de bactérias (GHASEMI et al., 2011). Isso justifica a realização deste trabalho que tem como objetivo principal determinar as características bioquímicas e estruturais das quitinases recombinantes do cajueiro *rAoChi4849* e *rAoChi5472* e verificar a funcionalidades dessas enzimas na degradação da quitina e no controle *in vitro* de fungos e bactérias.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.2 Quitina e enzimas quitinolíticas

A quitina é um homopolímero linear e insolúvel em solução aquosa, formado por unidades de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc) unidas por ligações *O*-glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4) (Figura 1), sendo o polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose (CHEN; SHEN; LIU, 2010; CRINI, 2019).

Figura 1 - Estrutura primária da quitina.



Fonte: Khan et al. (2017). Dissacarídeo que representa a unidade básica da quitina, onde  $n$  é o grau de polimerização.

Esse polímero é um importante componente estrutural da parede celular de muitos fungos (GOW; LATGE; MUNRO, 2017) e de algumas algas (DURKIN; MOCK; ARMBRUST, 2009), do exoesqueleto de insetos e crustáceos (CHANDRAN et al., 2016), da concha de moluscos (JUNG et al., 2018), de ovos de nematoides (QUILÈS; BALANDIER; CAPIZZI-BANAS, 2006) e da matriz peritrófica que reveste o intestino médio da maioria dos invertebrados (HEGEDUS et al., 2009). A quitina não está presente em plantas e vertebrados superiores, onde a celulose e o ácido hialurônico, respectivamente, exercem a mesma função estrutural da quitina (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007). Entretanto, alguns estudos confirmam a presença de quitina em certos peixes e anfíbios (TANG et al., 2015).

Análises de difração de raios-x sugerem que a quitina ocorre em três diferentes formas cristalinas denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -quitina, que diferem com relação à configuração das cadeias paralelas e antiparalelas do polímero. A  $\alpha$ -quitina, estrutura alomórfica mais comum, apresenta monômeros de quitina arranjados de forma antiparalela ( $\uparrow\downarrow$ ) e é encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como a cutícula de artrópodes. A  $\beta$ -quitina apresenta cadeias arranjadas de forma paralelas ( $\uparrow\uparrow$ ) e a  $\gamma$ -quitina apresenta duas cadeias em paralelo seguidas de

uma terceira cadeia antiparalela ( $\uparrow\uparrow\downarrow$ ). A  $\beta$ -quitina e  $\gamma$ -quitina ocorrem em estruturas flexíveis, embora também resistentes, sendo a conformação  $\gamma$  menos estudada (CAMPANA-FILHO et al., 2007; USMAN et al., 2016; KAYA et al., 2017; KHAN et al., 2017).

A quitina é um polissacarídeo biocompatível, biodegradável, bioabsorvível e com baixa imunogenicidade. Por esses motivos, o polímero quitina e seus derivados, sobretudo a quitosana e quito-oligossacarídeos, vêm sendo estudados do ponto de vista de suas aplicações biomédicas como carreadores de drogas, na terapia genica, no controle de colesterol no sangue, como agentes antioxidantes, antimicrobianos, antitumorais e anticoagulantes (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; YOUNES; RINAUDO, 2015; KHAN et al., 2017), na cicatrização de feridas (AZUMA et al., 2015; JUNG et al., 2018), na regeneração de tecidos (TAO et al., 2020), como imunoadjuvantes (MUZZARELLI, 2010), além de apresentarem potenciais aplicações farmacêuticas como excipientes (BADWAN et al., 2015). Nas plantas a quitina atua como elicitor na resposta imune contra fitopatógenos, constituindo uma ferramenta para o controle de pragas com aplicações na agricultura (EGUSA et al., 2015). Além disso, a quitina e seus derivados apresentam aplicações em outras áreas, tais como tecnologia de alimentos, ciência de materiais, bionanotecnologia, na indústria de cosméticos, no tratamento de águas residuais, dentre outras (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; KHAN et al., 2017).

A degradação enzimática da quitina é realizada por enzimas quitinolíticas que hidrolisam este polissacarídeo em quito-oligossacarídeos ou unidades de GlcNAc. Dentre essas enzimas estão as quitina desacetilases (EC 3.5.1.41) que realizam a desacetilação da quitina produzindo a quitosana, as quitinases (EC 3.2.1.14) e quitosanases (EC 3.2.1.132) envolvidas na hidrólise da quitina e quitosana, respectivamente, as quito-oligossacarídeo desacetilases (EC 3.5.1.105) que modificam quito-oligossacarídeos e as monooxigenases líticas de polissacarídeo (LPMOs) (EC 1.14.99.53-56) envolvidas na degradação de quitina altamente cristalizada (KACZMAREK et al., 2019). Diversos organismos produzem uma variedade dessas enzimas, cuja função fisiológica envolve nutrição, parasitismo, reciclagem da quitina, morfogênese e defesa (CHAVAN; DESHPANDE, 2013; RATHORE; GUPTA, 2015).

As bactérias são potenciais fontes de enzimas quitinolíticas. As actinobactérias, por exemplo, estão entre os melhores organismos decompositores de quitina e podem utilizar esse polissacarídeo e seus derivados como fontes de carbono e nitrogênio (LACOMBE-HARVEY; BRZEZINSKI; BEAULIEU, 2018). Diversas cepas de *Bacillus* têm sido caracterizadas como bactérias quitinolíticas com importante aplicabilidade como biopesticidas enzimáticos contra fungos fitopatogênicos (SLIMENE et al., 2015; AGARWAL et al., 2017). Em fungos, as enzimas quitinolíticas atuam no processo de remodelação da parede celular e na adaptação aos

mecanismos de defesa do hospedeiro, em espécies parasitas (KAPPEL et al., 2020). Durante o desenvolvimento e metamorfose de insetos, a rotatividade do conteúdo de quitina da cutícula ocorre em função da atividade das quitinas sintases e das enzimas quitinolíticas que degradam a quitina (ZHU et al., 2016). Em plantas, as enzimas quitinolíticas estão envolvidas na resposta ao estresse biótico e abiótico, no processo de associações simbióticas com fungos e bactérias, bem como no crescimento e desenvolvimento de diversos tecidos vegetais (GROVER, 2012).

As enzimas quitinolíticas têm atraído a atenção do ponto de vista biotecnológico como ferramenta alternativa na conversão enzimática da quitina nativa em produtos químicos de interesse comercial, substituindo os métodos químicos convencionais que geram resíduos químicos agressivos ao meio ambiente (LV et al., 2016; LIN et al., 2019; ARNOLD et al., 2020). Outra perspectiva, é a utilização dessas enzimas para o biocontrole de fungos e insetos patógenos de plantas, uma vez que a quitina é o componente essencial da parede celular destes patógenos (MARTÍNEZ et al., 2012; SLIMENE et al., 2015). As quitinases, em particular, vêm sendo amplamente estudadas neste contexto, na perspectiva de obtenção de produtos alternativos para o controle de organismos patogênicos, incluindo fungos filamentosos (BANANI et al., 2015; SOUSA et al., 2019), leveduras (ALLONSIUS et al., 2019), insetos (SUGANTHI et al., 2017) e bactérias (GHASEMI et al., 2011).

### 2.3 Quitinases

Quitinases são glicosídeo hidrolases (GHs) capazes de clivar as ligações covalentes  $\beta$ -(1,4) entre os resíduos de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina presentes nas cadeias que constituem a quitina (RATHORE; GUPTA, 2015). Essas enzimas estão presentes em muitos organismos, como vírus (SUN et al., 1999), bactérias (JANKIEWICZ et al., 2019), fungos (ANWAR et al., 2019), protozoários (TAKEOA et al., 2009), insetos (LIU et al., 2017), algas (SHIROTA et al., 2008), plantas (HALIMA, 2019) e mamíferos (KIM et al., 2019). Participam de diversos eventos metabólicos como a digestão de nutrientes por bactérias (HAYES; DALIA; DALIA, 2017), peixes (IKEDA; KAKIZAKI; MATSUMIYA, 2017) e plantas carnívoras (RENNER; SPECHT, 2014), estão envolvidas no mecanismo de defesa de plantas (GAO; ZHAO, 2017), na resposta inflamatória e imunes de espécies de mamíferos (KIM et al., 2019; KOMI, SHARMA, CRUZ, 2018) e no processo de morfogênese de insetos (ZHU et al., 2016).

Glicosídeo hidrolases (EC 3.2.1.-) são um grupo de enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos, atuando na hidrólise das ligações glicosídicas. A nomenclatura dessas enzimas tem sido realizada pela *International Union of Biochemistry*

*and Molecular Biology* (IUBMB) considerando o tipo de reação que catalisam, a especificidade do substrato e seu mecanismo molecular. As GHs foram agrupadas em famílias por Henrissat et al. (1991, 1993, 1996) com base na semelhança entre as sequências de aminoácidos (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; BAIROCH, 1993; HENRISSAT; BAIROCH, 1996).

O mecanismo de ação das GHs ocorre via catálise ácida geral que requer dois resíduos críticos: um doador de prótons e uma base. Essa hidrólise ocorre por meio de dois mecanismos principais que dão origem a uma retenção ou uma inversão da configuração do carbono anomérico do resíduo de GlcNAc hidrolisado (DAVIES; HENRISSAT, 1995). Quitinases são amplamente distribuídas nos domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* e atualmente estão agrupadas em 168 famílias, como listadas no banco de dados CAZy (*Carbohydrate-active enzymes database*; <http://www.cazy.org>).

As quitinases estão agrupadas em duas famílias das GHs: GH18 e GH19. Esses dois grupos diferem na sequência de aminoácidos, na estrutura tridimensional e no mecanismo enzimático, o que sugere terem evoluído de ancestrais diferentes (RATHORE; GUPTA, 2015). A estrutura tridimensional das quitinases GH18 apresenta um dobramento do tipo  $(\beta/\alpha)_8$  ou barril TIM (triose fosfato isomerase), com oito hélices-alfa e oito folhas-beta (TERWISSCHA VAN SCHELTINGA et al., 1994). Já a estrutura tridimensional das quitinases GH19 apresenta um elevado conteúdo de  $\alpha$ -hélice e assemelham-se à lisozima (HOLM; SANDER, 1994). As quitinases da família GH18 constituem um grupo diversificado em termos evolutivos, representado por quitinases de *Archaea* (NISHITANI et al., 2018), vírus (HIRAMATSU et al., 2000), bactérias, fungos, animais e de certas plantas (ADRANGI; FARAMARZI, 2013). Enquanto que as quitinases da família GH19 compreendem quitinases de plantas, de nematoides e quitinases de bactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Vibrio* (UDAYA PRAKASH et al., 2010; GENG et al., 2002; KUMAR et al., 2019; HONDA; TANIGUCHI; KITAOKA, 2008).

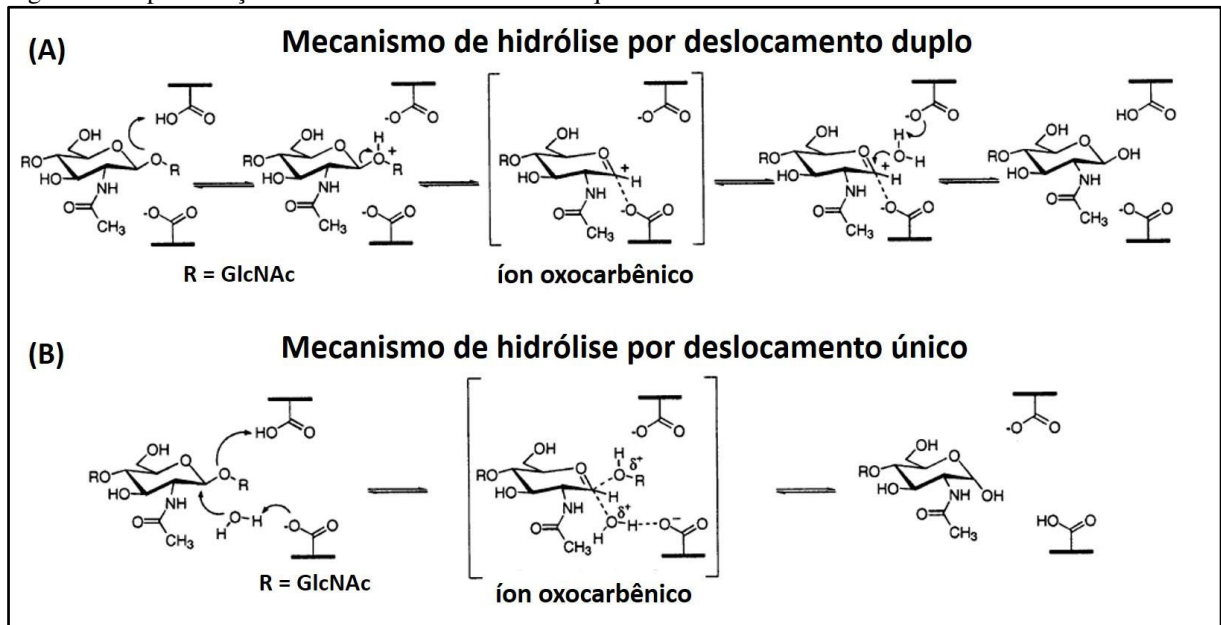
Do ponto de vista estrutural, as quitinases GH18 e GH19 apresentam os seguintes elementos: um peptídeo sinal, no caso de proteínas secretoras, um domínio de ligação à quitina (ChtBD) que auxilia a ligação da enzima ao substrato quitina e um domínio catalítico (CatD), onde ocorre a hidrólise das ligações glicosídicas da quitina. O CatD possui um centro catalítico definido pela sequência de aminoácidos padrão DxDxE nas quitinases GH18 e ExExS/T nas quitinases GH19, onde um resíduo de glutamato (Glu/E) atua como doador de prótons e é essencial à catálise, uma vez que tem sido demonstrado que mutações nesse resíduo levam à perda da atividade catalítica (HUANG et al., 2012; VOLPICELLA et al., 2014; FUKAMIZO, 2000). Repetições de domínios catalíticos ou domínios de ligação à quitina são observadas em quitinases da família GH18, o que pode favorecer a capacidade catalítica e aumentar a eficiência

de ligação a diferentes formas de quitina (HUANG et al., 2012). O domínio de ligação apresenta resíduos aromáticos altamente conservados e pode ocorrer de dois tipos: o tipo I contém oito resíduos de cisteína (Cys/C) conservados e o tipo II contém seis resíduos de Cys conservados, podendo se formarem quatro ou três ligações dissulfeto que são necessárias para orientar os resíduos aromáticos conservados envolvidos na ligação com a quitina (HUANG et al., 2012; LOBO et al., 2013; LANDIM et al., 2017; PRICE et al., 2015). A ausência do domínio de ligação à quitina não afeta a capacidade das quitinases para degradarem substratos solúveis, mas pode suprimir sua capacidade de hidrolisar quitina insolúvel (TAKASHIMA et al., 2018). A região denominada de ligante é rica em serina (Ser/S) e treonina (Thr/T) e, quando presente, normalmente se encontra ao lado do peptídeo sinal, do domínio catalítico ou do domínio de ligação, mas já foi encontrada na região C-terminal (HUANG et al., 2012).

As quitinases GH18 e GH19 diferem com relação ao mecanismo catalítico. A hidrólise realizada pelas quitinases GH18 ocorre por deslocamento duplo ou retenção, onde o oxigênio da ligação glicosídica  $\beta$ -(1,4) a ser quebrada é protonado pelo grupo carboxilato do resíduo de Glu, formando um íon oxocarbênio intermediário que é estabilizado pelo grupo carboxilato do resíduo de Aspartato (Asp/D) por meio de interações covalentes ou eletrostáticas (Figura 2A). Em seguida, o ataque nucleofílico realizado pela água produz os produtos da hidrólise, que retêm a configuração anomérica inicial (Figura 2A). Já o mecanismo de hidrólise das quitinases GH19 ocorre por deslocamento único ou inversão, onde o grupo carboxilato do resíduo de Glu doa um próton ao oxigênio da ligação glicosídica  $\beta$ -(1,4) a ser quebrada, formando também um íon oxocarbênio intermediário (Figura 2B). Simultaneamente, o grupo carboxilato do segundo resíduo de Glu, com o auxílio da cadeia lateral polar de um resíduo de Ser ou Thr, ativa uma molécula de água que realiza o ataque nucleofílico do átomo C1 do íon intermediário, finalizando a reação. Neste caso, o produto apresenta inversão da configuração anomérica inicial (Figura 2B) (BRAMELD; GODDARD, 1998; FUKAMIZO, 2000).

A distância entre os dois resíduos carboxilatos catalíticos está relacionada com o mecanismo de ação das quitinases. Tanto no mecanismo de retenção quanto no mecanismo de inversão, a posição do resíduo carboxilato doador de prótons é idêntica, ou seja, estão a uma mesma distância do oxigênio glicosídico. No mecanismo de retenção, o resíduo carboxilato que atua como base catalítica está próximo do carbono anomérico do resíduo de GlcNAc e no mecanismo de inversão este resíduo se encontra mais distante, possibilitando a acomodação da molécula de água que fará o ataque nucleofílico (Figura 2). Essa diferença resulta em uma distância média entre os dois resíduos catalíticos de aproximadamente 5,5 Å nas quitinases GH18 e de aproximadamente 10 Å nas quitinases GH19 (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

Figura 2 - Representação do mecanismo catalítico das quitinases GH18 e GH19.



Fonte: adaptada de Brameld e Goddard (1998). Mecanismo de ação das quitinases GH18 (A), mostrando o mecanismo de hidrólise por deslocamento duplo com a formação do íon oxocarbênico, que é estabilizado e em seguida hidrolisado formando um produto com retenção da configuração anomérica. Mecanismo de ação das quitinases GH19 (B), mostrando o mecanismo de hidrólise por deslocamento único com a formação do íon oxocarbênico, que pode ser hidrolisado gerando um produto com inversão da configuração anomérica.

Em relação ao mecanismo de ação, as quitinases podem ser classificadas em duas categorias principais: endoquitinases (EC 3.2.1.14) que clivam em locais internos da cadeia de quitina, gerando múltiplos de GlcNAc com baixo peso molecular, e exoquitinases que atuam a partir das extremidades da cadeia de quitina. As exoquitinases estão divididas em duas subcategorias: as quitobiosidases (EC 3.2.1.29), que catalisam a liberação de diacetilquitobiose, começando pela porção final não redutora da cadeia de quitina, e as  $\beta$ -1,4-*N*-acetil glucosaminidases (EC 3.2.1.30), que clivam os produtos oligoméricos de endoquitinases e quitobiosidases em monômeros de GlcNAc (RATHORE; GUPTA, 2015).

Um outro tipo de variação no mecanismo de ação dessas enzimas é encontrado em quitinases de ampla especificidade, uma espécie de novas quitinases que possuem dois ou mais catalisadores diferentes, ou seja, apresentam atividade exo e endoquitinásica. Esse evento é bastante relatado para fungos e bactérias (ZHOU et al., 2019). Em plantas, a ocorrência de atividade endoquitinásica e exoquitinásica em um mesmo organismo representa um recurso importante para os mecanismos de defesa. Nesse contexto, os dois mecanismos hidrolíticos incorporados em conjunto, é importante para uma linha de defesa vegetal eficaz (SYTWALA; GÜNTHER; MELZIG, 2015).

## 2.4 Quitinases de plantas

Nas plantas, as quitinases apresentam uma grande diversidade genética e funcional. Essas enzimas são expressas em diferentes tecidos e órgãos vegetais e atuam não só em processos relacionados à defesa, mas também no desenvolvimento e crescimento da planta. Na germinação, por exemplo, atuam na degradação de quitooligossacarídeos das paredes celulares do tegumento da semente, permitindo a emergência da radícula, e protegem os tecidos internos expostos da semente contra o ataque microbiano. A expressão de quitinases em plantas pode ser induzida também por estresses ambientais, como estresse osmótico e salino, condições de seca, por ferimento e toxicidade por metais pesados. Em certas plantas tolerantes ao congelamento, as quitinases têm ação anticongelante inibindo a formação de cristais de gelo no apoplasto (GROVER, 2012).

Nos mecanismos de defesa vegetal ocorre a expressão de genes específicos de quitinases, que podem ser induzidos após o ataque por um organismo patogênico. Diante de uma infecção fúngica, por exemplo, a ação das quitinases vegetais ocorre pela lise das pontas das hifas fúngicas, que apresentam cadeias de quitina expostas e acessíveis à hidrólise. Dessa forma, fragmentos de quitina das paredes das células fúngicas são liberados e podem atuar como elicitores, induzindo a imunidade inata da planta contra o patógeno. No caso de associações simbióticas entre a planta e fungos simbióticos do solo para a formação de micorrizas, a liberação de elicitores que induzem as reações de defesa da planta ocorre apenas durante os estágios iniciais do desenvolvimento da simbiose, e quando essa associação é estabelecida, as quitinases clivam esses elicitores (GROVER, 2012). É sugerido que receptores localizados nas membranas celulares vegetais estão envolvidos na percepção de fragmentos de quitina que desencadeiam a resposta imune da planta, e que o pré-tratamento com esses fragmentos aumenta a resistência de plantas contra patógenos (GAO; ZHAO, 2017; EGUSA et al., 2015).

As quitinases de plantas estão classificadas em sete classes diferentes (Classes I – VI) com base nas semelhanças estruturais. Essas proteínas estão envolvidas nos mecanismos de resistência das plantas contra o ataque de patógenos, e em razão disso foram classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (proteína PR), um grupo de proteínas que consiste em 17 famílias, sendo as quitinases pertencentes às famílias PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11 (ADRANGI; FARAMARZI, 2013; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

As quitinases das classes I, II, IV, VI e VII pertencem à família GH19. Estruturalmente, essas proteínas apresentam alto conteúdo de  $\alpha$ -hélice e possuem dois resíduos de Glu conservados, essenciais para a catálise, onde um resíduo age como ácido geral, doando



um próton na reação, e o outro age como base, ativando a molécula de água ao ataque nucleofílico (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).

Quitinases da classe I possuem um peptídeo sinal, um domínio de ligação à quitina (ChtBD) N-terminal rico em Cys e um domínio catalítico (CatD) C-terminal altamente conservado. Há também a presença de um peptídeo de ligação rico em prolina (Pro/P) entre o ChtBD e o CatD e uma extensão C-terminal (*C-terminal extension* - CTE) (OHME-TAKAGI; MEINS; SHINSHI, 1998; KASHYAP; DESWAL, 2017). As quitinases da classe II possuem peptídeo sinal e um domínio catalítico que compartilha identidade de sequência com o CatD dos membros da classe I, com deleção de cerca de 20 aminoácidos. Essa classe de quitinases não apresenta domínio de ligação à quitina e nem a extensão C-terminal da classe I (OHME-TAKAGI; MEINS; SHINSHI, 1998). Quitinases da classe IV possuem um peptídeo sinal, um domínio de ligação (ChtBD) N-terminal rico em Cys e um domínio catalítico C-terminal com alta identidade à quitinases da classe I. Há também a presença de um peptídeo de ligação entre o domínio de ligação e o domínio catalítico, mas não apresenta extensão C-terminal (TAKASHIMA et al., 2018). Nas quitinases das classes I, II, e IV há a presença de até cinco *loops* (I a V) de superfície no domínio catalítico. Nas quitinase da classe IV, além de haver uma deleção no ChtBD, há 3 deleções no CatD correspondente aos *loops* II, IV e V, o que torna essas quitinases menores em relação às demais (VOLPICELLA et al., 2014).

Na literatura existem poucos exemplos de quitinases da classe VI. Essas proteínas apresentam arranjo semelhante às proteínas de classe I, mas contêm um domínio de ligação à quitina com menos resíduos de Cys, além de variações no domínio catalítico e na CTE (TYLER et al., 2010). Proteínas representantes dessa classe apresentam o resíduo Glu conservado que atua como doador de prótons durante a catálise, substituído por um resíduo de lisina (Lys/K). Devido a esta divergência da assinatura da família GH19, essas proteínas foram classificadas como proteínas semelhantes à quitinase (*chitinase-like proteins* - PLCs), ao que tudo indica, sem atividade hidrolítica sobre a quitina. Como representantes dessa classe, estão as proteínas codificadas pelos genes AtCTL1 e AtCTL2 de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) e as proteínas codificadas pelos genes GhCTL1 e GhCTL2 do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (ZHONG et al., 2002; HOSSAIN et al., 2010; ZHANG et al., 2004). A substituição do resíduo de Glu pelo resíduo de Lys no sítio catalítico dessas proteínas, torna-se um fator determinante para a ausência de atividade hidrolítica sobre a quitina e, ao contrário das quitinases que participam de mecanismos de defesa contra patógenos, essas proteínas desempenham papel essencial para o crescimento e desenvolvimento normal da planta, atuando sobretudo na síntese da parede celular e deposição de lignina (KESARI et al., 2015).

As quitinases de classe VII estão relacionadas à classe IV, exibindo as mesmas deleções no CatD e a ausência da CTE, mas não apresentam o domínio de ligação à quitina N-terminal. A expressão heteróloga de uma quitinase do trigo (*Triticum spp.* L.) representante da classe VII, demonstrou que apesar da ausência do domínio de ligação à quitina, a enzima possui atividade antifúngica de amplo espectro contra fungos fitopatogênicos (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).

As quitinases de plantas das classes III e V pertencem à família GH18 e são estruturalmente diferentes das demais quitinases vegetais. Proteínas da classe III são similares às quitinases de bactéria e fungos, apresentam um peptídeo sinal N-terminal, mas não contêm domínio de ligação à quitina. Além disso, essas proteínas possuem seis resíduos de Cys conservados, que presumivelmente formam três ligações dissulfeto intramoleculares (VOLPICELLA et al., 2014; SPANÒ et al., 2015; KUO et al., 2008). Essas quitinases estão subdivididas em dois grupos: a classe IIIa, que contêm essas três ligações dissulfeto formadas, e a classe IIIb, sem essas ligações dissulfeto (KITAOKU et al., 2015). Quitinases da classe V possuem semelhança estrutural  $(\alpha/\beta)_8$  com as quitinases da classe III. Ambas possuem em comum o motivo catalítico DxDxE (Aspartato x Aspartato x Glutamato) conservado, embora suas sequências de aminoácidos não tenham alta identidade. Assim como outras quitinases da família GH18 de bactérias, as quitinases de plantas da classe V apresentam uma região extra de  $\alpha/\beta$ , mas não possuem domínio de ligação à quitina na região C-terminal, comum em quitinases bacterianas (OHNUMA et al., 2011a; OHNUMA et al., 2011b; KITAOKU et al., 2015).

Dentre as várias possibilidades de utilização das quitinases de plantas, tem se estabelecido o desenvolvimento de plantas transgênicas com genes de quitinases de diferentes classes. Um estudo realizado por Jabeen et al. (2015) retrata a obtenção de plantas transgênicas do tomate (*Solanum lycopersicum* Mill. cv.) geneticamente modificadas com o gene RCG3 de uma quitinase do arroz (*Oryza sativa* L.). Nesse estudo, todas as linhagens transgênicas R0 se mostraram resistentes aos fungos patogênicos do tomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) e *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L. R. Jones & Grout, ao mesmo tempo que essa resistência foi repassada de forma estável para as linhagens seguintes (JABEEN et al., 2015).

Isso reflete, portanto, a importância de pesquisas científicas destinadas à caracterização e aplicação de quitinases vegetais, sobretudo com a finalidade de estabelecer a utilização dessas proteínas para o controle de patógenos que ocasionam danos expressivos em culturas de grande importância econômica.

## 2.5 O cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta nativa da América tropical, encontrada em quase todas as regiões tropicais do mundo. Pertence à família Anacardiaceae e ao gênero *Anacardium*, que compreende 21 espécies, dentre as quais apenas *A. occidentale* é cultivada comercialmente. O Brasil é considerado o provável centro de origem desta espécie, que está presente em praticamente todos os estados brasileiros, porém melhor adaptada às condições climáticas do litoral nordestino (BARROS et al., 1993; ARAUJO, 2015).

O cajueiro é uma planta perene, com ramificação baixa e porte variado, em função do qual se distinguem os grupos anão-precoce (porte baixo) e comum (porte alto). O cajueiro-comum é originário do litoral nordestino, de onde foi dispersado via semente, e foi o primeiro a ser explorado comercialmente. A parte aérea do cajueiro-comum apresenta entre 8 e 15 m de altura, porém pode atingir até 20 m, sendo, por isso, também chamado de gigante (SERRANO; OLIVEIRA, 2013). Já o cajueiro anão-precoce é originário da Amazônia e seu cultivo ocorreu a partir de seleções fenotípicas e obtenção de clones nos trabalhos de melhoramento genético iniciados na década de 1960, sendo disponibilizado aos produtores na década de 1980. Este, raramente ultrapassa 5 m de altura, porém apresenta grande precocidade etária, florescendo entre 6 e 18 meses, contra 2 a 5 anos do cajueiro comum (CAVALCANTI; VIDAL-NETO; BARROS, 2013; CRISÓSTOMO et al., 2009). Existem 14 clones do cajueiro registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) autorizados para comercialização, sendo o clone CCP 76, obtido a partir do cajueiro anão-precoce, um dos clones mais difundidos e cultivados em várias regiões do Brasil, por apresentar elevada produtividade de castanha (ARAUJO, 2015; CRISÓSTOMO et al., 1999).

O caju, popularmente conhecido como fruto, é constituído pelo pedúnculo (pseudofruto) e a castanha (fruto verdadeiro) contendo uma amêndoa. Na industrialização do caju, a amêndoa é o principal produto visado para comercialização, no entanto, a casca da castanha também é aproveitada para a obtenção do líquido da casca da castanha - LCC, utilizado como matéria-prima básica para a fabricação de vernizes, tintas, plásticos, lubrificantes e inseticidas. O tanino, que é obtido da película da amêndoa, também é utilizado na indústria química para diversas aplicações. O pedúnculo, além de ser consumido *in natura* como fruta fresca, é também utilizado para a produção de diversos produtos alimentícios, tais como doces, bebidas e geleias (PAIVA; GARRUTTI; SILVA NETO, 2000). Outra possibilidade que se apresenta promissora, é a utilização do bagaço do pedúnculo como fonte de açúcares para a produção de etanol (ROCHA et al., 2011).

Os países que concentram a produção mundial do caju são o Vietnã, a Índia, alguns países africanos e o Brasil, que em 2018 ocupava a 9ª posição dentre os países produtores mundiais de castanha. Sobretudo no nordeste do Brasil, a agroindústria do caju ocupa lugar de destaque, com grande geração de emprego e renda. Atualmente o estado do Ceará concentra a maior parte da produção de caju (63,4%), seguido do Piauí (16,6%) e do Rio Grande do Norte (12,0)%, os quais direcionam seus produtos para o mercado local e internacional, concentrando-se principalmente na exportação da amêndoa, restando 8,0% da produção que fica distribuída entre os demais estados nordestinos (BRAINER; VIDAL, 2020).

Além de possuir um importante valor alimentício, na cultura popular o cajueiro é utilizado como planta medicinal, onde tradicionalmente se utiliza o chá da folha e da casca para o tratamento de várias doenças. Na literatura há bastante relatos sobre a atividade biológica de diferentes partes da planta do cajueiro. Um amplo espectro de atividade biológica tem sido relatado para o extrato da casca da árvore, que apresenta ação antimicrobiana sobre uma variedades de isolados bacterianos (AKINPELU, 2001), possui propriedades anti-inflamatórias (OLAJIDE et al., 2004; OLAJIDE; ADEROGBA; FIEBICH, 2013), efeito hipotensivo e cardioprotetor (TCHIKAYA et al., 2011), atua no controle de hiperglicemia (SINGH, 2010) e apresenta ação anti-helmíntico (MATHEW; CHAUHAN; SHAH, 1998). Extratos obtidos de folhas também apresentam propriedades antibacterianas (SANTOS; AMARAL; SILVA, 2018), efeito antioxidante e anti-inflamatório (BAPTISTA et al., 2020; SOUZA et al., 2017; DUANGJAN et al., 2019; PAWAR et al., 2000), efeito antiartrítico (NAZ et al., 2020) e atuação no controle de hiperglicemia (KAMTCHOUING et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que o extrato hidroetanólico de folhas do cajueiro possui ação anticâncer, induzindo apoptose em células de leucemia linfoblástica aguda (SANTOS et al., 2018).

Outras partes da planta do cajueiro também apresentam importantes atividades biológicas. A amêndoa do caju, através da administração oral em camundongos apresenta efeito antioxidante e anti-inflamatório em colite induzida (SIRACUSA et al., 2020). O suco do caju, também por administração oral em camundongos, possui efeito anti-inflamatório e cicatrizante (VASCONCELOS et al., 2015). O LCC e a goma do cajueiro também apresentam atividades interessantes. Estudos relatam o potencial do LCC como inseticida contra a *Musca domestica* L. e o *Aedes (Stegomyia) aegypti* L., dentre outros insetos (FARIAS et al., 2009; CARVALHO et al., 2019a; CARVALHO et al., 2019b; MUKHOPADHYAY et al., 2010; TORRES; GARBO; WALDE, 2015). Já a goma do cajueiro possui ação anticâncer, inibindo a proliferação *in vitro* de células tumorais (RIBEIRO et al., 2020; BARROS et al., 2020), além de propriedades anti-inflamatórias (YAMASSAKI et al., 2015) e antidiarreica (ARAÚJO et al., 2015).

*A. occidentale* contém uma série de metabólitos secundários polifenólicos já conhecidos, dentre os quais está o agatisflavona, com efeito antiviral contra o vírus da influenza (FREITAS et al., 2019) e propriedades neuroprotetoras (VELAGAPUDI et al., 2018). Além disso, compostos naturais isolados da castanha são ativos contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, agente da doença de chagas (BASTOS et al., 2019) e atuam como ansiolíticos, diminuindo ansiedade e estresse oxidativo em camundongos (GOMES JÚNIOR et al., 2018).

Proteínas importantes do metabolismo de *A. occidentale* também têm sido identificadas e depositadas no banco de dados UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), e atualmente somam 111 proteínas. Alguns estudos voltados para a identificação de compostos alergênicos da amêndoa descrevem três principais proteínas alergênicas: a vicilina 7S Ana o 1 de 50 kDa, a globulina 11S Ana o 2 de 33 kDa e a albumina 2S Ana o 3 de 12,6 kDa, purificadas e caracterizadas por Reitsma et al. (2016) e Reitsma et al. (2018). Estudos que investigam a composição química de espécies de plantas do gênero *Anacardium* têm registrado a composição nutricional, proteica e presença de fitoquímicos em *A. occidentale* (RICO; BULLÓ; SALAS-SALVADÓ, 2016; SALEHI et al., 2019). No entanto, apesar do Brasil ser considerado o berço do cajueiro e esta espécie representar uma cultura de grande importância econômica e social para o país, suas características bioquímicas e moleculares têm sido pouco investigadas.

Pesquisas voltadas para o melhoramento genético do cajueiro foram iniciadas no Brasil a partir da expansão do mercado de subprodutos do pedúnculo ocorrida na década de 1960. Esse direcionamento proporcionou ao segmento produtivo aumentar a produtividade dos seus plantios e incrementar o segmento industrial. O melhoramento genético do cajueiro começou a ser realizado em 1965 através da seleção fenotípica direcionada para o cajueiro-anão-precoce, o que permitiu o lançamento comercial de alguns clones do tipo anão-precoce. Inicialmente, a seleção desse cultivar foi favorecida pela facilidade à colheita manual do caju, em virtude do seu porte baixo. No entanto, para atender as demandas atuais da cajucultura, alguns características são consideradas essenciais, tais como a resistência a fatores bióticos e abióticos e amêndoas e pedúnculo com características adequadas à comercialização (CAVALCANTI; VIDAL-NETO; BARROS, 2013; VIDAL-NETO et al., 2013)

Com relação à resistência genética do cajueiro a fatores bióticos, a realização de estudos voltados para a seleção de clones resistentes a pragas e doenças fúngicas tem sido cada vez mais necessária (CAVALCANTI et al., 2000; LIMA et al., 2013a), uma vez que esta cultura se apresenta vulnerável a uma grande quantidade de patógenos, os quais tem sido responsáveis por consideráveis prejuízos aos produtores (SERRANO et al., 2013; MESQUITA; PINI; SOBRINHO, 2016; MARTINS; CARDOSO; VIANA, 2016).

## 2.6 Principais doenças que acometem o cajueiro

No Brasil, a expansão do cultivo de *A. occidentale* proporcionou o surgimento de diversas pragas e doenças ocasionadas por patógenos que atacam diferentes partes da planta em diferentes fases do desenvolvimento. Dentre esses patógenos estão um número significativo de artrópodes, que ocasionam importantes danos econômicos à produção do caju (MESQUITA et al., 2006; MESQUITA; PINI; SOBRINHO, 2016), uma variedade de espécies de fungos e até mesmo espécies de bactérias (EMPARN, 2004; MARTINS; CARDOSO; VIANA, 2016).

Algumas espécies de fungos fitopatogênicas são conhecidas por causarem importantes danos à cultura do cajueiro. O fitopatógeno *Oidium anacardii* Noack, por exemplo, ataca folhas e ramos novos, inflorescências, pedúnculo e castanhas jovens, causando uma doença conhecida como oídio. O fungo forma uma cobertura branca constituída pelo micélio e conídios sobre o limbo foliar, afetando o desenvolvimento da planta, e causa deformações e rachaduras no pedúnculo e no fruto. Já o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc causa a antracnose, uma das doenças mais prejudiciais à cultura do caju. Esse fungo ataca as folhas ocasionando manchas irregulares de coloração parda que se tornam avermelhadas à medida que as folhas envelhecem. Além disso provocam deformações no fruto e no pedúnculo e queda de frutos novos e de inflorescências (EMPARN, 2004; MARTINS; CARDOSO; VIANA, 2016; MARTINS et al., 2020).

O mofo-preto e a mancha-angular, causadas pelos fungos *Pilgeriella anacardii* Arx & Müller e *Septoria anacardii* Freire, respectivamente, estão entre as doenças mais importantes da cultura do cajueiro no Brasil. Estes fungos atacam as folhas da planta ocasionando lesões que tendem a evoluir para a queda prematura de folhas, comprometendo a produção final da planta. Os sintomas do mofo-preto são caracterizados pelo crescimento do fungo na face inferior de folhas maduras, causando lesões pequenas arredondadas de coloração marrom-escura, que evoluem para uma coloração verde pálida e preta até cobrir completamente a folha. A doença ocorre a partir do início do período chuvoso e atinge o ponto mais elevado ao término desse período, que coincide com o início do lançamento foliar do cajueiro, o que sugere a importância da umidade nesse processo. Já os sintomas da mancha-angular podem ocorrer ao longo de todo o ano, e é caracterizado pela ocorrência de lesões pequenas marrons e arredondadas em folhas jovens, que evoluem para manchas angulares em folhas maduras (MARTINS; CARDOSO; VIANA, 2016).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon é considerado o principal patógeno do cajueiro no semiárido nordestino, responsável pela ocorrência da resinose e da

podridão-preta-da-haste. Na resinose a planta apresenta podridão seca dos ramos, formação de cancos nos ramos lenhosos e no tronco, acompanhada de exsudação de goma e escurecimento dos tecidos. Isso gera uma redução da taxa de fotossíntese e bloqueio do movimento de seiva, levando à murcha e queda de folhas e baixo rendimento de produção pela planta. Na podridão-preta-da-haste os sintomas caracterizam-se pelo escurecimento dos tecidos da haste terminal, necrose dos tecidos apicais em estágio mais avançado e exsudação de goma em pontos específicos. Esses sintomas podem progredir até a necrose total das áreas afetadas, destruindo parcialmente a copa da planta (EMPARN, 2004; MARTINS; CARDOSO; VIANA, 2016; CARDOSO et al., 2009).

Além das doenças fúngicas, uma doença causada por bactérias do gênero *Xanthomonas*, conhecida como Mancha-de-xanthomonas, foi recentemente detectada em folhas e castanhas no cajueiro. Nas folhas surgem manchas marrom-escuras que se desenvolvem da nervura central para as nervuras laterais, podendo se espalhar para toda a área foliar, causando amarelecimento, necrose e queda da folha. Nos frutos ainda verdes, a doença causa manchas aquosas (semelhantes a uma mancha oleosa), que aumentam de tamanho e escurecem com a evolução da doença. Após a maturação da castanha, as lesões tornar-se deprimidas, úmida e de coloração cinza-claro. Essa doença exige a presença de água abundante para que ocorra a infecção, e por isso é favorecida em viveiro pelo excesso de irrigação. No campo, o orvalho noturno pode contribuir para a infecção e, sob essas condições climáticas favoráveis, essa doença tem potencial de promover prejuízo total na produção de amêndoas em clones susceptíveis (ARAUJO, 2015; MARTINS; CARDOSO; VIANA, 2016).

Com relação ao manejo no tratamento dessas doenças, o controle químico tem sido a técnica mais recomendada, através da pulverização de fungicidas (MARTINS; CARDOSO; VIANA, 2016). No entanto, sabe-se que o uso de defensivos químicos gera consequências desastrosas ao ambiente, devido ao desequilíbrio biológico que essas substâncias causam (LUSHCHAK et al., 2018). Uma alternativa para o controle de doenças no cajueiro tem sido a seleção de clones tolerantes ou resistentes aos seus principais fitopatógenos (CAVALCANTI et al., 2000; LIMA et al., 2013a; SERRANO et al., 2013).

Contudo, a seleção de fenótipos resistentes a doenças e a incorporação de genótipos de resistência ainda são pouco explorados no programa de melhoramento genético do cajueiro. Outra possibilidade consisti no desenvolvimento de plantas transgênicas que superexpressem genes de proteínas relacionadas à defesa vegetal, como as quitinases, ou até mesmo a obtenção dessas enzimas de forma heteróloga para uso como defensivos contra esses patógenos.

## 2.7 Ocorrência de quitinases no cajueiro

A ocorrência de quitinases no cajueiro foi reportada primeiramente por Marques e Xavier-Filho (1991) na goma exsudada da árvore. Neste estudo, os autores coletaram nódulos de goma em árvores de *A. occidentale* nativas e cultivadas de todo o estado do Ceará, nódulos esses provenientes da exudação produzida a partir de lesões físicas ou ataques por insetos ou microrganismos. As amostras de goma foram trituradas e analisadas com relação à composição glicídica e proteica, sendo constatada a presença de quitinases, além de outras enzimas relacionadas à defesa vegetal. De acordo com os autores, a composição de gomas vegetais tem sido estudada devido a sua associação com estados patológicos de árvores. Desta forma, embora encontrada em pequena quantidade em quase todas as amostras de exsudato testadas, os autores ressaltam que a presença de quitinases nessas amostras pode estar diretamente relacionada com os mecanismos de defesa de *A. occidentale* contra o ataque, especialmente, de agentes fitopatógenos (MARQUES; XAVIER-FILHO, 1991).

Apesar de ser uma cultura de grande importância para o Brasil, o potencial biotecnológico do cajueiro ainda é pouco explorado, devido à ausência, sobretudo, de dados genômicos. Nesta perspectiva, Alves Filho (2013) utilizando dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq), fez a montagem do primeiro esboço do transcriptoma de folhas e sementes em desenvolvimento do cajueiro anão-precoce CCP 76, nos quais foram identificados transcritos que codificam enzimas relacionadas à defesa vegetal (resultados a serem publicados).

Com base nesses dados, um estudo pioneiro realizado por um grupo de pesquisa do Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), reportou a identificação de 10 sequências referentes a quitinases GH19 no transcriptoma de sementes em desenvolvimento do cajueiro anão-precoce CCP 76 (ARAGÃO, 2015).

Sendo assim, duas destas sequências foram selecionadas para a realização deste trabalho (APÊNDICE A). O critério de escolha dos *contigs* (*locus* 4849 e 5472) foi o maior percentual de identidade com genes codificadores de quitinases depositados no *Genbank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e a presença da região de codificação (CDS - *Coding Sequence*) completa (APÊNDICE B). O primeiro *contig* selecionado, com 1071 nucleotídeos, apresentou 88% de similaridade com uma quitinase de *Mangifera indica* L. (ACD69683.1) e o segundo *contig*, com 1157 nucleotídeos, apresentou 84% de similaridade com uma quitinase-like de *Citrus sinensis* Macfad. (XP\_006488866.1), ambos apresentando regiões conservadas que as caracterizam como quitinases GH19 pertencentes à superfamília lisozima-like (ARAGÃO, 2015).



Recentemente, essas duas sequências de nucleotídeos foram depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com o número de acesso MN623694 para a sequência 1 (*locus* 4849) e MN623695 para a sequência 2 (*locus* 5472) (APÊNDICE A) (dados a serem publicados).

Para melhor identificação, a sequência codificadora ou a região da ORF (do inglês, *open reading frame*) referente à sequência 1 foi nomeada de *AoChi4849* e a ORF referente à sequência 2, de *AoChi5472*, bem como as respectivas proteínas codificadas (“*Ao*” em itálico referente ao nome da espécie *A. occidentale*, “*Chi*” referente a enzima quitinase, Chitinase no inglês, e a numeração referente ao *locus* no transcriptoma).

Uma análise inicial das sequências de aminoácidos deduzidas para as quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472*, constatou na *AoChi5472* a ausência de um resíduo de Glu conservado nas quitinases de plantas GH19. Esse resíduo de Glu, que atuaria como doador de prótons na catálise, é substituído por um resíduo de Lys, em situação semelhante ao que ocorre nas PLCs, proteínas pertencentes à classe VI de quitinases de plantas. Ao que tudo indica, essa substituição pode acarretar na ausência de atividade catalítica sobre a quitina (dados a serem publicados).

Atualmente, ainda não se tem dados publicado sobre o papel dessas quitinases na defesa vegetal e resistência a fitopatógenos no cajueiro. Portanto, fica evidente a importância de utilização desses dados para produção heteróloga dessas enzimas, o que possibilita elucidar suas características bioquímicas e funcionais, bem como investigar possíveis aplicações.

## 2.8 Sistemas de expressão heteróloga de proteínas

A obtenção de proteínas de forma heteróloga tornou-se possível a partir do desenvolvimento das técnicas de manipulação do DNA, área conhecida como tecnologia do DNA recombinante. Essas proteínas são chamadas de proteínas recombinantes e os organismos/células que as produzem são chamados de sistemas heterólogos de expressão. Essa ferramenta biotecnológica vem sendo bastante utilizada para obtenção de proteínas bioativas, por representar uma alternativa prática, rápida e com baixo custo (YIN et al., 2007).

Os sistemas heterólogos de expressão são constituídos por organismos procariótico e eucarióticos. Especialmente as bactérias *Escherichia coli* T. Escherich e *Bacillus subtilis* Cohn constituem sistemas procarióticos bastante utilizados devido à facilidade de manipulação e a rápida taxa de crescimento celular. Culturas dessas bactérias podem alcançar densidades muito altas em meios relativamente simples e baratos, o que garante um alto rendimento na produção de proteínas recombinantes com um custo baixo (YIN et al., 2007).

A utilização de organismos eucarióticos para expressão heteróloga de proteínas oferece vantagens em relação aos sistemas procarióticos, como a realização de modificações pós-traducionais importantes para o dobramento correto das proteínas, formação de ligação dissulfeto, glicosilação e fosforilação. Dentre esses sistemas está a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (Guillierm.) Phaff, a levedura não metilotrófica *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (BAGHBAN et al., 2019) e alguns fungos filamentosos, sobretudo espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (NEVALAINEN; TE'O; BERGQUIST, 2005).

Contudo, a necessidade de obtenção de complexos multiproteicos ou proteínas de massa molecular alta na quantidade e qualidade necessária para estudos estruturais, exigiu o desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga mais elaborados. Um desses sistemas utiliza baculovírus recombinante como vetor de expressão (BARFORD et al., 2013). Esse vetor permitem a inserção de grandes sequências de DNA e é utilizado para infectar células de insetos (VAN OERS, 2011) ou células de mamíferos (MANSOURI; BERGER, 2018).

A expressão heteróloga tanto em células de insetos quanto em células de mamíferos garante o processamento adequado de modificações pós-tradução, possibilitando a obtenção de proteínas recombinantes semelhantes à forma nativa. No entanto, nesses sistemas, o gene heterólogo não pode ser expresso continuamente, assim como ocorre em sistemas procarióticos e em leveduras, que realizam fermentação contínua. Nesse caso, é necessária a infecção de novas células a cada rodada de síntese da proteína de interesse, o que pode elevar os custos e o tempo de produção em relação a outros sistemas mais simples (YIN et al., 2007).

A escolha do sistema de expressão mais adequado para a produção heteróloga de uma proteína de interesse depende tanto da finalidade de uso final dessa proteína, quanto das suas características nativas (YIN et al., 2007). Muitas proteínas heterólogas são obtidas rotineiramente em laboratórios de pesquisa básica utilizando os sistemas formados pela bactéria *E. coli* e pela levedura *P. pastoris* (LOBO et al., 2013; LANDIM et al., 2017).

### **2.8.1 Expressão heteróloga em *Escherichia coli***

Esse organismo tem suas características genéticas, fisiológicas e bioquímicas bem elucidadas e, em virtude disso, uma variedade de sistemas de expressão compostos por diferentes vetores e cepas de *E. coli* têm sido projetados, comercializados e amplamente utilizados para fins laboratoriais e comerciais (ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019).

O sequenciamento do genoma de cepas de diferentes linhagens de *E. coli* tem ajudado a entender a base molecular de fenótipos úteis para a expressão heteróloga e,

atualmente, a cepa BL21 (DE3) é o hospedeiro preferido para a produção de proteína recombinante. As vantagens dessa cepa incluem o rápido crescimento celular, um alto nível de secreção, a produção diminuída de acetato, um produto da via fermentativa que age como inibidor no crescimento celular e na síntese de produtos heterólogos, e a deficiência de proteases, que estende a vida útil das proteínas (ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019).

A sequência que codifica para uma proteína de interesse é inicialmente clonada em um plasmídeo de expressão, que em seguida é inserido na célula de expressão. O plasmídeo deve conter pelo menos um promotor de iniciação da tradução, região que direciona a expressão da sequência codificadora da proteína de interesse, um gene que atua como marcador nas células contendo o plasmídeo, geralmente um gene que conferem resistência a antibióticos, e elementos necessários à replicação. A cepa BL21 (DE3) carrega uma cópia do gene da RNA polimerase do fago T7 (T7RNAP) sob controle do promotor lacUV5, assim, genes de interesse são clonados sob o controle de um promotor T7 em plasmídeos de expressão. Nesse sistema, a produção da proteína de interesse começa após a adição do indutor isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), possibilitando o controle da expressão da proteína recombinante (JIA; JEON, 2016; ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019).

O sucesso na obtenção de proteínas recombinantes em *E. coli*, especialmente em BL21 (DE3) e derivados, tem ocorrido pela manipulação genética dessas cepas, especialmente para garantir a formação de ligações dissulfeto e a expressão de proteínas codificadas por genes contendo códons raros. Além disso, tem ocorrido uma otimização das condições de cultivo das cepas, bem como avanços no *design* de plasmídeos contendo elementos genéticos que facilitam a detecção, purificação ou solubilização de proteínas recombinantes (JIA; JEON, 2016).

Apesar de ser um método bastante viável, a expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* não permite a realização de modificações pós-tradução necessárias para o dobramento adequado de muitas proteínas (YIN et al., 2007). Além disso, as proteínas expressas não necessariamente serão secretadas para o meio externo, em muitos casos podem se acumular no espaço periplasmático ou no meio intracelular em agregados insolúveis chamados de corpos de inclusão. Neste caso, as proteínas apresentam um dobramento errôneo, sendo necessárias etapas subsequentes de solubilização e redobramento através de processos que podem elevar os custos e diminuir o rendimento da proteína recombinante (SINGH et al., 2015).

Uma alternativa à esse sistema é a utilização de sistemas eucarióticos formados por leveduras, que realizam processamentos pós-traducionais e possuem subsídios que garantem a secreção da proteína recombinante no meio extracelular (BAGHBAN et al., 2019).

### 2.8.2 Expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

A expressão heteróloga em leveduras também apresenta vantagens com relação ao crescimento rápido e baixo custo da cultura, além de representar uma ferramenta adequada para a fermentação industrial em grande escala (YIN et al., 2007). Particularmente, a levedura metilotrófica *P. pastoris* vem sendo bastante utilizada como hospedeiro de expressão heteróloga para a produção com sucesso de uma variedade de proteínas recombinantes de procariotos e eucariotos, tanto para uso industrial (SPOHNER et al., 2015), como para pesquisa básica (LANDIM et al., 2017). Para a expressão de proteínas heterólogas nesse organismo é muito importante projetar um sistema recombinante adequado que inclua uma cepa hospedeira e um vetor de expressão apropriado para o tipo de proteína a ser expressa e para suas aplicações finais (JUTURU; WU, 2018; BAGHBAN et al., 2019).

O genoma de *P. pastoris* contém dois genes para a enzima álcool oxidase (AOX1 e AOX2), envolvida na via de utilização do metanol (MUT) como fonte de carbono para produção de energia. Dessa forma, cepas variantes de *P. pastoris* foram desenvolvidas pela exclusão dos genes AOX1 e AOX2. A cepa KM71, por exemplo, foi gerada pela exclusão do gene AOX1 e apresenta baixa taxa de crescimento e consumo de metanol (Fenótipo Mut<sup>S</sup>). Já a cepa GS115 possui os dois genes AOX funcionais e apresenta alta taxa de crescimento e consumo de metanol (fenótipo Mut<sup>+</sup>), semelhante ao tipo selvagem. O terceiro tipo de hospedeiro de expressão, como a cepa MC100-3, foi gerado pela exclusão dos dois genes AOX e não crescem na presença de metanol (fenótipo Mut<sup>-</sup>) (JUTURU; WU, 2018).

Os vetores de expressão utilizados atualmente para a produção de proteínas heterólogas na levedura *P. pastoris* apresentam os seguintes elementos: um sítio de clonagem múltipla (*Multiple Cloning Site* - MCS), o promotor do gene da enzima álcool oxidase (AOX1), um local de terminação da transcrição (TT), o gene *Sh ble*, que conferem resistência ao antibiótico zeocina e permite a seleção das células transformadas, uma *tag* que codifica seis histidinas adicionadas à extremidade C-terminal da proteína recombinante, permitindo sua detecção e purificação, e uma sequência de sinal de secreção, que auxilia a proteína recombinante expressa a entrar na via secretora, garantindo a obtenção da mesma no meio extracelular (BAGHBAN et al., 2019; KOPERA et al., 2014; TRABELSI et al., 2019).

O promotor AOX1, utilizado para direcionar a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, é regulado pela adição ou carência de metanol à cultura e tem sido bastante utilizado por gerar altos níveis de expressão de diferentes proteínas recombinantes. No entanto, os efeitos adversos inerentes ao uso do metanol representam uma desvantagem na escolha deste

promotor (JUTURU; WU, 2018). Assim, outros promotores têm sido utilizados, como o promotor do gene GAP, que codifica uma gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Esse promotor expressa proteínas continuamente em diferentes fontes de carbono, incluindo glicose, glicerol, etanol e ácido oleico, garantindo a obtenção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* sem a utilização de metanol (JUTURU; WU, 2018; BAGHBAN et al., 2019).

O sinal de secreção de *S. cerevisiae* (fator  $\alpha$ ) tem sido utilizado em muitos vetores de expressão, gerando proteínas heterólogas com uma pré-sequência de 19 aminoácidos (peptídeo sinal) e uma pró-região de 60 aminoácidos hidrofílicos. A pré-sequência é responsável por direcionar a proteína para o retículo endoplasmático (RE) e é subsequentemente clivada pela enzima peptidase sinal. Já a pró-região promove a transferência da proteína do RE para o complexo de Golgi e é posteriormente clivada pela protease kex2p. O local de clivagem da kex2p no lado N-terminal da proteína pode conter repetições de Glu-Ala, que são posteriormente removidas pela ação da aminopeptidase ste13p, resultando na liberação da proteína madura (DALY; HEARN, 2005).

O fator  $\alpha$  é funcional em todos os sistemas de expressão de levedura e amplamente usada para expressão heterólogas em *P. pastoris* (BAGHBAN et al., 2019; AHMAD; HIRZ; PICHLER, 2014). Contudo, sua principal desvantagem é a expressão de proteínas recombinantes com as extensões Glu-Ala amino-terminais remanescentes, devido a incapacidade da ste13p de processar uma grande quantidade de proteína recombinante durante a expressão (KOZLOV; YAGUDIN, 2008). Como alternativa, muitas proteínas têm sido expressas em *P. pastoris* com seu peptídeo sinal nativo (VADHANA et al., 2013). Além disso, um considerável número de novos peptídeos sinais endógenos foram previstos no genoma de *P. pastoris*, os quais demonstram ser eficientes para direcionar a secreção de proteínas recombinantes nesse organismo (DUAN et al., 2019).

Uma das vantagens de *P. pastoris* sobre outros organismos na expressão heteróloga é a sua capacidade de secretar poucas proteínas endógenas, que são consideradas contaminantes e devem ser removidas no processo de purificação da proteína recombinante. Mattanovich et al. (2009) observaram computacionalmente que o secretoma da linhagem DSMZ 70382 dessa levedura consiste em 88 ORFs, no entanto, quando cultivada em meio com glicose como fonte de carbono, apenas 20 proteínas foram secretadas em níveis detectáveis. Já Huang et al. (2011) identificaram um total de 75 proteínas em três amostras de sobrenadantes de culturas de *P. pastoris* X-33 induzidas por metanol. Neste estudo foi também relatado a influência da temperatura de cultivo no secretoma, onde mais proteínas do hospedeiro foram encontradas no sobrenadante de culturas cultivadas a 30 °C do que a 25 °C.

Outra importante vantagem de *P. pastoris* para expressão heteróloga é sua capacidade de realizar *N*-glicosilação e *O*-glicosilação durante o processamento das proteínas recombinantes. Na *N*-glicosilação os oligossacarídeos são anexados ao nitrogênio da amida do resíduo de asparagina (Asn/N) no lúmen do RE através de uma ligação *N*-glicosil dentro da sequência consenso Asn-x-Ser/Thr (onde x é qualquer aminoácido, exceto Pro) e na *O*-glicosilação os oligossacarídeos são anexados aos resíduos de Ser ou Thr por meio de uma ligação glicosídica. A *N*-glicosilação em alguns fungos, como em *S. cerevisiae*, é caracterizada por hipermanosilação, gerando proteínas com padrão de glicosilação elevado. No entanto, em *P. pastoris* os *N*-glicanos são frequentemente mais curtos, podendo ocorrer baixa incidência de proteínas recombinantes hiperglicosiladas. Isso faz com que este sistema seja adequado para expressão de glicoproteínas de eucariotos (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020).

## 2.9 Ação antifúngica de quitinases vegetais obtidas por expressão heteróloga

Quitinases de plantas apresentam potencial aplicação como agente antifúngico e são comumente expressas em sistemas de expressão heteróloga que utilizam tanto *E. coli* quanto *P. pastoris* como células hospedeiras (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007; XAYPHAKATSA et al., 2008; SIERRA-GÓMEZ et al., 2019; YAN et al., 2008; KUO et al., 2008; AKOND et al., 2014; LANDIM et al., 2017).

Yan et al. (2008) testou uma quitinase recombinante do arroz (*Oryza sativa* L.) expressa em *P. pastoris* GS115 contra os fungos *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. et Fr.) Vuill e *Botrytis squamosa* Walker, para os quais a quitinase teve efeito inibitório, e contra os fungos *Pythium aphanidermatum* (eds.) Fitzp e *Aspergillus niger* van Tiegh, para os quais a quitinase não apresentou ação antifúngica. Esses resultados demonstram que uma quitinase pode atuar de formas diferentes frente a diferentes fungos fitopatogênicos.

Neste mesmo estudo, a extensão da exposição de microestruturas de quitina na parede celular dos fungos foi examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e os resultados mostraram que os fungos *R. stolonifer* e *B. squamosa*, apresentam feixes de fibras de quitina expostos na superfície da parede celular, o que possibilitaria a quitinase entrar em contato facilmente com as ligações *O*-glicosídicas. No entanto, os fungos *P. aphanidermatum* e *A. niger* apresentam escamas arranjadas firmemente de forma a cobrir a quitina na parede celular, dificultando assim, o acesso da quitinase ao conteúdo de quitina. Além disso, a proporção de quitina na parede celular dos fungos, analisada por Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (EIVTF), é maior em *R. Stolonifer* e *B. squamosa* em relação a *P.*

*aphanidermatum* e *A. niger*. Isso demonstra que, a atividade inibitória da quitinase está diretamente correlacionada tanto com a extensão da exposição da quitina quanto com a proporção de quitina na parede celular do fungo (YAN et al., 2008).

Outras quitinases vegetais expressas na levedura *P. pastoris* demonstraram atividade antifúngica. É o caso da quitinase recombinante VuChiI do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), pertencente a classe I, que foi expressa em *P. pastoris* KM71H por Landim et al. (2017) e demonstrou ação inibitória contra o fungo *Penicillium herquei* Bainier & Sartory. Duas isoformas da quitinase recombinante BoChi3-1 do bambu (*Bambusa oldhamii* Munro), pertencentes a classe III e expressa em *P. pastoris* X-33, apresentaram atividade antifúngica contra *Scolecobasidium longiphorum* Matsush. (KUO et al., 2008) e uma quitinase recombinante de classe IV do inhame (*Dioscorea opposita* Thunb.), produzida também em *P. pastoris* X-33, demonstrou forte atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* Schltdl. e *Phytophthora nicotianae* var. parasítica (AKOND et al., 2014).

Sierra-Gómez et al. (2019) relatou a ação antifúngica das quitinases recombinantes AtChi1 e AtChi2 do *Agave tequilana* F.A.C.Weber sobre fungos *Aspergillus sp.* Essas quitinases pertencem a classe I e foram expressas em *E. coli* Rosetta-Gami. Outra quitinase do arroz, rCHT11 de classe II expressa em *E. coli* BL21, também apresentou ação antifúngica, nesse caso contra cepas de *Trichoderma viride* Pers. (XAYPHAKATSA et al., 2008). E uma quitinase recombinante de classe VII do trigo (*Triticum aestivum* L.), produzida em *E. coli* BL21 (DE3), demonstrou amplo espectro de atividade antifúngica, agindo contra uma variedade de fungos fitopatogênicos (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).

Em virtude da capacidade de degradar a quitina presente na parede celular de fungos, é crescente o interesse por quitinases na perspectiva de uso para o controle de patógenos fúngicos que causam doenças em plantas de interesse econômico e em humanos (KARASUDA et al., 2003; BANANI et al., 2015; NAGPURE; CHOUDHARY; GUPTA, 2014; ALLONSIUS et al., 2019). Nesse cenário, a expressão heteróloga representa o método ideal para obtenção dessas proteínas, em virtude da eficiência na produção de um alto rendimento proteico, bem como do baixo custo dos processos (YIN et al., 2007).

## **2.10 Quitinases vegetais com ação antibacteriana**

Muitas quitinases vegetais apresentam a capacidade de clivar peptidoglicanos assim como a lisozima, e por isso são chamadas de quitinases/lisozima. Ghasemi et al. (2011) demonstrou que essas enzimas são capazes de degradar o peptidoglicano presente na parede

celular de muitas bactérias e, portanto, são promissoras para o uso como agente antibacteriano.

A função dessas enzimas nas plantas parece estar relacionada com a defesa contra o ataque de patógenos microbianos e insetos (ROZEBOOM et al., 1990). Um exemplo clássico dessas proteínas é a hevamine, uma quitinase/lisozima isolada do látex de *Hevea brasiliensis* L. (seringueira) que apresenta alta identidade com quitinases de outras plantas (JEKEL; HARTMANN; BEINTEMA, 1991).

A estrutura da hevamine apresenta um dobramento do tipo  $(\beta/\alpha)_8$ , o que confirma o agrupamento dessa proteína na família 18 das glicosil hidrolases, e resíduos de Asp e Glu importantes para a atividade catalítica, como tal, conservados nas proteínas GH18 enzimaticamente ativas (TERWISSCHA VAN SCHELTINGA; HENNIG; DIJKSTRA, 1996). Diferentemente da lisozima, que cliva entre o C-1 de um *N*-acetilmuramato e o C-4 de uma *N*-acetilglucosamina, a hevamine cliva entre o C-1 da *N*-acetilglucosamina e o C-4 do ácido *N*-acetilmurâmico, e por conta disso não foi classificada como lisozima (BOKMA et al., 1997).

Quitinases/lisozima têm sido obtidas de diversas plantas, incluindo *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (HEITZ et al., 1994), *Citrus sinensis* L. (MAYER et al., 1996), *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* Jacq. (PATEL et al., 2009) e também de bactérias (GHASEMI et al., 2011; ZHANG et al., 2020). Essas enzimas podem apresentar bifuncionalidade, ou seja, demonstrarem atividade antifúngica e antibacteriana e, portanto, representam proteínas com grande potencial como antimicrobiano que precisam ser exploradas (GHASEMI et al., 2011).



### 3 HIPÓTESE

A identificação de quitinases no transcriptoma da castanha do cajueiro, juntamente com a constatação da presença dessas enzimas na goma exsudada da árvore, reportada por Marques e Xavier-Filho (1991), são evidências de que a expressão dessas enzimas constitui parte dos mecanismos bioquímicos relacionados à defesa da planta, pois sabe-se que a presença de exsudação em árvores está associada ao mecanismo de resposta da planta a uma infecção. Dessa forma, a caracterização bioquímica e a avaliação funcional dessas quitinases é fundamental para compreender seu papel biológico, bem como prospectar o seu aproveitamento biotecnológico como agente antimicrobiano.

Uma análise inicial das sequências de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472*, constatou a presença do aminoácido básico Lys na *AoChi5472* substituindo o aminoácido ácido Glu doador de próton na catálise, o que poderia ocasionar ou não a perda da atividade enzimática. Nesse cenário, a expressão heteróloga representa uma alternativa viável para obtenção dessas quitinases na quantidade e qualidade necessária para a realização de estudos estruturais e enzimáticos que determinem a funcionalidades das mesmas.

Diante disso, este trabalho foi desenvolvido com base nas seguintes hipóteses:

- i) As duas quitinases do cajueiro, *AoChi4849* e *AoChi5472*, podem ser obtidas na forma solúvel por expressão heteróloga em células de *Pichia pastoris* KM71H.
- ii) As duas quitinases recombinantes podem ser enzimaticamente ativas em relação a degradação da quitina, partindo do princípio de que o aminoácido Lys atua como doador de próton na catálise da *AoChi5472*.
- iii) As duas quitinases recombinantes podem apresentar ação enzimática sobre a quitina da parede celular de diferentes fungos patogênicos, podendo constituir um agentes antifúngico, e ainda apresentar atividade de lisozima, podendo constituir um agentes antibacteriano.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Determinar as características bioquímicas e estruturais das quitinases recombinantes do cajueiro *rAoChi4849* e *rAoChi5472* e verificar a funcionalidades dessas enzimas na degradação da quitina e no controle *in vitro* de fungos e bactérias.

### 4.2 Objetivos específicos

- i) Determinar parâmetros bioquímicos da *rAoChi4849* e da *rAoChi5472* em análises *in silico*: presença e delimitação de peptídeo sinal e domínios conservados, massa molecular, presença de sítios de *N* e *O*-glicosilação, ligações dissulfeto e predição do pKa dos resíduos catalíticos;
- ii) Determinar a relação filogenética das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* com quitinases de plantas representantes das classes I, II, IV, VI e VII, através de análises *in silico* de homologia;
- iii) Investigar a funcionalidade do resíduo Lys<sup>128</sup> da quitinase *rAoChi5472* como doador de prótons na catálise, através de *Docking* molecular do CatD com o ligante (GlcNAc)<sub>4</sub>;
- iv) Obter as quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* recombinantes na forma solúvel, utilizando o vetor pPICZαA e a levedura *Pichia pastores* KM71H como sistema heterólogo de expressão, bem como purificar as proteínas recombinantes e identifica-las por análises de LC-MS/MS;
- v) Determinar a funcionalidade das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* na degradação da quitina de diferentes fontes e determinar as condições ótimas para a atividade enzimática: pH, ótimo, temperatura ótima e efeito de íons metálicos e agentes químicos;
- vi) Caracterizar a atividade enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*: tipo de reação (endo ou exoquitinásica), cinética enzimática e tipo de oligômeros gerados na ação enzimática;
- vii) Investigar a ação da *rAoChi4849* e da *rAoChi5472* no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Fusarium* e analisar o efeito antifúngico por MEV, bem como investigar a ação dessas quitinases no controle *in vitro* de microrganismos de importância médica: cepas fúngicas do gênero *Candida* e cepas da bactéria *S. aureus*.

## 5 MATERIAIS

### 5.1 Bactérias, leveduras e fungos filamentosos

A estirpe DH5 $\alpha$  de *E. coli* foi utilizada nos experimentos de clonagem das sequências codificadoras das quitinases do cajueiro *AoChi4849* e *AoChi5472* e a estirpe KM71H de *P. pastoris* foi utilizada como hospedeiro de expressão das quitinases, ambas adquiridas da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Quatro isolados de *Lasiodiplodia spp.* (CCJ127, CCJ166, CCJ184 e BAN7) foram utilizados nos experimentos de atividade antifúngica. Esse fungo é o principal causador da resinose no cajueiro, sendo os isolados CCJ127, CCJ166 e CCJ184 obtidos de tecidos infectados de cajueiros, os quais pertencem à coleção do Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Agroindustrial Tropical. Já o isolado BAN7 foi obtido do processo pós-colheita de bananas do tipo Williams coletadas no município de Assu-RN, o qual está catalogado junto à coleção do Laboratório de Patologia Pós-colheita (LPPC) da EMBRAPA Agroindústria Tropical. Três isolados de *Fusarium spp.* (BAN16 - LPPC403, BAN100 - LPPC120, e BAN225 - LPPC402) também foram utilizados nos experimentos de atividade antifúngica. Esses isolados foram obtidos do processo pós-colheita de culturas de banana do tipo Maçã, Terra e Prata Catarina, respectivamente, coletadas nos municípios de Tianguá-CE, Rio Verde-GO e Russas-CE, respectivamente, os quais também estão catalogados na coleção do Laboratório de Patologia Pós-colheita (LPPC) da EMBRAPA Agroindústria Tropical. Na banana, esses fungos causam, principalmente, a doença conhecida como podridão da coroa.

Os experimentos de atividade antifúngica com leveduras do gênero *Candida* foram realizados com as cepas *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (ATCC 22019), *Candida krusei* (Castell.) Berkhout (ATCC 6258) e 15 cepas clínicas: seis cepas clínicas de *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout (duas sensíveis ao fluconazol e quatro resistentes), cinco cepas clínicas de *C. parapsilosis* (duas sensíveis ao fluconazol e três resistentes) e quatro cepas clínicas de *Candida tropicalis* (Castell.) Berkhout, (uma sensível ao fluconazol e três resistentes), todas pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, sob responsabilidade do Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior. As cepas resistentes possuem identificação molecular realizada através da amplificação de DNA por PCR usando os iniciadores ITS4 e ITS5, com acesso no *GenBank* (Tabela 1), e as cepas sensíveis identificadas por automação VITEK (Tabela 1).

Para os experimentos de atividade antibacteriana foram utilizadas três bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, um gênero de bactérias Gram-positivas patogênicas aos seres humanos. Dentre essas, duas cepas ATCC, *Staphylococcus aureus* Rosenbach (ATCC 6538P), *S. aureus* (ATCC 65398) metilina resistente (MRSA), e uma cepa clínica, *S. aureus* 1 (MRSA), todas pertencentes à bacterioteca do LABIMAN.

Tabela 1 – Cepas clínicas de leveduras do gênero *Candida* utilizadas nos ensaios de atividade antifúngica

Cepa	Origem	Nº de acesso no Genbank	Resistência ao fluconazol
<i>C. albicans</i> 1 (105)	Sangue	KJ740175	Sim
<i>C. albicans</i> 2 (71)	Sangue	KJ740179	Sim
<i>C. albicans</i> 3 (442)	Sangue	KJ740174	Sim
<i>C. albicans</i> 4 (938)	Sangue	AB861479	Sim
<i>C. albicans</i> 5 (47HM)	Urina	-	Não
<i>C. albicans</i> 6 (52HM)	Urina	-	Não
<i>C. parapsilosis</i> 1 (43)	Sangue	KJ740188	Sim
<i>C. parapsilosis</i> 2 (356)	Sangue	KJ740186	Sim
<i>C. parapsilosis</i> 3 (1980)	Sangue	AB861487	Sim
<i>C. parapsilosis</i> 4 (50HM)	Urina	-	Não
<i>C. parapsilosis</i> 5 (40HM)	Sangue	-	Não
<i>C. tropicalis</i> 1(23)	Sangue	AB861490	Sim
<i>C. tropicalis</i> 2 (72)	Sangue	KJ740181	Sim
<i>C. tropicalis</i> 3 (574)	Sangue	-	Não
<i>C. tropicalis</i> 4 (38HM)	Aspiração traqueal	KJ740185	Sim

Fonte: elaborada pela autora.

## 5.2 Enzimas e plasmídeos

As enzimas RNase A e DNase I, utilizadas nos protocolos de obtenção de ácidos nucleicos, e a  $\beta$ -*Glucuronidase de Helix pomatia* tipo HP-2, utilizada nos ensaios de atividade quitinásica, foram adquiridas da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A *Reverse Transcriptase ImProm-II™* (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizada para obtenção de cDNA e a *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) nas reações de PCR.

O plasmídeo pGEM-T *Easy vetor* (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizado como vetor de clonagem e o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) como vetor de expressão. A enzima DNA ligase utilizada na clonagem com o vetor pGEM-T *Easy* foi obtida da Promega e a DNA ligase utilizada na clonagem com o vetor pPICZ $\alpha$ A foi obtida da Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). As enzimas de restrição *EcoRI* (10 U. $\mu$ L<sup>-1</sup>), *XbaI* (10 U. $\mu$ L<sup>-1</sup>) e *SacI* (10 U. $\mu$ L<sup>-1</sup>), acompanhadas dos seus respectivos tampões de reação, também foram obtidas da empresa Thermo Scientific.

### 5.3 Reagentes e outros materiais

Os antibióticos ampicilina e zeocina utilizados para seleção dos clones obtidos com os vetores pGEM-T *Easy* e pPICZ $\alpha$ A, respectivamente, e os reagentes peptona, triptona, extrato de levedura, *N*-acetilglucosamina e quitina insolúvel foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os reagentes X-gal e IPTG, também utilizados para seleção de clones obtidos no vetor pGEM-T *Easy*, foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Nas eletroforeses de DNA foram utilizados os marcadores de massa molecular 1 kb DNA ladder (Sinapse Inc.) e *Lambda DNA/HindIII* (BioLab - Ontario, CA, USA). Nas eletroforeses de proteína foram utilizados os marcadores *Low Molecular Weight Marker* (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) e *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Os kits de extração de DNA plasmidial *miniprep NucleoSpin® Plasmid* e *midiprep NucleoBond Xtra Midi* foram adquiridos da marca MACHEREY-NAGEL (Düren, Alemanha) e o kit para purificação de DNA *Gel and PCR Clean-Up* foram adquiridos da GE Healthcare Life Sciences. Os demais reagentes utilizados continham alto grau de pureza.

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Análises *in silico* da sequência de aminoácidos deduzida das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472*

As sequências de aminoácidos das duas quitinases selecionadas para este trabalho foram deduzidas a partir das sequências de nucleotídeos (APÊNDICE A), utilizando a ferramenta *ExpPASy Translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>). A presença de peptídeo sinal foi verificada nas sequências de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* por meio da ferramenta *SignalP* versão 4.1 disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (APÊNDICES B e C).

A presença e delimitação de domínios nas proteínas foi verificada na base de dados de domínios conservados de proteínas (Conserved Domain Database – CDD) do NCBI disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, utilizando as sequências de aminoácidos das proteínas maduras, ou seja, sem os resíduos referentes aos peptídeos sinais. A caracterização dos domínios foi feita no *ExpPASy* – PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>). A busca por proteínas homólogas às quitinases foi realizada no PDB (*Protein Data Bank*, <http://www.rcsb.org/pdb/search/advSearch.do?search=new>) e os programas *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e *ALINE* (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009) foram utilizados para obter alinhamentos de sequências.

Análises *in silico* com a provável sequência primária de cada quitinase clonada no vetor pPICZ $\alpha$ A e expressa em *P. pastoris* (APÊNDICE E) foram realizadas para determinar os seguintes parâmetros estruturais: massa molecular no *Computer pI/Mw* do ExpPASy ([web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), presença de sítios de *N* e *O*-glicosilação, no NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), respectivamente, presença de ligações dissulfeto no servidor DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) e predição do pKa dos resíduos catalíticos no PROPKA ([http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.0.0/](http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/)).

Análise evolutiva das quitinases foi realizada pelo método da máxima verossimilhança (WHELAN; GOLDMAN, 2001). As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Joining e BIONJ a uma matriz de distâncias em pares estimadas usando um modelo JTT e, em seguida, selecionando a topologia com um valor de probabilidade de log superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre locais [5 categorias (+ G, parâmetro =

1,5399)]. A análise envolveu 63 sequências de aminoácidos. Havia um total de 363 posições no conjunto de dados final. As análises foram realizadas no MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Um provável mecanismo molecular para a atividade quitinolítica da *AoChi5472* foi investigado. Para isso, um modelo molecular tridimensional do domínio GH19 foi gerado por meio de modelagem por homologia utilizando o servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2015) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), ao qual a sequência de aminoácidos da *AoChi5472* foi submetida. A qualidade estereoquímica do modelo molecular obtido foi avaliada utilizando o servidor PROSESS (BERJANSKII et al., 2010) (<http://www.prosess.ca/index.php>). Em seguida, um docking molecular foi realizado entre o modelo tridimensional da *AoChi5472* validado e um quito-oligossacarídeo com 4 unidades de GlcNAc, usando as ferramentas AutoDock Tools v. 1.5.6 (MORRIS et al., 2009) e AutoDock Vina v. 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010), (TROTT; OLSON, 2010) conforme descrito por Maranhão et al. (2017).

## 6.2 Construção e obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores para as ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472*

Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram projetados para amplificação das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* que codificam duas quitinasas do cajueiro anão-precoce CCP 76. Para a ORF *AoChi4849*, foram projetados os iniciadores 5'-CCGGGAATTCCAAAAGTGTGGCTGTGCTCC-3' (senso/*Foward*) e 5'-CCGGTCTAGAACGCAAGACAAATTCTGGCCAGG-3' (antissenso/*Reverse*), excluindo os primeiros 84 nucleotídeos que codificam o peptídeo sinal N-terminal nativo, e para a ORF *AoChi5472* foram projetados os iniciadores 5'-CCGGGAATTCGATGGAGAAATGCCATCC-3' (senso/*Foward*) e 5'-CCGGTCTAGAACAGAAGATGACGAGGAAGAAG-3' (antissenso/*Reverse*), excluindo os primeiros 69 nucleotídeos que codificam o peptídeo sinal N-terminal nativo. Sítios de corte para as endonucleases de restrição *EcoRI* (GAATTC) e *XbaI* (TCTAGA) foram adicionados à extremidade 5' dos iniciadores senso e antissenso, respectivamente, de modo a permitir a inserção dos fragmentos amplificados no sítio múltiplo de clonagem do vetor pPICZαA. Após serem projetados, os iniciadores foram adquiridos na Eurofins MWG operon Inc.

As sequências dos iniciadores construídos, com as demais unidades nucleotídicas acrescentadas para permitir a clonagem, estão representadas na tabela 2. Para a ORF *AoChi4849* o *amplicon* (produto amplificado por PCR) gerado apresenta 761 pb e para a ORF *AoChi5472* 920 pb (APÊNDICE D).

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores projetados para amplificação das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472*

<b>ChiAnaoc4849F*</b>	5'-CCGGGAATTC <sup>1</sup> CAAAACTGTGGCTGTGCTCC-3'
<b>ChiAnaoc4849R**</b>	5'-CCGGTCTAGA <sup>2</sup> AC <sup>3</sup> GCAAGACAAATTCTGGCCAGG-3'
<b>ChiAnaoc5472F*</b>	5'-CCGGGAATTC <sup>1</sup> GATGGAGAAATGCCATCC-3'
<b>ChiAnaoc5472R**</b>	5'-CCGGTCTAGA <sup>2</sup> AC <sup>3</sup> AGAAGATGACGAGGAAGAAG-3'

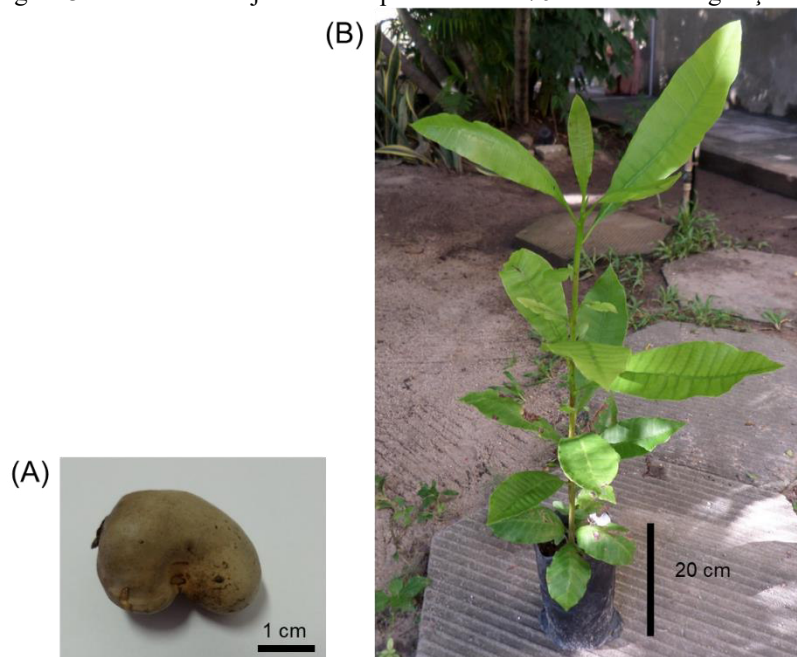
Fonte: dados da pesquisa. \**Foward*, \*\**Reverse*. <sup>1</sup>Sítio para a enzima de restrição *EcoRI*. <sup>2</sup>Sítio para a enzima de restrição *XbaI*. <sup>3</sup>Nucleotídeos adicionados para manter as sequências das ORF em *frame* com as sequências codificadoras das *Tags* (epítipo *c-myc* e cauda de histidina).

### 6.3 Obtenção de ácidos nucleicos do cajueiro anão-precoce CCP 76

#### 6.3.1 *Plantio do cajueiro*

Sementes (castanhas) do cajueiro anão-precoce CCP 76 foram fornecidas pela EMBRAPA Agroindústria Tropical - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT), Fortaleza, Ceará, Brasil. As sementes foram semeadas em solo arenoso, em vasos plásticos de 400 mL, mantidos em casa de vegetação e irrigadas diariamente com água da torneira. Após 60 dias do plantio (Figura 3), folhas jovens foram colhidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e utilizadas para purificação de ácidos nucleicos.

Figura 3 – Cultivo do cajueiro anão-precoce CCP 76 em casa de vegetação.



Fonte: elaborada pela autora. (A) Castanha e (B) cajueiro anão-precoce CCP 76 com 60 dias após o plantio.



### 6.3.2 Extração de ácidos nucleicos

#### i) Extração de DNA genômico

Amostras de DNA genômico (gDNA) de folhas do cajueiro CCP 76 foram obtidas utilizando o protocolo baseado no uso do detergente CTAB descrito por Warner (1996).

Para isso, 0,5 g de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido e incubadas por 60 min a 60 °C com 6,0 mL do tampão de extração contendo CTAB2x [Tris-HCl 100 mM (tris-hidroximetil-aminometano) pH 8,0; NaCl 2,0 M (cloreto de sódio); EDTA 25,0 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético); CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio), (w/v)], PVP 2% (polivinilpirrolidona) (w/v) e 2-mercaptoetanol 0,2% (v/v), aquecido previamente a 60 °C. Na sequência, um volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) foi adicionado à mistura para separar a fase orgânica da fase aquosa. Após centrifugação por 10 min a 5000 rpm e temperatura ambiente, a fase aquosa contendo os ácidos nucleicos foi recolhida, adicionada a 2/3 do volume de isopropanol 100% e incubada *overnight* a 4 °C para a precipitação do DNA. Após esse tempo, o DNA foi coletado por centrifugação a 3000 rpm, por 10 min e ressuspenso em 2 mL de NaCl 1,0 M estéril. Novamente o DNA foi precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol 100%, recolhido por centrifugação a 3.000 rpm por 10 min e lavado com etanol 70%, centrifugando-se por 5 min a 3.000 rpm. Após evaporação do etanol, o DNA obtido foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10,0 mM pH 8,0; EDTA 1,0 mM) contendo RNase A (20 µg.mL<sup>-1</sup>) e armazenado em freezer a -20 °C. A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e a concentração de DNA foi determinada pela medição da absorbância a 260 nm de acordo com Sambrook; Fritsch e Maniatis (1989). As etapas de centrifugação foram realizadas em centrífuga 5810 R Eppendorf®, rotor FA-45-6-30.

#### ii) Extração de RNA total

Amostras de RNA total de folhas do cajueiro CCP 76 foram obtidas utilizando o protocolo baseado no uso do detergente CTAB descritos por Chang, Puryear e Cairney (1993).

Para isso, 1,25 g de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido e incubadas por 60 min a 65 °C com 6,0 mL do tampão de extração [Tris-HCl 100 mM (tris-hidroximetil-aminometano) pH 8,0; NaCl 2,0 M (cloreto de sódio); EDTA 25,0 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético); CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio), (w/v)], PVP 2% (polivinilpirrolidona) (w/v) e 2-mercaptoetanol 0,2% (v/v), aquecido previamente a 65 °C. Na

sequência, um volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) foi adicionado à mistura para separar a fase orgânica da fase aquosa. Após centrifugação por 15 min a 2.500 rpm e temperatura ambiente, a fase aquosa contendo os ácidos nucleicos foi recolhida, adicionada a 1/4 do volume de LiCl (cloreto de lítio) 10 M e incubada *overnight* a 4 °C para a precipitação do RNA. Após esse tempo, o RNA foi recolhido por centrifugação a 10.000 rpm por 45 min e lavado duas vezes com etanol a 70%, centrifugando-se a 8.000 rpm por 10 min a 4 °C. Após evaporação do etanol, o RNA obtido foi ressuscitado em água ultrapura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e armazenado em freezer a -80 °C. A integridade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% e a concentração foi determinada pela medição da absorbância a 260 nm de acordo com Sambrook; Fritsch e Maniatis (1989). As etapas de centrifugação foram realizadas em centrífuga 5810 R Eppendorf®, rotor FA-45-6-30.

### 6.3.3 *Quantificação dos ácidos nucleicos*

O gDNA e RNA total obtidos de folhas do cajueiro anão-precoce CCP 76 foram quantificados pela medição da  $DO_{260nm}$  em espectrofotômetro *GeneQuant* (RNA/DNA CALCULATOR, PHARMACIA). Para estimar a concentração de gDNA, a seguinte relação foi utilizada:  $1 DO_{260nm} = 50 \mu g \cdot mL^{-1}$  de DNA de dupla hélice. Já a concentração de RNA foi estimada seguindo a relação de  $1 DO_{260nm} = 40 \mu g \cdot mL^{-1}$  de RNA. Dessa forma, a concentração de DNA e RNA foi calculada, respectivamente, pelos seguintes cálculos:  $[DNA \text{ ng} \cdot \mu l^{-1}] = 50 \times DO_{260nm} \times \text{fator de diluição}$  e  $[RNA \text{ ng} \cdot \mu l^{-1}] = 40 \times DO_{260nm} \times \text{fator de diluição}$ . A qualidade das amostras de ácidos nucleicos foi verificada por eletroforese em gel de agarose e através da relação das absorbâncias  $A_{260nm}/A_{280nm}$  (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

### 6.3.4 *Eletroforese em gel de agarose*

Géis de agarose, contendo brometo de etídio  $0,1 \mu g \cdot mL^{-1}$ , foram preparados em tampão TAE 1x (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) de acordo com o protocolo descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). As amostras foram preparadas em tampão de amostra (5x *Green GoTaq Reaction Buffer*) e aplicadas no gel juntamente com um marcador molecular. As corridas eletroforéticas foram realizadas sob voltagem constante de 80 V, por 40 min, com o gel submerso em tampão TAE em cuba horizontal. Após a corrida, os géis foram revelados por exposição à luz UV em um transluminador *Vilber lourmat* (Marne-la-Vallée, France) ligado a um fotodocumentador onde as imagens foram capturadas e armazenadas.

### 6.3.5 Tratamento da amostra de RNA total com DNase

A amostra de RNA total foi tratada com DNase I (Sigma Aldrich) para a remoção de resquícios de gDNA. A reação foi montada em microtubo de 1,5 mL com 80,0 µL da amostra de RNA ( $2,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 20,0 µL do tampão de reação (10 x), 4,0 µL de DNase ( $1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e 96,0 µL de água tratada com DEPC para o volume final de 200 µL. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min em banho maria. Em seguida foi adicionado 1,0 µL de *Stop Solution* da DNase para interromper a reação e incubou-se a 65 °C por 10 min para inativação da enzima DNase.

O RNA foi submetido a um procedimento de limpeza e concentração. Para isso, foi adicionado à amostra 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v). Após centrifugação a 12.000 rpm em MiniSpin® (Eppendorf) com rotor F45-12-11, por 5 min, à fase aquosa foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (preparado com água tratada com DEPC) e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e incubou-se *overnight* a 4 °C. No dia seguinte a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% (preparado com água tratada com DEPC). Após centrifugação a 12.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado, o etanol foi evaporado e o *pellet* resuspendido em 80 µL de água ultrapura tratada com DEPC.

O RNA obtido foi quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2%. Uma reação de PCR foi realizada com a amostra de RNA para certificar-se de que não havia contaminação com gDNA, utilizando como controle positivo amostra de gDNA.

### 6.3.6 Obtenção de cDNA

O RNA total obtido de folhas do cajueiro anão-precoce CCP 76 foi utilizado para obtenção de cDNA (DNA complementar) de fita simples por transcrição reversa com a enzima *Reverse Transcriptase* ImProm-II™ (Promega, Madison, WI, USA). A reação foi realizada em microtubo de 0,2 µL (Kasvi) com 1.000 ng de RNA tratado com DNase, 0,5 µg do iniciador oligo (dT)<sub>20</sub> (5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') e água deionizada tratada com DEPC para o volume final de 10 µL. Esta mistura foi incubada a 70 °C por 5 min, para permitir o anelamento do iniciador, e em seguida resfriada a 4 °C por 5 min. A esta reação foi acrescentado 1 µL da enzima *Reverse Transcriptase*, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP (ATP/TTP/CTP/GTP) a 0,5 mM cada, tampão da reação 1x concentrado e água deionizada tratada com DEPC para o volume final de 20 µL. Essa mistura foi incubada por 5 min a 25 °C, seguido de 1 h a 42 °C, 15 min a 70 °C, resfriada a 4 °C e armazenada a -20 °C.

#### 6.4 Amplificação das sequências codificadoras das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472*

As sequências codificadoras das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* foram amplificadas a partir do gDNA e do cDNA por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). As reações foram montadas em microtubos de 0,2 mL (Kasvi) com 1.000 ng de gDNA ou cDNA, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador (*Forward/Reverse*), 0,2 mM de cada dNTP (ATP/TTP/CTP/GTP), 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia), tampão de reação 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e água deionizada estéril para o volume de 15,0  $\mu$ L.

As reações ocorreram em termociclador Tx96 plus (Thermal Cyclers, Amplitherm), inicialmente em gradiente de temperatura de anelamento (45,0; 45,5; 47,0; 49,0; 51,4; 53,8; 56,2; 58,6; 61,0; 63,0; 64,5; 65,0 °C), para determinar a temperatura onde os iniciadores atuam de forma específica, e em seguida utilizando os seguintes parâmetros: etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, anelamento a 63 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min. Após o último ciclo, as reações foram incubadas a 72 °C por 8 min, resfriadas a 4 °C e analisadas em gel de agarose.

#### 6.5 Clonagem das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* no vetor pGEM-T Easy

##### 6.5.1 Obtenção dos vetores recombinantes e transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$

O produto da PCR realizada com cDNA (seção 6.4) foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega) usando a enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação de ligação foi realizada com 50 ng do vetor, 3 U de T4 DNA ligase, produto da PCR e tampão da reação 1x. Após o preparo, as reações foram incubadas *overnight* a 4 °C e, em seguida, utilizadas para a transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico, de acordo com protocolo adaptado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Para proceder com a transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico, inicialmente as células foram preparadas de modo a torná-las competentes. Para isso inoculou-se em 5 mL de caldo LB (Tryptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%) com uma colônia de *E. coli* DH5 $\alpha$  isolada e incubou-se a 37 °C sob agitação orbital de 180 rpm (Incubadora Refrigerada com Agitação, TE-422, TECNAL) por 16 h. Após esse tempo, 0,5 mL da cultura foi transferido para 50 mL de caldo LB e incubou-se a 37 °C, sob agitação orbital de 180 rpm, até atingir a DO<sub>600nm</sub> variando os valores de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 4 °C, 3.000 x g por 10 min, ressuspendidas em 1/5 do volume

com  $\text{CaCl}_2$  50 mM gelado e incubadas no gelo por 30 min. Novamente foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 1/10 do volume com  $\text{CaCl}_2$  50 mM gelado e mantidas no gelo.

A transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  foi realizada incubando-se 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de células recém preparadas com 10  $\mu\text{L}$  da reação de ligação na qual se obteve os plasmídeos recombinantes p-GEM-T Easy + *AoChi4849* e p-GEM-T Easy + *AoChi5472*. A mistura células/plasmídeo foi incubada em banho de gelo por 30 min, em banho-maria a 42 °C por 3 min e novamente no gelo por 2 min. Em seguida, as células foram recuperadas em 800  $\mu\text{L}$  de meio SOC (Tryptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM;  $\text{MgCl}_2$  10 mM; glucose 20 mM; pH 7,0) e incubadas a 37 °C por 90 min sob agitação orbital de 180 rpm. Após esse tempo, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células transformadas foram inoculados em placa de Petri com ágar LB (Tryptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; ágar 1,5%) contendo ampicilina 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) 80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) 0,5 mM. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

### 6.5.2 Confirmação da clonagem

Algumas colônias brancas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com os plasmídeos p-GEM-T Easy + *AoChi4849* e p-GEM-T Easy + *AoChi5472* foram inoculadas em caldo LB contendo ampicilina a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e incubadas a 37 °C por 16 h sob agitação orbital de 180 rpm. Em seguida, parte do volume das culturas foi estocado em glicerol a uma concentração final de 15% a -80 °C e a outra parte submetida a extração de DNA plasmidial com o kit *miniprep NucleoSpin® Plasmid* (MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemanha).

O pGEM-T Easy possui um sítio de corte da enzima de restrição *EcoRI* em cada uma das extremidades (ANEXO A). Dessa forma, o inserto que codifica as quitinases pode ser separado do vetor para confirmação da clonagem. Com essa finalidade, as amostras de DNA plasmidial (p-GEM-T Easy + *AoChi4849* e p-GEM-T Easy + *AoChi5472*) foram submetidas a uma reação de digestão com *EcoRI*. As reações continham 500 ng de DNA plasmidial, 10 U de *EcoRI* e *buffer EcoRI* 1x em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas e, em seguida, a 65 °C por 20 min para inativar a enzima. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%.

### 6.5.3 Sequenciamento do DNA plasmidial

Amostras de DNA plasmidial de 12 clones confirmados para cada construção (pGEM-T Easy + *AoChi4849* e pGEM-T Easy + *AoChi5472*) foram enviadas à MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul) para sequenciamento, usando o método de Sanger e sequenciadores *Applied Biosystems 3730XL* de alto rendimento. Nesta análise foram utilizados os iniciadores T7 e SP6, uma vez que o vetor pGEM-T Easy contém os promotores T7 e SP6 da RNA polimerase que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem.

Após o sequenciamento, os cromatogramas gerados foram analisados no pacote Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) e os *contigs* obtidos para os diferentes clones foram deduzidos em sequências de aminoácidos no *ExPASy translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>). Em seguida, estas sequências foram alinhadas com as sequências de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* utilizando o programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

## 6.6 Subclonagem das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* no vetor pPICZ $\alpha$ A

### 6.6.1 Obtenção dos vetores recombinantes

Um clone de *E. coli* DH5 $\alpha$  positivo para cada construção plasmidial, pGEM-T Easy + *AoChi4849* e pGEM-T Easy + *AoChi5472* com sequência fidedigna para expressão das quitinases do cajueiro, e um clone de *E. coli* TOP10F' contendo o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A íntegro foram cultivados em meio LB caldo e submetidos à extração de DNA plasmidial com o kit *midiprep NucleoBond Xtra Midi* (MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemanha). Em seguida, as amostras de DNA plasmidial obtidas foram utilizadas em uma reação de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*.

A região codificadora das quitinases possui um sítio de clivagem para *EcoRI* e *XbaI*, adicionados às extremidades pelos iniciadores, enquanto que o vetor pPICZ $\alpha$ A apresenta as mesmas regiões no sítio de restrição (ANEXO B). Dessa forma, se formarão extremidades coesivas entre os insertos e o vetor pPICZ $\alpha$ A. As reações de digestão continham 500 ng de DNA plasmidial, 10 U *EcoRI*, 20 U de *XbaI* e *buffer* tango 2x, em um volume final de 20  $\mu$ L. As reações foram incubadas a 37 °C por 3 h e, em seguida, a 65 °C por 20 min para inativar as enzimas. Os produtos das digestões foram aplicados em eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da digestão, purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*

(Promega) e submetidos a uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific) para obtenção dos plasmídeos pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*.

As reações de ligação foram realizadas seguindo a proporção de 5/1 (inserto/plasmídeo), conforme instruções do fabricante da enzima, utilizando a fórmula abaixo para o cálculo das quantidades de inserto e plasmídeo:

$$[ \ ] \text{ inserto} = \frac{[\text{plasmídeo}] \times \text{tamanho do inserto} \times 5}{1 \times \text{Tamanho do plasmídeo}}$$

A reação para a ORF *AoChi4849* continha 51,25 ng de inserto e a reação para a ORF *AoChi5472* continha 62,29 ng, que foram misturados a 50 ng de vetor pPICZ $\alpha$ A, 1 U de T4 DNA ligase, tampão de reação 1x e água deionizada estéril q.s.p. 20  $\mu$ L. As reações foram incubadas a 22 °C por 20 min e em seguida a 70 °C por 5 min para inativar a enzima. O produto da ligação foi usado para transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico, como descrito na seção 6.5.1, utilizando zeocina 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> para seleção dos clones.

### 6.6.2 Confirmação da subclonagem

O DNA plasmidial de quatro clones de *E. coli* DH5 $\alpha$ , obtidos para cada construção (pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*), foi extraído com o kit *miniprep NucleoSpin® Plasmid* (MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemanha) e digerido com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*. As reações foram montadas com 500 ng de DNA plasmidial, 10 U *EcoRI*, 20 U *XbaI* e *buffer* Tango 2 x em um volume final de 20  $\mu$ L. As reações foram incubadas a 37 °C por 3 horas e, em seguida, a 65 °C por 20 min para inativar as enzimas. O material digerido foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% e o DNA plasmidial com a construção pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472* confirmada foi utilizado para transformação da célula de expressão *Pichia pastoris* KM71H.

## 6.7 Transformação de células de *Pichia pastoris* KM71H com os vetores pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*

### 6.7.1 Preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* KM71H

Uma alíquota de células de *P. pastoris* KM71H conservadas em glicerol 15% (v/v) à -80 °C foi plaqueada em ágar YPD (extrato de levedura 1,0%, peptona 2,0%, glucose 2,0%, ágar 2,0%) e incubada por 5 dias a 30 °C. Após esse tempo, uma colônia foi inoculada em 5

mL de caldo YPD (extrato de levedura 1,0%, peptona 2,0%, glucose 2,0%) e incubada a 30 °C *overnight*, sob agitação orbital a 180 rpm. Uma alíquota de 0,1 mL desta cultura foi transferida para 50 mL de meio YPD caldo, permanecendo incubada *overnight* nas mesmas condições até atingir a DO<sub>600nm</sub> de 1,3 a 1,5.

As células foram coletadas por centrifugação a 2.000 x g, durante 5 min a 4 °C e ressuspendidas em 10 mL de caldo YPD e 2 mL de tampão HEPES 1,0 M, pH 8,0. Em seguida, DTT foi adicionado para a concentração final de 0,02 M e a mistura foi incubada a 30 °C, por 15 min. Decorrido o tempo de incubação, água deionizada previamente gelada foi adicionada à cultura para um volume final de 50 mL. A cultura foi centrifugada a 2.000 x g, durante 5 min a 4 °C e as células foram novamente ressuspendidas em 25 mL de água deionizada gelada e centrifugadas nas mesmas condições. O *pellet* de células foi ressuspendido em 2 mL de solução gelada de sorbitol 1,0 M, sendo por fim, centrifugada novamente nas mesmas condições e ressuspendidas em 500 µL de solução de sorbitol 1,0 M gelada, sendo mantidas no gelo até a etapa de transformação.

### **6.7.2 Linearização dos plasmídeos pPICZαA recombinantes e íntegro**

Um clone de *E. coli* DH5α positivo para cada construção plasmidial, pPICZαA + *AoChi4849* e pPICZαA + *AoChi5472*, foi cultivado em caldo LB Lennox e submetidos à extração de DNA plasmidial com o kit *midiprep NucleoBond Xtra Midi* (MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemanha). Após a extração, o DNA plasmidial foi submetido a uma reação de digestão com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* para confirmar a integridade do DNA recombinante. As reações continham 500 ng de DNA plasmidial, 10 U de *EcoRI*, 20 U de *XbaI* e *buffer* Tango 2x, em um volume final de 20 µL. Após o preparo das reações, incubou-se a 37 °C por 3 h e, em seguida, a 65 °C por 20 minutos para inativar as enzimas. O produto da digestão foi aplicado em eletroforese em gel de agarose 1%.

O DNA plasmidial confirmado (pPICZαA + *AoChi4849* e pPICZαA + *AoChi5472*), juntamente com pPICZαA íntegro, foram submetidos a uma reação de digestão com a endonuclease *SacI*, que possui um único sítio de corte no vetor pPICZαA, localizado na sequência do promotor *AOX1*. A linearização dos plasmídeos com esta enzima direciona o evento de integração do DNA recombinante ao genoma da levedura *P. pastoris*, pois ocorre um único *crossing over* entre o *locus AOX1* no cromossomo e o promotor *AOX1* no vetor. Este evento gera transformantes fenotipicamente com crescimento em metanol, uma vez que mantém o gene *AOX1* endógeno intacto.



As reações de linearização foram montadas com 10 µg de DNA plasmidial, 8 µL da enzima *SacI* (10 U.µL<sup>-1</sup>) e *buffer SacI* 1x, em um volume final de 50 µL. As reações foram realizadas em termociclador Tx96 plus (Thermal Cyclers, Amplitherm) a 37 °C, *overnight*. No dia seguinte, uma alíquota de 2,5 µL foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a eficiência da linearização dos plasmídeos. A reação foi encerrada por inativação da enzima a 65 °C por 20 min.

Em seguida, o DNA plasmídial linearizado foi submetido a uma etapa de purificação. Para isso, adicionou-se 1/10 do volume da reação de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol 100%. Após incubação à temperatura ambiente por 10 min, fez-se uma centrifugação a 12.000 x g, durante 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi incubado com etanol 80% por 15 min para lavar o DNA e foi novamente centrifugado nas mesmas condições por 10 min. Após a evaporação do etanol, o DNA plasmidial foi ressuspensionado em 10 µL de água deionizada estéril e utilizado para transformação de células de *P. pastoris* KM71H eletrocompetentes preparadas previamente como descrito na seção 6.7.1.

### **6.7.3 Transformação de *P. pastoris* KM71H com pPICZα. A recombinante e íntegro**

Para a transformação das células de *P. pastoris* KM71H, 80 µL de células eletrocompetentes foram misturados a 10 µL de DNA plasmidial linearizado (5 a 10 µg), incubadas no gelo por 5 min e transferidas para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm, BIO-RAD) resfriada, a qual foi aplicada um pulso elétrico de 2.500 volts em eletroporador (Electroporator 2510, Eppendorf). Logo após o pulso elétrico, foi adicionada 1 mL de solução de sorbitol 1,0 M resfriada à cubeta para recuperação das células. Em seguida, as células foram transferidas para um tubo estéril e incubadas a 30 °C por 90 min. Após o tempo de incubação, um estoque das células foi preparado em glicerol 15% e armazenado a -80 °C e 50 µL da cultura foram plaqueados em meio YPDS ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glucose 2%, sorbitol 1,0 M, ágar 2%) contendo zeocina 500 µg.mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias e, após o crescimento das colônias, seis clones obtidos para cada construção de DNA plasmidial recombinante e dois clones obtidos para o pPICZαA íntegro foram selecionados para extração de DNA genômico. Em seguida, a eficiência da transformação de *P. pastoris* KM71H foi confirmada por PCR com o gDNA obtido.

#### 6.7.4 Confirmação da transformação de *P. pastoris* KM71H

##### i) Extração de DNA genômico de *P. pastoris* KM71H

A confirmação da integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* foi realizada em seis clones obtidos para cada construção plasmidial (pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*) e em dois clones obtidos com pPICZ $\alpha$ A íntegro.

Inicialmente, o gDNA de cada clone foi obtido de acordo com o protocolo descrito por Warner (1996). Os clones foram inoculados em 6 mL de meio YPD caldo, contendo zeocina 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e incubados a 30 °C por 18 h com agitação orbital de 180 rpm. Parte da cultura obtida foi utilizada para na preparação de estoques em glicerol 15%, os quais foram armazenados a -80 °C. O restante da cultura foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugada em centrífuga MiniSpin® (Eppendorf) com rotor F45-12-11, a 12.000 x g, por 3 min a temperatura ambiente. A massa celular coletada foi lavada com 800  $\mu\text{L}$  de água milli-Q estéril, centrifugação nas mesmas condições e ressuspendida em 700  $\mu\text{L}$  de CTAB contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% e pré-aquecido a 60 °C. A suspensão de células foi incubada em estufa a 60 °C *overnight* e, posteriormente, 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. Após inversão dos tubos, a mistura foi centrifugada a 12.000 x g, por 20 min a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela foi adicionado 2/3 do volume de isopropanol para a precipitação do DNA. O material permaneceu por 1 h em a 4 °C, em seguida foi centrifugado a 12.000 x g, por 10 min a temperatura ambiente. O gDNA obtido foi lavado com etanol 70%, centrifugando-se nas mesmas condições, e após evaporação do etanol foi solubilizado em 200  $\mu\text{L}$  de TE contendo RNase A (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A concentração de gDNA foi estimada pela medição da absorbância a 260 nm e a qualidade da amostra foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS 1989).

##### ii) PCR para confirmação da transformação de *P. pastoris* KM71H

Para confirmação da integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* KM71H, as amostras do gDNA obtidas dos clones selecionados foram submetidas uma reação de PCR com os iniciadores 5'-AOX1 (GACTGGTTCCAATTGACAAGC) e 3'-AOX1 (GCAAATGGCATTCTGACATCC) que amplificam o gene *AOX-1* presente no próprio vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A. Caso o gDNA extraído dos clones de *P. pastoris* tenha uma ou mais cópias do DNA plasmidial recombinante, a PCR resultará na formação de um amplicon com

tamanho correspondente ao cassete de expressão das quitinases com um acréscimo de 588 pb correspondente ao gene *AOX1*.

As reações de PCR foram montadas em microtubos de 0,2 mL (Kasvi), sendo utilizado 1000 ng de gDNA, 0,2  $\mu$ M de cada *primers* (5'-AOX1/3'-AOX1), 0,2 mM de cada dNTP (ATP/TTP/CTP/GTP), 1 U de *Taq* DNA polimerase (GE), tampão de reação 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e água deionizada estéril para o volume de 15,0  $\mu$ L. Foram realizadas em termociclador Tx96 plus (Thermal Cyclers, Amplitherm) programado com uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 63 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 3 min e 15 s. Após o último ciclo, as reações foram incubadas a 72 °C por 8 min, resfriadas a 4 °C e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%.

## 6.8 Produção das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* em *P. pastoris* KM71H

Os clones de *P. pastoris* KM71H cujas transformações com os vetores pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472* foram confirmadas, foram avaliados quanto à capacidade de expressar as respectivas proteínas. No total, foram avaliados 6 clones para cada construção e um clone transformado com o vetor pPICZ $\alpha$ A íntegro, utilizado como controle.

Uma alíquota do estoque em glicerol de cada clone foi estriada em meio YPDS ágar contendo zeocina 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias e, posteriormente, algumas colônias isoladas de cada clone foram inoculadas em 10 mL de caldo BMGY (Extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 1,34%, glicerol 1%, biotina 0,00004%) contendo zeocina 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Os inóculos foram incubados *overnight* a 30 °C sob agitação orbital de 180 rpm até atingir DO<sub>600nm</sub> igual a 10. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g, por 5 min a 4° C, ressuspendidas em 10 mL de água destilada estéril gelada para lavagem das células e centrifugadas nas mesmas condições. As células foram novamente ressuspendidas em água destilada estéril gelada (5 mL) para uma segunda lavagem e centrifugadas nas mesmas condições. Por fim, as células foram inoculadas em 100 mL de caldo BMMY (extrato de levedura 15, peptona 2%, tampão de potássio 100 mM pH 6,0, YNB 1,34%, metanol 0,5%, biotina 0,00004%) contendo zeocina 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, obtendo assim, uma DO<sub>600nm</sub> igual a 1,0.

Os inóculos foram incubados a 17 °C, sob agitação orbital de 180 rpm por 144 h. Para a manutenção da indução, a cada 24 h metanol 100% foi adicionado às culturas para uma concentração final de 0,5%. Neste sistema de expressão, o metanol induz à expressão do gene *AOX1*, que por sua vez, direciona a expressão do gene de interesse.

Alíquotas de 10 mL de cultura foram coletadas no início da indução e a cada 24 h (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h). A cada coleta realizada, a  $DO_{600nm}$  foi mensurada para acompanhar o aumento da densidade celular durante a indução e as células foram coletadas (por centrifugadas a 3.000 x g, por 5 min a 4 °C), pesadas e descartadas posteriormente. O sobrenadante livre de células foi dialisado contra água destilada, utilizando uma membrana de celulose com limite de exclusão de 12,4 kDa para retirada dos componentes do meio de cultura. Em seguida foi utilizado para quantificação das proteínas totais solúveis e para detectar a presença das quitinases por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e em condições redutoras (SDS-PAGE) e por ensaio de atividade quitinásica.

As quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* produzidas neste sistema heterólogo foram nomeadas de *rAoChi4849* e *rAoChi5472*, respectivamente (“r” referente a “recombinante”).

## 6.9 Dosagem de proteínas totais solúveis

A dosagem de proteínas totais solúveis foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). Neste ensaio, 100 µL de amostra (diluída ou não) foram adicionados a 2,5 mL do reagente de Bradford (*Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,01%, etanol 4,7% e ácido fosfórico 8,5%, em água deionizada). A mistura foi homogeneizada e, após 10 min em repouso a temperatura ambiente, leituras de absorbância a 595 nm foram realizadas em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (Thermo Fischer Scientific – Waltham, MA, USA). A concentração de proteínas totais solúveis foi estimada utilizando uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

## 6.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e agente redutor (SDS-PAGE)

Eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença do agente desnaturante SDS (dodecil sulfato de sódio) e do agente redutor β-mercaptoetanol foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970). O gel de concentração [Acrilamida:bisacrilamida 5,0% (m/v); Tris-HCl 0,126 M, pH 6,8; SDS 0,1% (m/v); TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane) 58,12 M; persulfato de amônio 0,1% (m/v)] e o gel de separação [Acrilamida:bisacrilamida 15% (m/v); Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8; SDS 0,1% (m/v); TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane) 46,496 M; persulfato de amônio 0,1% (m/v)] foram montados entre duas placas de vidro vedadas nas laterais e na parte inferior, de modo a proporcionar a espessura de 2 mm para o gel.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0% (v/v); glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v)] 4 vezes concentrado, aquecidas a 100 °C por 10 min, resfriada a temperatura ambiente e em seguida 30  $\mu$ L foram aplicados no gel. Os marcadores *Low Weight Marker* (GE healthcare) e *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific), contendo proteínas com peso molecular conhecido, foram utilizados como padrão. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 120 V em tampão Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v). Após a corrida, os géis foram corados de acordo com protocolo descrito por Candiano et al., 2004 e Dyballa e Metzger, 2009.

### **6.11 Ensaio enzimático para determinação de atividade quitinásica**

A atividade quitinásica foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Legrand et al., (1987). O ensaio tem como base a detecção do *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) liberado a partir da ação hidrolítica sobre a quitina coloidal preparada a partir da quitosana, conforme metodologia descrita por Reissig; Strominger e Leloir (1955).

Neste ensaio, a atividade enzimática total mensurada engloba a ação endo e exoquitinásica. Inicialmente, 250  $\mu$ L da amostra de proteína em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 foram incubados com 250  $\mu$ L de quitina coloidal 1% a 37 °C por 1 h sob leve agitação. Nesta etapa a atividade hidrolítica da quitinase libera oligômeros solúveis em água a partir de quitina coloidal. Após esse tempo, a reação foi interrompida por incubação a 100 °C por 5 min em banho-maria e, imediatamente, resfriada em banho de gelo por 5 min. Em seguida o material foi centrifugado a 10.000 x g, por 10 min em MiniSpin® (Eppendorf) com rotor F45-12-11, à temperatura ambiente para retirada do excesso de substrato insolúvel. O precipitado foi descartado e 300  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e incubado com 10  $\mu$ L de uma solução de  $\beta$ -Glucuronidase (13,1 U/mL) a 37 °C, por 1 h sob leve agitação. Esta etapa permite que os oligossacarídeos possivelmente produzidos por uma endoquitinase sejam clivados em GlcNAc. Em seguida, a reação foi interrompida por incubação a 100 °C por 5 min em banho-maria, seguida de resfriamento em banho de gelo por 5 min. A amostra obtida foi incubada com 190  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e 100  $\mu$ L de tetraborato de potássio 0,6 M a 100 °C por 5 min e resfriada em banho de gelo por 5 min. Em seguida, foi incubada novamente com 1 mL de DMAB [p-dimetilaminobenzaldeído 10% (m/v) preparado em ácido acético contendo 12,5% de HCl 11,5 M], diluído 2x em ácido acético, por 20 min a 37 °C sob leve agitação e teve sua absorbância mensurada a 585 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso pela média dos três valores de absorvância obtidos. A atividade quitinásica foi calculada em planilha construída no programa Excel da Microsoft (Versão 2012 para Windows), onde foi possível estimar a quantidade de GlcNAc liberada nas reações enzimáticas das quitinases, a partir de uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de GlcNAc comercial (100 a 600  $\mu\text{M}$ ) (REISSIG; STROMINGER; LELOIR, 1955). A atividade enzimática foi expressa em unidade de atividade enzimática (U), definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de GlcNAc por 1 mL em 1 h a 37 °C.

## **6.12 Purificação das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472**

### **6.12.1 Fracionamento das proteínas com sulfato de amônio**

O clone de *P. pastoris* KM71H recombinante com melhor rendimento na expressão das quitinases foi utilizado na preparação de uma indução em larga escala (1 litro). Esta indução foi realizada nas mesmas condições já descritas na seção 6.8, com o tempo de coleta padronizado para 144 h. O meio livre de células foi analisado por SDS-PAGE, utilizado para determinação da concentração de proteínas totais solúveis, para ensaio de atividade quitinásica e submetido a fracionamento e concentração das proteínas totais solúveis por precipitação com sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ .

Para este procedimento, o sulfato de amônio foi adicionado à amostra, sob agitação constante, para os intervalos de saturação de 0-35%, 35-65% e 65-95% com a finalidade de se obter uma fração mais pura contendo as quitinases (GREEN; HUGHES, 1955). Após a adição e completa dissolução do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a amostra foi mantida em repouso *overnight* a temperatura ambiente e posteriormente foi centrifugada a 12.000 x g, por 20 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para obtenção da fração seguinte, seguindo o mesmo procedimento, e o precipitado foi solubilizado em um pequeno volume de água destilada. As frações obtidas, F0/35, F35/65 e F65/95, foram exaustivamente dialisadas contra água destilada em uma membrana de celulose com limite de exclusão de 12,4 kDa. Àquela que possivelmente contém as quitinases recombinantes foi utilizada no processo de purificação das quitinases, realizado através de cromatografia de afinidade com íon metálico imobilizado (IMAC - *Immobilized metal ion affinity chromatography*).

### 6.12.2 Cromatografia de afinidade em níquel imobilizado

Após as proteínas serem concentradas com sulfato de amônio, a fração proteica contendo a proteína recombinante foi dialisada contra o tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 500 mM e Imidazol 5 mM por 24 h. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g, por 20 min a 4 °C para retirada de proteínas insolúveis e o sobrenadante límpido foi aplicado na matriz cromatográfica composta de 3 mL de Ni-*Sepharose 6 Fast Flow* de alta performance (GE Healthcare) equilibrada com o tampão de equilíbrio, que contém imidazol 5 mM para evitar a ligação de proteínas indesejáveis. A amostra circulou duas vezes na coluna cromatográfica e as proteínas que não se ligaram à matriz, ou interagiram fracamente, foram eluídas com o tampão de equilíbrio até que a Absorbância a 280 nm do eluato fosse menor que 0,030. Em seguida, o mesmo tampão contendo quantidades crescentes de imidazol (25, 100 e 250 mM) foi aplicado na matriz cromatográfica para permitir a eluição das proteínas retidas. O fluxo de eluição foi de 1 mL.min<sup>-1</sup>, sendo coletadas frações de 3 mL. Por fim, a matriz foi regenerada por lavagem com Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, e as frações obtidas com absorbância a 280 nm maior que 0,100 para cada concentração de imidazol foram reunidas e dialisadas contra água destilada. A pureza das proteínas recombinantes foi avaliada por SDS-PAGE, a concentração foi determinada pelo método de Bradford e a atividade quitinásica foi verificada pelo ensaio enzimático já descrito.

### 6.13 Identificação das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 por espectrometria de massas

A fim de confirmar a sequência primária das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 produzidas em *P. pastoris* KM71H, amostras das proteínas purificadas foram analisadas por espectrometria de massas. Inicialmente, amostras contendo as proteínas foram aplicadas em gel SDS-PAGE. As bandas referentes a cada uma das quitinases foram excisadas do gel e submetidas a tratamento com a enzima tripsina. Os peptídeos obtidos foram extraídos do gel de acordo com Shevchenko et al., (2007).

Os peptídeos tripticos foram separados em uma coluna de fase reversa BEH300 C18 (100 µm × 100 mm) eluída a um fluxo de 600 µL/min e um gradiente linear de 10 % a 85 % de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido fórmico em um sistema nanoAcquity (Waters Corp) conectado a uma fonte de nanoelectrospray de um espectrômetro de massas híbrido (SYNAPT HDMS – Waters Corp). O espectrômetro de massas operou em modo positivo, sob voltagem do

capilar de 3,5 kV e temperatura da fonte de 90 °C, e foi calibrado com íons de ácido fosfórico. O *Lockmass* utilizado foi  $m/z$  686,8461. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (*Data Dependent Analysis* – Análise Dependente de Dados), sendo selecionados para análise de MS/MS íons precursores dupla- e triplamente carregados. Os íons selecionados foram fragmentados por CID (*Collision Induced Dissociation*), utilizando argônio como gás de fragmentação e a rampa de energia de colisão variou de acordo com o estado de carga do precursor selecionado. A aquisição dos dados foi realizada na faixa de  $m/z$  de 300 a 2100 para o modo MS (1scan/seg.) e  $m/z$  de 50-2500 para modo MS/MS. Os espectros foram coletados com o software MassLynx v4.1, processados pelo software ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.) e submetidos a uma busca em banco de dados local, utilizando as sequências de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* já conhecidas.

## **6.14 Caracterização bioquímica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472***

### ***6.14.1 Atividade quitinásica com diferentes substratos***

A atividade enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* foi avaliada utilizando diferentes substratos: quitina coloidal, quitina insolúvel (matriz de carapaça de caranguejo obtida comercialmente - Sigma) e quitosana com grau de desacetilação de 80%. Todos os substratos foram preparados na concentração de 1% (m/v), utilizando a metodologia descrita por Choi et al., (2004) para a preparação da quitosana e a metodologia descrita por Reissig; Strominger; Leloir, (1955) para a preparação da quitina coloidal. Para a preparação da quitina insolúvel, 25 mg foram resuspendidos em 2,5 mL de água destilada.

Nas atividades, 250 µL dos substratos foram incubados com 250 µL de amostra das quitinases purificadas (37,5 µg) por 1 h a 37 °C. Após o tempo de incubação, o ensaio de atividade quitosanásica foi prosseguido de acordo com o método descrito por Miller (1959), com alterações, e as atividades quitinásicas foram realizadas como já descrito na seção 6.11. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso em média ± DP.

### ***6.14.2 Atividade quitinásica na presença e ausência de $\beta$ -glucuronidase***

Para avaliar se as quitinases purificadas, *rAoChi4849* e *rAoChi5472*, possuem atividade endo e/ou exoquitinásica, ensaios de atividade quitinásica foram realizados na presença e na ausência da enzima  $\beta$ -Glucuronidase. Para verificar o potencial endoquitinásico,



a atividade foi realizada seguindo a mesma metodologia já descrita na seção 6.11, e para verificar o potencial exoquitinásico, a atividade foi realizada seguindo a mesma metodologia, porém, substituindo a  $\beta$ -glucuronidase por água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso em média  $\pm$  DP.

#### **6.14.3 Efeito do pH na atividade quitinásica**

Esse experimento foi realizado para determinar o pH ótimo para a atividade quitinásica da rAoChi4849 e da rAoChi5472. Para isso, as proteínas purificadas foram preparadas para a concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em diferentes tampões na concentração de 50 mM: Glicina-HCl pH 2, Glicina-HCl pH 3, Acetato de sódio pH 4, Acetato de sódio pH 5, Acetato de sódio pH 6, Tris-HCl pH 7, Tris-HCl pH 8, Glicina-HCl pH 9 e Glicina-HCl pH 10. Após a preparação das soluções de proteína, o ensaio de atividade quitinásica foi realizado como descrito na seção 6.11.

A estabilidade das quitinases frente a variação do pH também foi avaliada. Inicialmente, soluções de proteína purificada foram preparadas para a concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  nos mesmos tampões citados acima, e incubadas por 24 h à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram dialisadas por 24 h no tampão para o qual as quitinases apresentaram melhor atividade. Em seguida, o ensaio de atividade quitinásica foi realizado como descrito na seção 6.11. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso em média  $\pm$  DP.

#### **6.14.4 Efeito da temperatura na atividade quitinásica**

A temperatura ótima para a atividade quitinásica da rAoChi4849 e da rAoChi5472 foi determinada realizando ensaios enzimáticos, como já descrito na seção 6.11, em diferentes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C.

A estabilidade das quitinases em diferentes temperaturas também foi avaliada. Inicialmente amostras de proteína purificada foram incubadas em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por 1 h em banho-maria. Após o tratamento térmico, as amostras foram resfriadas e utilizadas para determinação da atividade quitinásica, como já descrito na seção 6.11, na temperatura em que apresentaram melhor atividade. Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso em média  $\pm$  DP.

#### **6.14.5 Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade quitinásica**

O efeito de íons metálicos e agentes químicos desnaturantes, quelantes e redutores sobre a atividade enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* foi investigado. Para isso, as proteínas purificadas foram incubadas por 1 hora a 30 °C na presença de soluções de AlCl<sub>3</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CsCl, PbCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, LaCl<sub>2</sub>, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, AgCl, RbCl e ZnCl<sub>2</sub> na concentração final de 5 mM e na presença de soluções de SDS (0,5, 1,0 e 2,0%), EDTA (5, 50 e 100 mM), DTT (5, 50 e 100 mM) e β-mercaptoetanol (5%). Após o tempo de incubação, o ensaio de atividade quitinásica foi realizado, conforme descrito na seção 6.11.

O efeito do Cloreto de Sódio (NaCl) sobre a atividade enzimática das quitinases também foi investigado. Para isso, ensaios de atividade quitinásica das proteínas purificadas foram realizados na presença de NaCl em diferentes concentrações: 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 M.

Os testes foram realizados em triplicata, e o resultado expresso em média ± DP foi comparado à atividade das quitinases sem a presença dos tratamentos através da aplicação do teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

#### **6.14.6 Análise por Dicroísmo Circular**

O dicroísmo circular ou CD (do inglês *Circular Dichroism*) é uma técnica de espectroscopia que tem como base a absorção diferenciada da luz circularmente polarizada, no sentido horário e ou anti-horário, por cromóforos que possuem quiralidade intrínseca ou são colocados em ambientes quirais. Nas proteínas, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são as ligações peptídicas, os resíduos aromáticos do triptofano, da tirosina e da fenilalanina, e as ligações dissulfeto. Na região do UV distante (190 nm a 240 nm), a ligação peptídica é o principal grupo absorvente e estudos nesta região podem fornecer informações sobre a estrutura secundária das proteínas (KELLY; PRICE, 2000).

A estabilidade estrutural das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* em diferentes condições de pH e temperatura foi investigada por análises de CD em espectropolarímetro Jasco, modelo J-815 (Jasco International Corporation, Tóquio, Japão) conectado a um *peltier* com temperatura controlada. As amostras de proteína purificada foram adicionadas a uma cubeta retangular de quartzo com caminho ótico de 0,1 cm e analisadas na região do UV distante (190 a 240 nm). Os espectros foram gerados a uma velocidade de varredura de 50 nm.min<sup>-1</sup>, com média de 8 varreduras e largura de banda de 1 nm, sob N<sub>2</sub> constante e temperatura de 20 °C.

O efeito do pH na estrutura secundária das quitinases foi avaliado. Amostras da quitinase rAoChi4849 a 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> foram preparadas nos tampões Glicina HCl pH 2, Acetato de sódio pH 5 e Glicina HCl pH 10, e amostras da quitinase rAoChi5472 a 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> foram preparadas nos tampões Glicina HCl pH 2, Acetato de sódio pH 6 e Glicina HCl pH 10, todos na concentração de 50 mM. As proteínas ficaram em contato com os tampões por 24 horas a 4 °C e em seguida os espectros de CD foram obtidos a 20 °C na faixa de 190 a 240 nm.

Os parâmetros termodinâmicos de enovelamento e desnaturação das quitinases foram analisados com amostras de proteína a 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>. Para o cálculo da temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>), as mudanças na elipticidade molar em função da temperatura, entre 20 e 95 °C, foram monitoradas a 215 nm com uma rampa de temperatura com taxa de 3 °C.min<sup>-1</sup> e amostragem obtida a cada 1 °C. Espectros entre 190 e 240 nm foram obtidos após as quitinases serem submetidas, por 5 min, à temperatura de 20 °C, onde espera-se que se apresentem na conformação nativa, e a 95 °C, onde espera-se que se apresentem desnaturadas (GREENFIELD, 2006a). Após a desnaturação a 95 °C as amostras retornaram à temperatura de 20 °C e uma nova medida de CD foi realizada para verificar a reversibilidade da desnaturação térmica.

Os espectros obtidos nas análises foram corrigidos com o “branco”, água ou tampão, e a elipticidade molar residual ([θ]) expressa em miligráus (mdeg).

#### **6.14.7 Cinética enzimática**

Os parâmetros cinéticos da atividade enzimática da rAoChi4849 e da rAoChi5472 foram determinados a partir da atividade quitinásica específica obtida em 60 min de incubação, a 40 °C, com a quitina coloidal. Os ensaios enzimáticos foram realizados, conforme descrito na seção 6.11, com amostras da proteína purificada rAoChi4849 a 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e rAoChi5472 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, com concentração final de quitina coloidal variando de 0,5 a 5 mg.mL<sup>-1</sup> (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média dos três valores obtidos.

Os valores da velocidade enzimática (atividade quitinásica expressa em nmol de GlcNAc obtido por nmol de enzima em 1 min) para cada concentração de substrato foram calculados no Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posteriormente plotados no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego California USA) com linha de tendência logarítmica, onde foram obtidos os valores de V<sub>máx</sub>, K<sub>m</sub>, K<sub>cat</sub> e a Eficiência Catalítica (K<sub>cat</sub>/ K<sub>m</sub>) (DA CRUZ et al., 2019).

### **6.14.8 Perfil da produção de oligômeros**

O perfil dos oligômeros de GlcNAc produzidos pela ação enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*, utilizando a quitina coloidal como substrato, foi investigado por espectrometria de massas.

Para obtenção dos oligômeros, 1,0 mL de amostra de cada quitinase foi preparado para na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão acetato de sódio 50 mM em pH 5,0 para a *rAoChi4849* e pH 6,0 para a *rAoChi5472*. Em seguida, as amostras foram incubadas com 1,0 mL de quitina coloidal 1% por 24 h a 40 °C em incubadora sob agitação constante (TE-422, TECNAL). Após esse tempo, as amostras foram incubadas a 100 °C por 5 min para inativação da enzima e centrifugadas a 12.000 x g, por 10 min a 20 °C. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante, contendo os oligômeros de GlcNAc solúveis, foi utilizado para quantificação de açúcares redutores com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959).

A massa molecular média dos oligômeros de GlcNAc obtidos foi determinada por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS). A amostra foi dissolvida em uma solução de acetonitrila 50% contendo ácido fórmico 0,2%, para a concentração de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 100 µL foi centrifugada a 8.000 x g por 5 min e depois carregada em uma fonte de nanoelectrospray acoplada a um espectrômetro de massa Synapt HDMS ESI-Q-ToF (Waters Corp., Milford, MA, EUA), usando uma seringa de Hamilton. O instrumento foi calibrado com de ácido fosfórico, operado no modo positivo, usando uma temperatura da fonte de 363K e voltagem capilar a 2,5 kV. Os espectros de massa foram adquiridos por varredura na faixa de *m/z* de 100 a 1.500 e a 1 *scans/s*. A coleta e o processamento dos dados foram controlados pelo software MassLynx 4.1 (Waters).

## **6.15 Atividade biológica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472***

### **6.15.1 Atividade sobre o crescimento micelial de fungos filamentosos fitopatogênicos**

A ação antifúngica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* sobre espécies de fungos filamentosos fitopatogênicos foi realizada utilizando-se os métodos descritos por Lopes Neto (2014), com modificações.

O cultivo dos fungos filamentosos (isolados CCJ127, CCJ166, CCJ184, BAN7, BAN16, BAN100 e BAN225) foi realizado em placa de Petri (90 cm x 15 mm) contendo meio

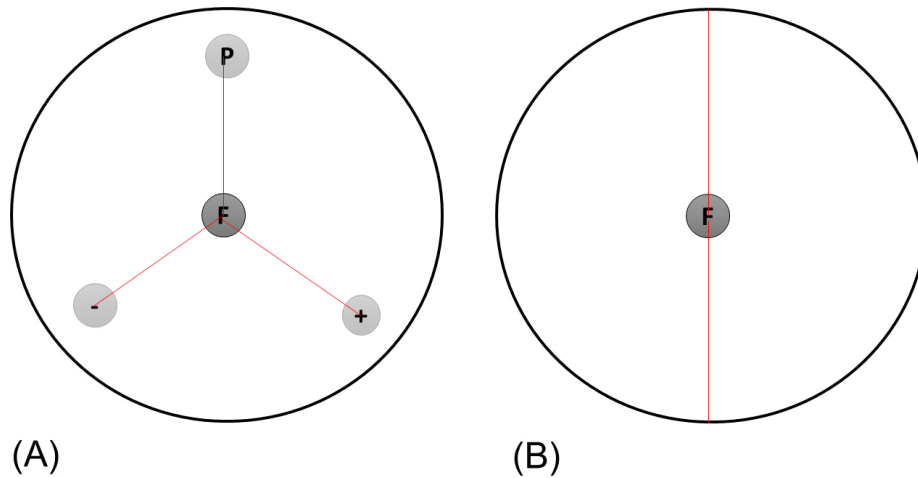
de cultura BDA (*Potato Dextrose Agar* M096, HIMEDIA). Os fungos foram mantidos em sala de incubação a temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 10 h de claro e 14 h de escuro, e renovados pela transferência de um fragmento de micélio com 8 mm de diâmetro para uma nova placa com BDA a cada 15 dias.

Os ensaios de atividade antifúngica foram montados de duas formas diferentes. Na primeira, discos de micélio de 8 mm de diâmetro foram retirados de placas com oito dias de incubação e repicados no centro de novas placas contendo 20 mL de BDA. Em seguida, os tratamentos foram adicionados sobre discos de papel filtro de 10 mm de diâmetro colocados sobre a superfície do meio BDA equidistantes 2,0 cm do disco fúngico (Figura 4A). Na segunda, cada tratamento foi espalhado sobre a superfície de uma placa contendo BDA com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, um disco de micélio de 8 mm de diâmetro obtido de placas com oito dias de incubação foi adicionado sobre as placas contendo cada tratamento (Figura 4B). Em ambos os ensaios os seguintes tratamentos foram utilizados: uma solução de proteína (*rAoChi4849* ou *rAoChi5472*) na dose de 500 µg, 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) como controle negativo da *rAoChi4849*, 100 µL de água destilada estéril como controle negativo da *rAoChi5472*, o fungicida carbendazim na dose de 2 ou 5 µg como controle positivo dos isolados BAN7, CCJ127, CCJ166 e CCJ184 e o fungicida tiabendazol na dose de 5 mg como controle positivo para os isolados BAN16, BAN100 e BAN225.

Todos os tratamentos, exceto os fungicidas, foram esterilizados por filtração em membrana de ultrafiltração (0,22 µm - KASVI). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada isolado fúngico, sendo cada uma das repetições constituída de uma placa contendo todos os tratamentos, nos ensaios realizados pela difusão dos tratamentos em discos de papel, e uma placa para cada tratamento, nos ensaios realizados pelo espalhamento dos tratamentos no meio BDA. Todos os processos foram realizados em câmara de fluxo laminar. As placas foram mantidas em sala de incubação a 28 °C, com fotoperíodo de 10 h de claro e 14 h de escuro, até o micélio atingir a borda da placa.

Para a avaliação da ação antifúngica das quitinases fez-se os seguintes procedimentos: nos ensaios realizados utilizando discos de papel, uma reta foi construída sobre a placa de Petri ligando o centro da placa, onde foi colocado o disco fúngico, ao centro dos discos de papel, onde foram adicionados os tratamentos (Figura 4A); nos ensaios realizados pelo espalhamento dos tratamentos sobre o meio BDA, uma reta foi construída sobre a placa de Petri ligando o centro da placa, onde foi colocado o disco fúngico, às extremidades da placa (Figura 4B). A cada 24 h de incubação, o crescimento micelial foi medido com auxílio de um paquímetro (DIGIMESS) sobre as retas construídas nas placas e fez-se registros fotográficos.

Figura 4 – Esquema de montagem dos ensaios de atividade antifúngica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*.



Fonte: elaborada pela autora. Esquema de montagem dos ensaios de atividade antifúngica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*. (A) Ensaio realizado pela difusão dos tratamentos em discos de papel. F: disco fúngico (8 mm). P: proteína recombinante na dose de 500  $\mu\text{g}$ ; +: controle positivo, carbendazim (2  $\mu\text{g}$ ) ou tiabendazol (5 mg); -: controle negativo, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (para a *rAoChi4849*) ou água destilada estéril (para a *rAoChi5472*). (B) Ensaio realizado pelo espalhamento dos tratamentos na superfície do meio BDA. F: disco fúngico (8 mm). A reta vermelha representa a faixa padrão desenhada para orientar a medição do micélio fúngico.

### 6.15.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O efeito da atividade antifúngica da quitinase *rAoChi5472* sobre o desenvolvimento micelial de um isolado fúngico foi analisado por MEV.

As amostras biológicas foram obtidas a partir de placas montadas durante o experimento de atividade antifúngica. Inicialmente, cortes de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> foram realizados na área micelial em contato com os tratamentos (proteína, antifúngico e água) e incubados em uma solução de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 5% CaCl 0,05%) para a fixação primária do material biológico. As amostras foram armazenadas a 4 °C e posteriormente utilizadas. Na sequência, a solução de Karnovsky foi descartada e a amostra lavada três vezes com tampão Cacodilato 50 mM, pH 7,0, com um intervalo de tempo de 10 min em cada lavagem. Em seguida, foi realizada a fixação secundária com Tetróxido de Ósmio 1% por 1 h. Após este tempo, o fixador foi descartado e as amostras lavadas três vezes com água destilada, com um intervalo de tempo de 10 min em cada lavagem. Em seguida, as amostras foram desidratadas por lavagens com diluições sucessivas de etanol (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90%), com um intervalo de 15 min em cada lavagem. Na etapa final de desidratação, as amostras foram lavadas três vezes com etanol 100% e transferidas para “gaiolas”, suportes onde foram secas em aparelho de secagem ao ponto crítico (Quorum K850). Após secagem, as

amostras foram montadas em porta amostras (*stubs*) e recobertas com uma camada de ouro em metalizadora (Emitech K550). Posteriormente foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (TESCAN, modelo VEGA 3 SBU), sob uma voltagem de aceleração de 15 kv, para visualização da estrutura micelial e obtenção das imagens (BOZZOLA; RUSSELL, 1999).

### 6.15.3 Atividade com fungos leveduriformes do gênero *Candida*

A investigação da atividade antifúngica das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 sobre leveduras do gênero *Candida* foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 do *Clinical e Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M do ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, EUA). Os ensaios foram realizados com as cepas de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 e uma cepa clínica de *C. albicans* resistentes ao antifúngico fluconazol - *C. albicans* 2 (71).

As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35° C por 24 h. Após esse tempo, uma suspensão de inóculo inicial foi preparada de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção do inóculo final contendo 0,5 a 2,5 x 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Soluções das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472, em diferentes concentrações (750 a 1,46 µg.ml<sup>-1</sup>), foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e água, respectivamente. Em seguida, as diferentes concentrações de proteína foram incubadas com os inóculos, preparados para cada cepa, em microplacas de 96 poços a uma temperatura de 35 °C por 24 h. Tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e água, também foram utilizados como tratamento (controle). Após o tempo de incubação, as placas foram examinadas visualmente para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração da substância capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o resultado verificado no poço controle contendo somente meio de cultura e no poço controle contendo o inóculo sem tratamento (CLSI, 2008). Os testes foram realizados em triplicata para todas as cepas testadas, sendo cada uma das repetições constituída de um experimento independente.

Em virtude da quitinase rAoChi5472 ter apresentado atividade antifúngica, sobre estas cepas de *Candida*, em concentrações baixa de proteína, inclusive sobre a cepa clínica, novos testes antifúngicos foram realizados com esta proteína na faixa de 800 a 2 µg.ml<sup>-1</sup>, incluindo novas cepas de *Candida*. Para isso, foram utilizadas seis cepas clínicas de *C. albicans* (duas sensíveis ao fluconazol e quatro resistentes), cinco cepas clínicas de *C. parapsilosis* (duas

sensíveis ao fluconazol e três resistentes) e quatro cepas clínicas de *C. tropicalis* (uma sensível ao fluconazol e três resistentes). As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose, incubadas a 35 °C por 24 h e utilizadas para determinação da CIM, como descrito acima.

#### **6.15.4 Atividade com cepas de Bactérias**

A investigação da atividade antibacteriana das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* foi realizada sobre as cepas de bactérias *S. aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* ATCC 65398 metilina resistente (MRSA) e uma cepa clínica de *S. aureus* (*S. aureus* 1 MRSA), pela técnica de diluição em microplacas de 96 poços, de acordo com a metodologia descrita no protocolo M7-A10 do CLSI (CLSI, 2015).

As bactérias foram cultivadas a 35 °C por 24 h em ágar Mueller-Hinton e, após esse tempo, foram utilizadas para a preparação de um inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland. Em seguida, este inóculo foi diluído em caldo Mueller-Hinton para a concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Soluções das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*, em diferentes concentrações (1500 a 2,92 µg.ml<sup>-1</sup>) foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e água, respectivamente. Em seguida, as diferentes concentrações de proteína foram incubadas com os inóculos das bactérias em microplacas de 96 poços por 20 h a 35 °C. Tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e água foram utilizados como tratamento controle. Após o tempo de incubação, as placas foram examinadas visualmente para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração da substância capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo, em comparação com o resultado verificado no poço controle contendo somente meio de cultura e no poço controle contendo o inoculo sem tratamento (CLSI, 2015). Os testes foram realizados em triplicata para todas as cepas testadas, sendo cada uma das repetições constituída de um experimento independente.

#### **6.16 Análise estatística**

Todos os experimentos de atividade quitinásica e os ensaios de atividade antifúngica e antibacteriana foram realizados em triplicata. O efeito dos íons metálicos e dos agentes químicos na atividade quitinásica e a atividade antifúngica sobre os fungos filamentosos foram comparados aos seus respectivos controles pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni usando o programa GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego California USA). Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .



## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

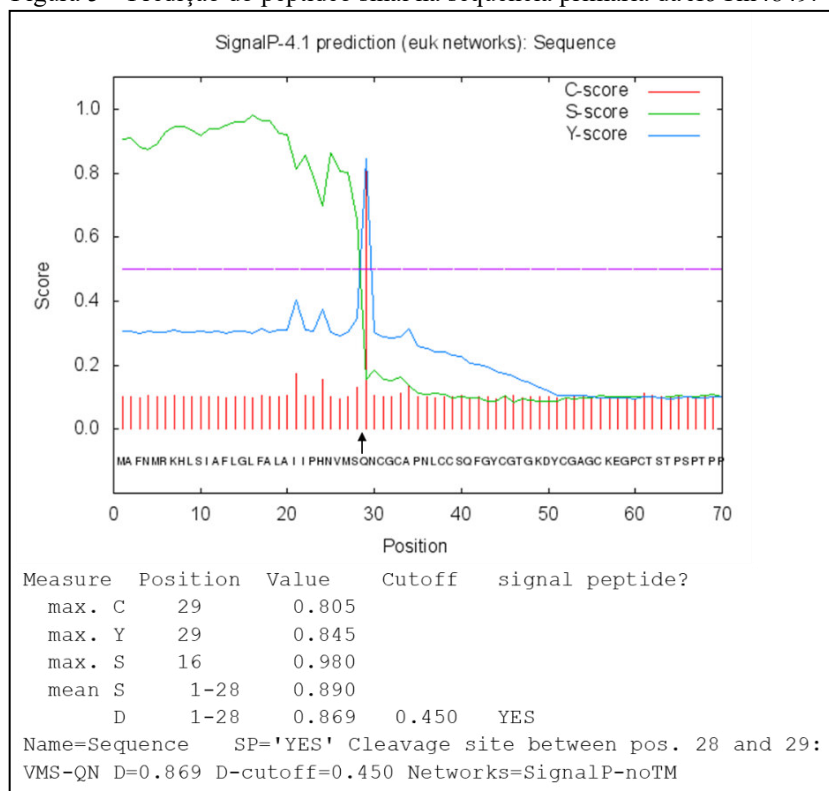
### 7.1 Análise *in silico* da sequência de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472*

As sequências de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* foram obtidas a partir da sequência de nucleotídeos (APÊNDICE A) no ExPASy *Translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>). As sequências de aminoácidos obtidas correspondem a proteínas de 274 e 322 resíduos de aminoácidos para as ORF *AoChi4849* e *AoChi5472*, respectivamente (APÊNDICE C).

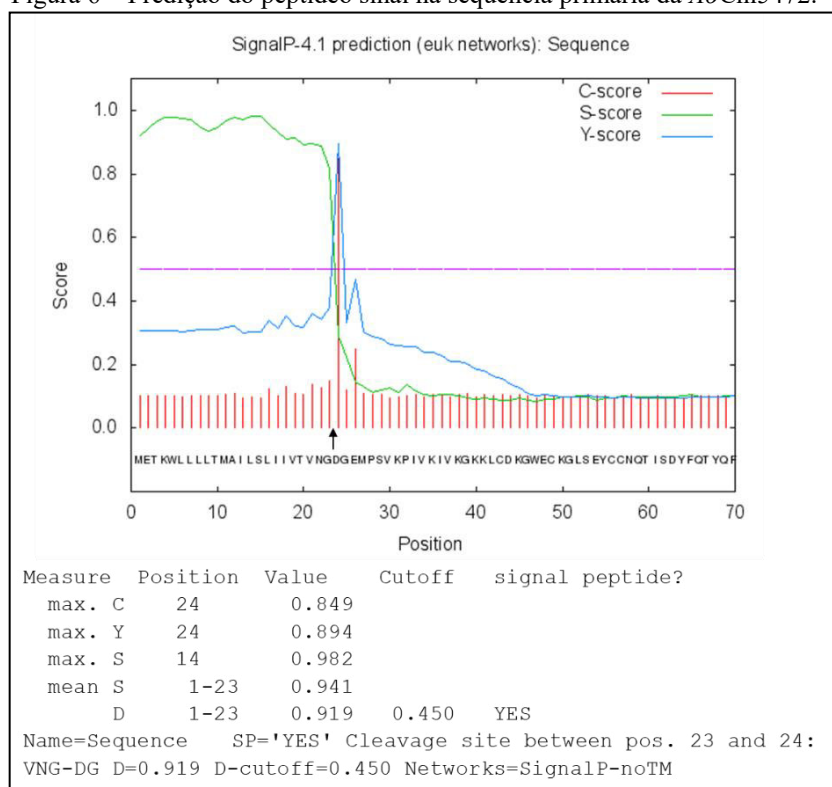
#### 7.1.1 Predição de peptídeo sinal

A análise no *SignalP* 4.1 da sequência de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* indicou que ambas apresentam peptídeo sinal na região N-terminal, sugerindo que sejam sintetizadas como pré-proteínas. Para a *AoChi4849* o peptídeo sinal corresponde aos resíduos 1-28 (Figura 5) e para a *AoChi5472* aos resíduos 1-23 (Figura 6).

Figura 5 – Predição do peptídeo sinal na sequência primária da *AoChi4849*.



Fonte: elaborada pela autora. Análise da sequência primária da *AoChi4849* no *SignalP* 4.1 mostrando a presença de um peptídeo sinal com 28 aminoácidos.

Figura 6 – Predição do peptídeo sinal na sequência primária da *AoChi5472*.

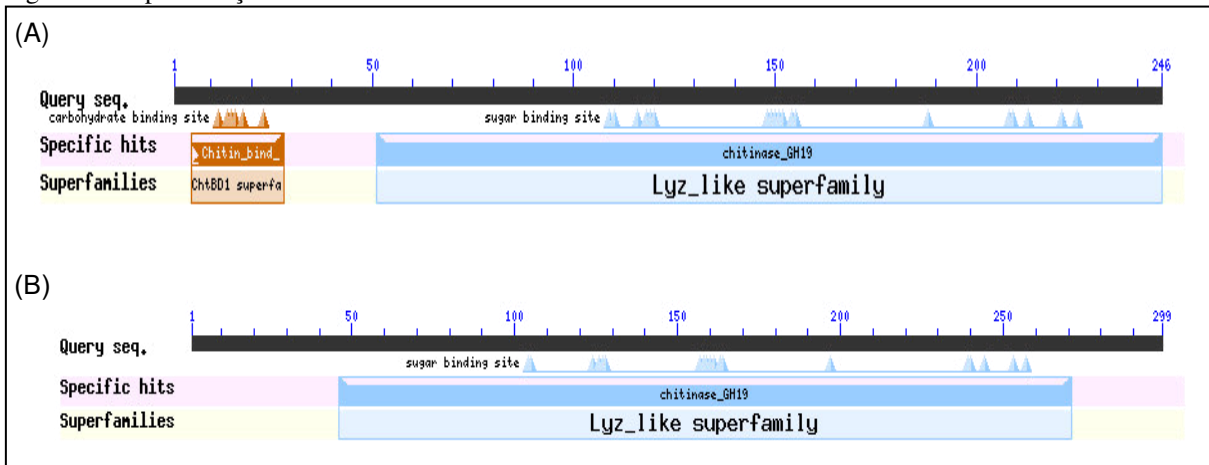
Fonte: elaborada pela autora. Análise da sequência primária da *AoChi5472* no *SignalP* 4.1 mostrando a presença de um peptídeo sinal com 23 aminoácidos.

A previsão da sequência primária do peptídeo sinal das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* foi fundamental na projeção dos cassetes de expressão destinados ao vetor pPICZαA. Nessa estratégia, faz-se a remoção desses resíduos e considera-se apenas a sequência primária da proteína madura, já que o vetor garante a secreção das proteínas recombinantes devido a presença do sinal de secreção de *S. cerevisiae* (fator α) (DALY; HEARN, 2005).

### 7.1.2 Predição de domínios

A busca por domínios conservados no CDD com a sequência primária das proteínas maduras (APÊNDICE C) mostrou que as duas quitinases apresentam região conservada característica das quitinases\_GH19 pertencentes à superfamília lisozima-like, confirmando dados mostrados por Aragão (2015). A *AoChi4849* apresenta um domínio de ligação à quitina tipo 1 (ChtBD1), referente aos resíduos 5-28 na região N-terminal (número de acesso no CDD: cd00325) e um domínio catalítico (CatD) quitinase\_GH19 na região C-terminal referente aos resíduos 51-246 (número de acesso: Pfam00187), separados por uma região rica em Pro e Glv. Já a *AoChi5472* apresenta apenas o domínio catalítico quitinase\_GH19 na região C-terminal (número de acesso: cd00325) referente aos resíduos 46-270 (Figura 7).

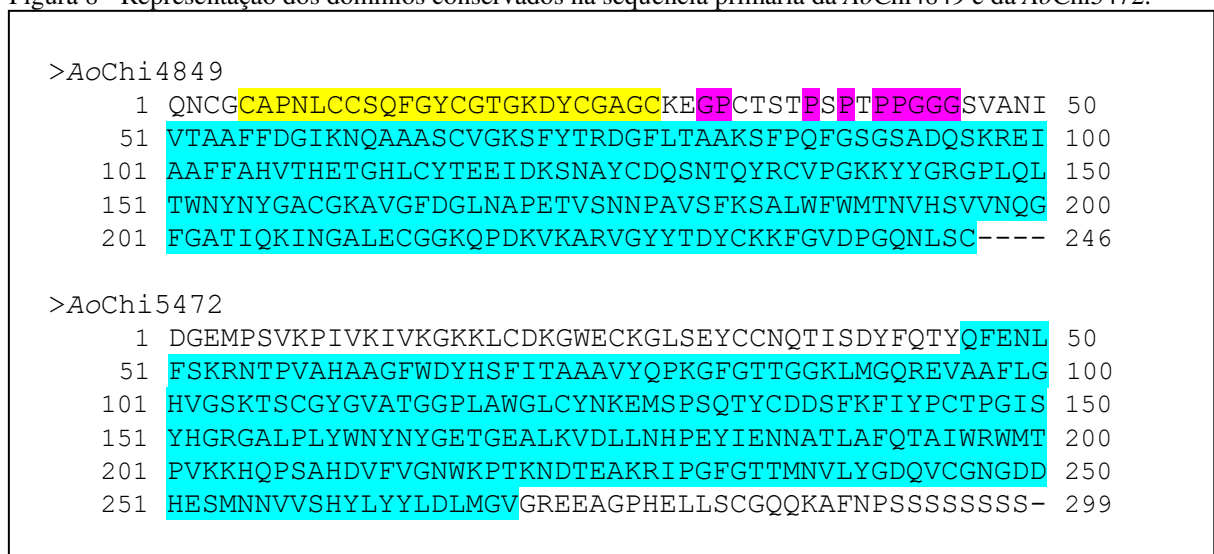
Figura 7 - Representação dos domínios conservados na *AoChi4849* e *AoChi5472*.



Fonte: elaborada pela autora. Domínios conservados identificados nas quitinasas do cajueiro através da busca de danos no CDD. (A) Domínio de ligação à quitina (resíduos 5-28) e domínio catalítico quitinase\_GH19 (resíduos 51-246) da *AoChi4849*. (B) Domínio catalítico quitinase\_GH19 (resíduos 46-270) da *AoChi5472*.

A figura 8 mostra que a estrutura primária da *AoChi4849* sem os resíduos de aminoácidos referentes ao peptídeo sinal corresponde a 246 resíduos de aminoácidos, compreendendo um domínio de ligação à quitina de 24 resíduos (em amarelo: 5-28) e um domínio catalítico de 196 resíduos (em azul turquesa: 51-246). A estrutura primária da *AoChi5472*, sem os resíduos de aminoácidos referente ao peptídeo sinal, corresponde a 299 resíduos de aminoácidos e apresenta um domínio catalítico de 225 resíduos (em azul turquesa: 46-270). Os resíduos de prolina e glicina do *link* entre o domínio de ligação e o domínio catalítico da *AoChi4849* estão marcados na cor lilás.

Figura 8 - Representação dos domínios conservados na sequência primária da *AoChi4849* e da *AoChi5472*.



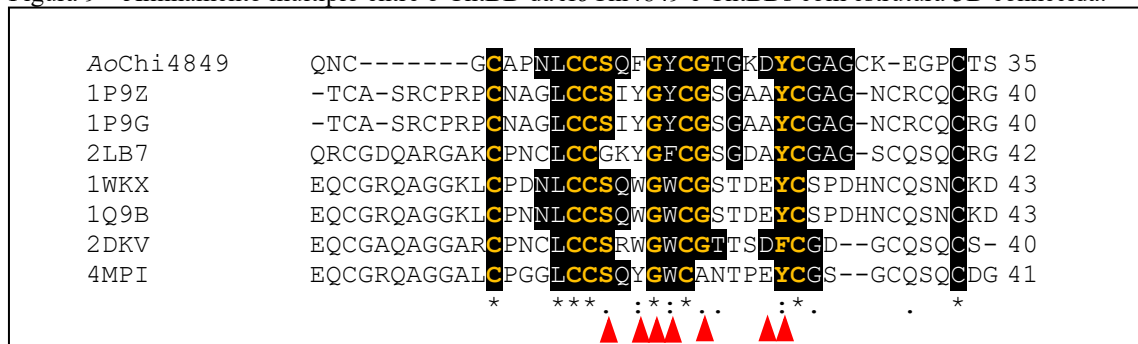
Fonte: elaborada pela autora. Os resíduos de aminoácidos das sequências primárias das proteínas estão numerados à direita e à esquerda das sequências. Na cor amarela está o ChtBD (resíduos 5-28) da *AoChi4849*, na cor lilás estão os resíduos de Pro e Glv do *link* entre o ChtBD e o CatD da *AoChi4849* e na cor azul turquesa estão os CatD quitinase\_GH19 da *AoChi4849* (resíduos 51-246) e da *AoChi5472* (resíduos 46-270), respectivamente.

Segundo Kesari et al. (2015), o genoma de plantas contém um grande número de sequências que codificam proteínas com alta semelhança e homologia estrutural com quitinases GH18 e GH19, e que eventos de duplicação de genes de quitinases seguidos por mutação resultaram em substituições no ChtBD ou CatD e, conseqüentemente, na perda da capacidade de se ligar a quitina e na perda da atividade catalítica, como é o caso de muitas CLPs (Proteínas semelhantes a quitinase). Esses achados sugerem que a perda do ChtBD de uma quitinase pode ocorrer como resultado de um evento evolutivo durante a duplicação do gene e o mesmo pode ter ocorrido com a *AoChi5472*. Mesmo assim, muitas CLPs sem ChtBDs típicos, podem se ligar à quitina com alta afinidade assim como quitinases, devido a afinidade de alguns resíduos de aminoácido a este polissacarídeo (KESARI et al., 2015).

Quando presente, o ChtBD das quitinases ocorre tipicamente na região N-terminal, contém de 30 a 43 resíduos de aminoácidos e até oito resíduos conservados de Cys formando ligações dissulfeto (PRICE et al., 2015). A estrutura primária do ChtBD da *AoChi4849* é do tipo heveína (5-CAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGC-28), contém 6 resíduos de Cys e segue o padrão consenso C-x(4,5)-C-C-S-x(2)-G-x-C-G-x(3,4)-[FYW]-C, uma assinatura para o ChtBD1 de acordo com o PROSITE (número de acesso: PS00026) (Figura 9).

A sequência primária do ChtBD da *AoChi4849* foi alinhada com a sequência primária do ChtBD de outras proteínas vegetais com estrutura 3D conhecida e disponibilizadas no PDB. Como pode ser observado na figura 9, a sequência de aminoácidos do ChtBD1 da *AoChi4849* apresenta similaridade com as demais, sobretudo na região consenso do ChtBD1 (destacado em letras amarelas) e entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação à quitina (marcados com triângulos vermelhos), serina (S), glicina (G) e tirosina (Y).

Figura 9 – Alinhamento múltiplo entre o ChtBD da *AoChi4849* e ChtBDs com estrutura 3D conhecida.



Fonte: elaborada pela autora. Alinhamento múltiplo realizado no *Clustal Omega* entre as sequências de aminoácidos do ChtBD da *AoChi4849* e do ChtBD de *Eucommia ulmoides* (PDB IDs: 1P9Z e 1P9G), *Triticum kiharae* (PDB ID: 2LB7), *Oryza sativa* subsp. *japonica* (PDB ID: 2DKV) e *Hevea brasiliensis* (PDB ID: 1WKX, 1Q9B e 4MPI). As posições em que a sequência de aminoácidos da *AoChi4849* apresenta similaridade com as demais sequências estão sombreadas em preto. O padrão consenso do PROSITE para o ChtBD1 está destacado em amarelo e os resíduos envolvidos na ligação à quitina estão indicadas por triângulos. O número de resíduos de aminoácidos de cada domínio está à direita de cada sequência.

A sequência de aminoácidos do CatD das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* foi alinhada com a sequência primária de CatDs de proteínas vegetais com estrutura 3D conhecida e disponibilizadas no PDB (Figura 10). Como pode ser observado, o CatD da quitinase *AoChi4849* também segue o padrão consenso para as quitinases GH19 apresentado pelo PROSITE tanto na assinatura 1 (número de acesso: PS00773) C-x(4,5)-F-Y-[ST]-x(3)-[FY]-[LIVMF]-x-A-x(3)-[YF]-x(2)-F-[GSA], quanto na assinatura 2 (número de acesso: PS00774) [LIVM]-[GSA]-F-x-[STAG](2)-[LIVMFY]-W-[FY]-W-[LIVM] (Figura 10). Já o CatD da quitinase *AoChi5472* apresenta algumas substituições na sequência padrão referente às duas assinaturas do PROSITE (Figura 10).

O alinhamento do domínio catalítico das quitinases revelou que a *AoChi4849* apresenta os resíduos catalíticos típicos das quitinases GH19, caracterizado por um padrão conservado de 3 resíduos, Glu-Xn-Glu-Xn-Ser/Thr (Figura 10). Isso sugere que esta quitinase seja enzimaticamente ativa em relação a degradação da quitina. No entanto, na quitinase *AoChi5472*, os resíduos possivelmente envolvidos na catálise seguem o padrão Lys-Xn-Glu-Xn-Tyr (Figura 10). Isso sugere a presença de duas mutações no sítio catalítico da *AoChi5472*, o que pode causar ou não a perda da atividade catalítica sobre a quitina. Nesse caso, a substituição da Ser/Thr por Tyr poderia não causar perda da atividade devido a semelhança de polaridade entre esses aminoácidos, no entanto, a substituição de um aminoácido ácido (Glu) por um aminoácido básico (Lys) pode ser fator crucial para a perda da atividade. Dessa forma, os resíduos envolvidos na catálise das quitinases do cajueiro teriam a seguinte numeração: Glu<sup>138</sup> (E), Glu<sup>147</sup> (E) e Thr<sup>179</sup> (T) na *AoChi4849* e Lys<sup>128</sup> (K), Glu<sup>150</sup> (E) e Tyr<sup>183</sup> (Y) na *AoChi5472* (Figura 10), (APÊNDICE C).

Diante disso, percebeu-se a necessidade de se obter mais informações sobre a funcionalidade dessas quitinases. Para isso, inicialmente, análises evolutivas foram realizadas para investigar a relação filogenética das duas quitinase, *AoChi4849* e *AoChi5472*, com outras quitinases de plantas representantes das classes I, II, IV, VI e VII, e assim, determinar a qual classe essas quitinases pertencem.

Figura 10 – Alinhamento múltiplo entre o CatD das quitinasases *AoChi4849* e *AoChi5472* com o CatD de proteínas com estrutura 3D conhecida.

CatD5472	YFQTYQFENLFSKRNTPVAAHAA <b>GFWDYHS</b> <b>FITAAAVY</b> QPK <b>FGT</b> TGGKLMGQREVAALFLG	60
2Z37	TISR <b>DQ</b> FYKMLKHMNDND <b>CHAV</b> <b>GF</b> TYDA <b>FITAAKS</b> FP--S <b>FGN</b> TGDLAMR <b>K</b> ETAAFFG	58
3W3E	VIGASLFDQLLKHRNDQA <b>CEGKGFYSYNA</b> <b>FITAAARS</b> FA--A <b>FGT</b> TGDSNTRKREVAALFLA	58
1DXJ	VIDASLFDQLLKHRNDPA <b>CEGKGFYSYNA</b> <b>FVTAARS</b> FG-- <b>CFG</b> TGDTNTRKREVAALFLA	58
3CQL	TISRSMFDQMLKHRNNPA <b>CPAKGFYTYDA</b> <b>FITAAKS</b> FP--S <b>FGT</b> TGSTDVRKREIAAFLG	58
2DKV	I <b>VPRDL</b> FERLLLHRNDGA <b>CPARGFYTYEA</b> <b>FLAAAAA</b> FP--A <b>FG</b> TGNTETRKREVAALFLG	58
4DWX	I <b>TSHAQ</b> FDRLMLLHRNDGA <b>COAKGFYTYDA</b> <b>FVAAAANA</b> FP-- <b>FGA</b> TGSTDARKRDVAALFLA	58
2BAA	I <b>VSRAQ</b> FDRLMLLHRNDGA <b>COAKGFYTYDA</b> <b>FVAAAAA</b> FP-- <b>FGT</b> TGSADAQKREVAALFLA	58
1CNS	I <b>VSRAQ</b> FDRLMLLHRNDGA <b>COAKGFYTYDA</b> <b>FVAAAAA</b> FS-- <b>FGT</b> TGSADVQKREVAALFLA	58
CatD4849	I <b>VTA</b> AFD <b>FDG</b> -IKNQAAAS <b>CVGK</b> S <b>FYTR</b> RD <b>GLTA</b> AKSFP-- <b>QFG</b> S-GSADQSKREIAAFFA	56
3HBD	I <b>ISQ</b> SFFNGL-AGGAASS <b>CEGKGFYTYNA</b> <b>FITAAANA</b> Y--S <b>FGT</b> TGSNDVKREIAAFFA	57
	. * # . . *: . . *: * * : ** *	
CatD5472	H <b>VGS</b> K <b>T</b> SCG <b>Y</b> GVAT <b>GC</b> PLAWGLCY <b>NK</b> EMSPSQTYCDD <b>S</b> FKFIY <b>PCT</b> PGI <b>SY</b> HGR <b>AL</b> PL <b>Y</b>	120
2Z37	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> WSGAPDGANT <b>W</b> GYCY <b>KE</b> IDKSDPHCD <b>SN</b> -NLE <b>W</b> PC <b>AP</b> GK <b>FY</b> YGR <b>GP</b> M <b>ML</b> S	117
3W3E	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> AATSPDGPYAWGY <b>CF</b> VT <b>ER</b> DKSNRYCDG--S--G <b>PC</b> SAGK <b>SY</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>T</b>	114
1DXJ	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> AAGSPDGPYAWGY <b>CF</b> VT <b>ER</b> DKSNKYCDP--G--T <b>PC</b> PA <b>CK</b> S <b>Y</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>T</b>	114
3CQL	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> WPS <b>AP</b> DGPYAWGY <b>CF</b> L <b>K</b> ERNPSSNY <b>CAP</b> --SPRY <b>PC</b> AP <b>GK</b> S <b>Y</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>S</b>	116
2DKV	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> W <b>TAP</b> DGPF <b>SW</b> GY <b>CF</b> K <b>Q</b> QNPSSDY <b>QCP</b> --S <b>PE</b> W <b>PC</b> AP <b>GR</b> K <b>Y</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>S</b>	116
4DWX	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> W <b>TAP</b> DGAFAWGY <b>CF</b> K <b>Q</b> ERGAAADY <b>CTP</b> --SA <b>Q</b> W <b>PC</b> AP <b>GR</b> K <b>Y</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>S</b>	116
2BAA	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> W <b>TAP</b> DGAFAWGY <b>CF</b> K <b>Q</b> ERGASSDY <b>CTP</b> --SA <b>Q</b> W <b>PC</b> AP <b>GR</b> K <b>Y</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>S</b>	116
1CNS	QT <b>SH</b> ET <b>TGG</b> W <b>TAP</b> DGAFAWGY <b>CF</b> K <b>Q</b> ERGASSDY <b>CTP</b> --SA <b>Q</b> W <b>PC</b> AP <b>GR</b> K <b>Y</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>S</b>	116
CatD4849	H <b>V</b> T <b>H</b> ET <b>G</b> -----H <b>LC</b> Y <b>T</b> E <b>I</b> DKSNAYCD <b>Q</b> SN-T <b>Q</b> Y <b>R</b> CV <b>PG</b> K <b>Y</b> YGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>T</b>	102
3HBD	N <b>V</b> M <b>H</b> ET <b>G</b> -----G <b>LC</b> Y <b>I</b> N <b>E</b> K <b>N</b> EPIN <b>Y</b> C <b>Q</b> SS--S <b>T</b> W <b>P</b> CT <b>S</b> G <b>K</b> S <b>Y</b> HGR <b>GP</b> I <b>Q</b> L <b>S</b>	102
	: . : * # : * . : # # * * : * * : *	
CatD5472	W <b>N</b> YNY <b>G</b> ET <b>GE</b> AL <b>K</b> V <b>D</b> LL <b>NH</b> PE <b>Y</b> I <b>EN</b> NAT <b>LAF</b> Q <b>T</b> AI <b>W</b> R <b>W</b> M <b>T</b> PV <b>K</b> K <b>H</b> Q <b>PS</b> AHD <b>V</b> F <b>VC</b> N <b>N</b> W <b>K</b> P <b>T</b>	180
2Z37	W <b>N</b> YNY <b>G</b> PC <b>GR</b> DL <b>GL</b> ELL <b>KN</b> PD <b>V</b> ASS <b>DP</b> VI <b>AF</b> K <b>T</b> AI <b>W</b> F <b>W</b> M <b>T</b> P <b>Q</b> A-P <b>K</b> PS <b>CH</b> D <b>V</b> IT <b>D</b> Q <b>W</b> E <b>P</b> S	176
3W3E	H <b>N</b> YNY <b>NA</b> AG <b>R</b> AL <b>G</b> VD <b>L</b> IN <b>N</b> PD <b>L</b> VAR <b>DA</b> V <b>VS</b> F <b>K</b> T <b>AI</b> W <b>F</b> W <b>M</b> T <b>P</b> Q <b>G</b> -N <b>K</b> PS <b>CH</b> D <b>V</b> IT <b>N</b> R <b>W</b> T <b>P</b> S	173
1DXJ	H <b>N</b> YNY <b>AQ</b> AG <b>R</b> AL <b>G</b> VD <b>L</b> IN <b>N</b> PD <b>L</b> VAR <b>DA</b> V <b>IS</b> F <b>K</b> T <b>AI</b> W <b>F</b> W <b>M</b> T <b>P</b> Q <b>G</b> -N <b>K</b> PS <b>CH</b> D <b>V</b> IT <b>N</b> R <b>W</b> T <b>P</b> S	173
3CQL	W <b>N</b> YNY <b>G</b> PC <b>GE</b> AL <b>R</b> V <b>N</b> LL <b>GN</b> PD <b>L</b> VAT <b>DR</b> VI <b>SF</b> K <b>T</b> AI <b>W</b> F <b>W</b> M <b>T</b> P <b>Q</b> A-P <b>K</b> PS <b>CH</b> D <b>V</b> IT <b>G</b> R <b>W</b> Q <b>P</b> S	175
2DKV	E <b>N</b> YNY <b>G</b> PAG <b>R</b> AI <b>G</b> VD <b>LL</b> S <b>N</b> PD <b>L</b> VAT <b>D</b> AT <b>VS</b> F <b>K</b> T <b>AI</b> W <b>F</b> W <b>M</b> T <b>P</b> Q <b>G</b> -N <b>K</b> PS <b>SH</b> D <b>V</b> IT <b>G</b> R <b>W</b> A <b>P</b> S	175
4DWX	H <b>N</b> YNY <b>G</b> PAG <b>R</b> AI <b>G</b> VD <b>LL</b> LR <b>N</b> PD <b>L</b> VAT <b>D</b> PT <b>VS</b> F <b>K</b> T <b>AI</b> W <b>F</b> W <b>M</b> T <b>A</b> Q <b>A</b> -P <b>K</b> PS <b>SH</b> AV <b>IT</b> G <b>K</b> W <b>S</b> P <b>S</b>	175
2BAA	H <b>N</b> YNY <b>G</b> PAG <b>R</b> AI <b>G</b> VD <b>LL</b> AN <b>PD</b> L <b>V</b> AT <b>D</b> AT <b>VS</b> F <b>K</b> T <b>AI</b> W <b>F</b> W <b>M</b> T <b>A</b> Q <b>P</b> -P <b>K</b> PS <b>SH</b> AV <b>I</b> AG <b>W</b> S <b>P</b> S	175
1CNS	H <b>N</b> YNY <b>G</b> PAG <b>R</b> AI <b>G</b> VD <b>LL</b> AN <b>PD</b> L <b>V</b> AT <b>D</b> AT <b>VS</b> F <b>K</b> T <b>AI</b> W <b>F</b> W <b>M</b> T <b>A</b> Q <b>P</b> -P <b>K</b> PS <b>SH</b> AV <b>I</b> W <b>G</b> W <b>S</b> P <b>S</b>	175
CatD4849	W <b>N</b> YNY <b>G</b> AC <b>G</b> K <b>AV</b> G <b>F</b> D <b>G</b> LN <b>AP</b> ET <b>V</b> S <b>N</b> NP <b>AV</b> S <b>F</b> K <b>S</b> AL <b>W</b> F <b>W</b> M <b>T</b> N <b>V</b> H-----S-----V-----	147
3HBD	W <b>N</b> YNY <b>GA</b> AG <b>K</b> S <b>I</b> G <b>F</b> D <b>G</b> LN <b>N</b> PE <b>K</b> V <b>G</b> D <b>S</b> T <b>IS</b> F <b>K</b> T <b>AI</b> W <b>F</b> W <b>M</b> K <b>N</b> SN-----C <b>H</b> S <b>A</b> I <b>T</b> -----	151
	* : * * * . . : : : * : : . . : * : * * . . . . .	
CatD5472	K <b>N</b> D <b>T</b> E <b>A</b> K <b>R</b> I <b>P</b> G <b>F</b> G <b>T</b> I <b>M</b> N <b>V</b> L <b>Y</b> G <b>D</b> Q <b>V</b> C <b>G</b> N <b>G</b> D <b>D</b> H <b>E</b> S <b>M</b> N <b>N</b> V <b>S</b> H <b>Y</b> L <b>Y</b> L <b>D</b> L <b>M</b> G <b>V</b> G <b>R</b> E <b>E</b> A <b>G</b> P <b>H</b> E <b>L</b>	240
2Z37	A <b>A</b> D <b>I</b> S <b>A</b> G <b>R</b> L <b>P</b> G <b>Y</b> G <b>V</b> I <b>T</b> N <b>I</b> I <b>N</b> G <b>L</b> E <b>C</b> A <b>G</b> R <b>D</b> -V <b>A</b> K <b>V</b> Q <b>D</b> R <b>I</b> S <b>F</b> Y <b>T</b> R <b>Y</b> C <b>G</b> M <b>F</b> G <b>V</b> D <b>P</b> G-----S <b>N</b>	230
3W3E	A <b>A</b> D <b>K</b> A <b>N</b> R <b>V</b> P <b>G</b> F <b>G</b> V <b>I</b> T <b>N</b> I <b>I</b> N <b>G</b> L <b>E</b> C <b>G</b> K <b>G</b> P-T <b>P</b> A <b>S</b> G <b>D</b> R <b>I</b> G <b>F</b> Y <b>K</b> R <b>Y</b> C <b>D</b> V <b>F</b> G <b>V</b> S <b>Y</b> G-----P <b>N</b>	227
1DXJ	A <b>A</b> D <b>V</b> A <b>A</b> N <b>R</b> T <b>P</b> G <b>F</b> G <b>V</b> I <b>T</b> N <b>I</b> I <b>N</b> G <b>L</b> E <b>C</b> G <b>R</b> G <b>P</b> -S <b>P</b> A <b>S</b> G <b>D</b> R <b>I</b> G <b>F</b> Y <b>K</b> R <b>Y</b> C <b>D</b> V <b>L</b> H <b>L</b> S <b>Y</b> G-----P <b>N</b>	227
3CQL	A <b>A</b> D <b>T</b> A <b>A</b> G <b>R</b> L <b>P</b> G <b>Y</b> G <b>V</b> I <b>T</b> N <b>I</b> I <b>N</b> G <b>L</b> E <b>C</b> G <b>K</b> G <b>P</b> -N <b>P</b> Q <b>V</b> A <b>D</b> R <b>I</b> G <b>F</b> F <b>R</b> Y <b>C</b> G <b>I</b> L <b>G</b> V <b>G</b> T <b>G</b> -----N <b>N</b>	229
2DKV	P <b>A</b> D <b>A</b> A <b>A</b> G <b>R</b> A <b>P</b> G <b>Y</b> G <b>V</b> I <b>T</b> N <b>I</b> I <b>N</b> G <b>L</b> E <b>C</b> G <b>H</b> G <b>P</b> -D <b>D</b> R <b>V</b> A <b>N</b> R <b>I</b> G <b>F</b> Y <b>Q</b> R <b>Y</b> C <b>A</b> F <b>G</b> I <b>G</b> T <b>G</b> -----G <b>N</b>	229
4DWX	G <b>A</b> D <b>R</b> A <b>A</b> G <b>R</b> A <b>P</b> G <b>F</b> G <b>V</b> I <b>T</b> N <b>I</b> I <b>N</b> G <b>L</b> E <b>C</b> G <b>H</b> G <b>Q</b> -D <b>S</b> R <b>V</b> A <b>D</b> R <b>I</b> G <b>F</b> Y <b>K</b> R <b>Y</b> C <b>D</b> I <b>L</b> G <b>V</b> G <b>Y</b> G-----D <b>N</b>	229
2BAA	G <b>A</b> D <b>R</b> A <b>A</b> G <b>R</b> V <b>P</b> G <b>F</b> G <b>V</b> I <b>T</b> N <b>I</b> I <b>N</b> G <b>L</b> E <b>C</b> G <b>H</b> G <b>Q</b> -D <b>S</b> R <b>V</b> A <b>D</b> R <b>I</b> G <b>F</b> Y <b>K</b> R <b>Y</b> C <b>D</b> I <b>L</b> G <b>V</b> G <b>Y</b> G-----N <b>N</b>	229
1CNS	G <b>A</b> D <b>R</b> A <b>A</b> G <b>R</b> V <b>P</b> G <b>F</b> G <b>V</b> I <b>T</b> N <b>I</b> I <b>N</b> G <b>L</b> E <b>C</b> G <b>H</b> G <b>Q</b> -D <b>S</b> R <b>V</b> A <b>D</b> R <b>I</b> G <b>F</b> Y <b>K</b> R <b>Y</b> C <b>D</b> I <b>L</b> G <b>V</b> G <b>Y</b> G-----N <b>N</b>	229
CatD4849	-----V <b>N</b> Q <b>G</b> F <b>G</b> A <b>T</b> I <b>Q</b> K <b>I</b> N <b>G</b> A <b>L</b> E <b>C</b> G <b>G</b> K <b>Q</b> -P <b>D</b> K <b>V</b> K <b>A</b> R <b>V</b> G <b>Y</b> Y <b>T</b> D <b>Y</b> C <b>K</b> K <b>F</b> G <b>V</b> D <b>P</b> G-----Q <b>N</b>	194
3HBD	-----S <b>G</b> Q <b>G</b> F <b>G</b> G <b>T</b> I <b>K</b> A <b>I</b> N-S <b>M</b> E <b>C</b> N <b>G</b> G <b>N</b> -S <b>G</b> E <b>V</b> S <b>S</b> R <b>V</b> N <b>Y</b> Y <b>K</b> K <b>I</b> C <b>S</b> Q <b>L</b> G <b>V</b> D <b>P</b> G-----A <b>N</b>	197
	* : * : : # : : : # : : . .	

Fonte: elaborada pela autora. Alinhamento múltiplo realizado no *Clustal Omega* entre as seqüências de aminoácidos do CatD das quitinasases *AoChi4849* e *AoChi5472* com o CatD de *Brassica juncea* (PDB ID: 2Z37), *Vigna unguiculata* (PDB ID: 3W3E), *Canavalia ensiformis* (PDB ID: 1DXJ), *Carica papaya* (PDB ID: 3CQL), *Oryza sativa* subsp. *japonica* (PDB ID: 2DKV), *Secale cereale* (PDB ID: 4DWX), *Hordeum vulgare* (PDB IDs: 2BAA e 1CNS) e *Picea abies* (PDB ID: 3HBD). Os resíduos idênticos para todas as seqüências estão sombreados em preto, os padrões consenso 1 e 2 do PROSITE para o CatD estão destacados em amarelo, os resíduos catalíticos estão destacados em vermelho e as Cys conservadas nas quitinasases GH19 estão marcados com #.

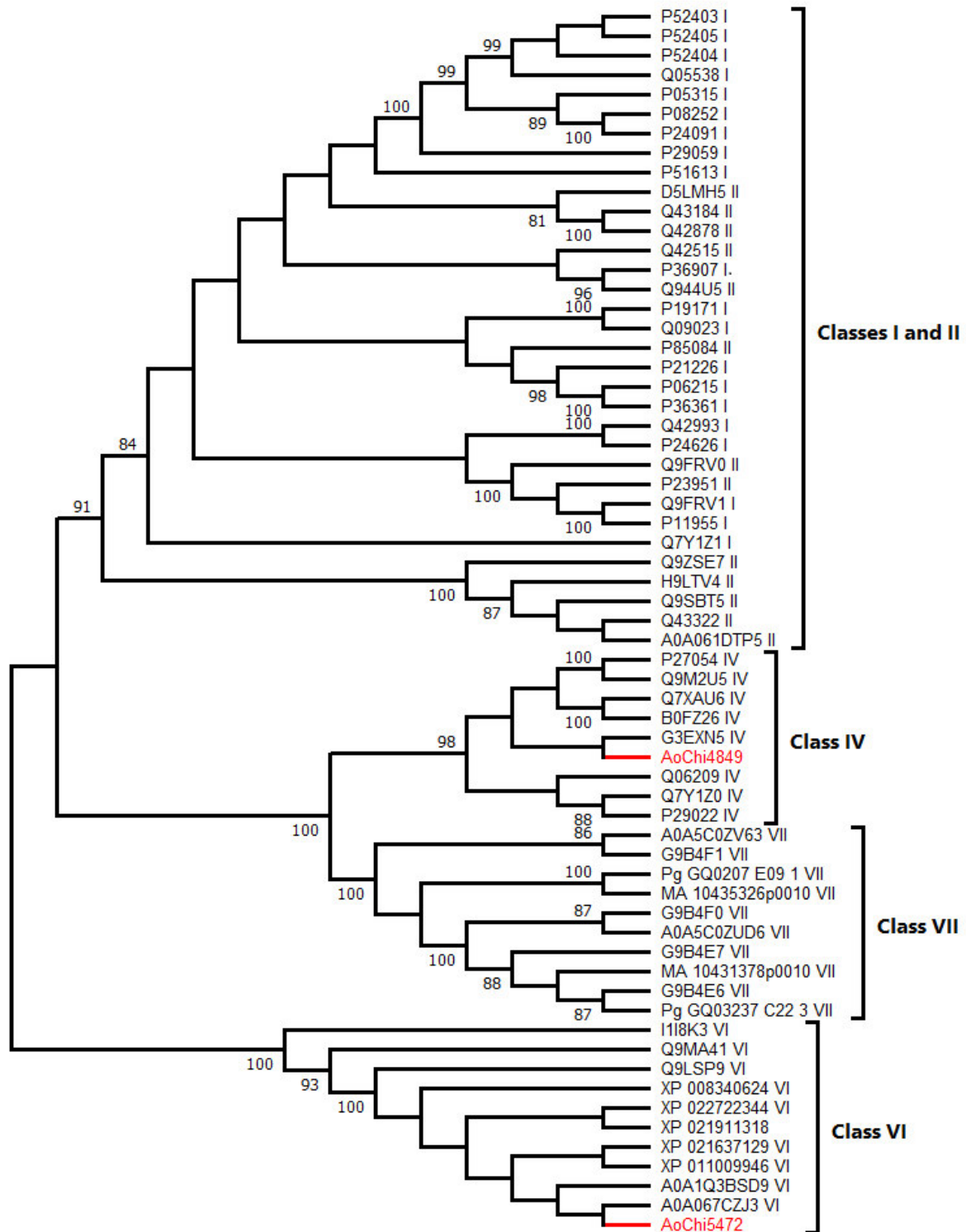
### 7.1.3 Análise filogenética, modelagem e docking molecular

Para determinar a qual classe as quitinases de caju pertencem, suas sequências de aminoácidos foram alinhadas às estruturas primárias de quitinases GH19 de plantas representativas das classes I, II, IV, VI e VII. O alinhamento múltiplo evidenciou relação mais próxima da *AoChi4849* com membros da classe IV e a *AoChi5472* com membros da classe VI (alinhamento não mostrado). Para reforçar essa suposição, as estruturas primárias foram alinhadas com diversos membros de cada classe de quitinases vegetais GH19 e análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR et al., 2018). Como pode ser observado na Figura 11, a sequência da *AoChi4849* foi recuperada dentro de um clado que agrupou todas as quitinases de classe IV e a *AoChi5472* agrupada em um clado com as quitinases de classe VI. Além disso, constatou-se por meio do alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio catalítico da *AoChi5472* com sequências de aminoácidos de quitinases representantes da classe VI, que, os mesmos resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise da *AoChi5472*, Lys<sup>128</sup>, Glu<sup>150</sup> e Tyr<sup>183</sup>, são também encontrados nas quitinases agrupadas na classe VI (Figura 12).

O domínio catalítico GH19 das quitinases vegetais é estabilizado por três ligações dissulfeto, envolvendo seis resíduos de Cys conservados, Cys<sup>1</sup> = Cys<sup>95</sup>, Cys<sup>2</sup> = Cys<sup>143</sup>, Cys<sup>3</sup> = Cys<sup>155</sup>, Cys<sup>4</sup> = Cys<sup>164</sup>, Cys<sup>5</sup> = Cys<sup>242</sup> e Cys<sup>6</sup> = Cys<sup>261</sup> na *AoChi4849* (Figura 10). No entanto, na estrutura da *AoChi5472*, o Cys<sup>1</sup> é substituído por um resíduo de Ala (Ala<sup>82</sup>), enquanto um novo resíduo de Cys emergiu em outro local (Cys<sup>131</sup>) substituindo um resíduo de Gly que é conservado em quitinases das classes I e II ou ausente nas quitinases pertencentes às classes IV e VII (Figura 13). Dessa forma, os resíduos de Cys foram identificados nas seguintes posições: Cys<sup>1</sup> = Cys<sup>131</sup>, Cys<sup>2</sup> = Cys<sup>146</sup>, Cys<sup>3</sup> = Cys<sup>158</sup>, Cys<sup>4</sup> = Cys<sup>168</sup>, Cys<sup>5</sup> = Cys<sup>268</sup> e Cys<sup>6</sup> = Cys<sup>307</sup> (Figura 13). Curiosamente, esta mutação envolvendo os resíduos Cys e Gly conservados foi encontrada também nas demais quitinases de classe VI analisadas (dados não mostrados).

Outra característica estrutural da *AoChi5472* é a presença de cinco regiões de *loop* (I-V), conforme descreveu Volpicella et al. (2014) para quitinases de plantas, e a inserção de um peptídeo de cinco resíduos (<sup>294</sup>GREEA<sup>298</sup>) próximo à extremidade C terminal. Esse peptídeo gera um *loop* adicional que está presente em quitinases da classe VI e em algumas outras quitinases, como mostrou Taira et al. (2011), mas está ausente na maioria das quitinases das classes I, II, IV e VII (Figura 13).

Figura 11 - Árvore de máxima verossimilhança mostrando a relação filogenética das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* com quitinases de plantas representativas das classes I, II, IV, VI e VII.



Fonte: GRANGEIRO, T. B. A análise filogenética realizada com as sequências de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* foi realizada pelo método de máxima verossimilhança de Whelan e Goldman (2001). A árvore com a maior probabilidade de log é mostrada. Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+ G, parâmetro = 1,5328)). O modelo de variação da taxa permitiu que alguns sites fossem evolutivamente invariáveis (dados não mostrados). A porcentagem de árvores nas quais as sequências associadas se agruparam, conforme determinado pelo teste de *bootstrap* (100 réplicas), é mostrada ao lado dos ramos. Esta análise envolveu 63 sequências de aminoácidos e foi conduzida no MEGA X (KUMAR et al., 2018).



Figura 12 - Alinhamento de um trecho da sequência de aminoácidos do domínio catalítico da *AoChi5472* com sequências de aminoácidos de quitinases de plantas representantes da classe VI.

	#	#	#									
<i>Anacardium occidentale</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQT	YCDDSF	KFI	YPCT	GIS	YHGRGAL	PLYW	
<i>Hevea brasiliensis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SKLY	CDDYY	KYT	YPCT	GAS	YHGRGAL	PLYW	
<i>Populus euphratica</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SKTY	CDDYY	KYT	YPCT	GVS	YHGRGAL	PLYW	
<i>Cephalotus follicularis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKELSP	NKLY	CDDYY	KLT	YPCT	SGAS	YHGRGAL	PLYW	
<i>Durio zibethinus</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SKFY	CDEYY	KYT	YPCT	GVSY	YHGRGAL	PLYW	
<i>Morella rubra</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKELSP	DSFY	CDEYY	KLT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Quercus suber</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKELSP	DSL	CDEYY	KLT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Juglans regia</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKELSP	EKDY	CNEDF	KLT	YPCT	SGAS	YHGRGAL	PLYW	
<i>Ziziphus jujuba</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKELSP	SQS	CDDYF	KLT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Parasporia andersonii</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SKI	CDDYY	KLT	YPCT	GVSY	YHGRGAL	PLYW	
<i>Morus notabilis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SKLY	CDDDY	KDT	FPCT	GVSY	YHGRGAL	PLYW	
<i>Citrus sinensis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	NI	CDDDF	KYT	YPCT	GVSY	YHGRGAL	PLYW	
<i>Acer yangbiense</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQTY	CDDTF	KYT	YPCT	GVSY	YHGRGAL	PLYW	
<i>Punica granatum</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQY	CDDYF	KFT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Eucalyptus grandis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDSF	KYT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Malus baccata</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQLY	CDDYY	KYT	YPCT	SGAS	YHGRGAL	PLYW	
<i>Carica papaya</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SKVY	CDDYY	KFT	YPCT	DVS	YHGRGAL	PLYW	
<i>Nyssa sinensis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDSY	KYT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Camellia sinensis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDSF	KYT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Actinidia chinensis</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDYY	KYT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Olea europaea</i>	HVGSKT	TCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDFF	KYT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Eucommia ulmoides</i>	HVGSKT	TCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDYY	KYT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Vitis vinifera</i>	HVGSKT	TCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SKS	CDDDY	KYT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Cucurbita maxima</i>	HVGSKT	TCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKELSP	DKLY	CDEYY	KLT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Daucus carota</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNRELSP	SQTY	CDDSY	KYT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Sesamum indicum</i>	HVGAKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQDY	CDEYY	KYD	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	HVGAKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQDY	CDDYY	KYD	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Erythranthe guttata</i>	HVGAKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYKEMSP	SQDY	CDEYY	KYD	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Salvia splendens</i>	HVGAKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	DKDY	CDDYF	KYD	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Nicotiana glauca</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQDY	CDDFF	KLT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Ipomoea nil</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQDY	CDDYY	KLT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Cynara cardunculus</i>	HVGSQT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQDY	CDDYY	KYT	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Dorcoeras hygrometricum</i>	HVGAKT	SCGY	GVA TGGP	LSWGLCYNKEMSP	SQDY	CDDFF	KYE	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW	
<i>Prosopis alba</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKELSP	DKY	CDDYY	KLT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Nepenthes sp. MF-2019</i>	HVGSKT	SCGY	SVATGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDYY	KYT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	DQLY	CDDYY	KLT	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Striga asiatica</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNKEMSP	SQS	CDDFY	KVE	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW	
<i>Nelumbo nucifera</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNHEMSP	SQS	YCD	S	TDYV	YPCT	GV	YHGRGAL	PLYW
<i>Macleaya cordata</i>	HVGSKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNREMSP	SQS	YCNP	-	DY	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW
<i>Tarenaya hassleriana</i>	HVAAKT	SCGY	GVA TGGP	LAWGLCYNREMSP	SQS	YCD	ESW	KY	YPCT	GA	YHGRGAL	PLYW

Fonte: GRANGEIRO, T. B. Alinhamento realizado no programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009) com 61 resíduos de aminoácidos da estrutura primária de *AoChi5472*, que contém os três resíduos catalíticos, com sequências de aminoácidos correspondentes a estrutura primária de quitinases de plantas representantes da classe VI. Os resíduos idênticos para todas as sequências estão na cor vermelha escuro, os resíduos diferentes na cor branca e os resíduos catalíticos estão marcados com sinal # (lisina - Lys/K, glutamato - Glu/E e tirosina - Tyr/Y).

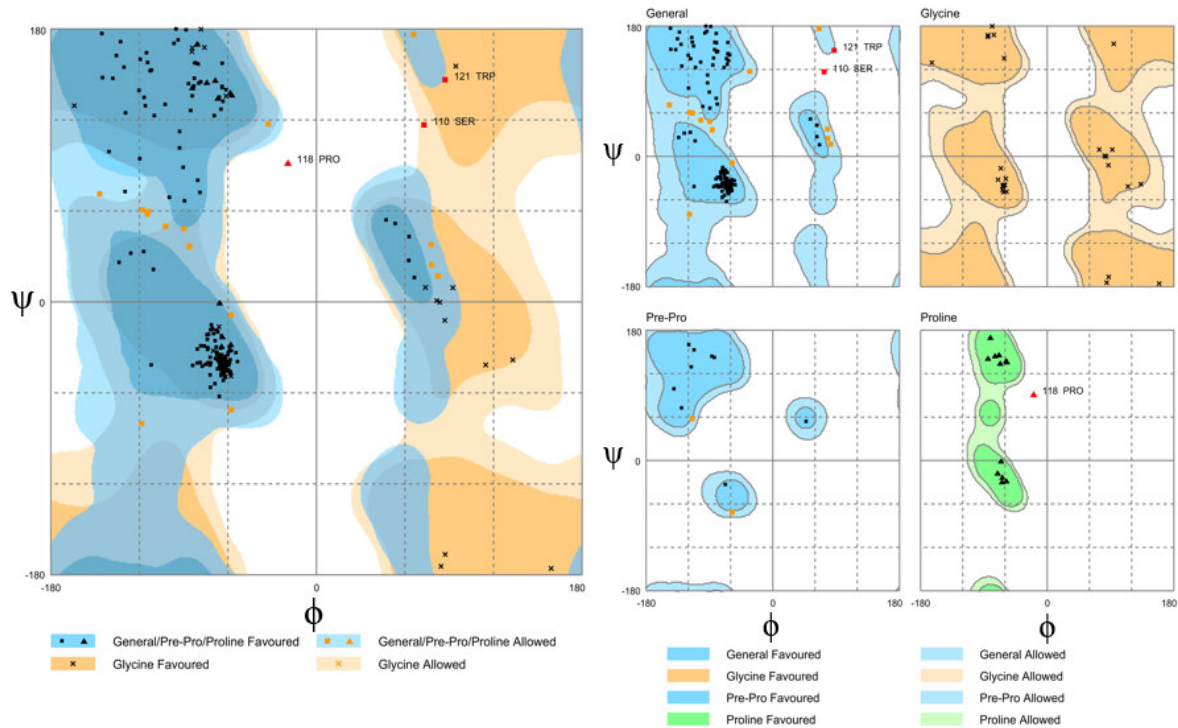


Devido a mutação envolvendo o resíduo catalítico Glu nas quitinases de classe VI, essas enzimas foram classificadas como proteínas semelhantes a quitinase (CLPs), presumivelmente sem atividade hidrolítica em relação à quitina. A essas enzimas são atribuídos outros papéis importantes nos processos de desenvolvimento das plantas, como deposição de lignina, síntese de celulose e determinação da arquitetura de raiz e caule (KESARI et al., 2015).

Diante disso, buscou-se investigar um provável mecanismo catalítico sobre a quitina para a *AoChi5472*. Para isso, um modelo molecular tridimensional de seu domínio quitinásico GH19 foi gerado através de modelagem por homologia (Figura 15A), o qual, em seguida, foi utilizado para a realização de cálculos de *docking* molecular, onde o oligossacarídeo (GlcNAc)<sub>4</sub> foi acoplado na fenda de ligação do substrato de *AoChi5472* (Figura 15B).

A modelagem molecular do domínio GH19 da *AoChi5472* realizada no algoritmo Phyre2 (KELLEY et al., 2015) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), gerou automaticamente um alinhamento da sequência de aminoácidos dessa quitinase com domínios GH9 de outras quitinases vegetais (dados não mostrados). O modelo foi validado submetendo-se as coordenadas atômicas do mesmo ao servidor PROSESS (<http://www.prosess.ca/index.php>) (BERJANSKII et al., 2010), no qual foi gerado o gráfico de Ramachandran mostrando os ângulos diédricos da cadeia principal ( $\phi$ ,  $\psi$ ) de todos os resíduos do modelo tridimensional (Figura 14). Nesse gráfico é possível localizar todos os resíduos de aminoácidos, apenas os resíduos de glicina, apenas os resíduos de prolina e apenas os resíduos de pré-prolina nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas. Para o modelo tridimensional do domínio GH19 da *AoChi5472*, o número de resíduos nas regiões favorecidas e nas regiões permitidas foi de 223 (92,5%) e 15 (6,2%), respectivamente, sendo observados apenas 3 resíduos *outliers* (1,2%), o que pode caracterizar um modelo válido, já que há poucos resíduos (apenas 3) em áreas não permitidas (Figura 14).

Figura 14 – Gráfico de Ramachandran obtido na validação do modelo tridimensional do domínio GH19 da quitinase do cajueiro *AoChi5472*.



Fonte: GRANGEIRO, T. B. Gráfico de Ramachandran obtido no servidor PROSESS (BERJANSKII et al., 2010) mostrando os ângulos diédricos da cadeia principal ( $\phi$ ,  $\psi$ ) de todos os resíduos do modelo tridimensional do domínio GH19 da *AoChi5472* obtido no servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2015). O número de resíduos nas regiões favorecidas e nas regiões permitidas foi de 223 (92,5%) e 15 (6,2%), respectivamente, e o número de resíduos *outliers* formam apenas 3 (1,2%).

O modelo tridimensional do domínio GH19 da *AoChi5472* apresenta características típicas da estrutura das quitinases GH19, com 11  $\alpha$ -hélices, várias regiões de *loop* conectando os segmentos helicoidais e 3 ligações dissulfeto (Figura 15A). O modelo também confirma que a substituição de um resíduo de Cys conservado por um resíduo de Ala (Ala<sup>82</sup>) foi compensada pelo surgimento de um novo resíduo de Cys (Cys<sup>131</sup>), e este foi previsto estabelecendo uma ligação dissulfeto com o resíduo Cys<sup>146</sup>, mantendo assim o número conservado de três ligações dissulfeto, uma característica estrutural típica das quitinases GH19 de plantas (Figura 15A).

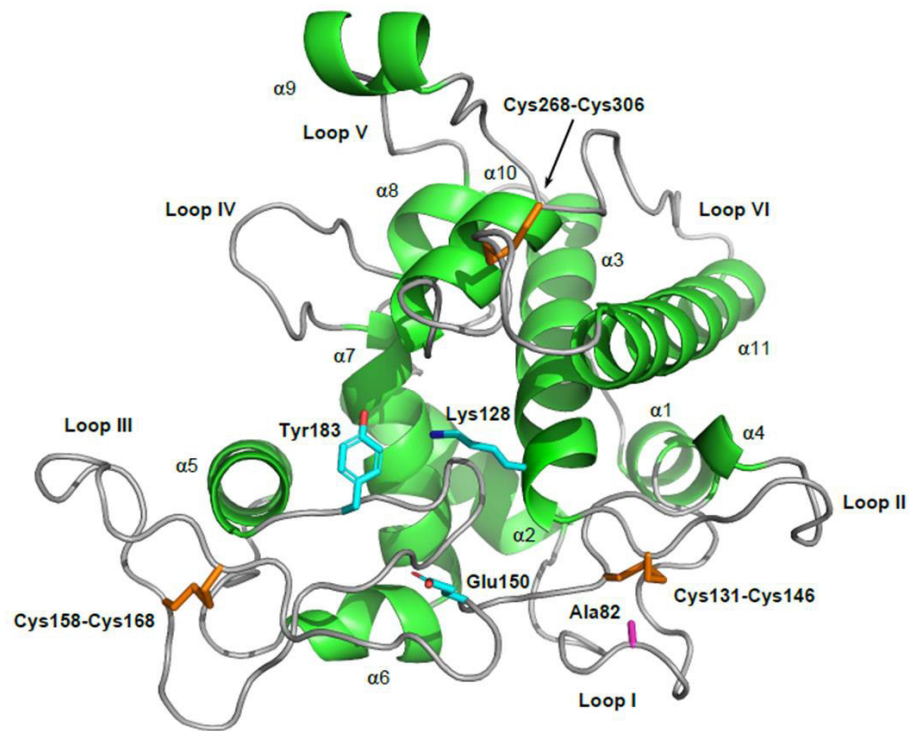
Após validação do modelo tridimensional do domínio GH19 da *AoChi5472*, um *docking* molecular foi realizado ancorando-se o oligossacarídeo (GlcNAc)<sub>4</sub> na fenda de ligação ao substrato da *AoChi5472* e os cálculos de *docking* foram realizados (Figura 15B). Foi previsto que o complexo proteína-carboidrato é estabilizado por uma rede de ligações de hidrogênio, envolvendo átomos de oxigênio (O) e nitrogênio (N) das cadeias laterais de certos resíduos de aminoácidos da *AoChi5472* e átomos de O dos grupos hidroxila e carbonila das unidades de açúcar, bem como os átomos de O das ligações glicosídicas, ligando as unidades GlcNAc do oligossacarídeo (Figura 15B). A cadeia lateral de Lys<sup>128</sup>, que substitui o Glu conservado doador de prótons nas quitinases clássicas, foi direcionada para o ligante. A cadeia lateral de Glu<sup>150</sup>, a base geral putativa, estava no lado oposto da fenda de ligação ao substrato. As distâncias entre o átomo N $\zeta$  de Lys<sup>128</sup> e os átomos O $\epsilon$ 1 e O $\epsilon$ 2 de Glu<sup>150</sup> foram de 8,0 Å e 7,9 Å. As posições relativas das cadeias laterais de Lys<sup>128</sup> e Glu<sup>150</sup>, bem como a distância média entre seus átomos N $\zeta$  e O $\epsilon$ , concordam com o que é normalmente observado para as posições e distâncias médias entre os grupos carboxila catalíticos em várias GHs (MHLONGO et al., 2014). Além disso, a distância entre o átomo N $\zeta$  de Lys<sup>128</sup> e a ligação *O*-glicosídica mais provável de ser quebrada no oligossacarídeo ancorado no sulco de ligação ao substrato de *AoChi5472* (~ 4 Å), sugere que Lys<sup>128</sup> poderia atuar como o doador de prótons na catálise (Figura 15B).

Portanto, a análise de *docking* molecular revelou que o ligante (GlcNAc)<sub>4</sub> foi encaixado no sulco de ligação ao substrato da *AoChi5472*, ao mesmo tempo que a posição dessa ancoragem fornece evidências de que o resíduo Lys<sup>128</sup> está envolvido na reação catalítica. Dessa forma, pode-se sugerir que a *AoChi5472* apresenta características funcionais de uma quitinase GH19, assim como a *AoChi4849*, que apresenta estrutura típica das quitinases GH19 de plantas e, por essa razão, não foi submetida a modelagem molecular e análises de *docking*.

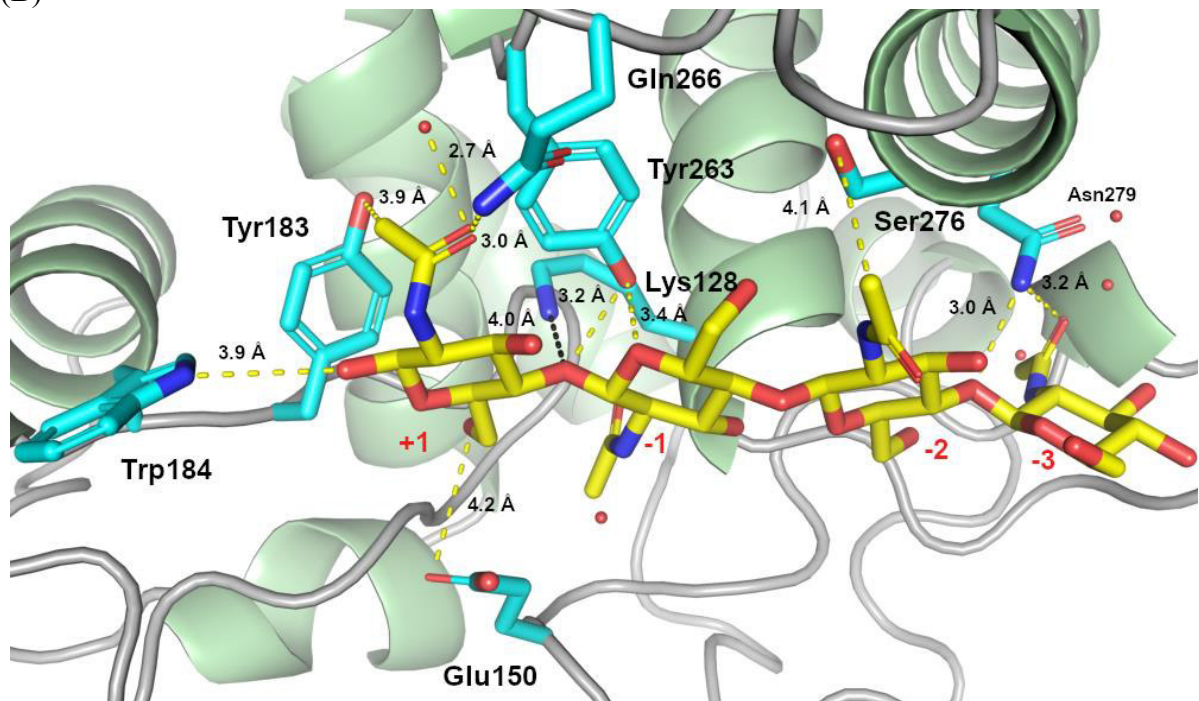
Para verificar se ambas as quitinases, *AoChi4849* e *AoChi5472*, de fato atuam na degradação da quitina, o cDNA correspondente aos genes das mesmas foi clonado para produção das proteínas de forma heteróloga, e estas foram caracterizadas e avaliadas quanto a capacidade de degradar a quitina e intervir no crescimento de fungos e bactérias.

Figura 15 – Modelo molecular tridimensional do domínio GH19 da *AoChi5472* e sua interação com  $(\text{GlcNAc})_4$ .

(A)



(B)

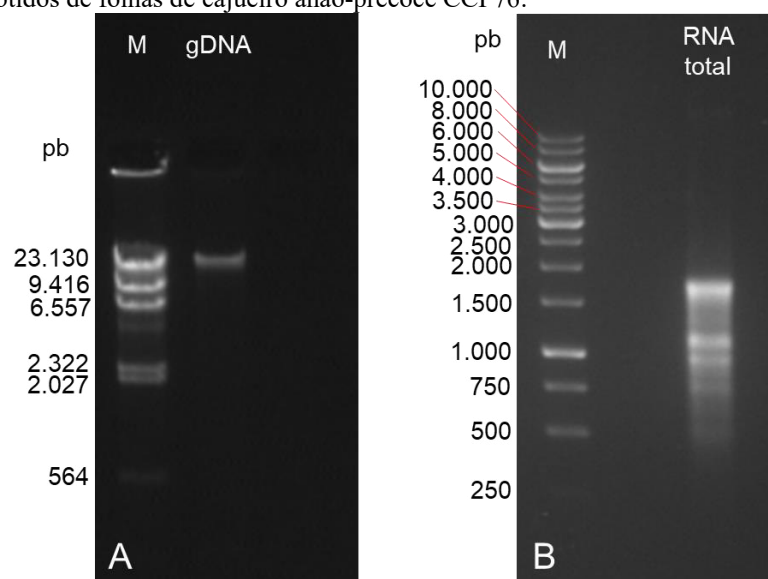


Fonte: GRANGEIRO, T. B. (A) Representação do modelo molecular tridimensional do domínio GH19 da *AoChi5472* gerado através de modelagem por homologia. As cadeias laterais de resíduos catalíticos putativos estão mostradas como bastões. As ligações dissulfeto estão coloridas de laranja. (B) Visão detalhada de um  $(\text{GlcNAc})_4$  (amarelo) ancorado na fenda de ligação do substrato da *AoChi5472* (cor verde). As cadeias laterais dos resíduos catalíticos e dos resíduos de aminoácidos que provavelmente interagem com o ligante por meio de ligações de hidrogênio (representadas como linhas pontilhadas amarelas) são mostradas como bastões na cor ciano. A distância entre o resíduo de  $\text{Ly}^{s128}$  responsável pela catálise ácida e o oxigênio da ligação glicosídica a ser quebrada está demonstrada por linhas pontilhadas pretas. Os átomos de N e O são coloridos de azul e vermelho, respectivamente.

## 7.2 Obtenção de ácidos nucleicos do cajueiro anão-precoce CCP 76

O gDNA e RNA total do cajueiro anão-precoce CCP 76 foram obtidos em quantidade satisfatória da folha de plantas com 60 dias de crescimento. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, no qual pode se observar a presença de uma única banda de alto peso molecular bem definida correspondente ao gDNA, indicando a ausência de degradação (Figura 16A), e bandas correspondentes a RNA ribossômico na amostra de RNA, indicando eficiência na obtenção de RNA total (Figura 16B). Além disso, a relação entre as absorvâncias  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  para as amostras de gDNA e RNA total apresentou valores em torno de 1,8 e 2,0, respectivamente, indicando ausência de contaminação com proteína. Da mesma forma, outros trabalhos relatam a obtenção de ácidos nucleicos de plantas, incluindo o *A. occidentale*, com bons rendimentos e boa qualidade através do método utilizado neste trabalho (ABBASI KEJANI et al., 2010; NADIYA et al., 2015; INGLIS et al., 2018).

Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose das amostras de gDNA e RNA total obtidos de folhas de cajueiro anão-precoce CCP76.

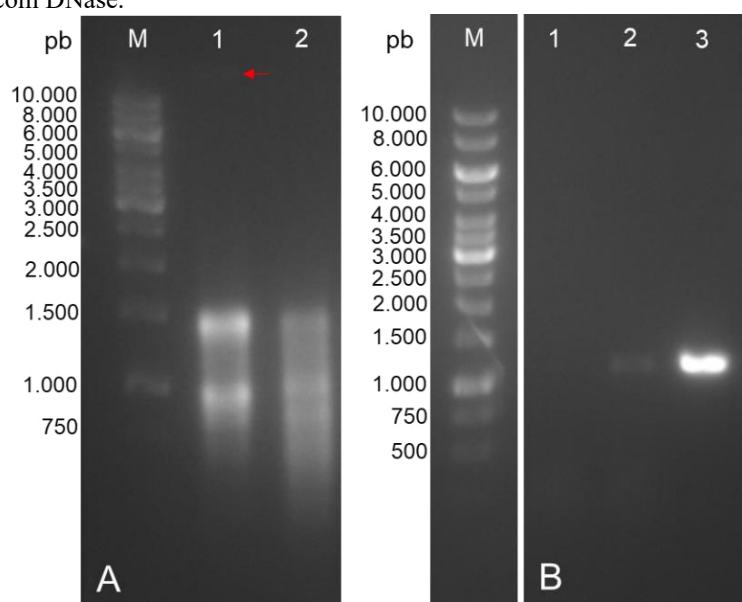


Fonte: elaborada pela autora. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amostra de gDNA obtido de folhas de cajueiro anão-precoce CCP 76: no gel foram aplicados 500 ng do marcador  $\lambda$ DNA/*HindIII* (M) e 1.000 ng de gDNA. (B) Eletroforese em gel de agarose 1,2% da amostra de RNA total obtido de folhas de cajueiro anão-precoce CCP 76: no gel foram aplicados 300 ng do marcador 1 kb DNA ladder e 1.000 ng de RNA total.

Diferentes métodos são utilizados para obtenção de RNA de plantas, incluindo alguns kits comerciais (NADIYA et al., 2015). A obtenção de RNA total de folhas do cajueiro utilizando o CTAB foi satisfatória, entretanto, a contaminação com gDNA é evidenciada pela presença de uma banda acima de 10.000 pb no gel de agarose (Figura 17A).

Dessa forma, a amostra de RNA total foi digerida com a enzima DNase I (Sigma Aldrich), e em seguida foi utilizada em uma reação de PCR com iniciadores específicos para uma região do gDNA do cajueiro anão-precoce CCP 76. Na figura 17B é possível visualizar a amplificação de uma região do DNA do cajueiro na amostra de gDNA, na amostra de RNA total não tratada com DNase I e a ausência de amplificação na amostra de RNA total tratada com a DNase I, indicando a pureza do RNA obtido após este tratamento.

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose de amostras do RNA total, obtidas de folhas de cajueiro anão-precoce CCP76, não tratado e tratado com DNase.



Fonte: elaborada pela autora. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,2% do RNA total obtido de folhas de cajueiro antes e após o tratamento com a DNase: o poço M contém 300 ng do marcador 1 kb DNA *ladder*; o poço 1 contém amostra de RNA total não tratado com DNase e o poço 2 contém amostra de RNA total após tratamento com DNase. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto das PCRs realizadas com RNA total tratado e não tratado com DNase: o poço M contém 300 ng do marcador 1 kb DNA *ladder* e os poços 1, 2 e 3 contêm respectivamente, o produto da PCR realizada com RNA tratado com DNase, o produto da PCR realizada com RNA não tratado com DNase e o produto da PCR realizada com gDNA. O par de iniciadores ChiAnao5472F/ChiAnao5472R foi utilizado nas reações de PCR.

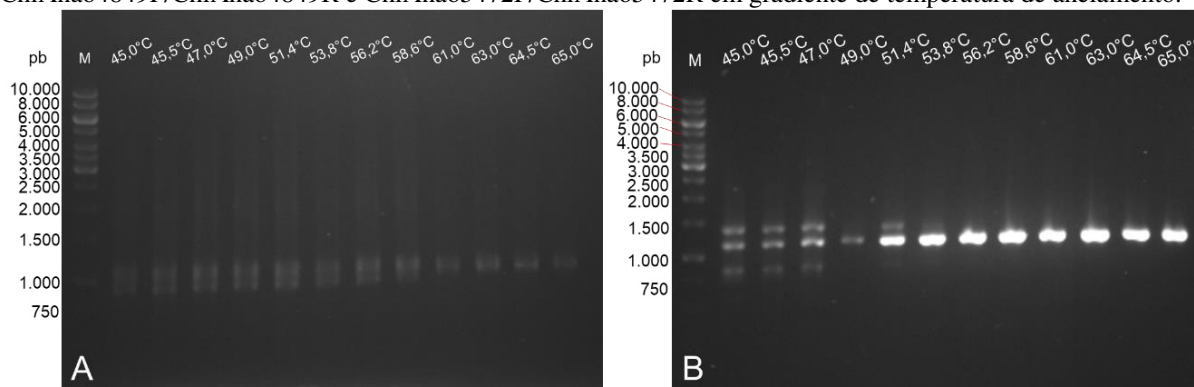
### 7.3 Amplificação das sequências codificadoras das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi547*

A amplificação das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* foi realizada com iniciadores específicos a partir do gDNA obtido da folha do cajueiro CCP 76 e a partir do cDNA obtido da transcrição reversa realizada com a amostra de RNA total.



A PCR realizada com gDNA em um gradiente de temperatura de anelamento demonstrou que 63,0 °C é a temperatura de anelamento ideal para a realização das reações de PCR. A figura 18 mostra que nesta temperatura, a amplificação do DNA ocorre de forma mais intensa e específica, ou seja, com amplificação de apenas uma banda bem definida.

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos das PCRs realizadas com os iniciadores ChiAnao4849F/ChiAnao4849R e ChiAnao5472F/ChiAnao5472R em gradiente de temperatura de anelamento.

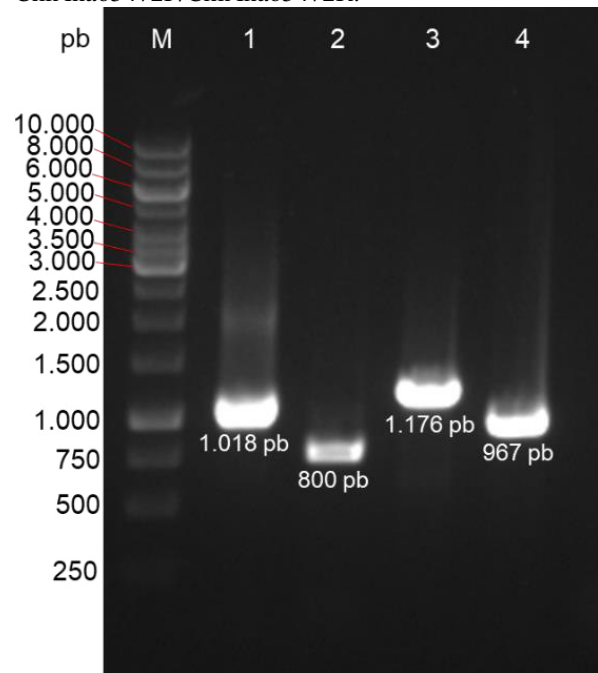


Fonte: elaborada pela autora. Nas figuras A e B os poços M contêm 250 ng do marcador 1 kb DNA ladder e os demais poços contêm 7,0 µL do produto das PCRs realizadas com os iniciadores (A) ChiAnao4849F/ChiAnao4849R e (B) ChiAnao5472F/ChiAnao5472R e DNA genômico obtido de folhas de cajueiro anão-precoce CCP 76, em gradiente de temperatura de anelamento.

Estes oligonucleotídeos iniciadores foram projetados para amplificação de um amplicon de 761 pb, referente a ORF *AoChi4849*, e um amplicon de 920 pb, referente a ORF *AoChi5472*, correspondentes às sequências codificadoras das quitinases sem a região do peptídeo sinal (APÊNDICE D). No entanto, o produto das reações de PCR realizadas com gDNA apresenta tamanho bem acima do esperado para as regiões codificadoras, enquanto que a amplificação a partir de cDNA gera amplicons com tamanho próximos ao esperado (Figura 19). Dessa forma, considerou-se que as PCRs realizadas com gDNA amplifica, também, regiões correspondentes a *introns*, o que é bastante comum nas quitinases vegetais, como mostrou Backiyarani et al. (2015) para as quitinases da banana, Chen et al. (2018) para as quitinases do nabo e Cao et al. (2019) para as quitinases do *Ammopiptanthus nanus* (Popov) S. H. Cheng.

Dessa forma, considerou-se que os amplicons obtidos a partir de cDNA sejam correspondentes às ORFs das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472*, e que o tamanho maior apresentado em relação ao esperado, seja consequência da pouca precisão do programa utilizado para o cálculo. Por este motivo, apenas o cDNA foi utilizado para a obtenção dos amplicons referentes à região codificadora das quitinases sem *introns* para, em seguida, proceder com a clonagem.

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto das PCRs realizadas com gDNA, cDNA e os iniciadores ChiAnao4849F/ChiAnao4849R e ChiAnao5472F/ChiAnao5472R.



Fonte: elaborada pela autora. O poço M contém 300 ng do marcador 1 kb DNA *ladder*. Os poços 1 e 2 contêm 8  $\mu$ L do produto das PCRs realizadas com os iniciadores ChiAnao4849F/ChiAnao4849R e com gDNA e cDNA, respectivamente. Os poços 3 e 4 contêm 8  $\mu$ L do produto das PCRs realizadas com os iniciadores ChiAnao5472F/ChiAnao5472R e com gDNA e cDNA, respectivamente. O tamanho dos amplicons foi calculado no *software E-Capt*.

Outro aspecto importante a ser ressaltado é que a amplificação das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* a partir do cDNA pode indicar que estas quitinases sejam expressas por genes constitutivos, já que as ORFs foram inicialmente obtidas a partir de dados do transcriptoma de sementes. Quitinases vegetais, além de apresentarem padrão de expressão regulados por diferentes condições de estresse biótico (BACKIYARANI et al., 2015) e abiótico (CAO et al., 2019), podem também apresentar um padrão de expressão específico para diferentes partes da planta, como mostrou Chen et al. (2018) para as quitinases do nabo.

Sobre a expressão constitutiva de quitinases em plantas, diversos autores ressaltam que esta característica amplia o potencial de resistência contra pragas e doenças fúngicas na planta e tem sido a característica primordial na obtenção de plantas transgênicas transformadas com genes de quitinases (ORNATOWSKI et al., 2004; ZENG et al., 2014; CHAKRAVARTHI et al., 2016; TOBIAS et al., 2017).

#### 7.4 Clonagem das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* no vetor pGEM-T Easy

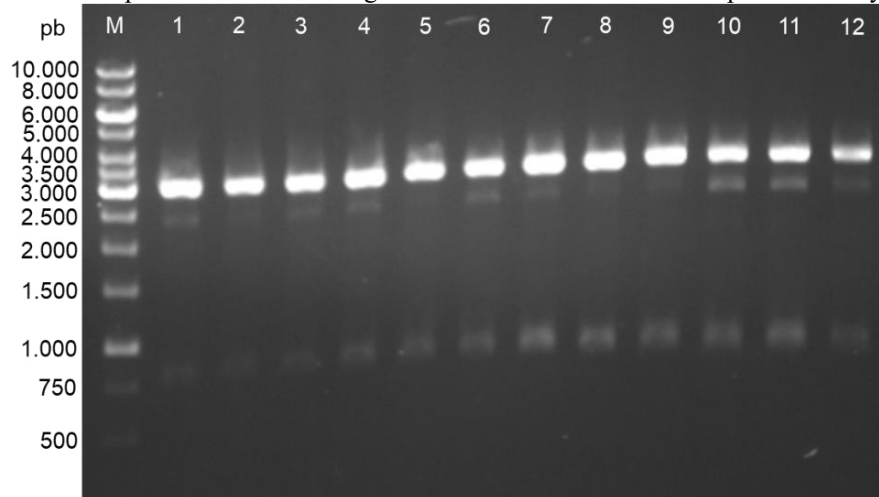
Os fragmentos de DNA correspondentes às regiões codificadoras das quitinasases (insertos obtidos nas reações de PCR realizadas com cDNA, oligoiniciadores específicos e a enzima *Taq* DNA polimerase) foram ligados ao vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy em uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase. Dessa forma, obteve-se os plasmídeos recombinantes p-GEM-T Easy + *AoChi4849* e p-GEM-T Easy + *AoChi5472*. O vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy representa um sistema conveniente para a clonagem de produtos de PCR realizada com a *Taq* DNA polimerase, isso porque uma timina (T) é adicionada em ambas as extremidades 3' do vetor, permitindo a ligação de um produto de PCR obtido com a *Taq* DNA polimerase, que adiciona uma adenina (A) às extremidades 3' do fragmento de DNA produzido. Assim, o fragmento de DNA foi facilmente ligado às extremidades coesivas presentes no vetor.

Após a transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  com os plasmídeos recombinantes, os clones obtidos foram selecionados considerando as marcas de seleção do pGEM<sup>®</sup>-T Easy, um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina e um gene que codifica a  $\beta$ -galactosidase (gene *lacZ*) localizado no sítio múltiplo de clonagem (ANEXO A). Por via de regra, todos os clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  obtidos em placas de LB ágar contendo ampicilina, possuem o plasmídeo pGEM-T Easy, recombinante ou não. Quando a clonagem é bem-sucedida, a sequência do gene *lacZ* é interrompida pelo fragmento de DNA inserido e não há produção da  $\beta$ -galactosidase, gerando colônias brancas. Já as bactérias que possuem o plasmídeo pGEM-T Easy não recombinante, produzem a enzima  $\beta$ -galactosidase e formam colônias de cor azul. Isso acontece porque o IPTG presente no meio de cultura atua como indutor da expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase que degrada o X-Gal, também presente no meio de cultura, formando um produto de cor azul.

Após a obtenção de colônias brancas em meio LB ágar contendo ampicilina, o DNA plasmidial de alguns clones obtidos para cada construção plasmidial (p-GEM-T Easy + *AoChi4849* e p-GEM-T Easy + *AoChi5472*) foi extraído por *miniprep* e confirmado por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. O pGEM-T Easy possui um sítio de corte desta enzima em cada uma das extremidades. Dessa forma, os insertos que codificam as quitinasases podem ser separados do vetor para a confirmação da clonagem. Após a digestão, o DNA digerido foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%, onde foi possível identificar a banda referente ao plasmídeo de 3.015 pb (Figuras 20 e 21), uma banda referente ao inserto da quitinase *AoChi4849* (amplicon de 761 pb) (Figura 20) e uma banda referente ao inserto da quitinase *AoChi5474* (amplicon de 920 pb) (Figura 21), confirmando assim a clonagem.

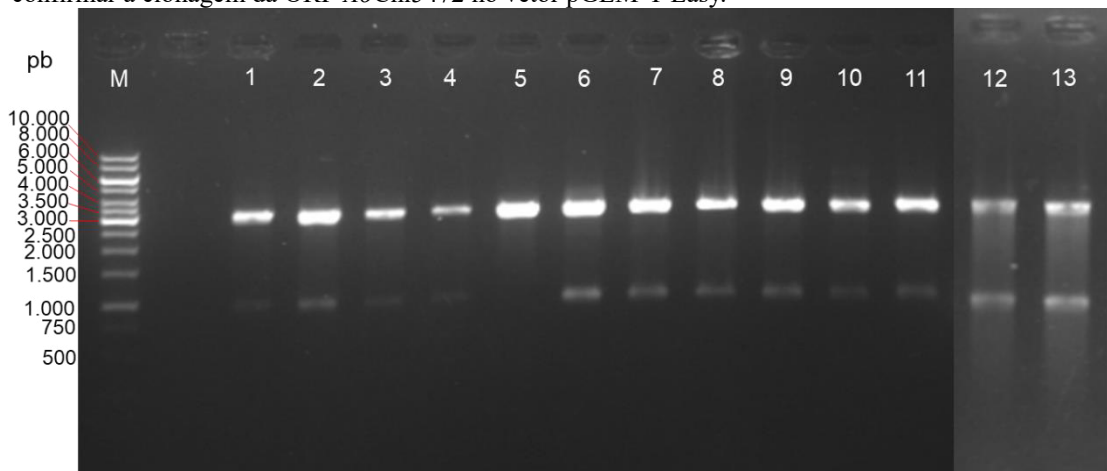
Na figura 20, uma banda inespecífica é visualizada com tamanho um pouco menor que 3015 pb, no entanto, esta representa amostra de DNA plasmidial fechado, ou seja, um restante de DNA plasmidial que não foi digerido durante a reação.

Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão realizada com *EcoRI* para confirmar a clonagem da ORF *AoChi4849* no vetor pGEM-T Easy.



Fonte: elaborada pela autora. O poço M contém 300 ng do marcador 1 kb DNA *ladder*. Os poços 1 a 12 contêm 10  $\mu$ L de amostra do DNA plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi4849* purificado de 12 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  e digerido com *EcoRI*.

Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão realizada com *EcoRI* para confirmar a clonagem da ORF *AoChi5472* no vetor pGEM-T Easy.



Fonte: elaborada pela autora. O poço M contém 300 ng do marcador 1 kb DNA *ladder*. Os poços 1 a 13 contêm 10  $\mu$ L de amostra do DNA plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi5472* purificado de 13 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  e digeridos com a enzima *EcoRI*.

A utilização da enzima *Taq* DNA polimerase em reações de PCR cujo objetivo é obter fragmentos de DNA para clonagem, apresenta algumas desvantagens em virtude da sua fidelidade relativamente baixa e ausência de um mecanismo de correção. Desta forma, os amplicons destinados à clonagem poderiam ser gerados com nucleotídeos errados durante as reações de PCR e, conseqüentemente, as proteínas recombinantes produzidas em seguida poderiam apresentar resíduos de aminoácidos errados. Sendo assim, o DNA plasmidial de 12 clones obtidos para cada uma das construções plasmidiais, pGEM-T Easy + *AoChi4849* e pGEM-T Easy + *AoChi5472*, foi sequenciado e confirmado.

#### **7.4.1 Sequenciamento do DNA plasmidial**

O DNA plasmidial de 12 clones confirmados para cada uma das construções plasmidiais, pGEM-T Easy + *AoChi4849* e pGEM-T Easy + *AoChi5472*, foi sequenciado. As sequências de nucleotídeos obtidas foram deduzidas em sequências de aminoácidos no *Expasy translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>), as quais foram alinhadas com as sequências de aminoácidos das quitinases *AoChi4849* e *AoChi5472* utilizando o programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para verificar a presença de possíveis alterações na sequência primária das proteínas. As figuras 22 e 23 mostram o resultado destes alinhamentos para a *AoChi4849* e *AoChi5472*, respectivamente. Para a *AoChi4849* foram obtidas quatro sequências de aminoácidos idênticas a partir dos clones 2, 5, 13 e 15 (Figura 22). Para a *AoChi5472* foi obtida apenas uma sequência de aminoácidos idêntica a partir dos clones 14 (Figura 23). Dessa forma, o clone 2 da *AoChi4849* e o clone 14 da *AoChi5472* foram selecionados para a realização da subclonagem da região codificadora das quitinases no vetor de expressão pPICZ $\alpha$ A.

Figura 22 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da *AoChi4849* com as sequências de aminoácidos deduzidas do DNA plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi4849* sequenciado a partir de 12 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Clone_7	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVT <b>S</b> AFFD	60
Clone_14	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCG <b>V</b> GCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_17	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_12	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_9	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCG <b>E</b> AGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_8	--FQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	58
Clone_10	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_3	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
<i>AoChi4849</i>	---QNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	57
Clone_2	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_5	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_13	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
Clone_15	REFQNCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEKPCTSTPSPTPPGGGSVANIVTAAFFD	60
	*****.*****:****	
Clone_7	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_14	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_17	GIKNQAAAACVKGKSFYTRD <b>GL</b> LTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTH <b>E</b> TGHLCT	120
Clone_12	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_9	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_8	GIKNQAAAACV <b>R</b> SFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	118
Clone_10	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_3	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
<i>AoChi4849</i>	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	117
Clone_2	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_5	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_13	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
Clone_15	GIKNQAAAACVKGKSFYTRDGFLLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTHETGHLCT	120
	*****:*****:***** *****	
Clone_7	EEIDKSNAYCD <b>R</b> SNTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>S</b>	180
Clone_14	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGR <b>E</b> PLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_17	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_12	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYY <b>C</b> GRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_9	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_8	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	178
Clone_10	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGAC <b>G</b> RAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_3	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAV <b>G</b> IDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
<i>AoChi4849</i>	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	177
Clone_2	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_5	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_13	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
Clone_15	EEIDKSNAYCDQ <b>S</b> NTQYRCVPGKKYYGRGPLQLTWNINYGACGKAVGFDGLNAPETVSN <b>N</b>	180
	***** **.:***** ** *****:***:*****.	
Clone_7	PAV <b>P</b> FKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_14	PAD <b>S</b> FKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_17	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_12	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_9	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDY <b>R</b> KFG	240
Clone_8	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	238
Clone_10	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_3	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
<i>AoChi4849</i>	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	237
Clone_2	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_5	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_13	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
Clone_15	PAVSFKSALWFWMNTNVHSVNVQGFQGIQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFG	240
	** *****:***	

(Continua)

(Continuação)

Clone_7	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_14	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_17	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_12	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_9	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_8	VDPGQNLSCVLDR	251
Clone_10	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_3	VDPGQNLSCVLDR	253
AoChi4849	VDPGQNLSC----	246
Clone_2	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_5	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_13	VDPGQNLSCVLDR	253
Clone_15	VDPGQNLSCVLDR	253
	*****	

Fonte: elaborada pela autora. A sequência AoChi4849 refere-se à sequência de aminoácidos deduzida da ORF AoChi4849. As demais sequências de aminoácidos foram deduzidas do DNA plasmidial pGEM-T Easy + AoChi4849 obtido de 12 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  e sequenciado pelo método de Sanger. Em vermelho estão os aminoácidos que não apresenta similaridade com a sequência da AoChi4849.

Figura 23 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da *AoChi5472* com as sequências de aminoácidos deduzidas do DNA plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi5472* sequenciado a partir de 12 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Clone_9	RFREFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	60
Clone_2	-----GEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	54
Clone_16	--REFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	58
Clone_12	RFREFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	60
Clone_10	SIREFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	60
Clone_8	--REFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	58
Clone_7	--REFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	58
Clone_3	--REFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	58
Clone_17	--REFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCN-TISDYFQTYQFENLFSKRN	57
Clone_14	-----DGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	55
Clone_11	-----GEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	54
<i>AoChi5472</i>	-----DGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	55
Clone_5	RFREFDGEMPSVKPIVKIVKGGKCLDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRN	60
	*****	
Clone_9	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	120
Clone_2	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS <b>R</b> GYGVATG	114
Clone_16	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	118
Clone_12	TPVAHAAG <b>I</b> WDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	120
Clone_10	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	120
Clone_8	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQ <b>N</b> GFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	118
Clone_7	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	118
Clone_3	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	118
Clone_17	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	117
Clone_14	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	115
Clone_11	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	114
<i>AoChi5472</i>	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGSKTS CGYGVATG	115
Clone_5	TPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQRE <b>A</b> AFLGHVGSKTS CGYGVATG	120
	*****	
Clone_9	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	180
Clone_2	GPLAWGL <b>S</b> YNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	174
Clone_16	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNY <b>S</b> YGETGEALKVD	178
Clone_12	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	180
Clone_10	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	180
Clone_8	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	178
Clone_7	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	178
Clone_3	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	178
Clone_17	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	177
Clone_14	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	175
Clone_11	GPLAWGLCYNKEMSPS <b>R</b> TYCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	174
<i>AoChi5472</i>	GPLAWGLCYNKEMSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	175
Clone_5	GPLAWGLCYNK <b>G</b> MSPSQT YCDDSFKFIY PCTPGI SYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVD	180
	*****	
Clone_9	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQ <b>LPLTTSLLVTGS</b> PRTI PRPNGLVLAPP	240
Clone_2	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	234
Clone_16	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	238
Clone_12	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	240
Clone_10	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	240
Clone_8	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	238
Clone_7	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	238
Clone_3	LL <b>S</b> HPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	238
Clone_17	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	237
Clone_14	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	235
Clone_11	LL <b>D</b> HPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	234
<i>AoChi5472</i>	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	235
Clone_5	LLNHPEYIENNATLAFQTA IWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTT	240
	** ***** *	

(Continua)



(Continuação)

Clone_9	<b>-TFS-MEIRCVAMAMTMNP-TT---SSPITCITLT-WALAVKRQDPMNCSAVANKRLSIH</b>	293
Clone_2	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	294
Clone_16	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	298
Clone_12	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	300
Clone_10	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLY <b>N</b> LDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	300
Clone_8	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	298
Clone_7	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAG <b>L</b> HELLSCGQQKAFNPSSSS	298
Clone_3	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	298
Clone_17	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	297
Clone_14	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	295
Clone_11	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	294
AoChi5472	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	295
Clone_5	MNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGPHELLSCGQQKAFNPSSSS	300
	* * * *	
Clone_9	<b>HLLP</b> RHLLF-TG	304
Clone_2	SSSSVLDR----	302
Clone_16	SSSSVLDR----	306
Clone_12	SSSSVLDR----	308
Clone_10	SSSSVLDR----	308
Clone_8	SSSSVLDR----	306
Clone_7	SSSSVLDRNR--	308
Clone_3	SSSSVLDR----	306
Clone_17	SSSSVLDR----	305
Clone_14	SSSSVLDR----	303
Clone_11	SSSSVLDR----	302
AoChi5472	SSSS-----	299
Clone_5	SSSSVLDR----	308

Fonte: elaborada pela autora. A sequência AoChi5472 refere-se à sequência de aminoácidos deduzida da ORF AoChi5472. As demais sequências de aminoácidos foram deduzidas do DNA plasmidial pGEM-T Easy + AoChi5472 obtido de 12 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  e sequenciado pelo método de Sanger. Em vermelho estão os aminoácidos que não apresenta similaridade com a sequência da AoChi5472.

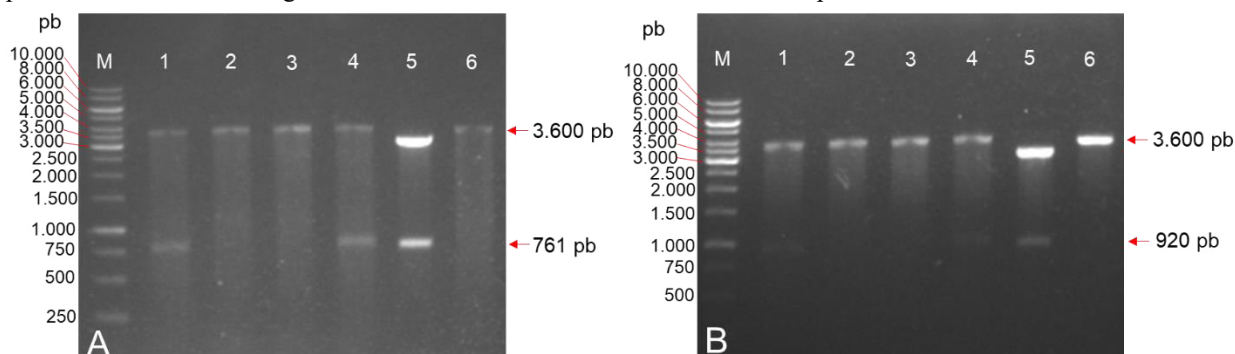
## 7.5 Subclonagem das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* no vetor pPICZ $\alpha$ A

O clone 2 de *E. coli* DH5 $\alpha$  positivo para a construção plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi4849*, o clone 14 de *E. coli* DH5 $\alpha$  positivo para a construção plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi5472* e um clone de *E. coli* TOP10F' contendo o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A íntegro, foram cultivados em meio LB caldo e submetidos à extração de DNA plasmidial com o kit *midiprep NucleoBond Xtra Midi* (MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemanha). As amostras de DNA plasmidial foram utilizadas em uma reação de digestão com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*.

A região codificadora das quitinases possui um sítio de clivagem para *EcoRI* e *XbaI*, adicionados às extremidades pelos iniciadores, enquanto que o vetor pPICZ $\alpha$ A apresenta as mesmas regiões no sítio de restrição (ANEXO B). Dessa forma, se formaram extremidades coesivas entre os insertos e o vetor pPICZ $\alpha$ A, que foram ligadas em uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific). Após a ligação, as construções plasmidiais obtidas, pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*, foram utilizadas para transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , onde o DNA foi propagado. Na sequência, o DNA plasmidial recombinante de quatro clones foi utilizado em uma reação de digestão com as mesmas enzimas de restrição para confirmar a obtenção das construções plasmidiais pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*. O material desta digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%, onde foi possível observar uma banda referente ao pPICZ $\alpha$ A íntegro (~3.600 pb) e uma banda referente à região codificadora da *AoChi4849* (amplicon de 761 pb) nos clones 1 e 4 (Figura 24A) e bandas referentes ao pPICZ $\alpha$ A íntegro (~3.600 pb) e a região codificadora da *AoChi5472* (amplicon de 920 pb) nos clones 1 e 4 (Figura 24B). Como controle, foram aplicadas amostras do DNA plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi4849* e pGEM-T Easy + *AoChi5472* digeridas com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* nos poços 5 e amostra do pPICZ $\alpha$ A íntegro (~3.600 pb) nos poços 6 (Figura 24).

Dessa forma, dois clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram confirmados para as construções de DNA plasmidial pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*, a partir dos quais foram obtidas amostra de DNA plasmidial suficiente para a transformação das células de expressão *Pichia pastoris* KM71H.

Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão realizada com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* para confirmar a subclonagem das ORFs *AoChi4849* e *AoChi5472* no vetor pPICZ $\alpha$ A.



Fonte: elaborada pela autora. Nas figuras A e B os poços M contém 300 ng do marcador 1 kb DNA ladder. Os poços 1 a 4 contêm 10  $\mu$ L de amostra de DNA plasmidial purificado de quatro clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformados com o plasmídeo (A) pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e (B) pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472* digeridos com *EcoRI* e *XbaI*. Os poços 5 e 6 contêm respectivamente, DNA plasmidial pGEM-T Easy + *AoChi4849* e pGEM-T Easy + *AoChi5472* digeridos com *EcoRI* e *XbaI* e amostra do pPICZ $\alpha$ A íntegro (~3.600 pb).

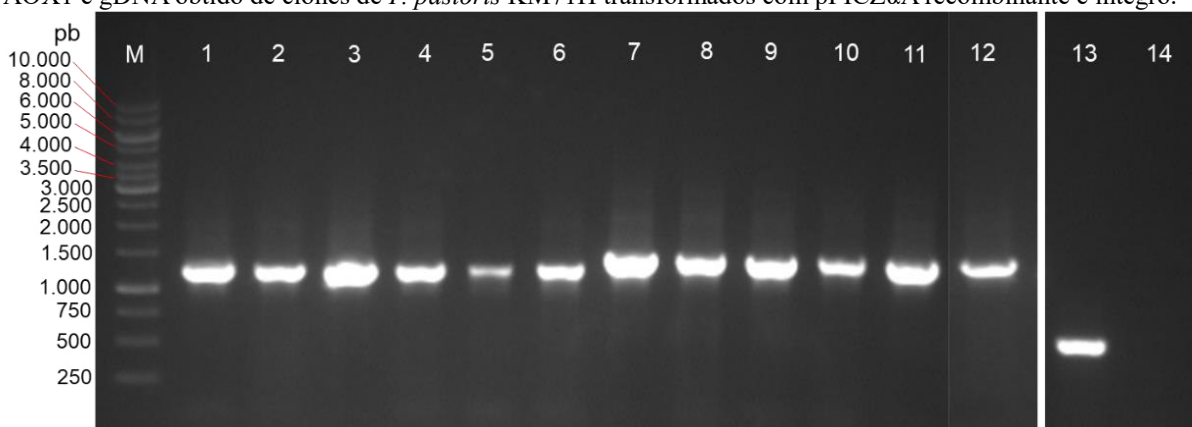
## 7.6 Confirmação da transformação de células de *Pichia pastoris* KM71H com os vetores pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*

A confirmação da integração do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* KM71H foi realizada em seis clones obtidos para cada uma das construções plasmidiais pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*, e em dois clones obtidos com o pPICZ $\alpha$ A íntegro. Esta confirmação foi realizada através de reações de PCR com amostras de gDNA obtidas de cada clone e os iniciadores 5'-AOX1 (GACTGGTTCCAATTGACAAGC) e 3'-AOX1 (GCAAATGGCATTCTGACATCC) que amplificam o gene *AOX-1* do vetor pPICZ $\alpha$ A. Caso o gDNA extraído dos clones de *P. pastoris* KM71H apresentasse uma ou mais cópias do DNA plasmidial recombinante, haveria amplificação de uma região do DNA correspondente a região codificadora das quitinases e ao gene *AOX1* de 588 pb. Para o gDNA extraído dos clones de *P. pastoris* KM71H transformados com pPICZ $\alpha$ A íntegro haveria amplificação apenas do gene *AOX1* de 588 pb.

As amostras obtidas nas reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, onde foi possível confirmar a amplificação do cassete de expressão das quitinases, pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*, juntamente com a região do gene *AOX1* (Figura 25). Nos poços 1 a 6 do gel foram aplicadas as amostras das PCRs realizadas com o gDNA obtido dos clones transformados com o DNA plasmidial pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849*. Neste caso, se esperava um amplicon de aproximadamente 1.350 pb (588 pb correspondente ao gene *AOX1* + 761 pb correspondente ao amplicon da *AoChi4849*), o que é confirmado pela altura apresentada pelas bandas em relação ao marcador (Figura 25). Nos poços 7 a 12 foram

aplicadas as amostras das PCRs realizadas com o gDNA obtido dos clones transformados com o DNA plasmidial pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*, onde se esperava um amplicon de aproximadamente 1.500 pb (588 pb correspondente ao gene *AOX1* + 920 pb correspondente ao amplicon da *AoChi5472*), o que é confirmado (Figura 25). Para o gDNA dos clones transformados com pPICZ $\alpha$ A íntegro, houve a amplificação do gene *AOX1* apenas em um dos clones, como pode ser observado na figura 25, poços 13 e 14.

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto das PCRs realizadas com os iniciadores 5'-AOX1/3'-AOX1 e gDNA obtido de clones de *P. pastoris* KM71H transformados com pPICZ $\alpha$ A recombinante e íntegro.



Fonte: elaborada pela autora. O poço M contém 300 ng do marcador 1 kb DNA ladder. Os poços 1 a 6 contêm o produto das PCRs realizadas com os iniciadores 5'-AOX1/3'-AOX1 e gDNA obtido de seis clones de *P. pastoris* KM71H transformados com a construção pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849*. Os poços 7 a 12 contêm o produto das PCRs realizadas com os iniciadores 5'-AOX1/3'-AOX1 e gDNA obtido de seis clones de *P. pastoris* KM71H transformados com a construção pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*. Os poços 13 e 14 contêm o produto das PCRs realizadas com os iniciadores 5'-AOX1/3'-AOX1 e gDNA obtido de 2 clones de *P. pastoris* KM71H transformados com pPICZ $\alpha$ A íntegro.

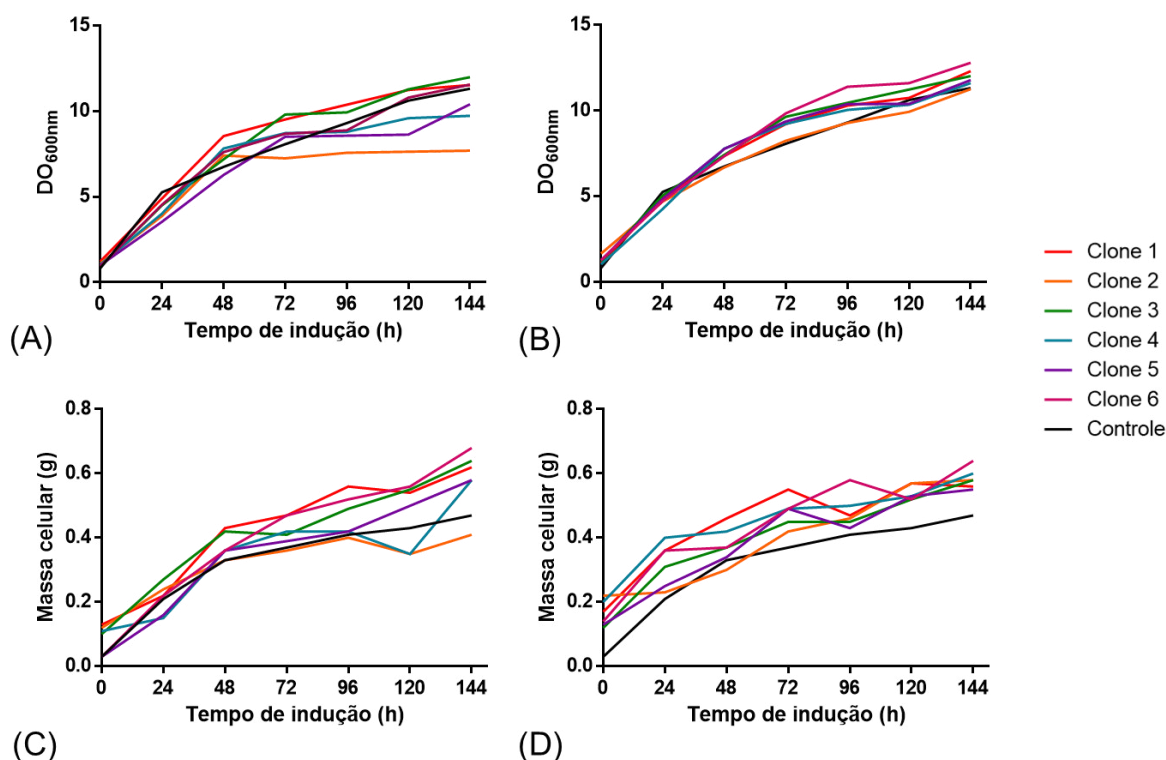
Os clones de *P. pastoris* KM71H confirmados para os cassetes de expressão pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*, e o clone de *P. pastoris* KM71H confirmado para o pPICZ $\alpha$ A íntegro, foram utilizados em uma indução piloto para expressão das quitinases recombinantes (*rAoChi4849* e *rAoChi5472*).

## 7.7 Produção das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* em *P. pastoris* KM71H

Os clones de *P. pastoris* KM71H cuja transformação com os vetores pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472* foi confirmada, foram avaliados quanto à capacidade de expressar as respectivas proteínas. Para isso, foram selecionados os 6 clones confirmados para cada um dos plasmídeos recombinantes e um clone transformado com o vetor pPICZ $\alpha$ A íntegro para a realização de uma indução piloto.

A figura 26 mostra os valores da  $DO_{600nm}$  e a quantificação da massa celular na cultura dos clones. Foi observado que os clones 1, 3 e 6 que expressam a *rAoChi4849* apresentam maior  $DO_{600nm}$  e maior quantidade de massa celular em relação aos demais clones (Figura 26 A e C). Dentre os clones que expressam a *rAoChi5472*, o clone 6 com 144 h de indução possui maior  $DO_{600nm}$  e maior quantidade de massa celular (Figura 26 B e D). Com relação ao clone controle, transformado com o vetor pPICZ $\alpha$ A íntegro, este apresenta padrão de crescimento celular semelhante aos clones transformados com pPICZ $\alpha$ A recombinante (Figura 26), indicando que a presença do cassete de expressão das quitinasases não interfere no padrão de crescimento das células.

Figura 26 – Perfil do crescimento celular dos clones de *P. pastoris* KM71H transformados com os plasmídeos recombinantes pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849* e pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472* e com o plasmídeo pPICZ $\alpha$ A íntegro durante a indução piloto de 144 h.



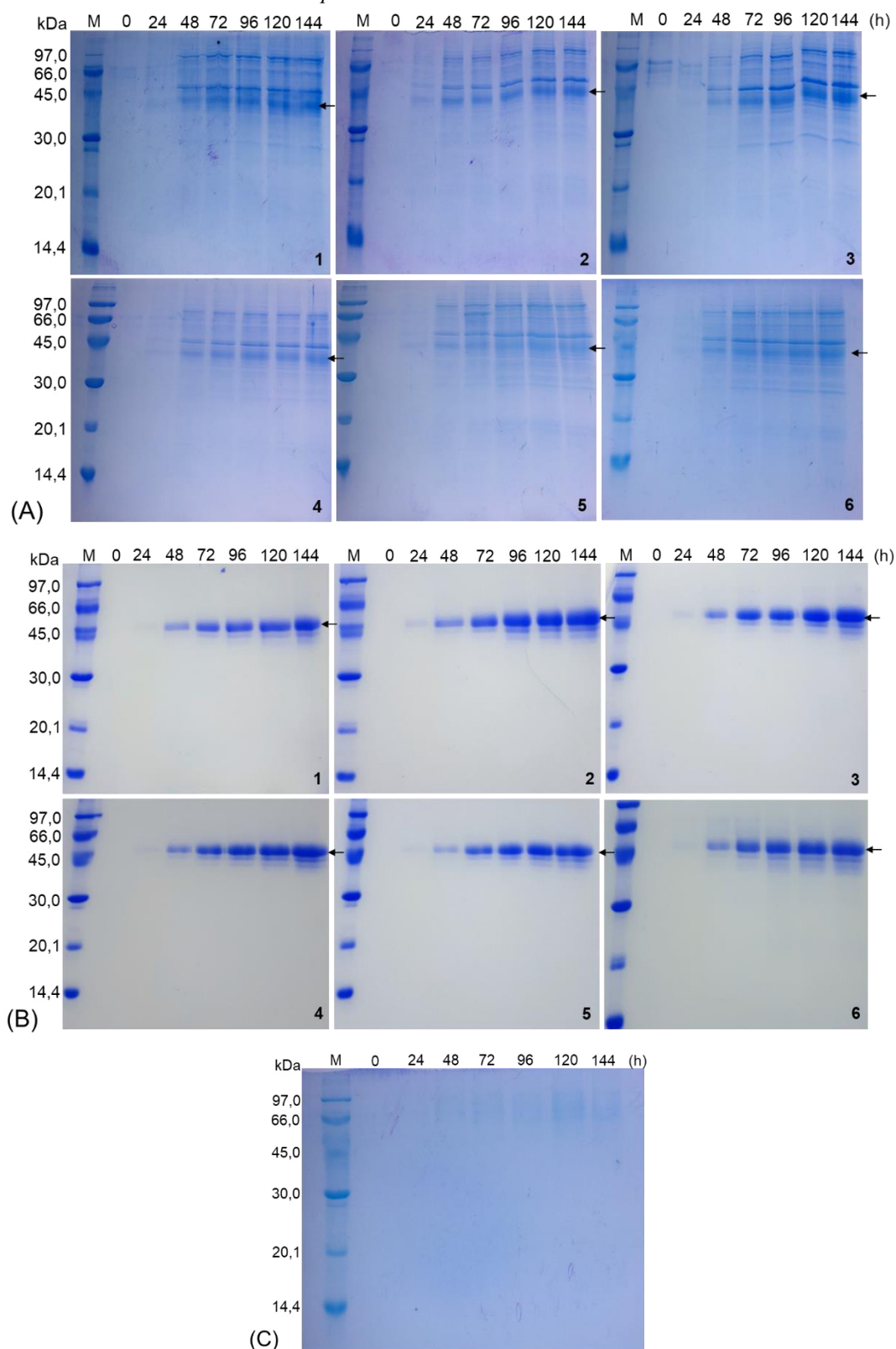
Fonte: elaborada pela autora. (A) Densidade óptica das culturas a 600 nm e (C) massa celular das culturas de seis clones de *P. pastoris* KM71H transformados com o plasmídeo recombinante pPICZ $\alpha$ A + *AoChi4849*, em indução de 144 h. (B) Densidade óptica das culturas a 600 nm e (D) massa celular das culturas de seis clones de *P. pastoris* KM71H transformados com o plasmídeo recombinante pPICZ $\alpha$ A + *AoChi5472*, em indução de 144 h. A  $DO_{600nm}$  e a massa celular foram medidas no início da indução (tempo zero) e a cada 24 h. Um clone transformado com o pPICZ $\alpha$ A íntegro foi utilizado como controle.

A análise por SDS-PAGE do meio livre de células coletado a cada 24 h de indução, revelou a presença de um perfil proteico expresso de forma diferente entre os clones transformados com pPICZ $\alpha$ A recombinante e entre estes e o clone transformado com pPICZ $\alpha$ A íntegro (Figura 27). Nos clones que expressam a rAoChi4849 (Figura 27A), ocorre a produção de uma variedade maior de proteínas em relação aos clones que expressam a rAoChi5472, para os quais se observa a presença de poucas bandas de proteína no gel de SDS-PAGE (Figura 27B). Na figura 27, a banda proteica que possivelmente representa a quitinase recombinante está indicada com uma seta. Esta previsão foi feita com base na maior intensidade com que a banda aparece no gel de SDS-PAGE.

A diferença no perfil proteico expresso pelos clones transformados com pPICZ $\alpha$ A recombinante e entre estes e o clone transformado com pPICZ $\alpha$ A íntegro também foi notável com relação à quantificação de proteínas totais solúveis e na determinação da atividade quitinásica sobre a quitina coloidal (Figura 28). Nesta análise, o meio livre de células dos clones 6 de *P. pastoris* KM71H transformados para expressão da rAoChi4849 e da rAoChi5472 e o meio livre de células do clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZ $\alpha$ A íntegro, coletados com 144 h de indução, foram utilizados nos ensaios de determinação de proteínas totais solúveis e atividade quitinásica. O resultado mostra que a quantidade de proteínas totais solúveis produzidas pelos clones transformados com pPICZ $\alpha$ A recombinante foi superior à quantidade de proteínas totais solúveis produzidas pelo clone transformados com pPICZ $\alpha$ A íntegro (Figura 28A).

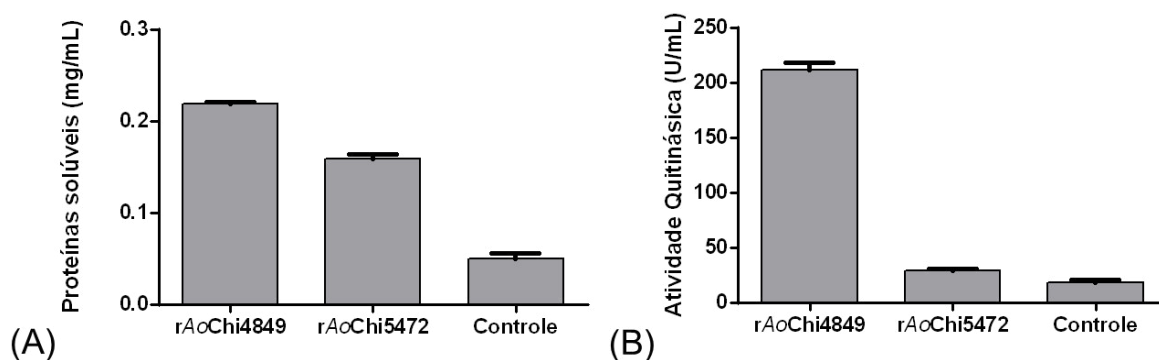
Com relação à atividade quitinásica, o meio livre de células do clone 6 de *P. pastoris* KM71H transformado para expressão da rAoChi4849 apresentou taxa de atividade 8 vezes maior em relação ao meio livre de células do clone 6 de *P. pastoris* KM71H transformado para expressão da rAoChi5472 (Figura 28B). Além disso, o ensaio também detectou uma atividade basal no meio livre de células do clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZ $\alpha$ A íntegro, que pode representar um falso positivo de atividade, sendo a coloração obtida, resultado da detecção de compostos do meio de cultura.

Figura 27 – Análise em gel de SDS-PAGE da indução piloto da expressão das quitinasases rAoChi4849 e rAoChi5472 em seis clones de *P. pastoris* KM71H.



Fonte: elaborada pela autora. SDS-PAGE do meio livre de células coletado a cada 24 h durante a indução piloto de 144 h realizada com (A) seis clones de *P. pastoris* KM71H transformados com o plasmídeo + AoChi4849, (B) seis clones de *P. pastoris* KM71H transformados com o plasmídeo pPICZαA + AoChi5472 e (C) um clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZαA íntegro. As bandas marcadas com seta aparecem com maior intensidade nos géis e possivelmente correspondem às quitinasases. Os poços M contêm 5  $\mu$ L do marcador *Low Weight Marker*.

Figura 28 – Perfil da produção de proteínas totais solúveis e atividade quitinásica nos clones 6 de *P. pastoris* KM71H transformados para expressão da *rAoChi4849* e da *rAoChi5472* em comparação com o clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZ $\alpha$ A íntegro.



Fonte: elaborada pela autora. (A) concentração de proteínas totais solúveis e (B) atividade quitinásica determinada no meio livre de células coletado com 144 h de indução de um clone de *P. pastoris* KM71H transformado para expressão da *rAoChi4849* (clone 6) e um clone de *P. pastoris* KM71H transformado para expressão da *rAoChi5472* (clone 6) em comparação ao clone de *P. pastoris* KM71H transformado com pPICZ $\alpha$ A íntegro (Controle).

A presença de atividade quitinásica no meio livre de células dos clones de *P. pastoris* transformados para expressão das quitinases, demonstra que as proteínas foram produzidas na forma solúvel e ativa, e que o fator- $\alpha$  de *S. cerevisiae* presente no vetor pPICZ $\alpha$ A atuou com eficiência no direcionamento das quitinases para o meio extracelular. Daly e Hearn (2005) ressaltam a eficiência deste sistema de expressão na obtenção proteínas recombinantes, o qual tem sido utilizado por vários pesquisadores, incluindo Landim et al. (2017), que obtiveram uma quitinase do feijão-caupi (*V. unguiculata*) na forma solúvel e ativa.

## 7.8 Purificação e Identificação das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*

Os clones 6 de *P. pastoris* KM71H recombinantes foram utilizados na preparação de uma indução da expressão das quitinases em larga escala (1 litro). O meio livre de células foi utilizado para concentração e fracionamento das proteínas com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nos intervalos de saturação de 0-35%, 35-65% e 65-95% (GREEN; HUGHES, 1955). As frações de proteína obtidas, F0/35, F35/65 e F65/95, foram analisadas por SDS-PAGE (imagens não mostradas), onde foi possível observar que a *rAoChi4849* ficou retida nas três frações e a *rAoChi5472* na F35/65 e F65/95, as quais foram reunidas e utilizadas no processo de purificação das quitinases através de cromatografia de afinidade com íon metálico imobilizado (IMAC).

Esta cromatografia consiste na interação entre íons metálicos imobilizados e a *tag* calda de histidina (6xHis) presente nas proteínas recombinantes produzidas no vetor pPICZ $\alpha$ A. Em geral, o níquel II ( $\text{Ni}^{2+}$ ) é o íon metálico mais utilizado por possuir alta capacidade de ligação com a *tag* 6xHis (YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012).

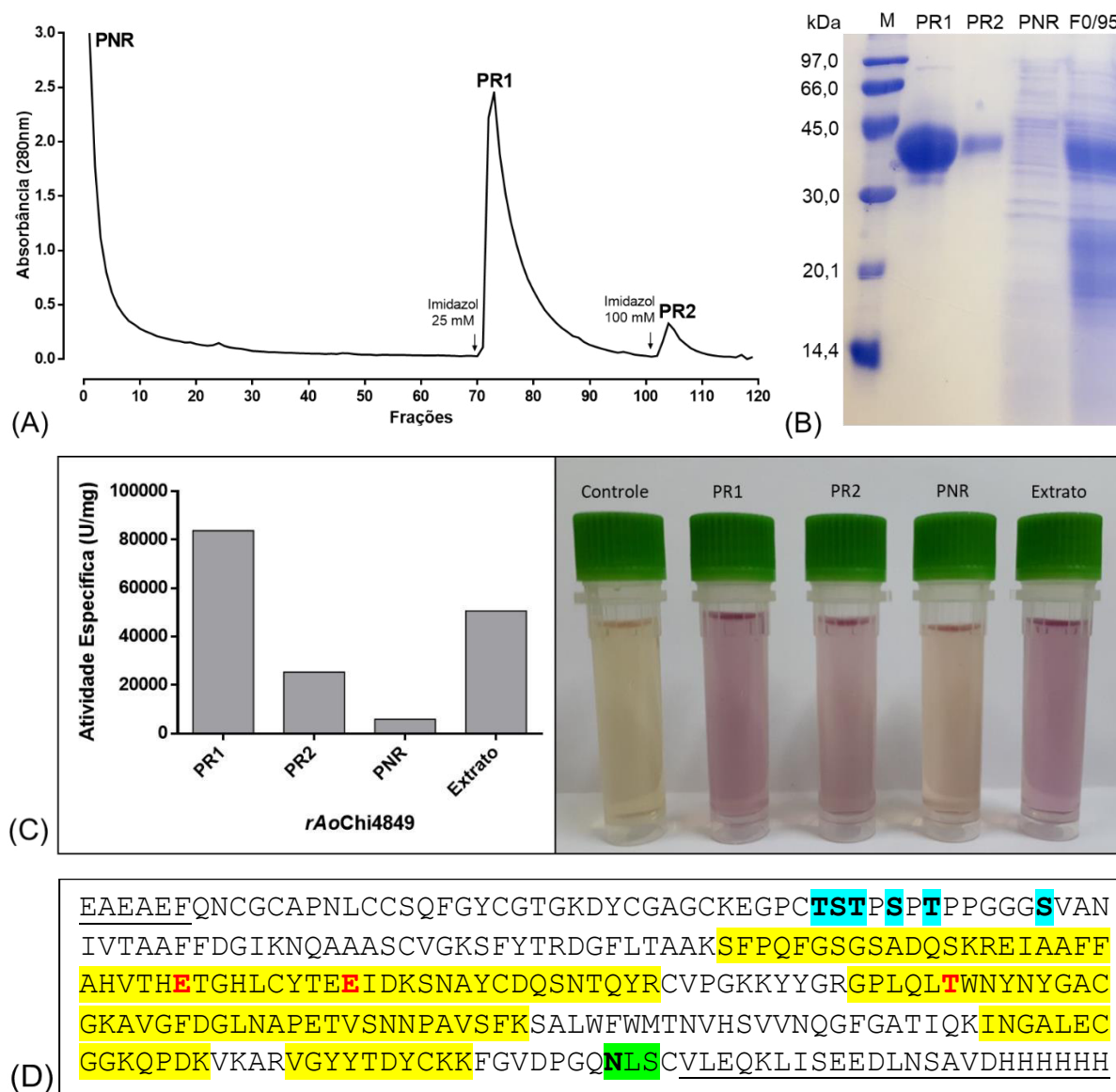


Na purificação da rAoChi4849, as proteínas retidas na matriz cromatográfica foram eluídas com imidazol na concentração de 25 e 100 mM gerando dois picos retidos, PRI e PRII (Figura 29A). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, onde foi possível constatar a presença de uma única banda proteica nos dois picos com massa molecular aparente entre 30 e 45 kDa (Figura 29B). Um ensaio de atividade quitinásica utilizando a quitina coloidal como substrato foi realizado com estas amostras e pôde-se constatar a presença de atividade tanto no PRI quanto no PRII, através do aumento da absorbância a 585 nm e coloração rosa adquirida pelas amostras (Figura 29C).

Para confirmar a identidade da quitinase recombinante, rAoChi4849, a banda referente a proteína foi excisada do gel de poliacrilamida e analisada por espectrometria de massas. Os peptídeos identificados (nove no total) cobriram 41,6% da sequência da quitinase recombinante, incluindo os resíduos catalíticos, e foram 100% idênticos à sequência de aminoácidos já conhecida (Figura 29D). Nesta análise, a massa molecular teórica da quitinase rAoChi4849 foi calculada para 29,50 kDa, o que está de acordo com a previsão realizada para a sequência putativa no programa *Compute pI/Mw* ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)), que mostrou uma massa molecular teórica de 29,56 kDa. No entanto, há uma considerável diferença entre a massa molecular teórica e a massa molecular observada na SDS-PAGE, que mostra um peso molecular consideravelmente maior (Figura 29B).

Neste caso, a proteína heteróloga possivelmente apresenta-se glicosilada e por conta disso possui peso molecular maior que o previsto, já que, segundo as análises realizadas no *NetNGlyc 1.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e no *NetOGlyc 4.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), esta quitinase contém um possível sítio para *N*-glicosilação (NxS/T, x ≠ P), destacado em verde na figura 29D, e potenciais locais para *O*-glicosilação, destacados na cor ciano na figura 29D. Portanto, confirma-se a produção da quitinase recombinante AoChi4849 do cajueiro em *P. pastoris* KM71H.

Figura 29 – Purificação e identificação da quitinase recombinante *rAoChi4849* produzida em *P. pastoris* KM71H.



Fonte: elaborada pela autora. (A) Perfil cromatográfico da purificação da *rAoChi4849* em matriz de Ni-*Sepharose*. (B) Gel de SDS-PAGE 15% com as amostras de proteínas obtidas na purificação: o poço M contém 5 µL do marcador *Low Weight Marker*; o PNR (Pico Não Retido) contém as proteínas não retidas na matriz cromatográfica; o PR (Pico Retido) 1 e 2 contém, respectivamente, as proteínas retidas na matriz cromatográfica eluídas na presença de imidazol 25 e 100 mM, e a fração F0/95 contém as proteínas do meio livre de células da cultura de um clone de *P. pastoris* KM71H, concentradas com sulfato de amônio. (C) Atividade quitinásica realizada com as amostras de proteínas obtidas na purificação da *rAoChi4849* e com o extrato original (meio contendo o *pool* de proteínas obtidas da cultura de um clone de *P. pastoris* KM71H, incluindo a proteína recombinante). (D) Sequência de aminoácidos da *rAoChi4849*: os resíduos adicionados pelo vetor de expressão estão sublinhados; as sequências correspondentes aos peptídeos identificados por MS/MS estão sombreadas em amarelo; potenciais locais de *N*-glicosilação e *O*-glicosilação estão sombreados em verde e ciano, respectivamente, e os resíduos catalíticos estão destacados em vermelho.

Na purificação da *rAoChi5472*, as proteínas retidas na matriz cromatográfica foram eluídas na presença de imidazol na concentração de 40 e 250 mM gerando dois picos retidos, PRI e PRII (Figura 30A). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, onde foi possível constatar a presença de uma banda proteica isolada no PRI, com massa molecular prevista para 45 kDa de acordo com o padrão apresentado pelo marcador (Figura 30B). Um ensaio de atividade quitinásica utilizando a quitina coloidal como substrato foi realizado com a amostra do PRI, onde foi constatada a presença de atividade através do aumento da absorbância a 585 nm (valores não mostrados) e coloração rosa adquirida pela amostra (Figura 30C).

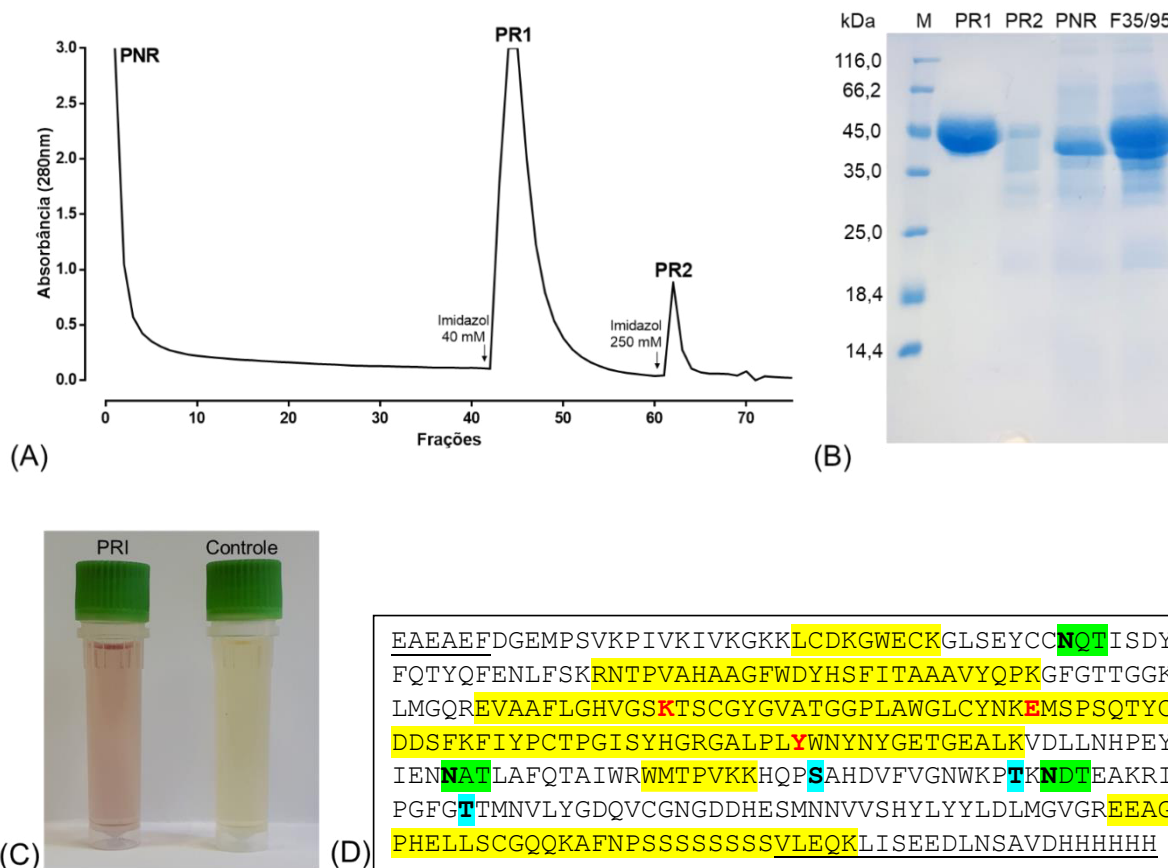
Para confirmar a identidade da quitinase recombinante *rAoChi5472*, a banda referente a proteína foi excisada do gel de poliacrilamida e analisada por espectrometria de massas. Os peptídeos identificados (onze no total) representam 47,0% da sequência primária da quitinase recombinante, os quais foram 100% idênticos à sequência de aminoácidos já conhecida (Figura 30D). Todos os resíduos catalíticos foram identificados nessa análise, incluindo o resíduo Lys<sup>128</sup>, confirmando a presença deste resíduo no CatD da quitinase recombinante *rAoChi5472* de *A. occidentale* (Figura 30D).

Nesta análise, a massa molecular teórica da quitinase *rAoChi5472* foi calculada para 36,42 kDa, o que está de acordo com a previsão realizada para a sequência putativa no programa *Compute pI/Mw* ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)), que mostrou um valor de massa molecular teórica de 36,45 kDa. No entanto, assim como ocorreu com a quitinase *rAoChi4849*, para a quitinase *rAoChi5472* também há uma considerável diferença entre a massa molecular teórica prevista e a massa molecular revelada na SDS-PAGE, onde se observa um peso molecular em torno de 45 kDa para esta proteína (Figura 30B).

Diante disso, é provável que a *rAoChi5472* também apresente-se glicosilada, já que, as análises realizadas no *NetNGlyc 1.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e no *NetOGlyc 4.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) indicam que esta proteína apresenta três possíveis sítios para *N*-glicosilação (NxS/T, x ≠ P), destacado em verde na figura 30D, e potenciais locais para *O*-glicosilação, destacados na cor ciano na figura 30D, o que poderia explicar a obtenção da proteína recombinante com peso molecular maior que o esperado.

Estes resultados confirmam a produção da quitinase recombinante *AoChi5472* do cajueiro em *P. pastoris* KM71H, bem como a presença do resíduo Lys<sup>128</sup> no domínio catalítico da enzima, que possivelmente desempenha a mesma função que o Glu doador de prótons realiza na catálise das quitinases convencionais.

Figura 30 – Purificação e identificação da quitinase recombinante rAoChi5472 produzida em *P. pastoris* KM71H.



Fonte: elaborada pela autora. (A) Perfil cromatográfico da purificação da rAoChi5472 em matriz de Ni-Sephrose. (B) Gel de SDS-PAGE 10% com as amostras de proteínas obtidas na purificação da rAoChi5472: o poço M contém 5  $\mu$ L do marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; o PNR (Pico Não Retido) contém as proteínas não retidas na matriz cromatográfica; o PR (Pico Retido) 1 e 2 contém, respectivamente, as proteínas retidas na matriz cromatográfica eluídas na presença de imidazol 40 e 250 mM, e a fração F35/95 contém as proteínas do meio livre de células da cultura de um clone de *P. pastoris* KM71H, concentradas com sulfato de amônio. (C) Atividade quitinásica realizada no PRI obtido na purificação da rAoChi5472. (D) Sequência de aminoácidos da rAoChi5472 produzida em *P. pastoris* KM71H: os resíduos adicionados pelo vetor de expressão estão sublinhados; as sequências correspondentes aos peptídeos identificados por MS/MS estão sombreadas em amarelo; potenciais locais de N-glicosilação e O-glicosilação estão sombreados em verde e ciano, respectivamente, e os resíduos catalíticos estão destacados em vermelho.

A *N*- e *O*-glicosilação de diferentes proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris* tem sido demonstrada, gerando grandes diferenças entre o valor das massas moleculares teóricas e o valor das massas moleculares observadas nessas proteínas (DIONISIO et al., 2012; LETOURNEUR et al., 2001). Akond et al. (2014), por exemplo, expressaram uma quitinase de classe IV do inhame em *P. pastoris* X-33 e observou por SDS-PAGE a presença de diferentes proteínas ativas com massa molecular de 58, 48, 38, 32 e 28 kDa. Após deglicosilação, o padrão das bandas ativas da quitinase mudou para 32 e 28 kDa. Uma quitinase de classe III do bambu (BoChi3-1) foi expressa também em *P. pastoris* X-33 em duas isoformas, uma isoforma não glicosilada com massa molecular de 28,3 kDa e a outra isoforma glicosilada com massa molecular de 35,7 kDa (KUO et al., 2008).

Apesar disso, a levedura *P. pastoris* tem sido preferencialmente utilizada por vários pesquisadores para a expressão heteróloga de quitinases vegetais, como Landim et al. (2017), que expressaram uma quitinase do feijão-caupi de classe I em *P. pastoris* KM71H, com massas moleculares aparentes de 34 e 37 kDa e Naumann (2011) que expressou uma quitinase de milho de classe IV em *P. pastoris* X-33 com massa molecular aparente de 30 kDa.

Neste estudo, nenhuma região contendo sítios de glicosilação foi identificada na sequência primária dos peptídeos das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 obtidos por MS/MS (Figuras 29D e 30D). Isso pode indicar que a presença de glicosilação nas proteínas, além de contribuir com o peso molecular total das quitinases, pode ter dificultado a formação de peptídeos detectáveis nas análises de LC-MS/MS, assim como descreveu Wang et al. (2017) para duas glicoproteínas modelos com padrão de glicosilação alto e heterogêneo.

A seguir será apresentado o rendimento proteico das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 após os procedimentos de purificação. A tabela 3 mostra todas as etapas desse processo realizado a partir de 500 mL de cultura de células de *P. pastoris* KM71H recombinantes. Pode-se observar que a atividade enzimática específica aumenta a cada etapa, indicando um aumento na concentração da enzima e, conseqüentemente, uma eficiência no processo de purificação (Tabela 3). O rendimento proteico observado para a rAoChi4849 foi de 19,4%, o que corresponde a 49,7 mg de proteína obtida a partir de 500 mL de cultura (Tabela 3). Para a rAoChi5472 o processo de purificação ocorreu com uma taxa menor de perda da proteína de interesse, sendo observado um rendimento de 23,4%, o que corresponde a 46,4 mg de proteína obtida a partir de 500 mL de cultura (Tabela 3). Este rendimento pode ser considerado um excelente resultado se comparado, por exemplo, ao obtido por Akond et al. (2014), que alcançou um rendimento de apenas 3% na purificação de uma quitinase do inhame produzida em *P. pastoris* X-33.

O índice de purificação das quitinases, valor que representa quantas vezes a proteína de interesse foi concentrada em relação ao material de partida, foi de 10,5 para a *rAoChi4849* e 17,0 para a *rAoChi5472* (Tabela 3), indicando, mais uma vez, que houve uma taxa menor de perda da proteína de interesse durante a purificação da *rAoChi5472* e que houve uma taxa maior de perda da proteína de interesse durante a purificação da *rAoChi4849*.

Apesar dos valores do rendimento proteico e do índice de purificação terem sido maiores no processo de obtenção da *rAoChi5472*, observa-se que foi obtida uma quantidade menor desta quitinase purificada (46,4 mg) em relação a *rAoChi4849* (49,7 mg) (Tabela 3). Isso pode ser explicado pelo fato de que a expressão da *rAoChi4849* ocorreu em maior quantidade em relação a expressão da *rAoChi5472*, uma vez que, no meio livre de células contendo a quitinase *rAoChi4849* há 1,3x mais proteínas totais solúveis (256,2 mg) em relação ao meio livre de células contendo a *rAoChi5472* (198,1 mg) (Tabela 3).

Tabela 3 – Etapas de purificação das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* por cromatografia de afinidade em matriz de Ni-*Sepharose 6 Fast Flow*<sup>1</sup>

<b>Etapas da purificação</b>	<b>Proteínas totais (mg)</b>	<b>Atividade Total (U*)</b>	<b>Atividade Específica (U*.mgP<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Purificação (fold)</b>
<b>Purificação da <i>rAoChi4849</i></b>					
<b>Meio livre de células</b>	256,2	999.315,2	3.900,0	100	1
<b>F0/95**</b>	127,1	2.753.774,5	21.664,4	49,6	5,5
<b>PR1***</b>	49,7	2.033.837,2	40.922,2	19,4	10,5
<b>Purificação da <i>rAoChi5472</i></b>					
<b>Meio livre de células</b>	198,1	3.2873,7	165,9	100	1
<b>F35/95**</b>	113,7	19.8910,1	1.749,4	57,4	10,5
<b>PR1***</b>	46,4	13.0973,5	2.822,7	23,4	17,0

<sup>1</sup>dados obtidos a partir de 500 mL de cultura de um clone de *P. pastoris* KM71H induzido por 144 h.

\*1 U de atividade total = 1 nmol de GlcNAc/h; 1 U de atividade específica = 1 nmol de GlcNAc/h/mgP.

\*\* Fração de proteína obtida do meio livre de células por fracionamento com sulfato de amônio.

\*\*\* Proteína retida na matriz cromatográfica de Ni-*Sepharose 6 Fast Flow* eluída na presença de imidazol.

## 7.9 Caracterização bioquímica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*

### 7.9.1 Atividade quitinásica com diferentes substratos

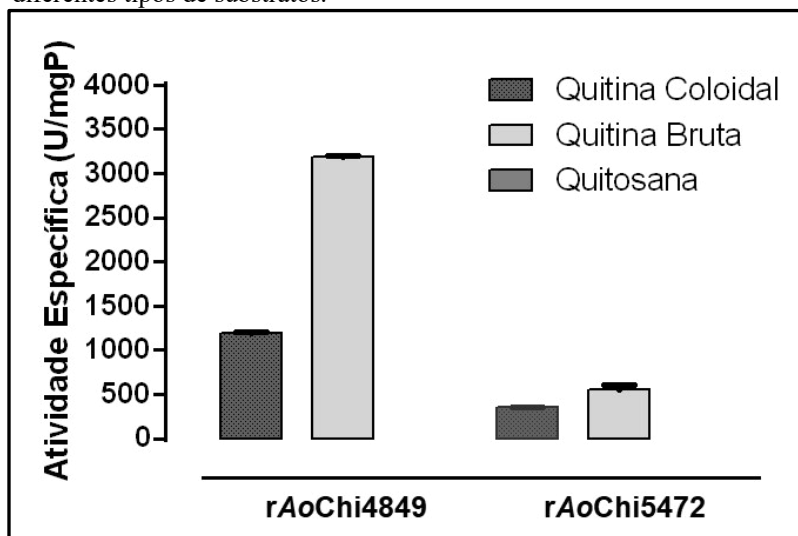
A atividade enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* foi avaliada em relação à especificidade para os substratos quitina coloidal, quitina insolúvel e quitosana. A *rAoChi4849* apresentou atividade específica de 1190,47 U.mgP<sup>-1</sup> sobre a quitina coloidal e de 2514,53 U.mgP<sup>-1</sup> sobre a quitina insolúvel. A *rAoChi5472* apresentou atividade específica de 357,42 U.mgP<sup>-1</sup> sobre a quitina coloidal e de 482,53 U.mgP<sup>-1</sup> sobre a quitina insolúvel. Nenhuma das duas quitinases apresentaram atividade catalítica sobre a quitosana (Figura 31). Este resultado demonstra que a *rAoChi4849* é mais ativa que a *rAoChi5472*, e que ambas possuem especificidade maior à quitina insolúvel.

Ao que tudo indica, a *rAoChi5472* deve ser menos ativa que a *rAoChi4849* em virtude da ausência do domínio de ligação à quitina e não em consequência da substituição do resíduo catalítico Glu pelo resíduo Lys, já que outros autores já demonstraram que a ausência do ChtBD pode suprimir a capacidade de hidrolisar alguns tipos de substratos, principalmente a quitina insolúvel (TAKASHIMA et al., 2018).

A matriz de carapaça de caranguejo (Sigma-Aldrich), escolhida para o ensaio de atividade quitinásica com quitina insolúvel, é formada por cadeias de Poly(*N*-acetyl-1,4-β-D-glucopyranosamine). Segundo Zhou et al. (2019), sob condições normais, a degradação completa da quitina requer a ação de diferentes tipos de enzimas catalíticas e, neste processo, as quitinases exo e endo podem atuar em cadeias longas de quitina insolúvel, disponibilizando cadeias menores que serão degradadas em *N*-acetilglucosamina através da clivagem de ligações β-1,4-glicosídicas pela ação enzimática da *N*-acetilglucosaminidase. Dessa forma, a ação quitinolítica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* sobre a matriz de carapaça de caranguejo pode ser um indício de que estas quitinases tenham preferência por quebrar longas cadeias de quitina e talvez por isso demonstrem maior atividade sobre a quitina insolúvel.

A ação enzimática sobre a quitina insolúvel é relatada para diversas quitinases recombinantes e isso leva à possibilidade de utilização dessas enzimas na degradação comercial da quitina com o objetivo de gerar bioprodutos de GlcNAc (YANG et al., 2016; WANG et al., 2018). Outra possibilidade relevante é a utilização dessas enzimas como biofungicidas para o controle de fungos patogênicos que causam doenças tanto em plantas, quanto em humanos (GARCÍA-FRAGA et al., 2015).

Figura 31 – Atividade das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* com diferentes tipos de substratos.



Fonte. Elaborada pela autora. Na atividade específica 1 U de atividade equivale a 1 nmol de GlcNAc formado por h a cada mg de proteína (1 nmol de GlcNAc/h/mgP).

A quitosana é um polissacarídeo obtido da desacetilação da quitina. Dependendo do seu grau de desacetilação, as quitinases podem apresentar atividade catalítica sobre a mesma (SHEHATA et al., 2018). Nos ensaios de atividade quitosanásica realizados com as quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* foi utilizada uma quitosana com grau de desacetilação de 80%. Dessa forma, a ausência de atividade indica que estas quitinases não possuem atividade quitinolítica para a quitosana neste grau de acetilação, podendo as mesmas apresentarem atividade para a quitosana com grau de acetilação maior.

As perspectivas de utilização dos produtos gerados a partir da hidrólise da quitosana incluem o uso como agentes antifúngicos, antibacterianos e antioxidantes. Dessa forma, há um grande interesse na obtenção de enzimas alternativas que atuem na degradação da quitosana (SHEHATA et al., 2018).

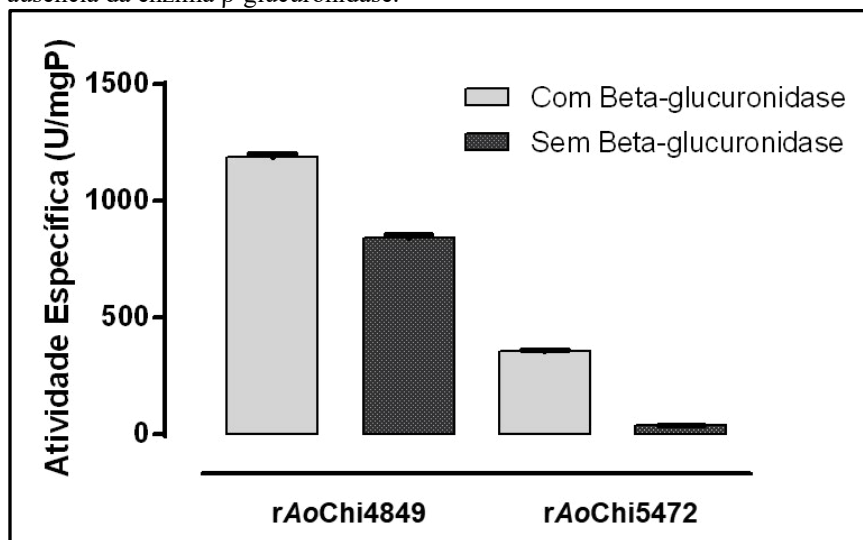
### 7.9.2 Atividade quitinásica na presença e ausência de $\beta$ -glucuronidase

Ensaio de atividade quitinásica foram realizados, com o substrato quitina coloidal, na presença e na ausência da enzima  $\beta$ -Glucuronidase, que catalisa a degradação de carboidratos complexos em carboidratos menores. A ocorrência de atividade quitinolítica na ausência desta enzima pode indicar ação exoquitinásica das quitinases, pois neste caso há formação de açúcares menores detectáveis no ensaio. Da mesma forma, a ausência de atividade quitinolítica pode indicar ação endoquitinásica das quitinases, onde há formação de cadeias longas de quitina



menos detectáveis no ensaio enzimático. Para a *rAoChi4849* foi obtida atividade quitinásica específica de 1190,47 U.mgP<sup>-1</sup> e 843,18 U.mgP<sup>-1</sup> na presença e ausência da  $\beta$ -Glucuronidase, respectivamente. A *rAoChi5472* apresentou atividade quitinásica específica de 357,42 U.mgP<sup>-1</sup> e 40,74 U.mgP<sup>-1</sup> na presença e ausência da  $\beta$ -Glucuronidase, respectivamente (Figura 32).

Figura 32 – Atividade das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* na presença e ausência da enzima  $\beta$ -glucuronidase.



Fonte. Elaborada pela autora. A atividade específica é equivalente a 1 nmol de GlcNAc/h/mgP.

A ocorrência de atividade quitinásica na ausência da  $\beta$ -Glucuronidase, embora menor, foi detectada. Isso indica que as quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* apresentam atividade exoquitinásica, mas que, preferencialmente exercem atividade endoquitinásica.

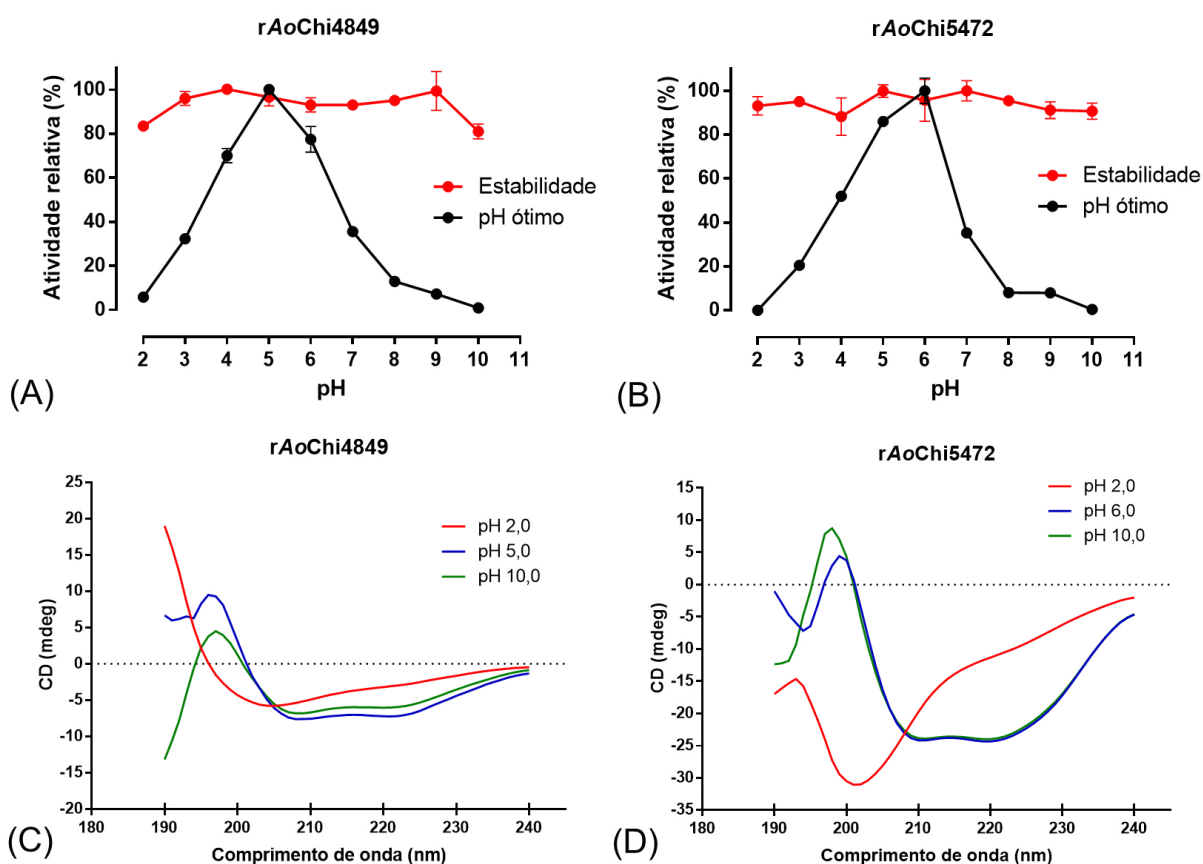
Zhou et al. (2019) relataram casos de quitinases que apresentam ampla especificidade, ou seja, quitinases que possuem dois ou três mecanismos catalíticos diferentes, incluindo os mecanismos exo e endoquitinásico. De acordo com esse autor, essas quitinases de ampla especificidade têm grande potencial na conversão de quitina e representam um importante insumo biotecnológico.

### 7.9.3 Efeito do pH na atividade quitinásica

O pH ótimo para a atividade enzimática e a estabilidade em diferentes pH foram investigados para as duas quitinases de *A. occidentale*. A *rAoChi4849* apresentou atividade enzimática ótima em pH 5,0 e a *rAoChi5472* em pH 6,0 (Figuras 33A e 33B, respectivamente). Após incubação por 24 h em tampões na faixa de pH 2,0 a 10,0, as duas quitinases mantiveram-se ativas, demonstrando estabilidade à variação do pH (Figuras 33A e 33B, respectivamente).

Análises de CD das proteínas foram realizadas no pH que apresentam melhor atividade e nos pH extremos 2,0 e 10,0. Para as quitinases GH19, proteínas com alto teor de  $\alpha$ -hélice, os espectros de CD apresentam bandas negativas em 208 e 222 nm e uma banda positiva em 193 nm (GREENFIELD, 2006b). Os espectros obtidos em diferentes pH mostram que a estrutura secundária das quitinases se manteve estável nos pH em que apresentam maior atividade (5,0 para a rAoChi4849 e 6,0 para a rAoChi5472) e no pH 10,0, mas apresentam mudanças nas suas conformações em pH 2,0 (Figuras 33C e 33D).

Figura 33 - Efeito da variação do pH na atividade enzimática e na estrutura secundária das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472.



Fonte: elaborada pela autora. Efeito do pH na (A e B) atividade enzimática e na (C e D) estrutura secundária das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472.

Atividade quitinásica ótima em pH igual a 5,0 ocorre em diversas quitinases vegetais, como demonstraram Sierra-Gómez et al. (2019) para duas quitinases de classe I do *A. tequilana*, Akond et al. (2014) para uma quitinase de classe IV do inhame e Landim et al. (2017) para uma quitinase de classe I do feijão-caupi. Da mesma forma, quitinases vegetais com pH ótimo igual a 6,0 já foram descritas, como relataram Vincenzi et al. (2014) para uma quitinase de classe IV da uva, Xayphakatsa et al. (2008) para uma quitinase de classe II do arroz e Preety;

Sharma e Hooda (2018) para uma quitinase de *Vigna mungo* (L.) Hepper. Algumas dessa quitinases vegetais também demonstraram estabilidade em ampla faixa de pH e apresentam instabilidade em pH 2,0. É o caso da quitinase do inhame, que manteve-se ativa após exposição aos pH 11,0 e 12,0, mas reteve menos de 40% da sua atividade após exposição ao pH 2,0 (AKOND et al., 2014). No caso das quitinases do cajueiro, após exposição ao pH 2,0 a *rAoChi4849* e a *rAoChi5472* mantiveram 80% e 90% da atividade enzimática, respectivamente.

As análises realizadas no PROPKA (<[http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.0.0/](http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/)>) mostraram que o resíduo do aminoácido Glu ácido catalítico da *AoChi4849* (Glu<sup>138</sup>) apresenta pKa igual a 5,52 e o Glu básico catalítico (Glu<sup>147</sup>) apresenta pKa igual a 4,04 em pH 5,0. Isso significa que neste pH o grupo carboxilato do Glu<sup>138</sup> está apto a doar um próton ao átomo de oxigênio da ligação glicosídica da quitina e o grupo carboxilato do Glu<sup>147</sup> a auxiliar o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao carbono anomérico do grupo de saída. Com relação ao resíduo do aminoácido Lys com função ácida catalítica na *AoChi5472* (Lys<sup>128</sup>), este apresenta pKa igual a 6,01 e o Glu básico catalítico (Glu<sup>150</sup>) pKa igual a 4,48 em pH 6,0. Isso indica que, da mesma forma como ocorre na *rAoChi4849*, há condições para a reação catalítica da *rAoChi5472* ocorrer, validando, portanto, a atuação do resíduo Lys<sup>128</sup> como ácido catalítico na reação enzimática desta quitinase.

Observa-se que em pH 2,0 e pH acima de 8,0 a atividade catalítica das duas quitinases é desprezível (Figuras 33A e 33B). Isso se deve a forma protonada do grupo carboxila dos resíduos de Glu básicos catalíticos em pH 2,0, desfavorecendo sua atuação como receptor de prótons na catálise, e a forma desprotonada do grupo amina dos resíduos ácidos catalíticos (Glu/Lys) em pH acima de 8,0, não podendo mais atuarem como doadores de prótons para sustentarem a catálise. A medida que o pH se afasta dos extremos e se aproxima dos valores ótimos para a atividade catalítica, haverá resíduos de Glu básico catalíticos aptos a receberem prótons e resíduos ácidos catalíticos aptos a doarem prótons para a catálise.

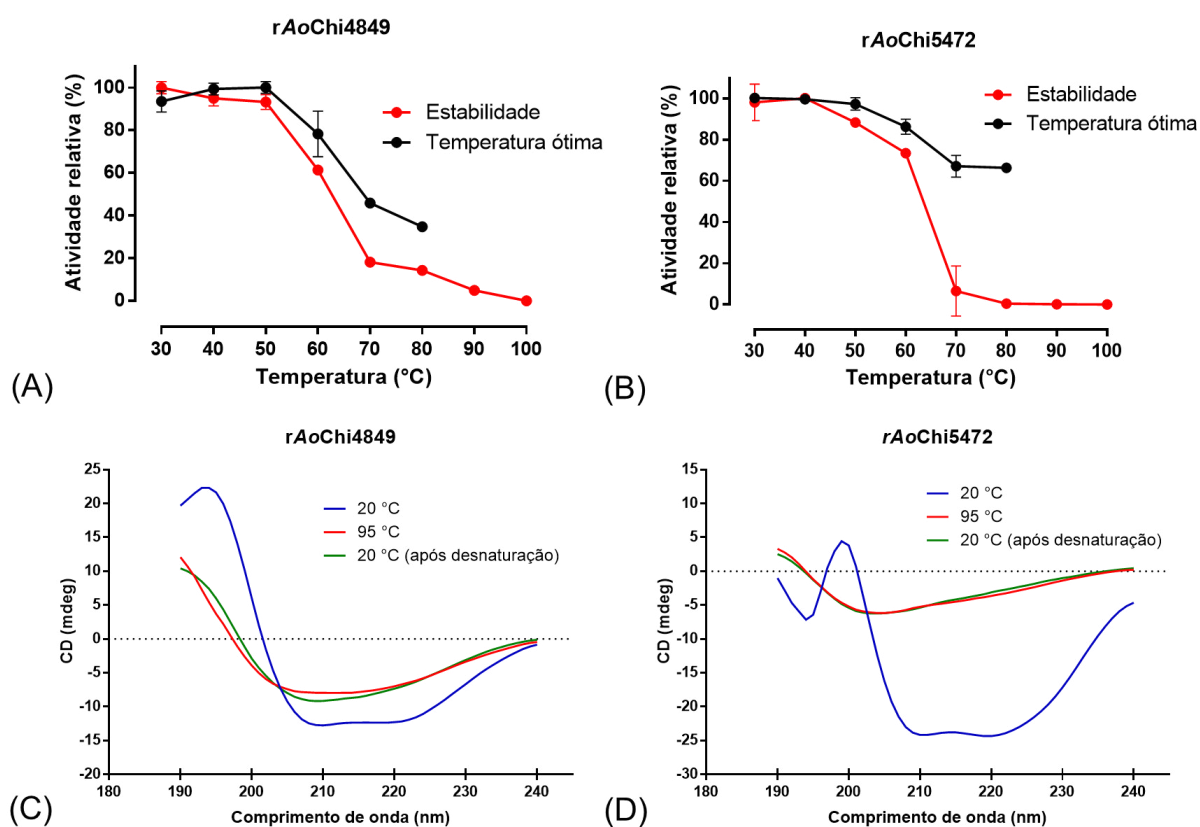
O CatD da *AoChi5472* possui, além do resíduo Lys<sup>128</sup>, outros 11 resíduos de Lys, todos eles com valores teóricos de pKa de seus grupos amina variando de 10,18 (Lys<sup>76</sup>) a 10,75 (Lys<sup>111</sup>), assim como o valor do pKa da Lys na água (10,57) (NOZAKI; TANFORD, 1967). No entanto, resíduos de Lys localizados em regiões hidrofóbicas de certas proteínas podem ter valores de pKa anormais e são essenciais para muitos processos bioquímicos, com determinou experimentalmente (KOUAGENTAKIS et al., 2018). Isso sugere, mais uma vez, que o resíduo Lys<sup>128</sup> da *rAoChi5472* atue como doador de prótons na catálise, confirmando a funcionalidade desta quitinase de *A. occidentale* de classe VI na degradação enzimática da quitina.

### 7.9.4 Efeito da temperatura na atividade quitinásica

A temperatura ótima para a atividade enzimática e a estabilidade à variação de temperatura foram investigadas para as duas quitinases de *A. occidentale*. A rAoChi4849 apresentou atividade enzimática ótima entre 40 e 50 °C e a rAoChi5472 entre 30 e 40 °C (Figuras 34A e 34B, respectivamente). Após incubação por 1 h na faixa de temperatura de 30 a 100 °C, a rAoChi4849 manteve sua atividade enzimática acima de 90% até 50 °C, sendo inativada gradativamente, com perda de 40% da atividade a 60 °C, mais de 80% a 70 °C e 100% a 100 °C (Figura 34A). Já a rAoChi5472 manteve 100% da sua atividade enzimática até 40 °C, perdeu 12% da atividade a 50 °C, 27% a 60 °C, 93,5% a 70 °C e 100% a 80 °C (Figura 34B).

As mudanças na conformação estrutural das quitinases após desnaturação térmica foram evidenciadas pelos espectros de CD obtidos a 95 °C (Figuras 34C e 34D). Para avaliar se esta desnaturação térmica é irreversível, após as análises a 95 °C as amostras de proteínas retornaram à temperatura de 20 °C e uma nova medição de CD foi realizada. Os espectros obtidos mostram que este processo é irreversível para as duas quitinases (Figuras 34C e 34D).

Figura 34 - Efeito da variação da temperatura na atividade enzimática e na estrutura secundária das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472.



Fonte: elaborada pela autora. Efeito da temperatura na (A e C) atividade enzimática e na (B e D) estrutura secundária das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472.

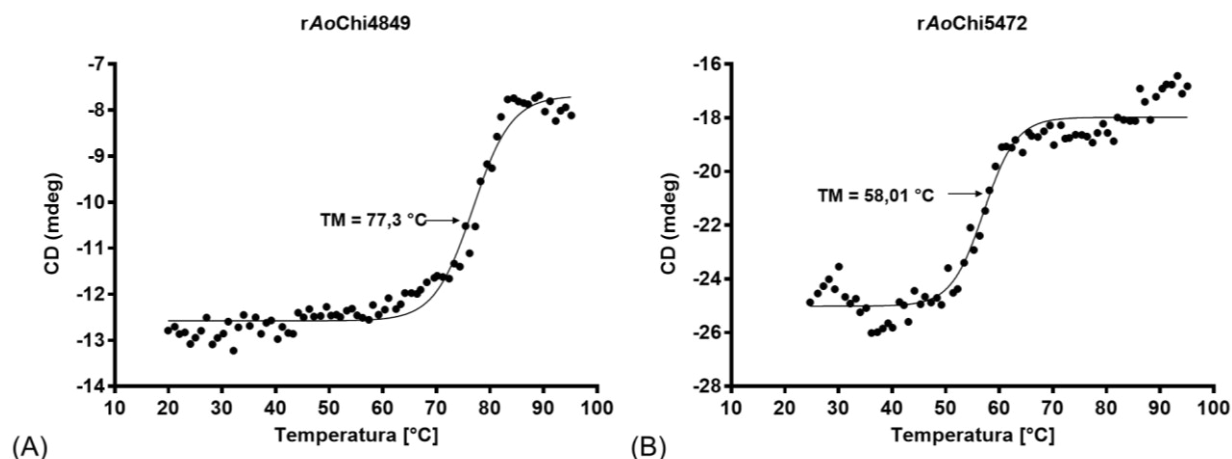
Muitas quitinases vegetais apresentam temperatura ótima de atividade quitinásica entre 30 e 50 °C, como foi mostrado para as quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*. A temperatura ótima de 30 °C foi demonstrada para uma quitina de classe IV da uva (VINCENZI et al., 2014), para uma quitinase também de classe IV do mamão (CHEN et al., 2007) e para uma quitinase de classe I do feijão-caupi (LANDIM et al., 2017). Uma quitinase de classe II do arroz apresentou atividade ótima em 35 °C (XAYPHAKATSA et al., 2008) e uma quitinase de *V. mungo* mostrou atividade ótima em 55 °C (PREETY; SHARMA; HOODA, 2018).

Em relação a estabilidade térmica, após incubação a 70 °C por 1 h a *rAoChi4849* reteve 18,2% da atividade enzimática, sendo totalmente inativada por incubação a 100 °C, mostrando ser mais termoestável em relação à *rAoChi5472*, que após incubação a 70 °C por 1 h reteve apenas 6,5% da atividade enzimática, sendo totalmente inativada já na temperatura de 80 °C (Figura 34A e 34B). Apesar desse resultado, é possível encontrar quitinases de plantas com alta estabilidade térmica, como é o caso das quitinases do inhame (AKOND et al., 2014) e da pêra (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) (HAN et al., 2016) que possuem temperatura ótima de atividade quitinásica a 70 °C e retêm 40% da atividade enzimática na temperatura de 80 °C.

A análise da sequência de aminoácidos putativa das quitinases recombinantes no servidor DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) prevê a formação de 8 ligações dissulfeto na *rAoChi4849* (Cys<sup>31</sup> - Cys<sup>52</sup>, Cys<sup>33</sup> - Cys<sup>45</sup>, Cys<sup>38</sup> - Cys<sup>39</sup>, Cys<sup>56</sup> - Cys<sup>61</sup>, Cys<sup>95</sup> - Cys<sup>143</sup>, Cys<sup>155</sup> - Cys<sup>164</sup>, Cys<sup>187</sup> - Cys<sup>261</sup> e Cys<sup>242</sup> - Cys<sup>274</sup>) e 6 na *rAoChi5472* (Cys<sup>43</sup> - Cys<sup>49</sup>, Cys<sup>56</sup> - Cys<sup>131</sup>, Cys<sup>57</sup> - Cys<sup>146</sup>, Cys<sup>158</sup> - Cys<sup>168</sup>, Cys<sup>268</sup> - Cys<sup>306</sup>). Isso pode refletir, portanto, na resistência à desnaturação térmica dessas quitinases e explica a maior estabilidade da *rAoChi4849* em relação à *rAoChi5472*, já que as ligações dissulfeto contribuem para a estabilidade estrutural de proteínas em altas temperaturas e, principalmente, para a estabilidade dos domínios catalíticos, assim como mostrou Ohnuma et al. (2008) para o domínio LysM da quitinase PrChi-A de *Pteris ryukyuensis* Tagawa.

A temperatura de fusão térmica (T<sub>m</sub>) das quitinases foi determinada monitorando as mudanças na elipiticidade molar em função da temperatura (GREENFIELD, 2006c). A T<sub>m</sub> obtida para a *rAoChi4849* e *rAoChi5472*, respectivamente, foi de 77,3 e 58,01 °C (Figura 35). Este resultado indica mais uma vez que a *rAoChi4849* é mais termoestável que a *rAoChi5472*, como também foi constatado nos ensaios de estabilidade térmica (Figura 34). Outras quitinases vegetais também apresentam valores de T<sub>m</sub> nessa faixa. Sierra-Gómez et al. (2019) identificaram valores de T<sub>m</sub> de 70 e 71 °C para as quitinases do *A. tequilana*, Landim et al. (2017) determinaram a T<sub>m</sub> de 54,4 para a quitinase do feijão-caupi e Falconer et al. (2010) determinaram a T<sub>m</sub> de 55 °C para uma quitinase da uva.

Figura 35 - Curva de desnaturação térmica das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 na faixa de 20 a 95 °C.



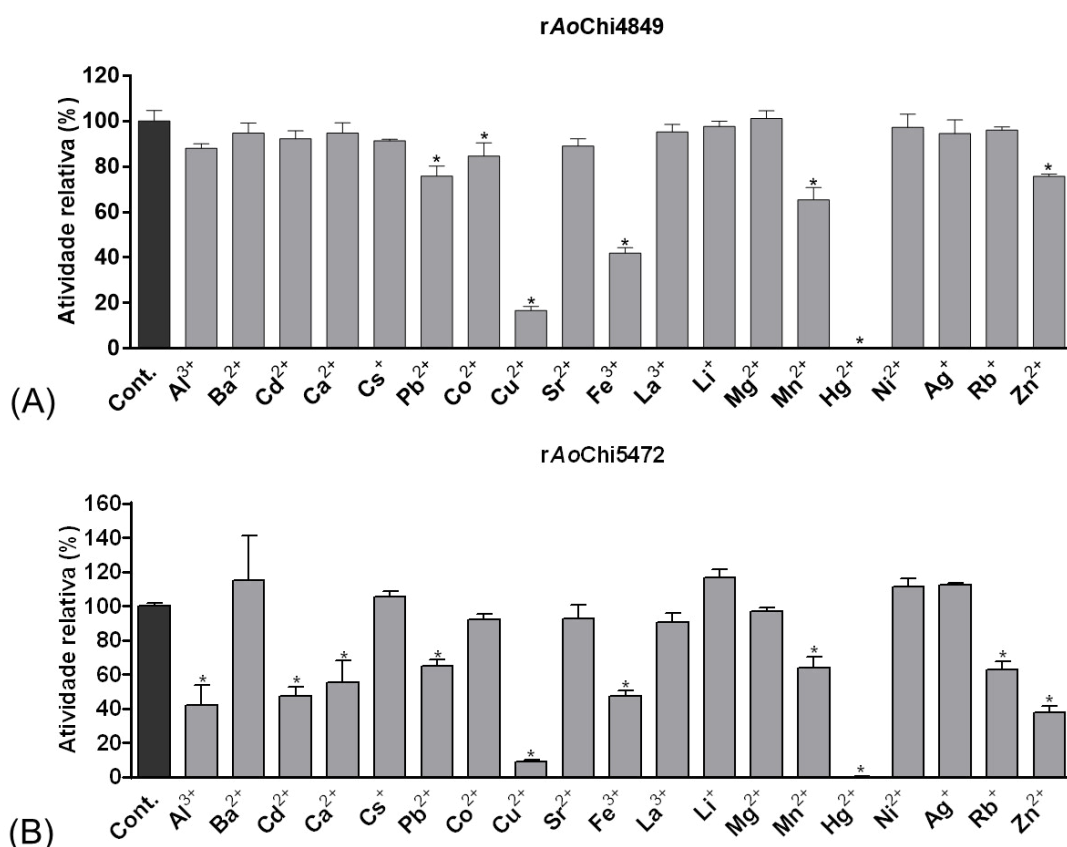
Fonte: elaborada pela autora. Curva de desnaturação térmica das quitinases (A) rAoChi4849 e (B) rAoChi5472 determinada pelo espectro de CD obtido a 215 nm em diferentes temperaturas (20 a 95 °C), com amostras de proteína purificada a 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> em água. TM calculada de acordo com Greenfield (2006b).

### 7.9.5 Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade quitinásica

Os ensaios de atividade quitinásica na presença de íons metálicos demonstraram que alguns íons reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade enzimática da rAoChi4849 (Pb<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>) e da rAoChi5472 (Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Rb<sup>+</sup> e Zn<sup>2+</sup>), enquanto que o Hg<sup>2+</sup> inibiu 100% a atividade de ambas as quitinases (Figura 36).

A interferência de íons metálicos carregados positivamente na atividade enzimática de quitinases tem sido descrita como consequência da interação destes íons com os resíduos carregados negativamente no sítio ativo da enzima, incluindo os resíduos de Glu envolvidos na atividade catalítica (LANDIM et al., 2017; SOUSA et al., 2019). Neste caso, a interação entre os íons metálicos positivos pode estar ocorrendo com os resíduos Glu<sup>138</sup> e Glu<sup>147</sup> na rAoChi4849 e com os resíduos de Lys<sup>128</sup> e Glu<sup>150</sup> na rAoChi5472, já que no ensaio enzimático em pH 6,0 a Lys se apresenta desprotonada, ou seja, com carga negativa e atuando como um ácido.

Lin et al. (2005) investigaram a influência do íon Hg<sup>2+</sup> na conformação e atividade de uma  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase de *Penaeus vannamei* Boone. Os dados mostram que uma molécula de Hg<sup>2+</sup> se liga a cada molécula de enzima causando a perda da atividade e que a inibição total e irreversível da enzima ocorre pela ligação covalente do íon com o grupo sulfidril de um resíduo de Cys localizado no seu sítio ativo. Segundo Ramakrishna et al. (2018), íons de metais pesados, como Hg<sup>2+</sup>, são agentes perturbadores da estrutura terciária de proteínas ao reagirem com grupos sulfidril, causando perda de atividade. Portanto, o íon Hg<sup>2+</sup> provavelmente interagiu com resíduos de Cys essenciais à estrutura funcional das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 inativando-as completamente e, talvez, irreversivelmente.

Figura 36 – Efeito de íons metálicos na atividade enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*.

Fonte: elaborada pela autora. Atividade enzimática das quitinasas (A) *rAoChi4849* e (B) *rAoChi5472* na presença de íons metálicos.

Concentrações crescentes de EDTA e DTT (5, 50 e 100 mM) causaram reduções significativas ( $p < 0,05$ ) na atividade enzimática da *rAoChi4849* e da *rAoChi5472*, exceto o EDTA na concentração de 5 mM que aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade da *rAoChi4849* (Figura 37). Inibição de 100% da atividade das duas quitinasas foi observada na presença de SDS em todas as concentrações testadas (0,5%, 1,0% e 2,0%) e quando expostas ao  $\beta$ -mercaptoetanol na concentração de 5% (Figura 37). Já o NaCl diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade das quitinasas apenas em concentrações acima de 1,0 M (Figura 38).

O EDTA é um agente quelante que forma complexos com diversos íons. A diminuição da atividade da *rAoChi4849* e da *rAoChi5472* na presença desse agente indica que estas quitinasas provavelmente sejam metaloenzimas, e que dependam de íons catiônicos para apresentarem ação catalítica completa, apesar de não haverem muitos relatos na literatura sobre quitinasas associadas a íons. Kabir et al. (2016) caracterizaram uma quitinase de sementes de *Trichosanthes dioica* Roxb. e observaram redução de 15% da atividade enzimática na presença do EDTA, e aumento significativo na presença dos íons  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , indicando a necessidade de íons divalentes para a atividade enzimática dessa quitinase.

O EDTA na concentração de 5 mM foi capaz de aumentar 8% a atividade da rAoChi4849 (Figura 37A). Este agente quelante constitui um ácido fraco que em soluções aquosas dissocia-se produzindo espécies aniônicas. Em baixa concentração, esse agente quelante não foi capaz de diminuir a atividade da quitinase rAoChi4849, mas suas formas aniônicas podem ter interferido no pH do meio de tal forma que favoreceu a atividade catalítica dessa quitinase. Aliabadi et al. (2016) também mostraram que o EDTA em baixa concentração (1%) foi capaz de aumentar 20% a atividade de uma quitinase termoestável de *Cohnella* sp.

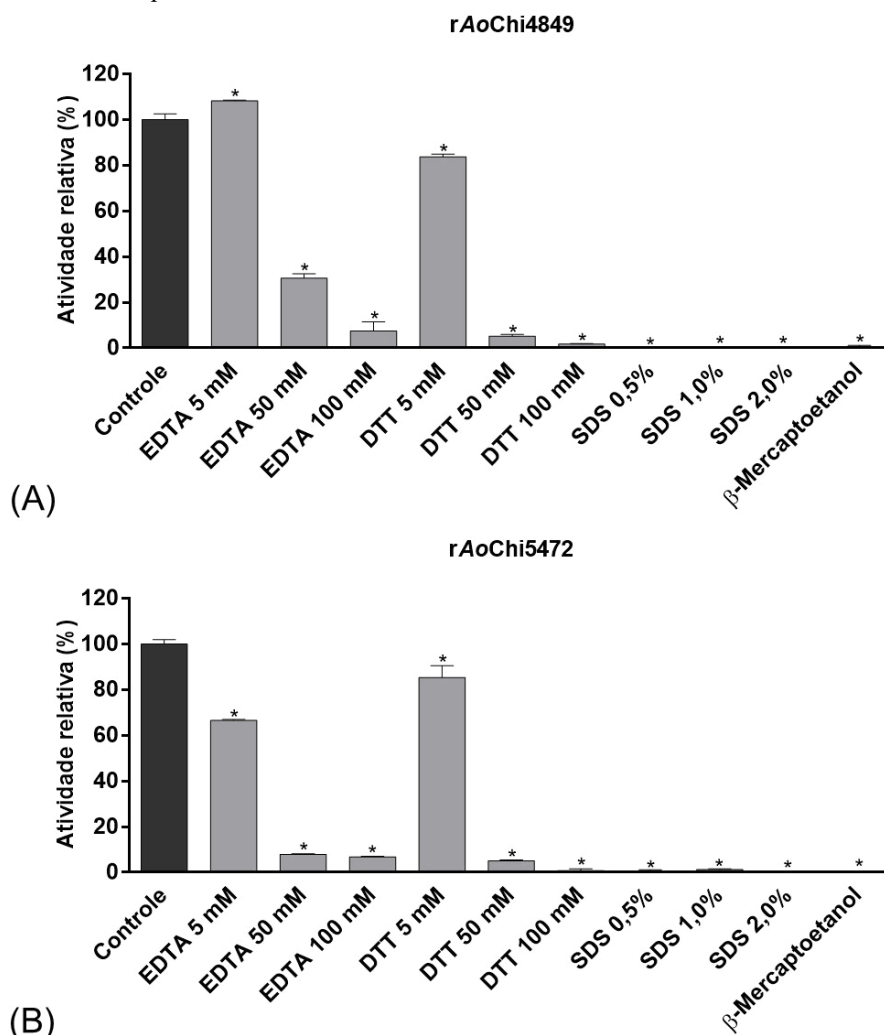
O DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol são agentes redutores capazes de reduzir as ligações dissulfeto nas proteínas. Dessa forma, a inibição causada por esses agentes na atividade enzimática das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 pode estar relacionada ao rompimento de ligações dissulfeto importantes para a estabilidade do domínio quitinase\_GH19 e, conseqüentemente, para suas conformações enzimaticamente ativas, assim como mostrou Ohnuma et al. (2008) para o domínio LysM da quitinase PrChi-A de *Pteris ryukyuensis* Tagawa.

O SDS é um agente desnaturante com propriedades anfipáticas que pode se ligar aos resíduos de aminoácidos das proteínas, gerando mudanças na sua conformação e, conseqüentemente, levando à perda de atividade. Este reagente químico inibiu completamente a atividade enzimática das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472, assim como inibiu 100% a atividade da quitinase VuChiI do feijão-caupi (LANDIM et al., 2017) e das quitinases CvChi45 e CvChi47 de *Chromobacterium violaceum* Schröter (LOBO et al., 2013; SOUSA et al., 2019). No entanto, para três quitinases bacterianas de *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HBK-51 (KUZU; GÜVENMEZ; DENIZCI, 2012), *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3 (TAKE et al., 2018) e *Cohnella* sp. (ALIABADI et al., 2016) o SDS teve pouca influência na atividade enzimática. Além disso, agentes com propriedades surfactantes, como o SDS, podem favorecer a atividade quitinásica. É o caso dos detergentes Tween20, Tween80 e Triton X-100 que proporcionaram um aumento de 10%, 15% e 8%, respectivamente, na atividade da quitinase de *Cohnella* sp. Por serem surfactantes mais suaves, esses reagentes diminuiriam a tensão superficial entre a proteína e o meio aquoso, aumento a frequência de contato entre o substrato e o sítio ativo da enzima (ALIABADI et al., 2016).

A atividade enzimática da rAoChi4849 e da rAoChi5472 foi reduzida significativa ( $p < 0,05$ ) na presença de NaCl (Figura 38). Essa interferência do NaCl ocorreu provavelmente por consequência do aumento da força iônica do meio promovido pelo sal, dificultando a solubilização das proteínas e o contato com o substrato. No entanto, esse resultado pode indicar também que essas quitinases apresentem boa tolerância ao meio salino, já que é preciso uma quantidade de NaCl superior a 1,0 M para insolubilizá-las pelo processo de "salting-out".

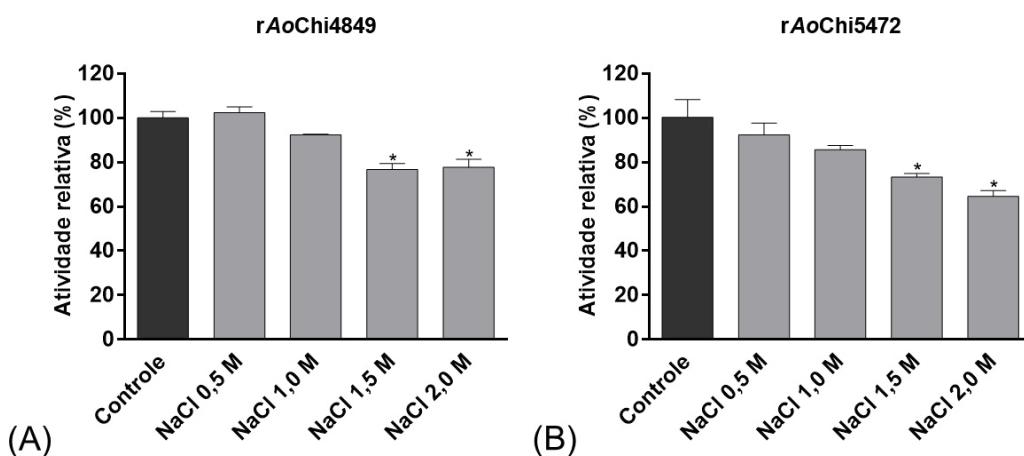


Figura 37 - Efeito de agentes químicos quelantes, redutores e desnaturantes na atividade enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*.



Fonte: elaborada pela autora. Atividade enzimática das quitinasas (A) *rAoChi4849* e (B) *rAoChi5472* na presença de EDTA, DTT, SDS e  $\beta$ -Mercaptoetanol (5%).

Figura 38 - Efeito do NaCl na atividade enzimática das quitinasas *rAoChi4849* e *rAoChi5472*.

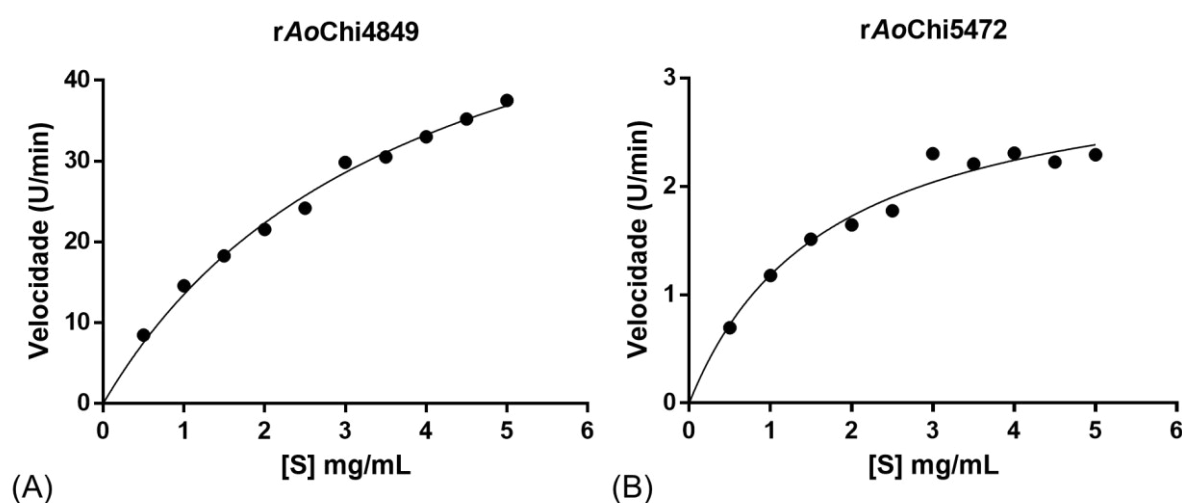


Fonte: elaborada pela autora. Atividade enzimática das quitinasas (A) *rAoChi4849* e (B) *rAoChi5472* na presença de NaCl.

### 7.9.6 Cinética enzimática

A atividade enzimática das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* com diferentes concentrações de quitina coloidal seguiu a cinética de Michaelis-Menten (Figura 39), onde observa-se as curvas de saturação das enzimas formadas a partir da relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação.

Figura 39 – Comportamento cinético das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* com o substrato quitina coloidal.



Fonte: elaborada pela autora. Plotagem da atividade enzimática das quitinases (A) *rAoChi4849* e (B) *rAoChi5472* com diferentes concentrações de quitina coloidal (0,5 a 5 mg.mL<sup>-1</sup>). Uma unidade de atividade quitinásica (U) representa 1 nmol de GlcNAc obtido por mg de enzima em 1 min.

Os parâmetros cinéticos determinados para as quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* estão agrupados na tabela 4. Para a *rAoChi4849*, os parâmetros cinéticos obtidos foram  $V_{\text{máx}} = 64,97 \text{ nmol.min.mg}^{-1}$ ,  $K_m = 3,81 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $K_{\text{cat}} = 18,20 \text{ min}^{-1}$  e  $K_{\text{cat}}/K_m = 4,77 \text{ mg.mL.min}^{-1}$  e para a *rAoChi5472* foram  $V_{\text{máx}} = 3,20 \text{ nmol.min.mg}^{-1}$ ,  $K_m = 1,71 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $K_{\text{cat}} = 1,15 \text{ min}^{-1}$  e  $K_{\text{cat}}/K_m = 0,67 \text{ mg.mL.min}^{-1}$ . O  $V_{\text{máx}}$ , referente ao valor máximo da velocidade inicial da reação quando todos os sítios ativos estão ocupados, foi 20 vezes maior para a *rAoChi4849* em relação a *rAoChi5472*. O  $K_m$ , concentração do substrato necessária para a reação chegar à metade da sua velocidade máxima, foi duas vezes maior para a *rAoChi4849*. O valor do  $K_m$  é inversamente proporcional a afinidade da enzima ao substrato, ou seja, quanto menor for o valor de  $K_m$ , maior será a afinidade da enzima ao substrato. Dessa forma, apesar de ter uma velocidade de reação menor, a *rAoChi5472* apresenta maior afinidade ao substrato em relação a *rAoChi4849*. O  $K_{\text{cat}}$ , número máximo de mols de substrato que pode ser convertido em produto por mol de enzima em uma unidade de tempo, foi 15 vezes maior para a *rAoChi4849*. Esses dados culminam na eficiência catalítica enzimática ( $K_{\text{cat}}/K_m$ ) que foi 7 vezes maior para a *rAoChi4849*.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 com o substrato quitina coloidal

Enzima	$V_{\max}$ (nmol.min.mg <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$K_{\text{cat}}$ (min <sup>-1</sup> )	Eficiência Catalítica (mg.mL.min <sup>-1</sup> )
rAoChi4849	64,97	3,81	18,20	4,77
rAoChi5472	3,20	1,70	1,15	0,67

Fonte: elaborada pela autora.

O  $K_m$  obtido para a rAoChi4849 (3,81 mg.mL<sup>-1</sup>) está próximo ao valor do  $K_m$  determinado para a quitinase AtChi1 (4,84 mg.mL<sup>-1</sup>) do *A. tequilana*, (SIERRA-GÓMEZ et al., 2019) enquanto que o  $K_m$  da rAoChi5472 (1,70 mg.mL<sup>-1</sup>) é próximo ao  $K_m$  determinado para a quitinase OsChia2b (1,9 mg.mL<sup>-1</sup>) de *O. sativa* (TRUONG et al., 2003). Embora a afinidade ao substrato da rAoChi5472 ( $K_m = 1,7$  mg.mL<sup>-1</sup>) seja maior que a afinidade da rAoChi4849 ( $K_m = 3,81$  mg.mL<sup>-1</sup>), a eficiência catalítica de rAoChi5472 (0,67 mg.mL.min<sup>-1</sup>) é significativamente menor que a eficiência catalítica de rAoChi4849 (4,77 mg.mL.min<sup>-1</sup>). No entanto, as duas quitinases do cajueiro possuem eficiência catalítica superior às quitinases AtChi1 (0,09 mg.mL.min<sup>-1</sup>) e AtChi2 (0,06 mg.mL.min<sup>-1</sup>) de *A. tequilana* (SIERRA-GÓMEZ et al., 2019). Todos esses dados foram obtidos utilizando a quitina coloidal como substrato.

A rAoChi5472 possui algumas características estruturais bem diferentes da rAoCh4849, incluindo a substituição do resíduo de aminoácido ácido Glu, responsável pela catálise, por um resíduo de aminoácido básico Lys. No entanto, ao que tudo indica, essa substituição não afeta a capacidade catalítica da rAoChi5472. Dessa forma, a menor eficiência catalítica desta quitinase pode estar relacionada à ausência do domínio de ligação à quitina, presente na rAoCh4849, pois tem sido demonstrado que este é um fator importante que pode suprimir a capacidade de hidrolisar alguns tipos de substratos (TAKASHIMA et al., 2018).

### 7.9.7 Perfil da produção de oligômeros

Os oligômeros de GlcNAc produzidos pela ação da rAoChi4849 e da rAoChi5472 a partir da quitina coloidal, foram analisados por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS). As massas obtidas nos espectros foram analisadas quanto ao tamanho correspondente à oligômeros de GlcNAc, levando em conta a presença de adutos inerentes da amostra e do equipamento e resultados obtidos por outros autores nesse tipo de análise.

A presença de (GlcNAc)<sub>1</sub> foi observada no espectro dos produtos de hidrólise gerados pela rAoChi4849, no íon com  $m/z$  de 244,1 considerando a massa do (GlcNAc)<sub>1</sub> (221,21)

com o  $\text{Na}^+$  (íon sódio,  $\text{PM} = 23,0$ ) como aduto (Figura 40A). Para a *rAoChi5472* a presença de  $(\text{GlcNAc})_1$  não ficou tão evidente, no entanto pode se considerar a  $m/z$  de 376,9 com os adutos  $\text{NaAc}$  (acetato de sódio,  $\text{PM} = 82,0$ ),  $\text{ACN}$  (acetonitrila,  $\text{PM} = 41,00$ ) e  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Metanol,  $\text{PM} = 32,0$ ) ou a  $m/z$  de 409,2 com os adutos  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $2\text{ACN}$  e  $\text{KCL}$  (cloreto de potássio,  $\text{PM} = 74,5$ ), como espectro de um  $(\text{GlcNAc})_1$  (Figura 40B).

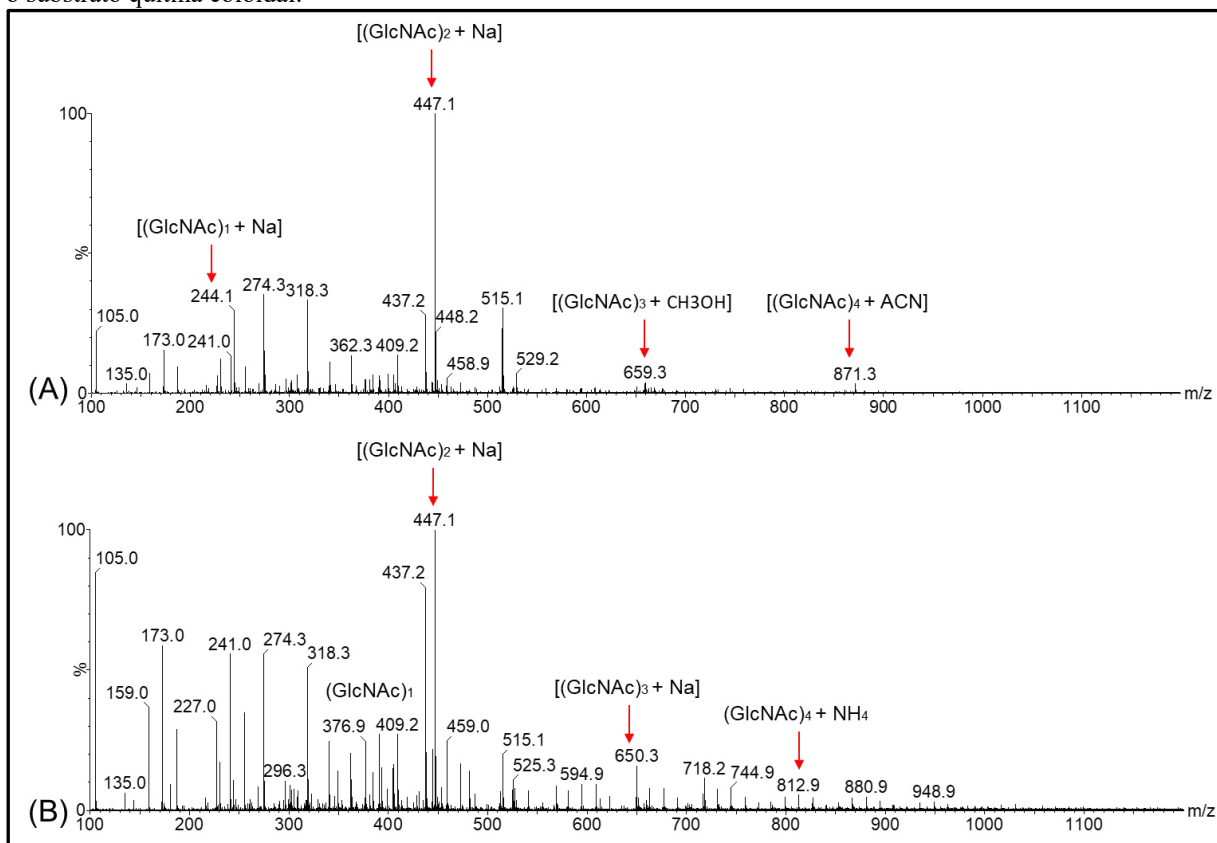
O  $(\text{GlcNAc})_2$  complexado com o  $\text{Na}^+$  e com  $m/z$  de 447,1 está presente nos espectros dos produtos de hidrólise das duas quitinases (Figura 40). Da mesma forma, um íon com  $m/z$  de 447,1 foi observado por Wang et al. (2014) no espectro de ESI-MS dos produtos de hidrólise da quitina coloidal realizada por uma quitinase de *Pseudoalteromonas sp.* Além disso, um íon com  $m/z$  de 447,28 correspondente a um di-*N*-acetilquitobiose foi obtido no espectro dos produtos da reação de hidrólise da quitina coloidal realizada por uma quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (FLEURI et al., 2009) e um íon de  $m/z$  de 447,26 foi detectado no trabalho de Young, Simpson e Ward, (2005) como único íon obtido no espectro de ESI-MS dos produtos de hidrólise da quitina coloidal gerados por uma quitinase recombinante do Baculovírus *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus*, sendo considerada pelo autores como uma exoquitinase. Isso reforça a ideia de que as quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* apresentam atividade exoquitinásica.

Um íon correspondente ao  $(\text{GlcNAc})_3$  com o aduto  $\text{Na}^+$  ( $m/z$  650,3) foi identificado nos espectros dos produtos de hidrólise da *rAoChi5472* (Figura 40B), assim como foi observado também nos trabalhos de Wang et al. (2014) e Fleuri et al. (2009). Para a *rAoChi4849* possivelmente a  $m/z$  de 659,3 com o aduto  $\text{CH}_3\text{OH}$  corresponde a um  $(\text{GlcNAc})_3$  (Figura 40A). Já o  $(\text{GlcNAc})_4$  com o aduto  $\text{ACN}$  ( $m/z$  871,3) foi identificado nos espectros dos produtos de hidrólise da *rAoChi4849* (Figura 40A), assim como foi identificada por Wang et al. (2014).

Kamst et al. (1995) identificaram o íon de  $m/z$  de 813 correspondente ao espectro de  $(\text{GlcNAc})_4$  obtido da reação de uma *N*-acetil-glucosaminiltransferase de *E. coli* sobre a quitina. Dessa forma, o íon de  $m/z$  de 812,9 identificado nos produtos de hidrólise da *rAoChi5472* sobre a quitina coloidal possivelmente corresponde a massa de um  $(\text{GlcNAc})_4$  com o aduto  $\text{NH}_4^+$  (íon amônio,  $\text{PM} = 18,0$ ).

Portanto, a detecção de monômeros, dímeros, trímeros e oligômeros com 4 unidades de  $\text{GlcNAc}$  nos espectros dos produtos de hidrólise da *rAoChi4849* e da *rAoChi5472*, sugerem que estas quitinases apresentam atividade exo e endoquitinásica, como sugerem também os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos realizados com a presença e ausência da enzima  $\beta$ -Glucuronidase.

Figura 40 – Perfil da produção de oligômeros de GlcNAc pela ação das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* com o substrato quitina coloidal.



Fonte: elaborada pela autora. (A) Espectro dos produtos de hidrólise da *rAoChi4849*. (B) Espectro dos produtos de hidrólise da *rAoChi5472*. Massa molecular: monômero de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc)<sub>1</sub> = 221.21; Sódio (Na<sup>+</sup>) = 23,00; Acetonitrila (ACN) = 41,00; Metanol (CH<sub>3</sub>OH) = 32,0; íon amônio (NH<sub>4</sub>) = 18,0.

## 7.10 Atividade biológica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472*

### 7.10.1 Atividade sobre o crescimento micelial de fungos filamentosos fitopatogênicos

A atividade antifúngica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* realizada através da difusão da amostra de proteína em discos de papel está demonstrada nas figuras 41, 42, 43 e 44, onde se observa as imagens dos fungos cultivados em placas de BDA e a curva de crescimento plotada no gráfico ao lado, onde cada ponto representa a média ± desvio padrão do crescimento micelial de cada fungo do centro da placa em direção aos discos.

O crescimento dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. na presença da quitinase *rAoChi4849* foi significativamente menor (\*,  $p < 0,05$ ) no ponto de 48 h para os isolados BAN7 e CCJ127 e no ponto de 72 h para os isolados CCJ166 e CCJ184 em relação ao crescimento na presença de tampão (Figura 41). Já os isolados de *Fusarium* spp. BAN16, BAN100 e BAN225 não apresentaram redução do crescimento micelial na presença da *rAoChi4849* em nenhum dos intervalos de tempo em que foram monitorados (Figura 42).

Na presença da quitinase *rAoChi5472*, o crescimento dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. foi significativamente menor (\*,  $p < 0,05$ ) no ponto de 48 h para os isolados BAN7 e CCJ127 e no ponto de 72 h para o isolado CCJ184 em relação ao crescimento na presença de água (Figura 43A, 43B e 43D). Já o isolado CCJ166 de *Lasiodiplodia* sp. e os isolados BAN16 e BAN100 de *Fusarium* spp., não apresentaram redução significativa do crescimento micelial na presença da *rAoChi5472* (Figuras 43C, 44A e 44B), enquanto o isolado BAN225 de *Fusarium* sp. teve redução significativa do crescimento micelial (\*,  $p < 0,05$ ) em todo o intervalo de tempo que foi monitorado (Figura 44C).

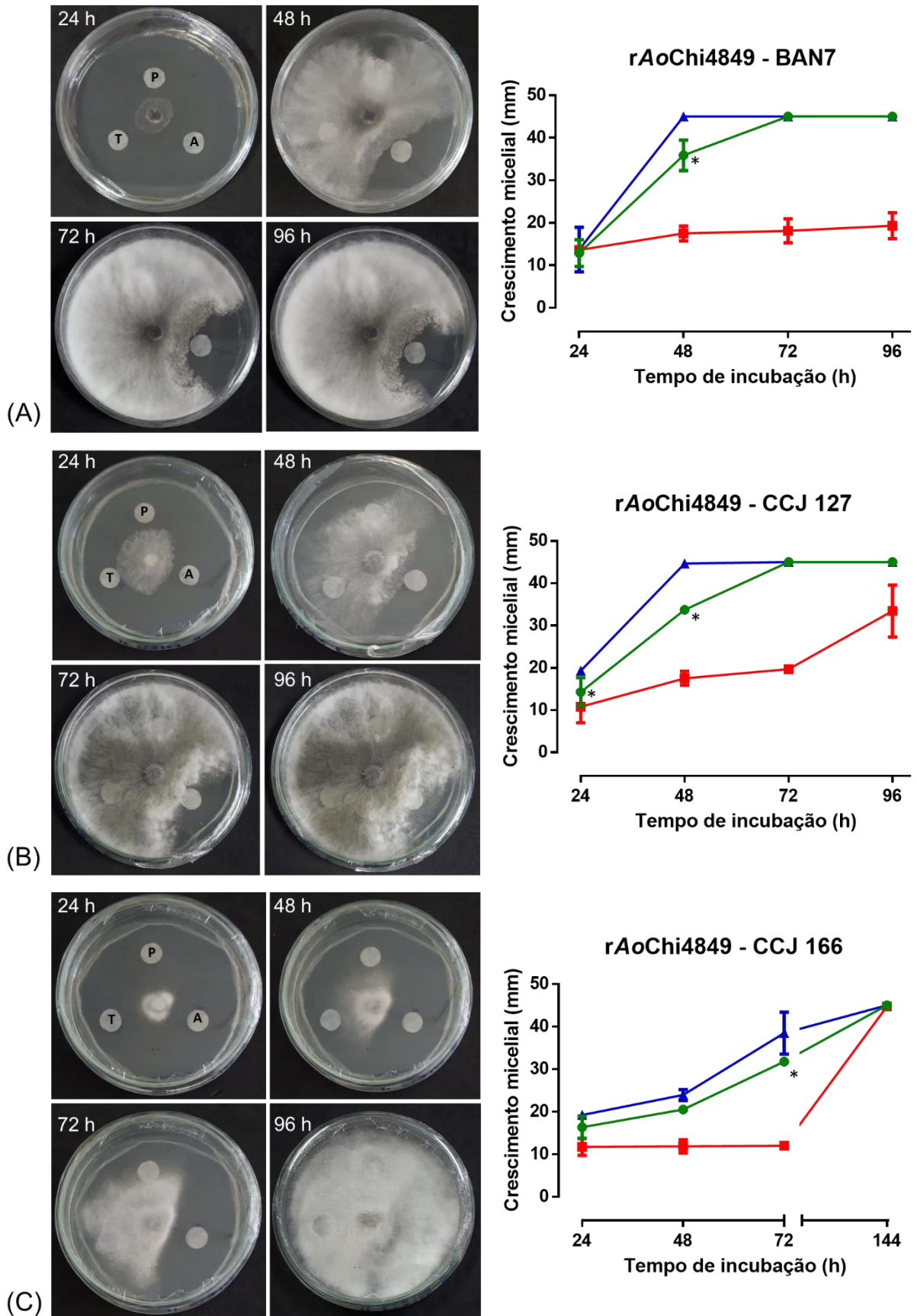
A atividade antifúngica das quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* realizada através da dispersão da amostra de proteína sobre o meio BDA está demonstrada nas figuras 45, 46, 47 e 48, onde se observa as imagens dos fungos cultivados em placas de BDA e a curva de crescimento plotada no gráfico ao lado, onde cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão do diâmetro médio do crescimento micelial de cada fungo.

As curvas de crescimento dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. e *Fusarium* spp. não mostraram redução significativa do crescimento micelial na presença da quitinase *rAoChi4849* em relação as curvas de crescimento na presença de tampão (Figuras 45 e 46), exceto a curva de crescimento do isolado CCJ127 de *Lasiodiplodia* sp. que teve redução significativa (\*,  $p < 0,05$ ) no ponto de 48 h de incubação (Figura 45B).

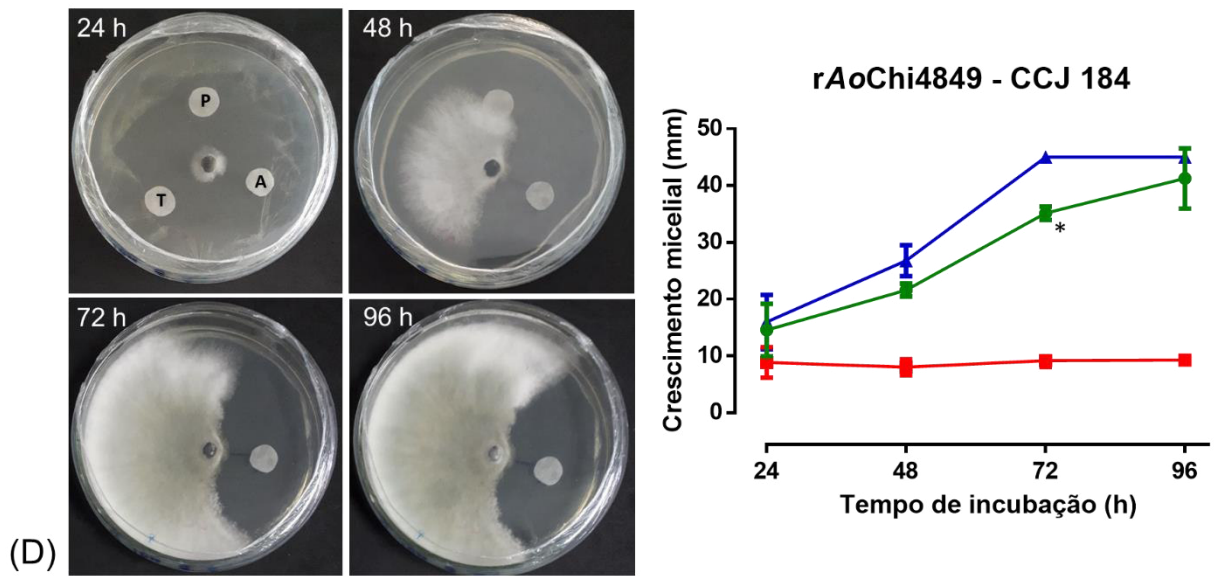
Já a *rAoChi5472* continuou mostrando atividade antifúngica sobre os isolados de *Lasiodiplodia* spp., sendo bastante expressiva para o isolado BAN7 que teve redução significativa (\*,  $p < 0,05$ ) do diâmetro médio do micélio nos pontos de 24, 48 e 72 h, em comparação ao crescimento micelial na presença de água (Figura 47A). Com 24 e 48 h de incubação, a inibição causada pela *rAoChi5472* (500  $\mu$ g) no crescimento micelial deste isolado assemelhou-se a inibição realizada pelo antifúngico carbendazim na dose de 5  $\mu$ g. Com 72 h de incubação, o crescimento do fungo foi retomado, mas o micélio apresentou aspecto danificado e com presença de estruturas de resistência, o que não ocorreu no controle (Figura 47A).

Sobre os demais isolados de *Lasiodiplodia* spp., a *rAoChi5472* reduziu significativamente (\*,  $p < 0,05$ ) nos pontos de 24 e 48 h o isolado CCJ127 (Figura 47B), no ponto de 72 h o isolado CCJ166 (Figura 47C) e nos pontos de 48 e 72 h o isolado CCJ184 (Figura 47D). Sobre os isolados BAN16 e BAN100 de *Fusarium* spp. a *rAoChi5472* não apresentou atividade de inibição significativa, mas continuou inibindo de forma significativa (\*,  $p < 0,05$ ) o crescimento micelial do isolado BAN225 (Figura 48).

Figura 41 – Atividade antifúngica da rAoChi4849 sobre isolados de *Lasiodiplodia* spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.



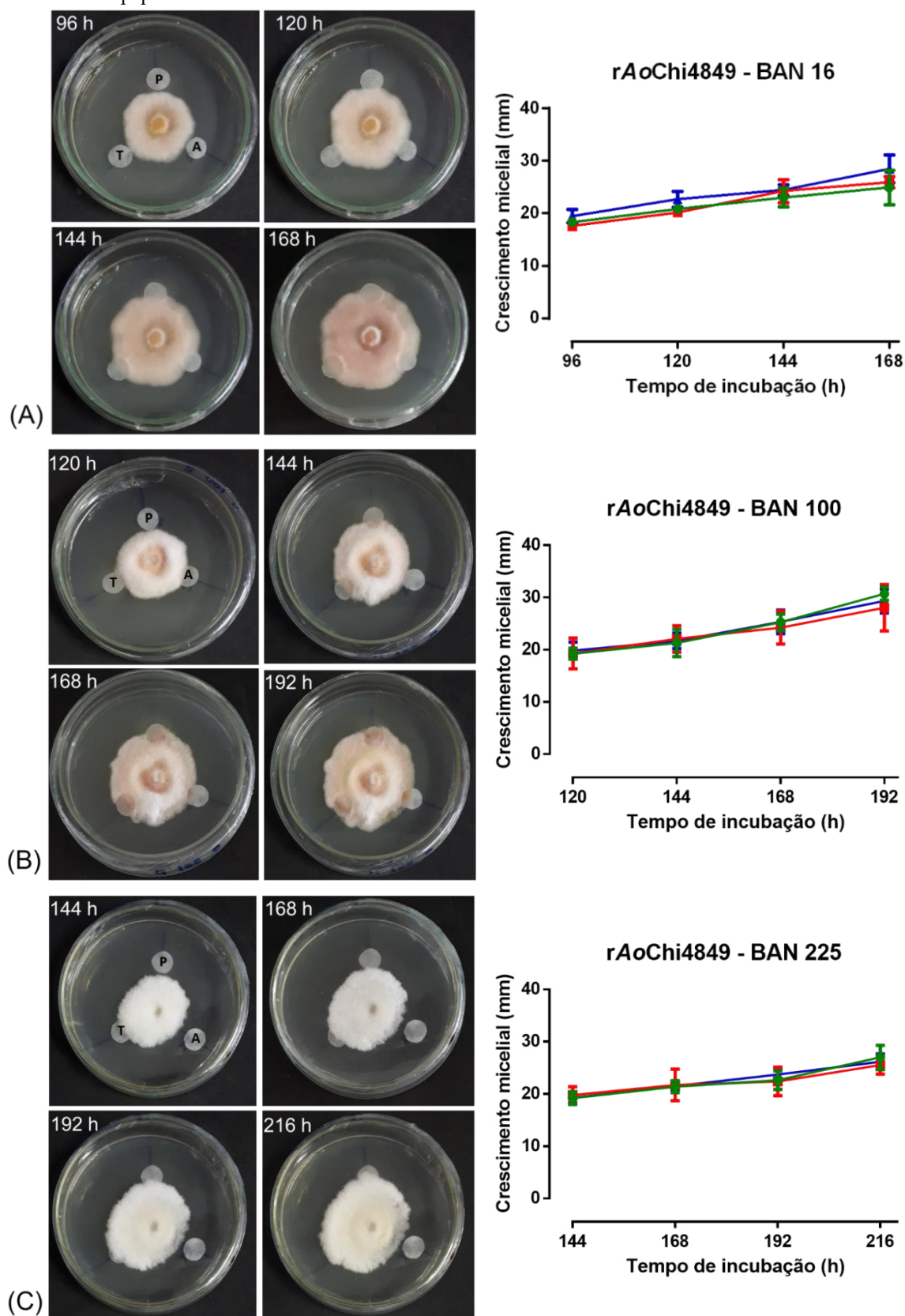
Continua



Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. (A) BAN7, (B) CCJ127, (C) CCJ166 e (D) CCJ184 na presença da quitinase rAoChi4849 na dose de 500 µg (P/●), carbendazim na dose de 2 µg (A/■) e 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (T/▲), difundidos em disco de papel.

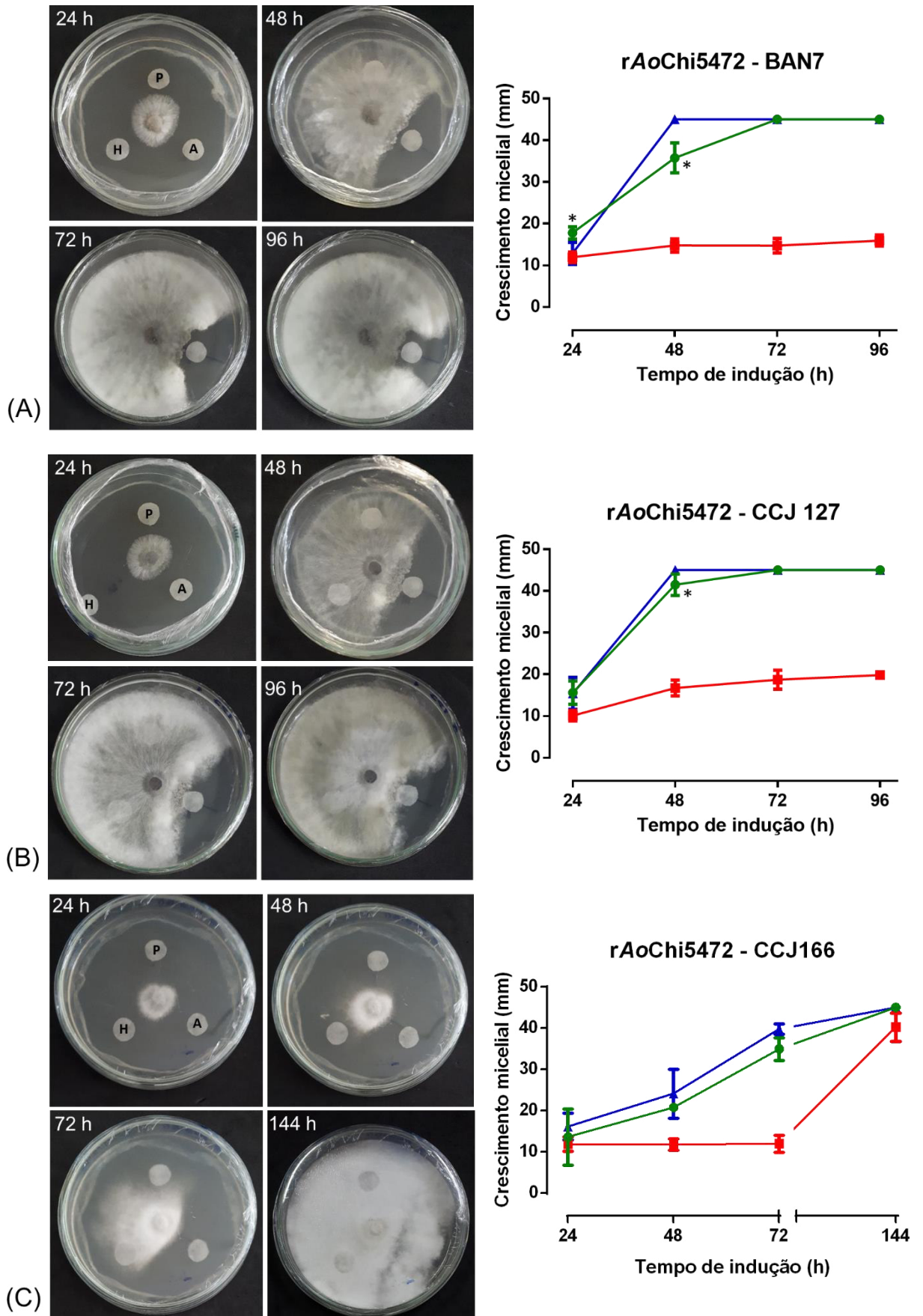


Figura 42 – Atividade antifúngica da rAoChi4849 sobre isolados de *Fusarium* spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.

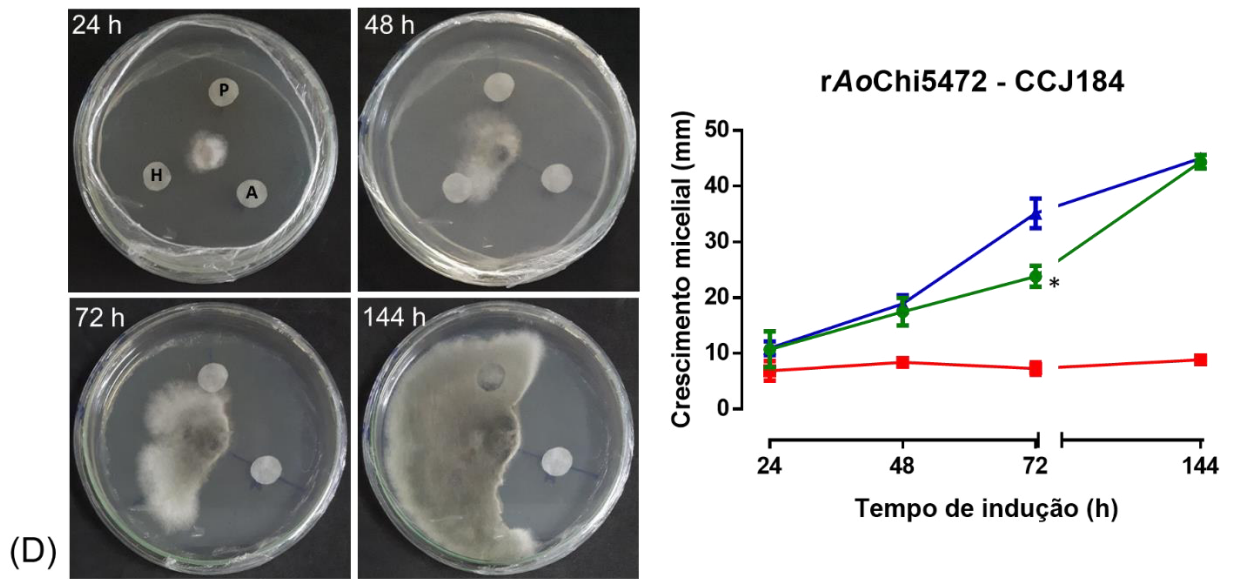


Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. (A) BAN16, (B) BAN100 e (C) BAN225 na presença da quitinase rAoChi4849 na dose de 500  $\mu$ g (P/●), tiabendazol na dose de 5 mg (A/■) e 100  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (T/▲), difundidos em disco de papel.

Figura 43 – Atividade antifúngica da rAoChi5472 sobre isolados de *Lasiodiplodia* spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.

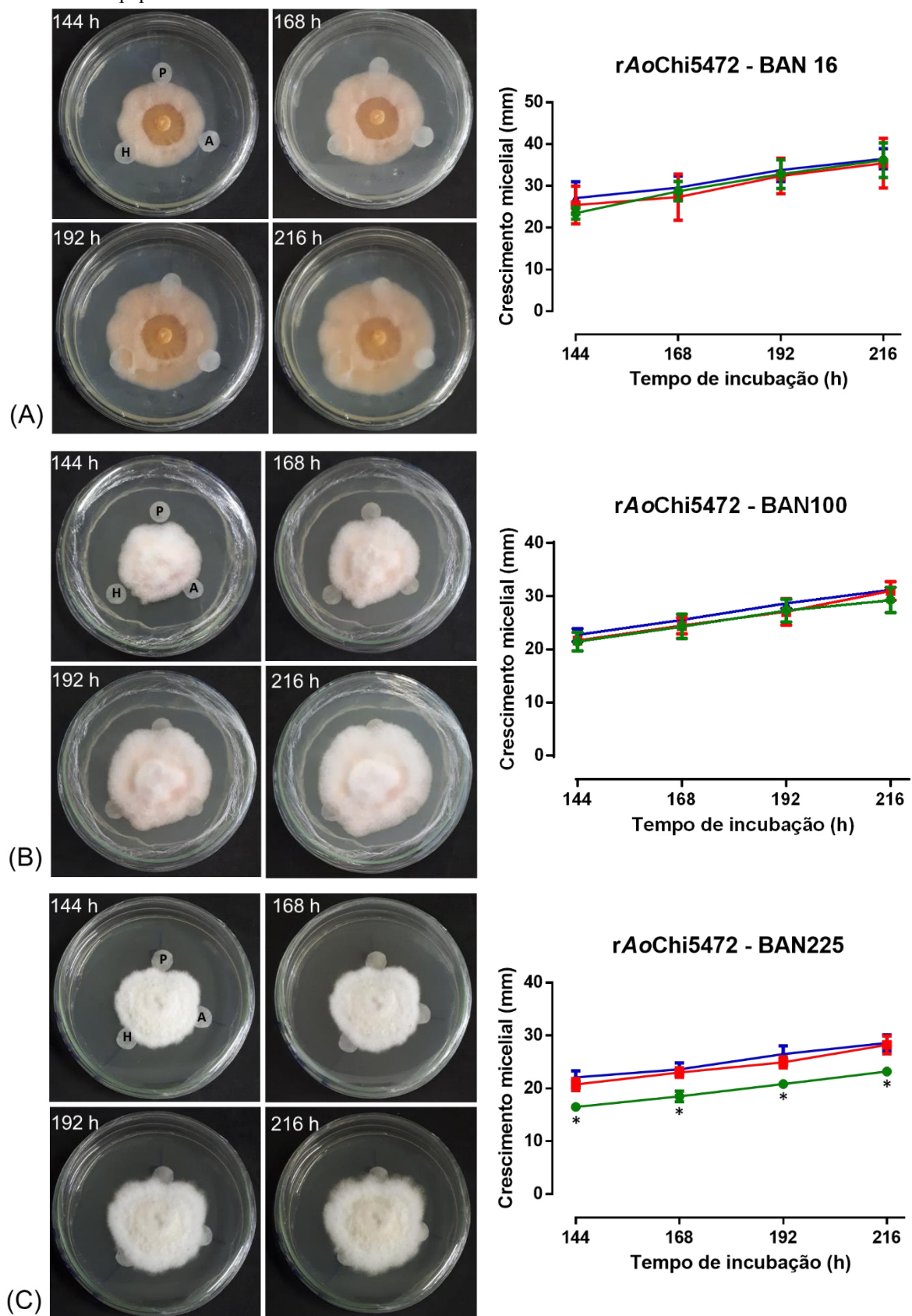


Continua



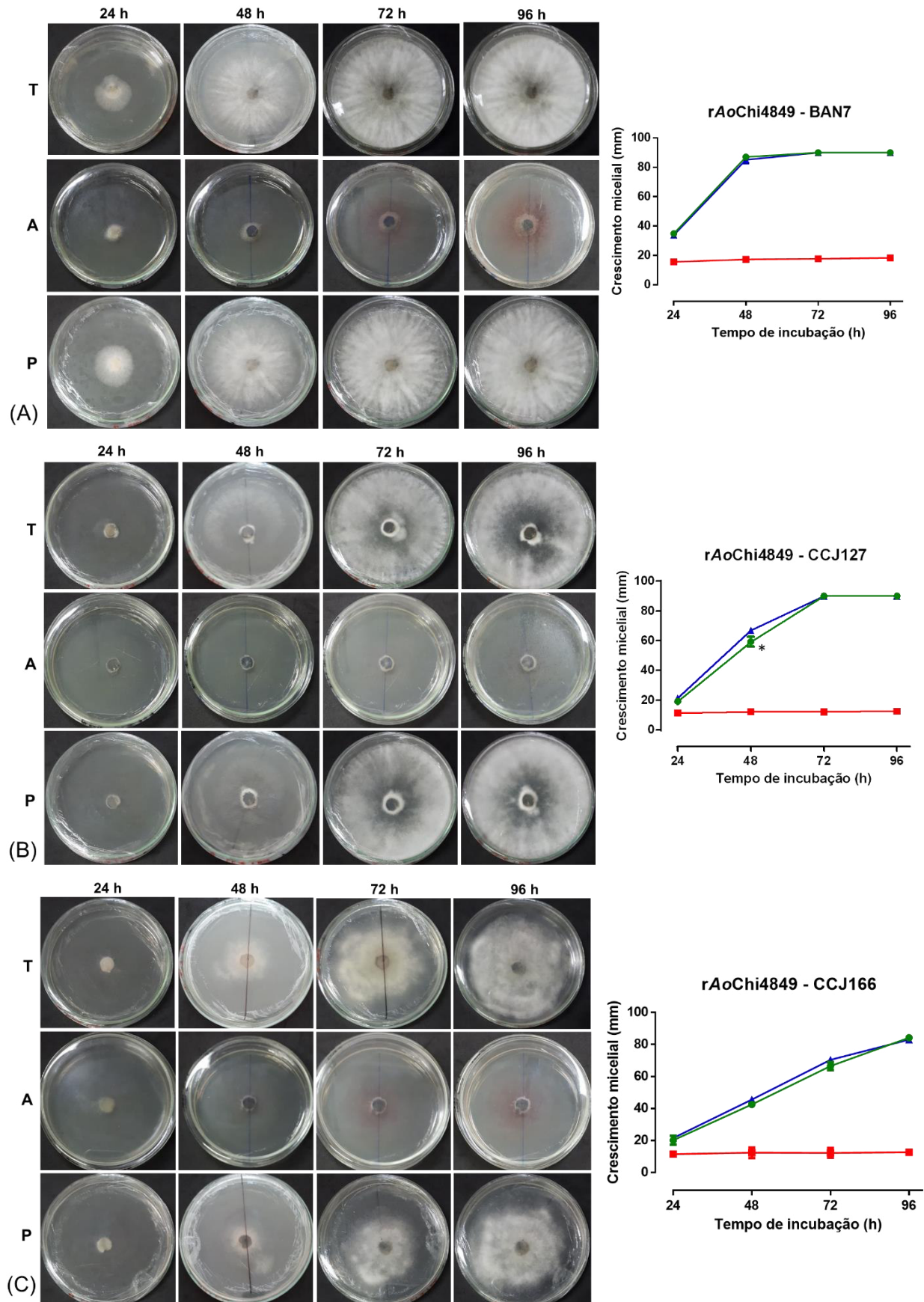
Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. (A) BAN7, (B) CCJ127, (C) CCJ166 e (D) CCJ184 na presença da quitinase *rAoChi5472* na dose de 500  $\mu\text{g}$  (P/●), carbendazim na dose de 2  $\mu\text{g}$  (A/■) e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril (H/▲), difundidos em disco de papel.

Figura 44 – Atividade antifúngica da rAoChi5472 sobre isolados de *Fusarium* spp. com os tratamentos difundidos em discos de papel.



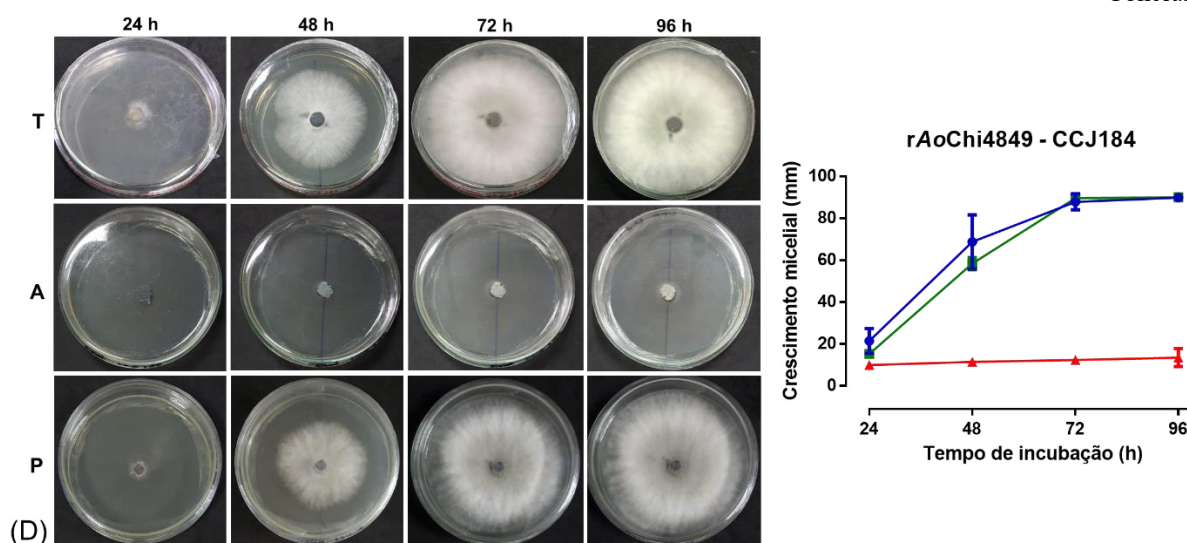
Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. (A) BAN16, (B) BAN100 e (C) BAN225 na presença da quitinase rAoChi5472 na dose de 500  $\mu\text{g}$  (P/●), tiabendazol na dose de 5 mg (A/■) e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril (H/▲), difundidos em disco de papel.

Figura 45 – Atividade antifúngica da rAoChi4849 sobre isolados de *Lasiodiplodia* spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.



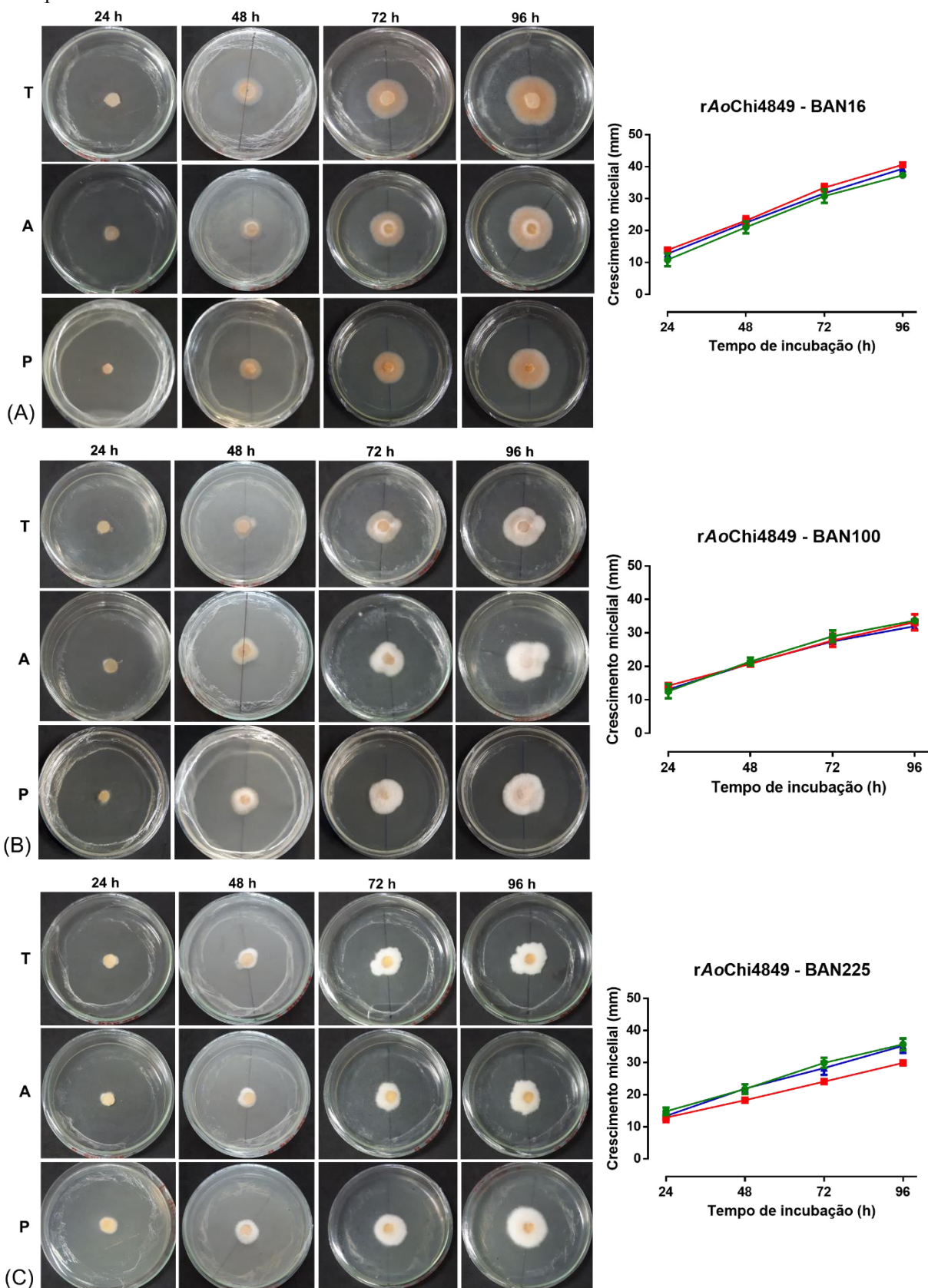
Continua

## Conclusão



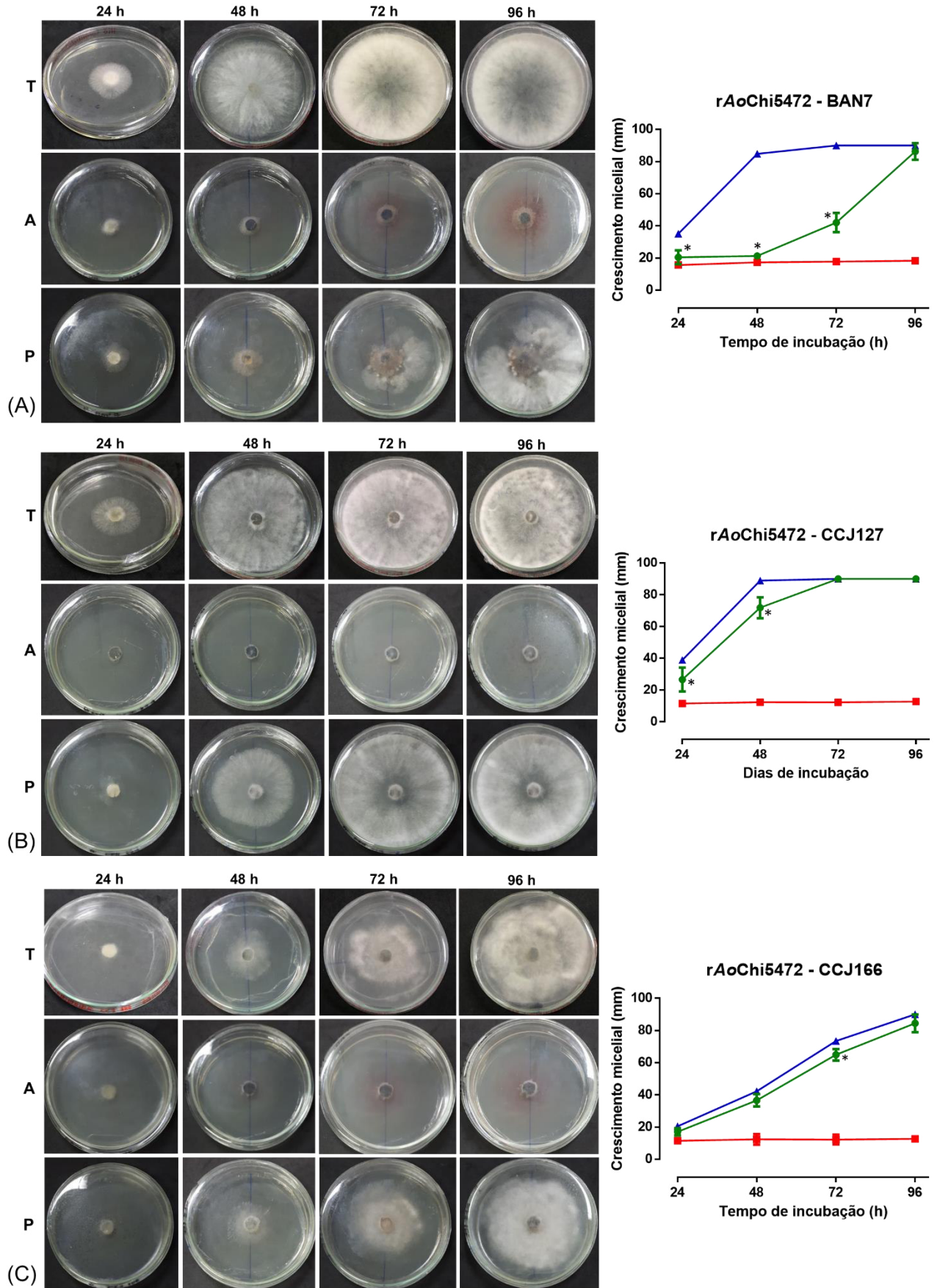
Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Lasioidiplodia* spp. (A) BAN7, (B) CCJ127, (C) CCJ166 e (D) CCJ184 na presença da quitinase *rAoChi4849* na dose de 500  $\mu\text{g}$  (P/●), carbendazim na dose de 5  $\mu\text{g}$  (A/■) e 100  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (T/▲), difundidos na superfície do BDA.

Figura 46 – Atividade antifúngica da rAoChi4849 sobre isolados de *Fusarium* spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.



Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. (A) BAN16, (B) BAN100 e (C) BAN225 na presença da quitinase rAoChi4849 na dose de 500 µg (P/●), tiabendazol na dose de 5 mg (A/■) e 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (T/▲), difundidos na superfície do BDA.

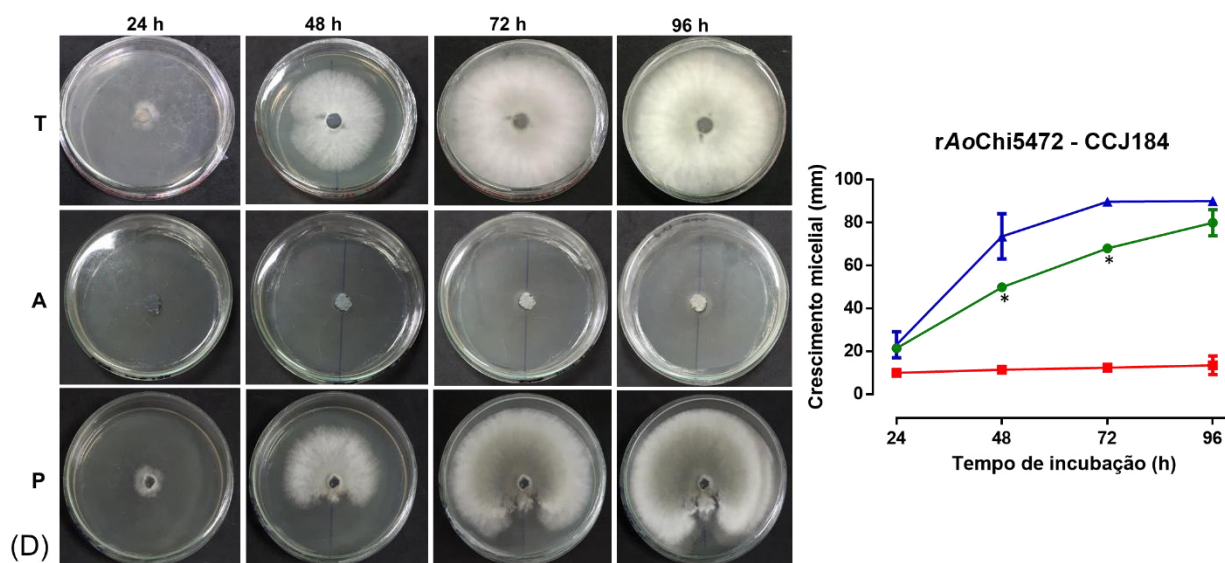
Figura 47 – Atividade antifúngica da rAoChi5472 sobre isolados de *Lasiodiplodia* spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.



Continua

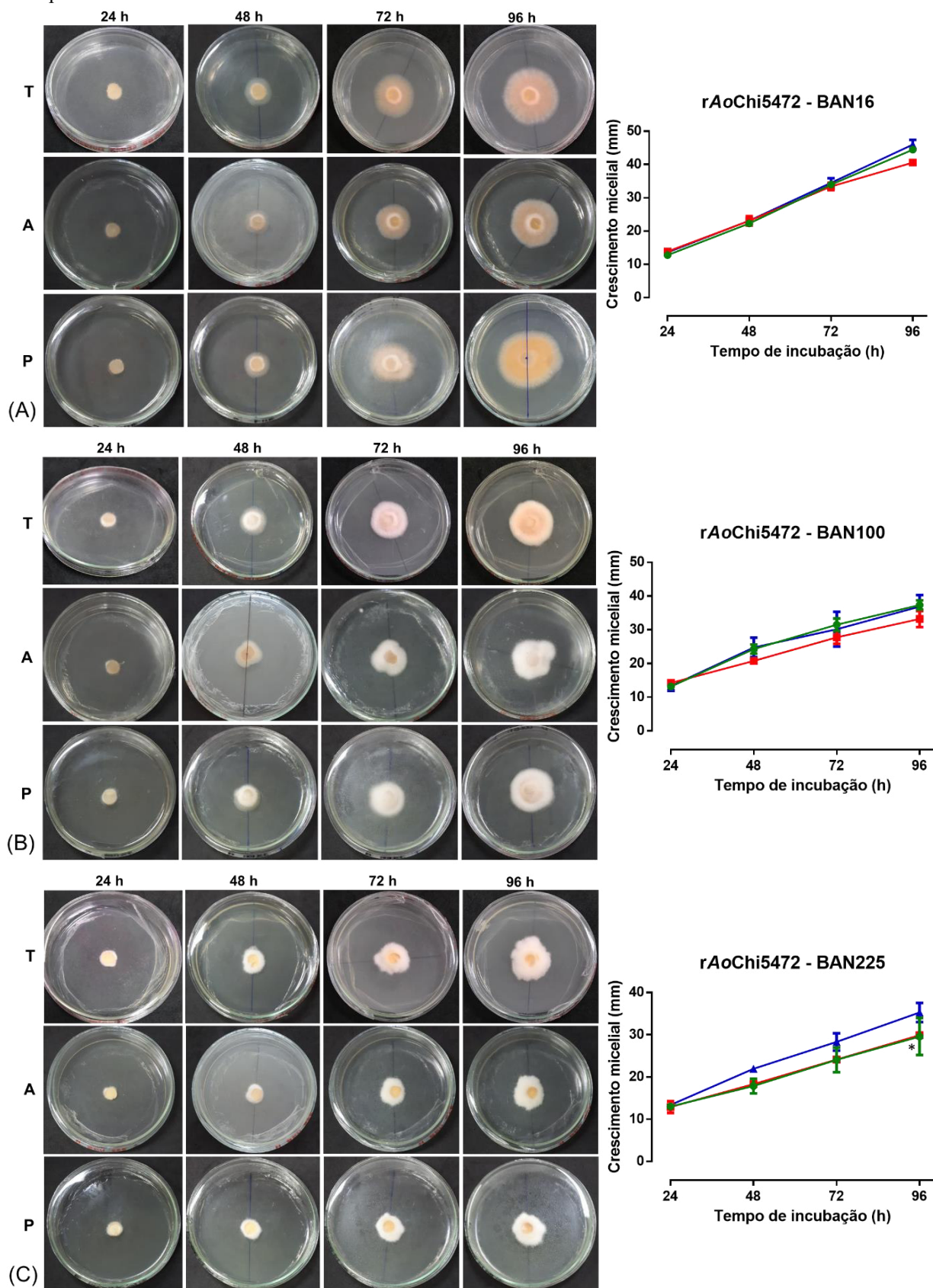


## Conclusão



Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. (A) BAN7, (B) CCJ127, (C) CCJ166 e (D) CCJ184 na presença da quitinase *rAoChi5472* na dose de 500  $\mu\text{g}$  (P/●), carbendazim na dose de 5  $\mu\text{g}$  (A/■) e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril (T/▲), difundidos na superfície do BDA.

Figura 48 – Atividade antifúngica da rAoChi5472 sobre isolados de *Fusarium* spp. com os tratamentos difundidos na superfície do BDA.



Fonte: elaborada pela autora. Crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp. (A) BAN16, (B) BAN100, (C) BAN225 na presença da quitinase rAoChi5472 na dose de 500 µg (P/●), tiabendazol na dose de 5 mg (A/■) e 100 µL de água destilada estéril (T/▲), difundidos na superfície do BDA.

A capacidade de inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos tem sido demonstrada para muitas quitinases vegetais recombinantes, incluindo as quitinases AtChi1 e AtChi2 de classe I de *A. tequilana* sobre *Aspergillus* sp. utilizando o método de difusão em discos (SIERRA-GÓMEZ et al., 2019), a quitinase de classe I VuChiI de *V. unguiculata* sobre *Penicillium herquei* (LANDIM et al., 2017), a quitinase de classe II rCHT11 de *O. sativa* contra cepas de *Trichoderma viride* (XAYPHAKATSA et al., 2008) e uma quitinase de classe VII de *T. aestivum* sobre uma variedade de fungos fitopatogênicos (SINGH; ISAAC KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007). Quitinases obtidas de fungos (SHEHATA et al., 2018) e bactérias (SOUSA et al., 2019), também apresentam potencial atividade antifúngica contra fungos filamentosos fitopatogênicos.

Neste trabalho foi demonstrado que as duas quitinases recombinantes do cajueiro rAoChi4849 e rAoChi5472 apresentam efeitos inibitórios variáveis para os diferentes fungos fitopatogênicos ou até mesmo nenhuma atividade sobre alguns isolados. Partindo do princípio de que estas quitinases atuam na quitina da parede celular fúngica, essa inibição diferenciada pode ser explicada por duas vertentes: pela variação da proporção da quitina na parede celular desses fungos, sendo aqueles com baixos níveis de quitina menos susceptíveis à ação das quitinases, ou pela exposição das ligações susceptíveis às quitinases na quitina da parede celular desses fungos, uma vez que ligações menos expostas são também menos susceptíveis ao ataque das quitinases, assim como mostrou Yan et al. (2008).

Outra questão a ser discutida é que a atividade antifúngica da quitinase rAoChi4849 sobre os isolados de *Lasiodiplodia* spp. foi mais expressiva no ensaio onde a amostra de proteína foi difundida em discos de papel, em relação ao ensaio onde a amostra foi espalhada sobre a superfície do BDA. Isso pode ser explicado pelo fato de que, sobre o disco de papel a amostra se manteve mais concentrada e, conseqüentemente, mais ativa sobre o micélio fúngico. Quando espalhada sobre o meio BDA, a mesma dose de proteína (500 µg) ficou menos concentrada e, conseqüentemente, menos ativa.

No entanto, apesar de ter sido utilizada nos mesmos tratamentos, a rAoChi5472 apresentou atividade antifúngica contra os mesmos fungos em ambos os ensaios, se mostrando, portanto, mais ativa que a rAoChi4849. Quando espalhada sobre o meio BDA, a mesma dose da rAoChi5472 (500 µg) teve sua área de atuação aumentada e, conseqüentemente, um efeito antifúngico mais expressivo, principalmente sobre o isolado BAN7, que visualmente se mostrou mais sensível a ação dessa quitinase em relação aos demais fungos.

O efeito inibitório das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 sobre o crescimento micelial dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. e *Fusarium* spp. reduziu significativamente com o

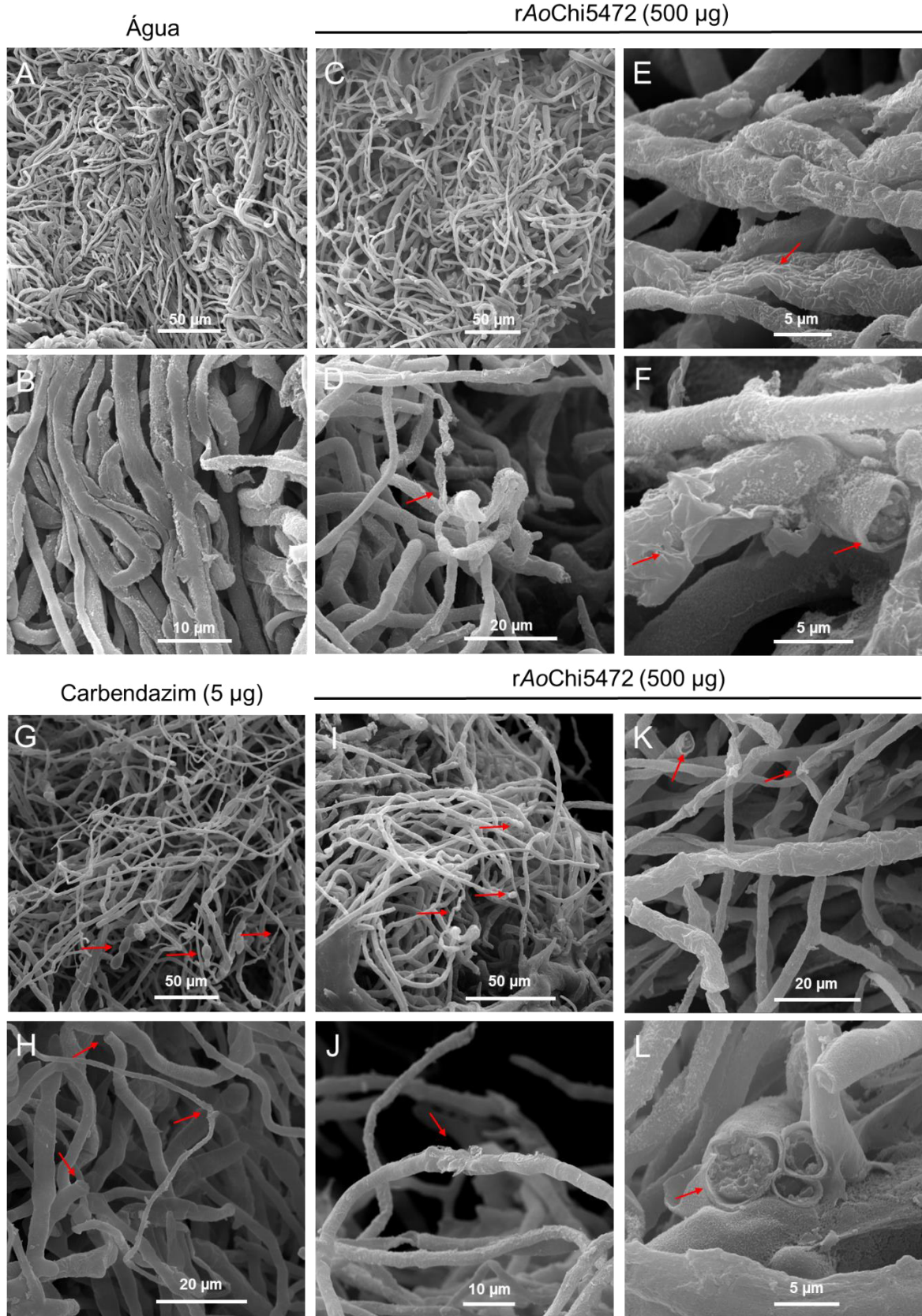
tempo e, na maioria dos ensaios, após 72 h de incubação o crescimento micelial normal foi retomado. Isso demonstra que as quitinases do cajueiro apesar de não apresentarem ação fungicida, exerceram ação fungistática, retardando o crescimento micelial. Além disso, a ação antifúngica dessas quitinases deve ser melhor estudada para avaliar o efeito sobre a esporulação desses fungos e sobre a germinação de esporos. Para o isolado BAN7 de *Lasiodiplodia* spp. observou-se que a retomada do crescimento micelial após 72 h de incubação com a rAoChi5472 não ocorreu de forma uniforme na placa, prevalecendo a presença de hifas tênues e a formação de conídios, o que caracteriza uma linha de defesa do fungo (Figura 47A). Dessa forma, uma porção do final dessas hifas foi coleta e analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura para elucidar o efeito da rAoChi5472 sobre a estrutura micelial desse fungo.

A figura 49 mostra as imagens obtidas do micélio fúngico de *Lasiodiplodia* sp. BAN7 após tratamento com a quitinase rAoChi5472 e com os controles água e carbendazim. Nas imagens obtidas do micélio tratado com água é possível observar hifas com uma aparência normal, caracterizada por uma densa rede de estruturas tubulares longas e entrelaçadas, exibindo uma superfície lisa e uniforme (Figuras 49A e 49B). Aala, Yusuf e Nulit (2013) analisaram por MEV os efeitos do extrato de alho sobre *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour e descreveram os padrões normais das hifas não tratadas como lineares, com superfície estável e ápice afilado, assim como foi observado para o isolado *Lasiodiplodia* sp. BAN7.

O micélio tratado com a rAoChi5472 apresenta hifas dispersas, mais curtas e não lineares (Figura 49C), hifas com baixo calibre, com perda da turgidez e com a superfície rugosa (Figura 49D) e hifas com retração que gera uma estrutura plana em forma de fita com torções em alguns pontos (Figura 49E). A presença de hifas escamosas sugere um destacamento da camada externa da parede celular das hifas de *Lasiodiplodia* sp. BAN7 em contato com a rAoChi5472 (Figura F), alguns aspectos também observados por Aala, Yusuf e Nulit (2013), os quais mencionam a ocorrência da demolição da parede celular das hifas de *T. rubrum* em contato com extrato de alho.

A atividade antifúngica da rAoChi5472 foi também comparada à ação do carbendazim, um antifúngico que atua na inibição de tubos germinativos, formação de apressórios e crescimento de micélios. Na presença do carbendazim, bem como na presença da rAoChi5472, observou-se a formação de hifas de baixo calibre e pontas de hifas com protuberâncias (Figuras 49G e 49I), que possivelmente representam hifas que foram impedidas de continuar seu crescimento. Além disso, também foram observados pontos de rupturas nas hifas (Figuras 49H, 49J e 49K) e hifas perpendicularmente rompidas, produzindo uma borda regular e plana (Figuras 49H, 49K e 49L).

Figura 49 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *Lasiodiplodia* sp. BAN7 cultivado na presença da quitinase rAoChi5472 e dos controles água e carbendazim.



Fonte: elaborada pela autora. Imagens de MEV do micélio de *Lasiodiplodia* sp. BAN7 tratado com água (A, B), carbendazim na dose de 5 µg (G, H) e rAoChi5472 na dose de 500 µg (C, D, E, F, I, J, K, L). As setas vermelhas indicam alterações estruturais evidenciadas no micélio fúngico ocasionadas pela ação da quitinase rAoChi5472 ou do antifúngico carbendazim.

Diante do exposto, sugere-se que a ação da rAoChi5472 nas cadeias de quitina presentes na parede celular do fungo *Lasiodiplodia* sp. BAN7, causa inibição do crescimento micelial, induzindo várias alterações morfológicas nas hifas, conforme revelado por MEV. Esse resultado também confirma, mais uma vez, que o resíduo Lys<sup>128</sup> de rAoChi5472 pode atuar como doador de prótons durante a catálise, explicando a capacidade desta quitinase de classe VI de *A. occidentale* de degradar a quitina e causar danos nas paredes celulares de fungos filamentosos fitopatogênicos.

As doenças causadas por fungos fitopatogênicos em plantações de importância econômica, representam uma das maiores preocupações na produção agrícola mundial (NETTO et al., 2017; RODRÍGUEZ-GÁLVEZ et al., 2017). O fitopatógeno *Lasiodiplodia* spp., em especial a espécie *L. theobromae*, é responsável por diversas patologias em culturas importantes. Este fungo pode infectar diferentes espécies de plantas em regiões tropicais e temperada e vem se tornando um sério problema para os produtores de plantas frutíferas no Nordeste brasileiro, bem como no estado do Ceará. Esse patógeno pode causar diferentes sintomas nas plantas infectadas, incluindo seca-descendente (*die-back*), cancro em ramos, caules e raízes, lesões em estacas e folhas, além de infectar frutos e incitar a morte de mudas e enxertos (FREIRE et al., 2004; LIMA et al., 2013b). No cajueiro, este fungo é o causador da podridão-preta-da-haste e da resinose, doenças caracterizadas pela deficiência nutricional, murcha, queda de folhas, podridão seca dos ramos e a formação de cancrios nos ramos lenhosos e no tronco, geralmente acompanhada de exsudação de goma e escurecimento dos tecidos (CARDOSO et al., 2009). Na banana, este patógeno está relacionado à patologia conhecida como podridão da coroa (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002). Além disso, foi relatado como causador da morte de culturas de manga no Peru (RODRÍGUEZ-GÁLVEZ et al., 2017).

Os agrotóxicos convencionais que tradicionalmente vêm sendo utilizados para o controle de pragas agrícolas, ocasionam também, vários danos ao homem e ao meio ambiente. As quitinases apresentam grande potencial de aplicação no controle de fungos fitopatogênicos e, em virtude disso, constituem enzimas candidatas ao desenvolvimento de biopesticidas e estratégias de biocontrole de pragas, como o tratamento pós colheita, na perspectiva de substituição dos meios de controle de pragas convencionais (KIM; JE, 2010; BANANI et al., 2015; RATHORE; GUPTA, 2015). Dessa forma, as quitinases do cajueiro, rAoChi4849 e rAoChi5472, representam um importante insumo biotecnológico a ser estudado, na perspectiva de sua aplicação como antifúngico.

### 7.10.2 Atividade contra fungos leveduriformes do gênero *Candida*

A investigação da atividade antifúngica das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 contra *Candida* spp. foi realizada inicialmente com as cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e a cepa clínica *C. albicans* 2. Nessa investigação, foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração de proteína capaz de reduzir 50% o crescimento fúngico após 24 h de incubação (CLSI, 2008).

A rAoChi4849 apresentou atividade contra as cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 com uma CIM de 23,43  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . No entanto, não apresentou atividade sobre a cepa clínica *C. albicans* 2. até a dose de 750  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 5). A rAoChi5472 apresentou atividade de inibição para as três cepas testadas com valores da CIM de 2,92  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para a *C. parapsilosis* ATCC 22019 e para a cepa clínica *C. albicans* 2 e de 1,46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para a *C. krusei* ATCC 6258 (Tabela 5). Com este resultado pode-se afirmar, mais uma vez, que a rAoChi5472 é mais ativa que a rAoChi4849 em relação a atividade antifúngica, assim como foi observado nos ensaios de atividade antifúngica contra fungos filamentosos fitopatogênicos.

Em virtude da quitinase rAoChi5472 ter apresentado atividade antifúngica em baixas concentrações da proteína para todas as cepas testadas, inclusive para a cepa clínica, novos testes antifúngicos foram realizados com outras cepas clínicas de *Candida* spp. para avaliar se essa quitinase apresenta um amplo espectro de ação sobre estas leveduras. Os valores de CIM encontrados para as diferentes cepas estão na tabela 5 e variam entre 2 a 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Observou-se que, das 15 cepas clínicas testadas, para oito a CIM obtida foi igual ou menor que 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para cinco cepas a CIM varia de 32 a 800  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para apenas 2 cepas a CIM não foi definida nas concentrações de proteína testadas (Tabela 5).

O gênero *Candida* compreende patógenos causadores de diversos tipos de infecções, tanto superficiais quanto infecções sistêmicas que podem ser fatais, sobretudo se tratando de infecções hospitalares (ALLONSIUS et al., 2019). Tradicionalmente, as infecções causadas por *Candida* spp. são tratadas com os compostos antifúngicos azóis, no entanto, a problemática da resistência antimicrobiana tem aumentado a busca por produtos antifúngicos alternativos, incluindo a perspectiva de uso de quitinases (HECTOR et al., 2016; ALLONSIUS et al., 2019). Dessa forma, a atividade antimicrobiana apresentada pela quitinase do cajueiro rAoChi5472 sobre cepas clínicas de *Candida* spp., representa um importante achado que merece ser investigado na perspectiva de gerar novos produtos terapêuticos alternativos aos convencionais, que se mostram defasados em relação aos mecanismos de resistência desses patógenos.

Tabela 5 – Valores de CIM obtidos para as quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 sobre cepas de *Candida* ssp.

Cepa <sup>a</sup>	Origem	Valores de CIM <sup>b</sup> (µg.mL <sup>-1</sup> )		
		Fluconazol	rAoChi5472	rAoChi4849
<i>C. albicans</i> 1 (105)	Sangue	32	256	750 µg.ml <sup>-1</sup>
<i>C. albicans</i> 2 (71)	Sangue	32	2,92 µg.ml <sup>-1</sup>	NT
<i>C. albicans</i> 3 (442)	Sangue	16	8	NT
<i>C. albicans</i> 4 (938)	Sangue	32	32	NT
<i>C. albicans</i> 5 (47HM)	Urina	0,25	>800	NT
<i>C. albicans</i> 6 (52HM)	Urina	0,25	>800	NT
<i>C. parapsilosis</i> 1 (43)	Sangue	32	4	NT
<i>C. parapsilosis</i> 2 (356)	Sangue	8	128	NT
<i>C. parapsilosis</i> 3 (1980)	Sangue	32	8	NT
<i>C. parapsilosis</i> 4 (50HM)	Urina	0,5	2	NT
<i>C. parapsilosis</i> 5 (40HM)	Sangue	4	4	NT
<i>C. tropicalis</i> 1 (23)	Sangue	32	8	NT
<i>C. tropicalis</i> 2 (72)	Sangue	32	4	NT
<i>C. tropicalis</i> 3 (574)	Sangue	32	800	NT
<i>C. tropicalis</i> 4 (38HM)	Aspiração traqueal	0,5	400	NT
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-	2	2,92	23,43
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	16	1,46	23,43

Fonte: elaborada pela autora. <sup>a</sup> Cepas de bactérias obtidas da coleção do LABIMAN. <sup>b</sup> CIM foi definida como a mais baixa concentração de proteína capaz de reduzir 50% o crescimento fúngico após 24 h de incubação. NT = não testado.

### 7.10.3 Atividade contra cepas de bactérias

A investigação da atividade antibacteriana das quitinases rAoChi4849 e rAoChi5472 foi realizada com três cepas da bactéria *Staphylococcus aureus*. A cepa *S. aureus* ATCC 6538P, a cepa *S. aureus* ATCC 65398 metilina resistente (MRSA) e uma cepa clínica de *S. aureus* também resistente à metilina (*S. aureus* 1 MRSA). Nessa investigação foi possível determinar a CIM, definida como a menor concentração de proteína capaz de inibir 100% o crescimento bacteriano após 20 h de incubação (CLSI, 2015).



O resultado obtido mostra que as quitinases do cajueiro *rAoChi4849* e *rAoChi5472* não apresentam atividade antibacteriana sobre as cepas testadas, na faixa de concentração de 1500 a 2,92  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de CIM obtidos para as quitinases *rAoChi4849* e *rAoChi5472* sobre cepas de *S. aureus*

Valores de CIM <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )				
Quitinases	Cepas <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> ATCC 65398 MRSA	<i>S. aureus</i> 1 MRSA
	<i>rAoChi4849</i>		>1500	>1500
<i>rAoChi5472</i>		>1500	>1500	>1500

Fonte: elaborada pela autora. <sup>a</sup>Cepas de bactérias obtidas da coleção do LABIMAN. <sup>b</sup>CIM definida como a menor concentração de proteína capaz de inibir 100% o crescimento bacteriano após 20 h de incubação.

Partindo do princípio de que algumas quitinases podem apresentar atividade sobre o componente peptidoglicano da parede celular de bactérias, semelhante a lisozima, essas proteínas também podem constituir importantes agentes antibacteriano. Muitas quitinases vegetais com atividade lisozima têm sido descritas na literatura e por isso são chamadas de quitinase/lisozima (HEITZ et al., 1994; MAYER et al., 1996; PATEL et al., 2009). Um exemplo clássico dessas proteínas é a hevamine, isolada do látex de *H. brasiliensis* (JEKEL; HARTMANN; BEINTEMA, 1991).

Algumas dessas quitinases/lisozima são consideradas bifuncionais, ou seja, podem apresentar tanto atividade antifúngica, quanto atividade antibacteriana (GHASEMI et al., 2011). As quitinases do cajueiro aqui estudadas, *rAoChi4849* e *rAoChi5472*, não demonstraram atividade antibacteriana sobre as cepas testadas, fato este que pode evidenciar a especificidade destas enzimas para a quitina.

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho comprovou a funcionalidade das quitinases recombinantes do cajueiro *rAoChi4849* e *rAoChi5472* com relação à capacidade de degradar a quitina, ao mesmo tempo que evidenciou um novo modo de ação das quitinases, no qual um resíduo de Lys atua como o doador de prótons na catálise.

Estas quitinases também apresentaram atividade antifúngica *in vitro* sobre fungos fitopatogênicos dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Fusarium* e cepas fúngicas de importância médica do gênero *Candida*. Embora a *rAoChi5472* apresente eficiência catalítica menor em relação a *rAoChi4849*, uma quitinase GH19 típica, essa quitinase demonstrou ser mais ativa em relação a atividade antifúngica, induzindo importantes alterações morfológicas nas hifas de um isolado de *Lasiodiplodia* sp., comparável à ação do antifúngico comercial carbendazim.

Portanto, conclui-se que a quitinase *AoChi5472* de classe VI do cajueiro conserva suas propriedades quitinolíticas e que as mutações que apresenta são provavelmente importantes para o papel dessa classe de proteínas na fisiologia vegetal. Além disso, ambas as proteínas recombinantes, *rAoChi4849* e *rAoChi5472*, constituem proteínas de interesse para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

## REFERÊNCIAS

- ALA, F.; YUSUF, U. K.; NULIT, R. Electron microscopy studies of the effects of garlic extract against *Trichophyton rubrum*. **Sains Malaysiana**, [s. l.], v. 42, n. 11, p. 1585-1590, 2013.
- ABBASI KEJANI, A. *et al.* Efficient isolation of high quality nucleic acids from different tissues of *Taxus baccata* L. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 797-800, Feb. 2010.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1786-1795, Dec. 2013.
- AGARWAL, M. *et al.* Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 205, p. 40-47, Sept. 2017.
- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s. l.], v. 98, p. 5301-5317, Apr. 2014.
- AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 286-287, Mar. 2001.
- AKOND, M. A. *et al.* Characterization of a yam class IV chitinase produced by recombinant *Pichia pastoris* X-33. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 222-230, Apr. 2014.
- ALIABADI, N. *et al.* Thermostable chitinase from *Cohnella* sp. A01: isolation and product optimization. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 931-940, Oct./Dec. 2016.
- ALLONSIUS, C. N. *et al.* Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1-12, Feb. 2019.
- ALVES FILHO, J. G. **Análises transcriptômica e proteômica de sementes de cajueiro (*Anacardium occidentale* L) visando aplicações biotecnológicas**. 2013. 196 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- ANWAR, W. *et al.* Chitinase genes from *Metarhizium anisopliae* for the control of whitefly in cotton. **Royal Society Open Science**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1-12, Aug. 2019.
- ARAGÃO, J. A. D. S. **Análise e aplicações biotecnológicas de proteínas ligantes à quitina de sementes de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* var. *nanum*)**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Medicina de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2015.
- ARAUJO, J. P. P. **Caju: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. ed. Brasília, DF:

EMBRAPA - CNPAT, 2015. 150 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1019462/caju-o-produtor-pergunta-a-embrapa-responde>. Acesso em 2 jun. 2016.

ARAÚJO, T. S. L. *et al.* Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 174, p. 299-307, Aug. 2015.

ARNOLD, N. D. *et al.* Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 1-27, Jan. 2020.

AZUMA, K. *et al.* Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials. **Journal of Functional Biomaterials**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 104-142, Mar. 2015.

BACKIYARANI, S. *et al.* Genome-Wide Analysis and Differential Expression of Chitinases in Banana Against Root Lesion Nematode (*Pratylenchus coffeae*) and *Eumusa* Leaf Spot (*Mycosphaerella eumusae*) Pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 175, n. 8, p. 3585-3598, Feb. 2015.

BADWAN, A. A. *et al.* Chitin and chitosan as direct compression excipients in pharmaceutical applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1519-1547, Mar. 2015.

BAGHBAN, R. *et al.* Yeast Expression Systems : Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 365-384, May 2019.

BANANI, H. *et al.* Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 199, p. 54-61, Apr. 2015.

BAPTISTA, A. B. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Anacardium occidentale* L. And *Anacardium microcarpum* D. Extracts on the Liver of IL-10 Knockout Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2020, p. 1-13, Dec. 2020.

BARFORD, D. *et al.* Baculovirus expression: Tackling the complexity challenge. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 357-364, June 2013.

BARROS, A. B. *et al.* Evaluation of antitumor potential of cashew gum extracted from *Anacardium occidentale* Linn. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 154, n. 2020, p. 319-328, July 2020.

BARROS, L. de M. *et al.* **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro-anão precoce**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, abr. 1993. 65 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/420247/recomendacoes-tecnicas-para-a-cultura-do-cajueiro-anao-precoce>. Acesso em: 2 jun. 2016.

BASTOS, T. M. *et al.* Chemical Constituents of *Anacardium occidentale* as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Sirtuins. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 1-13, Apr. 2019.

BERJANSKII, M. *et al.* PROSESS: A protein structure evaluation suite and server. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 38, p. 633-640, July 2010.

BOKMA, E. *et al.* 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 Letters**, [s. l.], v. 411, n. 2-3, p. 161-163, July 1997.

BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: A WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 510-512, May 2009.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists**. [s. l.]: Jones & Bartlett Learning, 1999, 670 p.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.

BRAINER, M. S. de C. P.; VIDAL, M. de F. **Cajucultura**. Fortaleza: Caderno Setorial ETENE - Banco do Nordeste, n. 114, maio 2020. 16 p. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/etene>. Acesso em: 25 fev. 2021.

BRAMELD, K. A.; GODDARD, W. A. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 8, p. 4276-4281, Apr. 1998.

CAMPANA-FILHO, S. P. *et al.* Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 644-650, jan. 2007

CANDIANO, G. *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1327-1333, May 2004.

CAO, S. *et al.* Genome-Wide Identification and Expression Analyses of the Chitinases under Cold and Osmotic Stress in *Ammopiptanthus nanus*. **Genes**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1-20, June 2019.

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

CARVALHO, G. H. F. de *et al.* Ovicidal and Deleterious Effects of Cashew (*Anacardium occidentale*) Nut Shell Oil and Its Fractions on *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Chemistry and Biodiversity**, [s. l.], v. 16, n. 5, May 2019a.

CARVALHO, G. H. de F. *et al.* Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 5514-5523, Feb. 2019b.

CAVALCANTI, J. J. V.; VIDAL-NETO, F. das C.; BARROS, L. de M. Avanços, desafios e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil. *In*: VIDAL-NETO, F. das C.; CAVALCANTI, J. J. V. **Melhoramento Genético de Plantas no Nordeste**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, 2013. p. 151-174. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/983841>. Acesso em: 5 jun. 2016.

CAVALCANTI, J. J. V. *et al.* **Resistência genética de clones de cajueiro anão precoce às principais fitomoléstias**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, out. 2000, 15 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/422725/resistencia-genetica-de- clones-de-cajueiro-anao-precoce-as-principais-fitomolestias>. Acesso em: 5 mar. 2021.

CHAKRAVARTHI, M. *et al.* A novel PR10 promoter from *Erianthus arundinaceus* directs high constitutive transgene expression and is enhanced upon wounding in heterologous plant systems. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 17-30, Jan. 2016.

CHANDRAN, R. *et al.* SEM characterization of anatomical variation in chitin organization in insect and arthropod cuticles. **Micron**, [s. l.], v. 82, p. 74-85, Mar. 2016.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993.

CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 833-846, July/Aug. 2013.

CHEN, J. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of chitinase gene family in *Brassica rapa* reveals its role in clubroot resistance. **Plant Science**, [s. l.], v. 270, p. 257-267, Feb. 2018.

CHEN, J. K.; SHEN, C. R.; LIU, C. L. N-acetylglucosamine: Production and applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 2493-2516, Sep. 2010.

CHEN, Y. T. *et al.* Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 714-722, Feb. 2007.

CHOI, Y. J. *et al.* Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. **Society**, [s. l.], v. 70, n. 8, p. 4522-4531, Aug. 2004.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts – M27-A3. 3. ed. **Clinical and laboratory standards institute**, Wayne, v. 28, n. 14, Apr. 2008.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – M07-A10. 10. ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, v. 35, n. 2, Jan. 2015.

CRINI, G. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 1623-1643, July 2019.

CRISÓSTOMO, J. R. *et al.* Melhoramento genético do cajueiro. *In*: QUEIROZ, M. A.

de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, nov. 1999. p. 828-843. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/153831/recursos-geneticos-e-melhoramento-de-plantas-para-o-nordeste-brasileiro>. Acesso em: 2 jun. 2016.

CRISÓSTOMO, L. A. *et al.* Cajueiro-Anão Precoce, *In*: CRISÓSTOMO, L. A.; NAUMOV, A. **Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, 2009. p. 50-69. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/658334/adubando-para-alta-produtividade-e-qualidade-fruteiras-tropicais-do-brasil>. Acesso em: 3 jun. 2016.

DA CRUZ, W. T. *et al.* Structural and enzymatic characterization of Peruvianin-I, the first germin-like protein with proteolytic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 126, p. 1167-1176, Apr. 2019.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 119-138, Mar./Apr. 2005.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 853-859, Sept. 1995.

DIONISIO, G. *et al.* Glycosylations and truncations of functional cereal phytases expressed and secreted by *Pichia pastoris* documented by mass spectrometry. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 179-185, Mar. 2012.

DUAN, G. *et al.* Screening endogenous signal peptides and protein folding factors to promote the secretory expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 306, p. 193-202, June 2019.

DUANGJAN, C. *et al.* Lifespan extending and oxidative stress resistance properties of a leaf extracts from *Anacardium occidentale* L. In *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2019, p. 1-16, June 2019.

DURKIN, C. A.; MOCK, T.; ARMBRUST, E. V. Chitin in diatoms and its association with the cell wall. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1038-1050, July 2009.

DYBALLA, N.; METZGER, S. Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 30, p. 1-5, Aug. 2009.

EGUSA, M. *et al.* Chitin nanofiber elucidates the elicitor activity of polymeric chitin in plants. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 6, p. 1-7, Dec. 2015.

EMPARN. **Cartilha do Caju**. Natal: SEBRAE, v. 9, n. 4, ago. 2004. Disponível em: <http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMPARN/DOC/DOC000000000017470.PDF>. Acesso em: 3 jun. 2016.

EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 186-194, Mar. 1998.

- FALCONER, R. J. *et al.* Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from sauvignon blanc and semillon juice and their role in haze formation in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 975-980, Jan. 2010.
- FARIAS, D. F. *et al.* Insecticidal action of sodium anacardate from Brazilian cashew nut shell liquid against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 386-389, Sept. 2009.
- FLEURI, L. F. *et al.* Elucidação parcial da estrutura de minoglucanooligossacarídeos (AGO's) produzidos enzimaticamente. **Polimeros**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 111-116, 2009.
- FREIRE, F. D. C. O. *et al.* **Novos Hospedeiros do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, v. 91, maio 2004. 6 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/422570/novos-hospedeiros-do-fungo-lasiodiplodia-theobromae-no-estado-do-ceara>. Acesso em: 2 dez. 2021.
- FREITAS, C. S. de *et al.* Agathisflavone, a Biflavonoid from *Anacardium occidentale* L., Inhibits Influenza Virus Neuraminidase. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 111-120, 2019.
- FUKAMIZO, T. Chitinolytic Enzymes: Catalysis, Substrate Binding, and their Application. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 105-124, July 2000.
- FUNKHOUSER, J. D.; ARONSON, N. N. Chitinase family GH18: Evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 7, p. 1-16, Juny 2007.
- GAO, Y.; ZHAO, K. Molecular mechanism of BjCHI1-mediated plant defense against *Botrytis cinerea* infection. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1-3, Jan. 2017.
- GARCÍA-FRAGA, B. *et al.* A novel family 19 chitinase from the marine-derived *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T: Heterologous expression, characterization and antifungal activity. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 93, p. 84-93, Oct. 2015.
- GENG, J. *et al.* Secretion of a novel developmentally regulated chitinase (family 19 glycosyl hydrolase) into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 124, n. 1-2, p. 11-21, Sept./Oct. 2002.
- GHASEMI, S. *et al.* First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 225-231, Mar. 2011.
- GOMES JÚNIOR, A. L. *et al.* Anxiolytic effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell in mice. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 1-12, May 2018.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 195-202, Mar. 1998.
- GOW, N. A. R.; LATGE, J.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Yeast**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1-25, May 2017.



GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 1, p. 67-90, 1955.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2527-2535, 2006a.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006b.

GREENFIELD, N. J. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. **Nature protocols**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1-7, 2006c.

GROVER, A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 57-73, 2012.

HALIMA, N. Ben. Analysis of glycoside hydrolases from oat (*Avena sativa*) seedling extract. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 678-688, Oct. 2019.

HAN, P. *et al.* Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from “Baozhu” pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 196, p. 808-814, Apr. 2016.

HAYES, C. A.; DALIA, T. N.; DALIA, A. B. Systematic genetic dissection of chitin degradation and uptake in *Vibrio cholerae*. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 4154-4163, Oct. 2017.

HECTOR, A. *et al.* Chitinase activation in patients with fungus-associated cystic fibrosis lung disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 138, n. 4, p. 1183- 1189.e4, Oct. 2016.

HEGEDUS, D. *et al.* New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 285-302, 2009.

HEITZ, T. *et al.* Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis-related (PR) protein: a new plant chitinase/lysozyme. **MGG Molecular & General Genetics**, [s. l.], v. 245, n. 2, p. 246-254, Oct. 1994.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 280, n. 2, p. 309-316, Dec. 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 293, n. 3, p. 781-788, Aug. 1993.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 696, p. 695-696, June 1996.

HIRAMATSU, S. *et al.* Two catalytic domains of *Chlorella* virus CVK2 chitinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 252-257, 2000.

HOLM, L.; SANDER, C. Structural similarity of plant chitinase and lysozymes from animals and phage. An evolutionary connection. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 340, n. 1-2, p. 129-132, Feb. 1994.

HONDA, Y.; TANIGUCHI, H.; KITAOKA, M. A reducing-end-acting chitinase from *Vibrio proteolyticus* belonging to glycoside hydrolase family 19. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 627-634, Mar. 2008.

HOSSAIN, M. A. *et al.* Mutation of the chitinase-like protein-encoding AtCTL2 gene enhances lignin accumulation in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 167, n. 8, p. 650-658, May 2010.

HUANG, C. J. *et al.* A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 235-247, Apr. 2011.

HUANG, Q. S. *et al.* The GH18 family of chitinases: Their domain architectures, functions and evolutions. **Glycobiology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 23-34, Jan. 2012.

IKEDA, M.; KAKIZAKI, H.; MATSUMIYA, M. Biochemistry of fish stomach chitinase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 104, p. 1672-1681, Nov. 2017.

INGLIS, P. W. *et al.* Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1-14, Oct. 2018.

INVITROGEN. **Technical manual pPICZ $\alpha$ A, B and C vectors**. Carlsbad, CA: Corporate Headquarters, 2010. 38 p.

JABEEN, N. *et al.* Expression of rice chitinase gene in genetically engineered tomato confers enhanced resistance to fusarium wilt and early blight. **Plant Pathology Journal**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 252-258, Sept. 2015.

JANKIEWICZ U, BARANOWSKI B, SWIONTEK BRZEZINSKA M, F. M. Purification, characterization, and gene cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 709-717, Jun. 2019.

JEKEL, P. A.; HARTMANN, J. B. H.; BEINTEMA, J. J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 200, n. 1, p. 123-130, Aug. 1991.

JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Current status and future perspectives. **Open Biology**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1-17, Aug. 2016.

JUNG, H. S. *et al.* Electrospinning and wound healing activity of  $\beta$ -chitin extracted from cuttlefish bone. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 193, p. 205-211, Aug. 2018.

- JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBioChem**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 7-21, Jan. 2018.
- KABIR, S. R. *et al.* Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 84, p. 62-68, Mar. 2016.
- KACZMAREK, M. B. *et al.* Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, p. 1-26, Sept. 2019.
- KAMST, E. *et al.* Mass spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium NodC* protein in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 177, n. 21, p. 6282-6285, Nov. 1995.
- KAMTCHOUING, P. *et al.* Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 95-99, Sept. 1998.
- KAPPEL, L. *et al.* Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 1-36, Feb. 2020.
- KARASUDA, S. *et al.* Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 221-224, Jan. 2003.
- KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 235, n. 9, p. 5867-5881, Sept. 2020.
- KASHYAP, P.; DESWAL, R. A novel class I Chitinase from *Hippophae rhamnoides*: Indications for participating in ICE-CBF cold stress signaling pathway. **Plant Science**, [s. l.], v. 259, p. 62-70, Jun. 2017.
- KAYA, M. *et al.* On chemistry of  $\gamma$ -chitin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 176, p. 177-186, Nov. 2017.
- KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 845-858, June 2015.
- KELLY, S.; PRICE, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 349-384, Dec. 2000.
- KESARI, P. *et al.* Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. **Proteomics**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 1693-1705, May 2015.
- KHAN, F. I. *et al.* Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 101, n. 9, p. 3513-3536, May 2017.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1988-2012, June 2010.

KIM, J. S.; JE, Y. H. A novel biopesticide production: Attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 1639-1648, Aug. 2010.

KIM, M. J. *et al.* Chitinase 3-like 1 protein plays a critical role in respiratory syncytial virus-induced airway inflammation. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 685-697, Apr. 2019.

KITAOKU, Y. *et al.* A class III chitinase without disulfide bonds from the fern, *Pteris ryukyuensis*: crystal structure and ligand-binding studies. **Planta**, [s. l.], v. 242, n. 4, p. 895-907, Oct. 2015.

KOMI, D. E. A.; SHARMA, L.; CRUZ, C. S. Dela. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. **Clin Rev Allergy Immunol.** [s. l.], v. 54, n. 2, p. 213-223, Apr. 2018.

KOPERA, E. *et al.* Expression, purification and characterization of glycosylated influenza H5N1 hemagglutinin produced in *Pichia pastoris*. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 597-602, Sept. 2014.

KOUGENTAKIS, C. M. *et al.* Anomalous Properties of Lys Residues Buried in the Hydrophobic Interior of a Protein Revealed with <sup>15</sup>N-Detect NMR Spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry Letters**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 383-387, Jan. 2018.

KOZLOV, D. G.; YAGUDIN, T. A. Antibody fragments may be incorrectly processed in the yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1661-1663, Sept. 2008.

KUMAR, M. *et al.* Draft genome of *Streptomyces* sp. strain 130 and functional analysis of extracellular enzyme producing genes. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 5063-5071, Oct. 2019.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1547-1549, June 2018.

KUO, C. J. *et al.* Cloning and characterization of an antifungal class III chitinase from suspension-cultured bamboo (*Bambusa oldhamii*) cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 23, p. 11507-11514, Dec. 2008.

KUZU, S. B.; GÜVENMEZ, H. K.; DENIZCI, A. A. Production of a Thermostable and Alkaline Chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Strain HBK-51. **Biotechnology Research International**, [s. l.], v. 2012, p. 1-6, Dec. 2012.

LACOMBE-HARVEY, M. È.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 17, p. 7219-7230, Sept. 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LANDIM, P. G. C. *et al.* Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. **Biochimie**, [s. l.], v. 135, p. 89-103, Apr. 2017.

LEGRAND, M. *et al.* Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 84, n. 19, p. 6750-6754, Oct. 1987.

LETOURNEUR, O. *et al.* Characterization of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) secreted from *Pichia pastoris*: evidence of hyper O-glycosylation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 35-45, Feb. 2001.

LIMA, J. S. *et al.* **Resistência de Clones de Cajueiro-comum à Antracnose**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, ago. 2013a. 20 p. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/13063>. Acesso em: 5 mar. 2021.

LIMA, J. S. *et al.* Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 81-88, fev. 2013b.

LIN, J. C. *et al.* Effects of mercuric ion on the conformation and activity of Penaeus Vannamei  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 327-330, Sept. 2005.

LIN, S. *et al.* Efficient Immobilization of Bacterial GH Family 46 Chitosanase by Carbohydrate-Binding Module Fusion for the Controllable Preparation of Chitooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 67, n. 24, p. 6847-6855, June 2019.

LIU, T. *et al.* Structure, catalysis, and inhibition of OfChi-h, the lepidoptera-exclusive insect chitinase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 292, n. 6, p. 2080-2088, Feb. 2017.

LOBO, M. D. P. *et al.* Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 13, p. 1-15, June 2013.

LOPES NETO, A. V. **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.)**. 2014. 55 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

LUSHCHAK, V. I. *et al.* Pesticide toxicity: A mechanistic approach. **EXCLI Journal**, [s. l.], v. 17, p. 1101-1136, Nov. 2018.

LV, M. *et al.* Preparation of chitooligosaccharides from fungal waste mycelium by recombinant chitinase. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 430, p. 1-7, July 2016.

MANSOURI, M.; BERGER, P. Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future. **Plasmid**, [s. l.], v. 98, p. 1-7, June 2018.

MARANHÃO, P. A. C. *et al.* cDNA cloning, molecular modeling and docking calculations of L-type lectins from *Swartzia simplex* var. *grandiflora* (Leguminosae, Papilionoideae), a member of the tribe Swartzieae. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 139, p. 60-71, July 2017.

MARQUES, M. R.; XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1431-1433, Oct. 1991.

MARTÍNEZ, C. P. *et al.* In vitro production of two chitinolytic proteins with an inhibiting effect on the insect coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) and the fungus *Hemileia vastatrix* the most limiting pests of coffee crops. **AMB Express**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1-11, Mar. 2012.

MARTINS, M. V. V. *et al.* **Saiba diferenciar os sintomas do oídio e da antracnose em cajueiro**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, Ago. 2020. 7 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1124366>. Acesso em: 2 mar. 2021.

MARTINS, M. V. V.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. Doenças do cajueiro, *In*: SERRANO, L. A. L. **Sistema de Produção do Caju**. 2. ed. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, p. 97-124, Jul. 2016. Disponível em: [file:///C:/Users/Simone%20Torres/Downloads/SPR16001%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Simone%20Torres/Downloads/SPR16001%20(2).pdf). Acesso em: 9 mar. 2021.

MATHEW, A. S.; CHAUHAN, M. G.; SHAH, B. K. On the antifeedant and anthelmintic potential of *Anacardium occidentale* L. **Ancient Science of Life**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 134-144, Oct. 1998.

MATTANOVICH, D. *et al.* Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 8, p. 1-13, June 2009.

MAYER, R. T. *et al.* Characterization of seven basic endochitinases isolated from cell. **Planta**, [s. l.], v. 200, n. 3, p. 289-295, 1996.

MESQUITA, A. L. M. *et al.* **Monitoramento de Pragas na Cultura do Cajueiro**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, Jul. 2006. 34 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/427039/monitoramento-de-pragas-na-cultura-do-cajueiro>. Acesso em: 4 mar. 2021.

MESQUITA, A. L. M.; PINI, N da S. D; SOBRINHO, R. B. Pragas do cajueiro. *In*: SERRANO, L. A. L. **Sistema de Produção do Caju**. 2. ed. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, p. 125-153, Jul. 2016. Disponível em: [file:///C:/Users/Simone%20Torres/Downloads/SPR16001%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Simone%20Torres/Downloads/SPR16001%20(2).pdf). Acesso em: 9 mar. 2021.

- MHLONGO, N. N. *et al.* A critical survey of average distances between catalytic carboxyl groups in glycoside hydrolases. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, [s. l.], v. 82, n. 9, p. 1747-1755, Sept. 2014.
- MILLER G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.
- MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of computational chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 174-182, Dec. 2009.
- MUKHOPADHYAY, A. K. *et al.* Larvicidal properties of cashew nut shell liquid (*Anacardium occidentale* L) on immature stages of two mosquito species. **Journal of Vector Borne Diseases**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 257-260, Dec. 2010.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 292-312, Feb. 2010.
- NADIYA, F. *et al.* High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 485, p. 25-27, Sept. 2015.
- NAGPURE, A.; CHOUDHARY, B.; GUPTA, R. K. Chitinases: In agriculture and human healthcare. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 215-232, Sept. 2014.
- NAUMANN, T. A. Modification of recombinant maize ChitA chitinase by fungal chitinase-modifying proteins. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 365-372, May 2011.
- NAZ, R. *et al.* Amelioration of Rheumatoid Arthritis by *Anacardium occidentale* via Inhibition of Collagenase and Lysosomal Enzymes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2020, p. 1-11, Nov. 2020.
- NETTO, M. S. B. *et al.* Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 437-451, Apr. 2017.
- NEVALAINEN, K. M. H.; TE'O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 468-474, Sept. 2005.
- NISHITANI, Y. *et al.* Crystal structures of an archaeal chitinase ChiD and its ligand complexes. **Glycobiology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 418-426, June 2018.
- NOZAKI, Y.; TANFORD, C. Acid-Base titrations in concentrated guanidine hydrochloride. Dissociation constants of the guanidinium ion and of some amino acids. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 736-742, Feb. 1967.
- OHME-TAKAGI, M.; MEINS, F.; SHINSHI, H. A tobacco gene encoding a novel basic class II chitinase: A putative ancestor of basic class I and acidic class II chitinase genes. **Molecular and General Genetics**, [s. l.], v. 259, n. 5, p. 511-515, Sept. 1998.

OHNUMA, T. *et al.* LysM domains from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A: A stability study and characterization of the chitin-binding site. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 8, p. 5178-5187, Feb. 2008.

OHNUMA, T. *et al.* Crystal structure and mode of action of a class V chitinase from *Nicotiana tabacum*. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 291-304, Feb. 2011a.

OHNUMA, T. *et al.* A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: Gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. **Planta**, [s. l.], v. 234, n. 1, p. 123-137, July 2011b.

OLAJIDE, O. A. *et al.* Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 95, n. 2-3, p. 139-142, Dec. 2004.

OLAJIDE, O. A.; ADEROGBA, M. A.; FIEBICH, B. L. Mechanisms of anti-inflammatory property of *Anacardium occidentale* stem bark: Inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK signalling in the microglia. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 42-49, Jan. 2013.

ORNATOWSKI, W. *et al.* Introduction and constitutive expression of a tobacco hornworm (*Manduca sexta*) chitinase gene in soybean. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 260-265, May/June 2004.

PAIVA, F. F. de A.; GARRUTTI, D. dos S.; SILVA NETO, R. M. **Aproveitamento Industrial do caju**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT/SEBRAE - CE, jun. 2000. 87 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/422033/aproveitamento-industrial-do-caju>. Acesso em: 2 jun. 2016.

PATEL, A. K. *et al.* ICChI, a glycosylated chitinase from the latex of *Ipomoea carnea*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 70, n. 10, p. 1210-1216, July 2009.

PAWAR, S. P. *et al.* Anti - Inflammatory and analgesic Activity of *Anacardium Occidentale* Leaf Extracts. **Ancient science of life**, [s. l.], v. 19, n. 3-4, p. 169-16973, Jan. 2000.

PONCZEK, R. L. **Deus ou seja a natureza: Spinoza e os novos paradigmas da física**. Salvador: EDUFBA, 2009.

PREETY; SHARMA, S.; HOODA, V. Purification and Analytical Application of *Vigna mungo* Chitinase for Determination of Total Fungal Load of Stored Cereals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 186, n. 1, p. 12-26, Sept. 2018.

PRICE, N. P. J. *et al.* Structure and disulfide bonding pattern of the hevein-like peptide domains from plant class IV chitinases. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 25-30, Nov. 2015.

PROMEGA. **Technical manual pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy vectors**. Madison, WI: Promega corporation, 2009. 28 p.

QUILÈS, F.; BALANDIER, J. Y.; CAPIZZI-BANAS, S. In situ characterisation of a



microorganism surface by Raman microspectroscopy: The shell of *Ascaris eggs*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 386, n. 2, p. 249-255, Sept. 2006.

RAMAKRISHNA, B. *et al.* Carboxy-terminal glycosyl hydrolase 18 domain of a carbohydrate active protein of *Chitinophaga pinensis* is a non-processive exochitinase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 115, p. 1225-1232, Aug. 2018.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 208-211, May 2002.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. **Enzyme Research**, [s. l.], v. 2015, p. 1-8, Nov. 2015.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified estimation colorimetric method of *N*-acetyl amino for the sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 217, n. 2, p. 959-966, Dec. 1955.

REITSMA, M. *et al.* Purification and Characterization of *Anacardium occidentale* (Cashew) Allergens Ana o 1, Ana o 2, and Ana o 3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 1191-1201, Feb. 2016.

REITSMA, M. *et al.* Origin and Processing Methods Slightly Affect Allergenic Characteristics of Cashew Nuts (*Anacardium occidentale*). **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 1153-1164, Apr. 2018.

RENNER, T.; SPECHT, C. D. Inside the trap: gland morphologies, digestive enzymes, and the evolution of plant carnivory in the Caryophyllales. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 1-11, Aug. 2014.

RIBEIRO, F. de O. S. *et al.* Anti-proliferative profile of *Anacardium occidentale* polysaccharide and characterization by AFM. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 156, p. 981-987, Aug. 2020.

RICO, R.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. **Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 329-338, Oct. 2016.

ROCHA, M. V. P. *et al.* Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 1099-1107, Aug. 2011.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E. *et al.* Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 452-465, Apr. 2017.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1412-

1422, Aug. 2019.

ROZEBOOM, H. J. *et al.* Crystallization of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 212, n. 3, p. 441-443, Apr. 1990.

SALEHI, B. *et al.* *Anacardium* plants: Chemical, nutritional composition and biotechnological applications. **Biomolecules**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1-34, Sept. 2019.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, G. H. F. dos; AMARAL, A.; SILVA, E. B. da. Antibacterial activity of irradiated extracts of *Anacardium occidentale* L. on multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Applied Radiation and Isotopes**, [s. l.], v. 140, p. 327-332, Oct. 2018.

SANTOS, J. M. *et al.* Effect of *Anacardium occidentale* leaf extract on human acute lymphoblastic leukaemia cell lines. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1633-1636, June 2018.

SERRANO, L. A. L. *et al.* **Influência do oídio nas castanhas de diferentes genótipos de cajueiro Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza: EMBRAPA - CNPAT, dez. 2013. 20 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/981602/influencia-do-oidio-nas-castanhas-de-diferentes-genotipos-de-cajueiro>. Acesso em: 6 mar. 2021.

SERRANO, L. A. L.; OLIVEIRA, V. H. Aspectos botânicos, fenologia e manejo da cultura do cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P. **Agronegócio Caju: práticas e inovações**. [s. l.]: EMBRAPA, p. 77-165, 2013.

SHEHATA, A. N. *et al.* Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, p. 990-999, Feb. 2018.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2856-2860, Jan. 2007.

SHIROTA, K. *et al.* Purification and characterization of chitinase isozymes from a red algae, *Chondrus verrucosus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 12, p. 3091-3099, Dec. 2008.

SIERRA-GÓMEZ, Y. *et al.* A biophysical and structural study of two chitinases from *Agave tequilana* and their potential role as defense proteins. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 286, n. 23, p. 4778-4796, Dec. 2019.

SINGH, A. *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1-10, Mar. 2015.

SINGH, A.; ISAAC KIRUBAKARAN, S.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new

antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 100-109, Nov. 2007.

SINGH, R. Antihyperglycemic effect of ethanolic extract and fractions of *Anacardium occidentale* L. Stem bark in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of basic and clinical pharmacy**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 16-169, Dec. 2010.

SIRACUSA, R. *et al.* The antioxidant and anti-inflammatory properties of *Anacardium occidentale* L. Cashew nuts in a mouse model of colitis. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1-20, Mar. 2020.

SLIMENE, I. Ben *et al.* Isolation of a Chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 Strain Exerting a Biological Control Against *Phoma medicaginis* Infection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 175, n. 7, p. 3494-3506, Apr. 2015.

SOUSA, A. J. S. *et al.* A thermostable chitinase from the antagonistic *Chromobacterium violaceum* that inhibits the development of phytopathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 126, p. 50-61, July 2019.

SOUZA, N. C. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Anacardium occidentale* Leaf Extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2017, p. 1-8, Aug. 2017.

SPANÒ, D. *et al.* Chitinase III in *Euphorbia characias* latex: Purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 116, p. 152-158, Dec. 2015.

SPOHNER, S. C. *et al.* Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 202, p. 118-134, May 2015.

SUGANTHI, M. *et al.* Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. **Journal of General and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 222-227, Sept. 2017.

SUN, L. *et al.* Characterization of two chitinase genes and one chitosanase gene encoded by *Chlorella* virus PBCV-1. **Virology**, [s. l.], v. 263, n. 2, p. 376-387, Oct. 1999.

SYTWALA, S.; GÜNTHER, F.; MELZIG, M. F. Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus *Euphorbia* - A contribution to plant defense mechanism. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 95, p. 35-40, Oct. 2015.

TAIRA, T. *et al.* Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*). **Glycobiology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 644-654, May 2011.

TAKASHIMA, T. *et al.* Structure and Enzymatic Properties of a Two-Domain Family GH19 Chitinase from Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) Pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 22, p. 5699-5706, June 2018.

TAKE, K. *et al.* Enzymatic and molecular characterization of an acidic and thermostable chitinase 1 from *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3. **Journal of General and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 190-197, Sept. 2018.

TAKEOA, S. *et al.* Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 243-248, Sept. 2009.

TANG, W. J. *et al.* Chitin is endogenously produced in vertebrates. **Current Biology**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 897-900, Mar. 2015.

TAO, F. *et al.* Applications of chitin and chitosan nanofibers in bone regenerative engineering. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 230, p. 1-20, Feb. 2020.

TCHIKAYA, F. O. *et al.* *Anacardium occidentale* Linn. (Anacardiaceae) stem bark extract induces hypotensive and cardio-inhibitory effects in experimental animal models. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 452-461, June 2011.

TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C. *et al.* Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. **Structure**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 1181-1189, Dec. 1994.

TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C.; HENNIG, M.; DIJKSTRA, B. W. The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 262, n. 2, p. 243-257, Sept. 1996.

TOBIAS, P. A. *et al.* Identification of the *Eucalyptus grandis* chitinase gene family and expression characterization under different biotic stress challenges. **Tree Physiology**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 565-582, May 2017.

TORRES, R. C.; GARBO, A. G.; WALDE, R. Z. M. L. Characterization and bioassay for larvicidal activity of *Anacardium occidentale* (cashew) shell waste fractions against dengue vector *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, n. 10, p. 3699-3702, Oct. 2015.

TRABELSI, S. *et al.* *Aspergillus oryzae* S2 AmyA amylase expression in *Pichia pastoris*: production, purification and novel properties. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 921-932, Feb. 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of computational chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 455-461, Jan. 2010.

TRUONG, N. H. *et al.* Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 5, p. 1063-1070, May 2003.

TYLER, L. *et al.* Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 11, p. 1-21, Oct. 2010.

UDAYA PRAKASH, N. A. *et al.* Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. **Journal of Molecular Evolution**, [s.

l.], v. 70, n. 5, p. 466-478, May 2010.

USMAN, A. *et al.* Chitin and chitosan based polyurethanes: A review of recent advances and prospective biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 86, p. 630-645, May 2016.

VADHANA, A. K. P. *et al.* Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 177-183, Mar. 2013.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 44, p. 135-162, Mar. 2006.

VAN OERS, M. M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 107, July 2011.

VASCONCELOS, M. da S. *et al.* Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 240, n. 12, p. 1648-1655, Dec. 2015.

VELAGAPUDI, R. *et al.* Agathisflavone isolated from *Anacardium occidentale* suppresses SIRT1-mediated neuroinflammation in BV2 microglia and neurotoxicity in APPSwe-transfected SH-SY5Y cells. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1957-1966, Oct. 2018.

VIDAL-NETO, F. C. *et al.* Melhoramento genético e cultivares de cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P. **Agronegócio Caju: práticas e inovações**. [s. l.]: EMBRAPA, p. 481-508, 2013.

VINCENZI, S. *et al.* Characterization of a grape class IV chitinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 24, p. 5660-5668, June 2014.

VOLPICELLA, M. *et al.* Overview of plant chitinases identified as food allergens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 25, p. 5734-5742, June 2014.

WANG, D. *et al.* A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 116, p. 863-868, Sept. 2018.

WANG, G. *et al.* Enhancing Accuracy in Molecular Weight Determination of Highly Heterogeneously Glycosylated Proteins by Native Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 89, n. 9, p. 4793-4797, May 2017.

WANG, X. *et al.* Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 70, p. 455-462, Sept. 2014.

WARNER, S.A.J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction. In: FOSTER, G.D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation: Principles and Practice**. West Sussex: John Wiley & Sons, p. 51-73, 1996.

- WHELAN, S.; GOLDMAN, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 691-699, May 2001.
- XAYPHAKATSA, K. *et al.* Gene cloning, expression, purification and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) class II chitinase CHT11. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 43, p. 19-24, Mar. 2008.
- YAMASSAKI, F. T. *et al.* Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 125, p. 241-248, July 2015.
- YAN, R. X. *et al.* In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 293-301, Aug. 2008.
- YANG, S. *et al.* Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 192, p. 1041-1048, Feb. 2016.
- YIN, J. *et al.* Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 335-347, Jan. 2007.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1133-1174, Mar. 2015.
- YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 620-634, May 2012.
- YOUNG, V. L.; SIMPSON, R. M.; WARD, V. K. Characterization of an exochitinase from *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus* (family Baculoviridae). **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 86, n. 12, p. 3253-3261, Dec. 2005.
- ZENG, X. F. *et al.* Constitutive expression of McCHIT1-PAT enhances resistance to rice blast and herbicide, but does not affect grain yield in transgenic glutinous rice. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 77-85, Jan./Feb. 2014.
- ZHANG, D. *et al.* Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 353-372, Feb. 2004.
- ZHANG, W. *et al.* Biochemical characterization of a bifunctional chitinase/lysozyme from *Streptomyces sampsonii* suitable for N-acetyl chitobiose production. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 1489-1499, Aug. 2020.
- ZHONG, R. *et al.* Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. **Plant Cell**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 165-179,

Jan. 2002.

ZHOU, J. *et al.* The broad-specificity chitinases: their origin, characterization, and potential application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 103, n. 8, p. 3289-3295, Apr. 2019.

ZHU, K. Y. *et al.* Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. **Annual Review of Entomology**, [*s. l.*], v. 61, p. 177-196, 2016.

**APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS QUE CODIFICAM DUAS  
QUITINASES GH19 NO CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE CCP 76**

Sequência 1 (1071 pb) disponível no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com o número de acesso MN623694.

```
CAGAAACCATTTCTCATCTTCTCGTTATTCATCACTCAGACGGTTCTGAAGATCAATGGC
TTTCAACATGAGAAAACATTTATCTATTGCTTTTTTTGGGACTTTTTGCCTTGGCCATTAT
TCCCCACAATGTCATGTCTCAAACTGTGGCTGTGCTCCGAACTTGTGTTGCAGTCAGTT
TGGTTACTGTGGCACCGGCAAAGATTACTGCGGAGCGGGGTGTAAGGAGGGTCCTTGAC
CTCGACGCCGTCACCTACACCGCCAGGCGGTGGTTCTGTTGCCAATATTGTTACGGCTGC
GTTCTTTTGATGGGATAAAGAATCAAGCTGCGGCAAGCTGTGTTGGAAAGAGCTTCTACAC
AAGAGATGGATTTCTTACTGCTGCCAAATCGTTTCCTCAATTTGGTTCAGGCTCTGCTGA
CCAATCCAAGCGTGAGATTGCTGCTTTTTTTGCTCATGTTACTCATGAAACTGGACATTT
ATGCTACACTGAAGAGATTGACAAGTCCAATGCCTACTGTGACCAGTCGAACACACAGTA
TCGATGCGTCCCCGGAAAGAAGTACTACGGCCGTGGACCACTGCAGCTGACCTGGAAC TA
CAACTATGGCGCCTGTGGAAAAGCCGTCGGGTTTGACGGCCTCAACGCTCCCGAAACCGT
GTCCAACAATCCTGCTGTCTCCTTCAAGTCCGCTTGTGGTTCTGGATGACCAATGTTCA
CTCAGTCGTGAACCAGGGCTTCGGGGCAACTATTCAGAAGATCAATGGCGCTCTTGAATG
CGGTGGCAAGCAGCCTGACAAGGTCAAAGCGCGTGTGGATATTACACTGATTACTGCAA
GAAATTCGGCGTTGATCCTGGCCAGAATTTGTCTTGCTAGATGACTGAATTTCAGAACTT
CCAGAACTTCAGAGCTTCTTTATATGCTTGGCGATTGAATAATGTTCTTGTGCGTAAA
GAGTTGTTCTATTGGACAACCTTATTTGAATGCAAATCTGTTGGAGTTTTATGTAAC TCGA
ACGAAATAAATGGAATAAAGAAACACTAAGAAGTGGGAAGTTCACTGGGAG
```

Sequência 2 (1157 pb) disponível no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com o número de acesso MN623695.

```
CTTTTTTCTATAAGGCAAACATGGAGACAAAATGGCTACTTCTTTTGACAATGGCGATTT
TATCATTAAATAATAGTTACTGTGAATGGAGATGGAGAAATGCCATCCGTAAAGCCGATCG
TGAAAATCGTGAAGGGCAAGAAGCTGTGCGACAAGGGATGGGAGTGCAAAGGGTTATCAG
AATATTGCTGCAACCAGACCATATCTGATTATTTCCAAACCTACCAATTCGAGAACCTTT
TCTCAAAGCGTAACACGCCGTGTGGCTCACGCAGCCGGTTCTGGGACTACCATTTCTTCA
TCACTGCGGCTGCTGTGTATCAGCCTAAGGGGTTTGGAAACAACAGGAGGGAAGCTCATGG
GCCAGAGGGAGGTTGCAGCTTTTCTCGGCCATGTGGGGAGCAAACCTCATGCGGTTATG
GAGTGGCCACGGGCGGTCCATTGGCTTGGGGTCTTTGCTACAACAAGGAAATGAGTCCAA
GCCAAACATACTGTGATGACAGCTTCAAATTCATCTATCCATGCACTCCTGGAATTTCTT
ATCATGGCCGTGGTGCCTTGCCCTTTTACTGGAACTACA ACTATGGAGAACTGGAGAGG
CCTTGAAGGTAGATCTGTTGAACCATCCAGAGTACATAGAAAACAATGCAACACTGGCGT
TCCAGACTGCAATTTGGAGGTGGATGACTCCGGTGAAGAAGCATCAGCCTTCCGCTCACG
ACGTCTTTGTTGGTAACTGGAAGCCCACCAAGAACGATACCGAGGCCAAACGGATTCCCTG
GTTTTGGCACCACCATGAACGTTCTCTATGGAGATCAGGTGTGTGGCAATGGCGATGACC
ATGAATCCATGAACAACGTCGTCTCCATTACTTGTATTACCTTGACCTGATGGGCGTTG
GCCGTGAAGAGGCAGGACCCCATGAACTGCTCAGCTGTGGCCAACAAAAGGCTTTCAATC
CATCATCTTCTTCCCTCGTCATCTTCTTGAGCGCACGATCGTCCATTGTTGAGCAGAACT
TCAATAAGAGAGTGGCAAGTGTTATTTTTTTGGAGAATATGAATATTCAGAACTTTGCTA
TGAAGTAATTTTCAATTGTGTGCAGGTCTACATTAGCATGGACAAGAATTATATAATATT
GTATATTGATCTGGCAC
```



**APÊNDICE B – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DAS ORFs *AoChi4849* E  
*AoChi5472***

Sequência de nucleotídeos da ORF *AoChi4849* (822 pb) que codifica uma quitinase no cajueiro  
anão-precoce CCP 76. Em destaque a sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo sinal.  
A sequência restante de 738 nucleotídeos codifica uma proteína madura sem o peptídeo sinal.

```

ATGGCTTTCAACATGAGAAAACATTTATCTATTGCTTTTTTTGGGACTTTTTGCCTTGCC
ATTATCCCCACAATGTCATGTCTCAAACTGTGGCTGTGCTCCGAACTTGTGTTGCAGT
CAGTTTGGTTACTGTGGCACC GGCAAAGATTACTGCGGAGCGGGGTGTAAGGAGGGTCCT
TGCACCTCGACGCCGTACCTACACCGCCAGGCGGTGGTTCTGTTGCCAATATTGTTACG
GCTGCGTTCTTTGATGGGATAAAGAATCAAGCTGCGGCAAGCTGTGTTGGAAAGAGCTTC
TACACAAGAGATGGATTTCTTACTGCTGCCAAATCGTTTCCTCAATTTGGTTCAGGCTCT
GCTGACCAATCCAAGCGTGAGATTGCTGCTTTTTTTTGCTCATGTTACTCATGAACTGGA
CATTTATGCTACACTGAAGAGATTGACAAGTCCAATGCC TACTGTGACCAGTCGAACACA
CAGTATCGATGCGTCCCCGGAAAGAAGTACTACGGCCGTGGACCACTGCAGCTGACCTGG
AACTACAAC TATGGCGCCTGTGGAAAAGCCGTGCGGGTTTGACGGCCTCAACGCTCCCGAA
ACCGTGTCCAACAATCCTGCTGTCTCCTTCAAGTCCGCCTTGTGGTTCTGGATGACCAAT
GTTCACTCAGTCGTGAACCAGGGCTTTCGGGGCAACTATT CAGAAGATCAATGGCGCTCTT
GAATGCGGTGGCAAGCAGCCTGACAAGGTCAAAGCGCGTGTGGATATTACTGATTAC
TGCAAGAAATTCGGCGTTGATCCTGGCCAGAATTTGTCTTGC

```

Sequência de nucleotídeos da ORF *AoChi5472* (966 pb) que codifica uma quitinase no cajueiro  
anão-precoce CCP 76. Em destaque a sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo sinal.  
A sequência restante de 897 nucleotídeos codifica uma proteína madura sem o peptídeo sinal.

```

ATGGAGACAAAATGGCTACTTCTTTTGACAATGGCGATTTTATCATTAAATAATAGTTACT
GTGAATGGAGATGGAGAAATGCCATCCGTAAAGCCGATCGTGAAAATCGTGAAGGGCAAG
AAGCTGTGCGACAAGGGATGGGAGTGCAAAGGGTTATCAGAATATTGCTGCAACCAGACC
ATATCTGATTATTTCCAAACCTACCAATTCGAGAACCTTTTCTCAAAGCGTAACACGCCT
GTGGCTCACGCAGCCGGGTCTGGGACTACCATTTCTTTCATCACTGCGGCTGCTGTGTAT
CAGCCTAAGGGGTTTGGAAACAACAGGAGGGAAGCTCATGGGCCAGAGGGAGGTTGCAGCT
TTTCTCGGCCATGTGGGGAGCAAAACCTCATGCGGTTATGGAGTGGCCACGGGCGGTCCA
TTGGCTTGGGGTCTTTGCTACAACAAGGAAATGAGTCCAAGCCAAACATACTGTGATGAC
AGCTTCAAATTCATCTATCCATGCACTCCTGGAATTTCTTATCATGGCCGTGGTGCCTTG
CCTCTTTACTGGAACTACAAC TATGGAGAACTGGAGAGGCCTTGAAGGTAGATCTGTTG
AACCATCCAGAGTACATAGAAAACAATGCAACACTGGCGTTCCAGACTGCAATTTGGAGG
TGGATGACTCCGGTGAAGAAGCATCAGCCTTCCGCTCACGACGTCTTTGTTGGTAACTGG
AAGCCCACCAAGAACGATACCGAGGCCAAACGGATTCTTGGTTTTGGCACCACCATGAAC
GTTCTCTATGGAGATCAGGTGTGTGGCAATGGCGATGACCATGAATCCATGAACAACGTC
GTCTCCCATTACTTGTATTACCTTGACCTGATGGGCGTTGGCCGTGAAGAGGCAGGACCC
CATGAACTGCTCAGCTGTGGCCAACAAAAGGCTTTC AATCCATCATCTTCTTCTCGTCA
TCTTCT

```

## APÊNDICE C – SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDAS DAS ORFs

### *AoChi4849 E AoChi5472*

Sequência de aminoácidos deduzida da ORF *AoChi4849* (274 aminoácidos). Os 28 aminoácidos referentes ao peptídeo sinal estão sublinhados. A sequência restante de 246 aminoácidos representa a proteína madura sem o peptídeo sinal. Os aminoácidos envolvidos na catálise estão destacados em vermelho: Glu<sup>138</sup> (E), Glu<sup>147</sup> (E) e Thr<sup>179</sup> (T).

1	<u>MAFNMRKHL</u> <u>SLIAFLGLFALAI</u> <u>IPHNVM</u> <u>SQNCGCAPNLCCS</u> <u>QFGYCGTGKD</u>	50
51	YCGAGCKEGPCTSTPSPTPPGGGSVANI VTAAFFDGIKNQAAASCVGKSF	100
101	YTRDGFLTAAKSFPQFGSGSADQSKREIAAFFAHVTH <b>E</b> TGHLCYTE <b>E</b> IDK	150
151	SNAYCDQSNTQYRCVPGKKYYGRGPLQL <b>T</b> WNYNYGACGKAVGFDGLNAPE	200
201	TVSNNPAVSFKSALWFWMTNVHSVVNQFGFATI QKINGALECGGKQDPKV	250
251	KARVGYYTDYCKKFGVDPGQNLSC-----	274

Sequência de aminoácidos deduzida da ORF *AoChi5472* (322 aminoácidos). Os 23 aminoácidos referentes ao peptídeo sinal estão sublinhados. A sequência restante de 299 aminoácidos representa a proteína madura sem o peptídeo sinal. Os aminoácidos envolvidos na catálise estão destacados em vermelho: Lys<sup>128</sup> (K), Glu<sup>150</sup> (E) e Tyr<sup>183</sup> (Y).

1	<u>METKWLLLL</u> <u>TMAILSLI</u> <u>IIVTVNGD</u> <u>GEMPSVKPIVKIVK</u> <u>GKKLCDKGWECK</u>	50
51	GLSEYCCNQTISDYFQTYQFENLFSKRNTPVAHAAGFWDYHSFITAAAVY	100
101	QPKGFGTTGGKLMGQREVA AFLGHVGS <b>K</b> TSCGYGVATGGPLAWGLCYN <b>E</b>	150
151	MSPSQTYCDDSFKFIYPCTPGISYHGRGALPL <b>Y</b> WNYNYGETGEALKVDLL	200
201	NHPEYIENNATLAFQTAIWRWMT PVKKHQPSAHDV FVGNWKPTKNDTEAK	250
251	RI PGFGTTMNVLYGDQVCGNGDDHESMNNVVSHYLYYLDLMGVGREEAGP	300
301	HELLSCGQQKAFNPSSSSSSSS-----	322

**APÊNDICE D – SEQUÊNCIA PUTATIVA DO AMPLICON GERADO NA  
AMPLIFICAÇÃO POR PCR DAS ORFs *AoChi4849* E *AoChi5472* SEM A REGIÃO  
CODIFICADORA DO PEPTÍDEO SINAL**

Sequência putativa do amplicon gerado na amplificação por PCR da ORF *AoChi4849* sem a região codificadora do peptídeo sinal (761 pb).

```

CCGGGAATTCCAAAACTGTGGCTGTGCTCCGAAC TTGTGTTGCAGTCAGTTTGGTTACTG
TGGCACCGGCAAAGATTACTGCGGAGCGGGGTGTAAGGAGGGTCCTTGCACCTCGACGCC
GTCACCTACACCGCCAGGCGGTGGTTCTGTTGCCAATATTGTTACGGCTGCGTTCTTTGA
TGGGATAAAGAATCAAGCTGCGGCAAGCTGTGTTGGAAAGAGCTTCTACACAAGAGATGG
ATTTCTTACTGCTGCCAAATCGTTTCCTCAATTTGGTTTCAGGCTCTGCTGACCAATCCAA
GCGTGAGATTGCTGCTTTTTTTGCTCATGTTACTCATGAACTGGACATTTATGCTACAC
TGAAGAGATTGACAAGTCCAATGCCTACTGTGACCAGTCGAACACACAGTATCGATGCGT
CCCCGAAAGAAGTACTACGGCCGTGGACCACTGCAGCTGACCTGGAAC TACAATATGG
CGCCTGTGGAAAAGCCGTCGGGTTTGACGGCCTCAACGCTCCCGAAACCGTGTCCAACAA
TCCTGCTGTCTCCTTCAAGTCCGCCTTGTGGTTCTGGATGACCAATGTTCACTCAGTCGT
GAACCAGGGCTTCGGGGCAACTATTCAGAAGATCAATGGCGCTCTTGAATGCGGTGGCAA
GCAGCCTGACAAGGTCAAAGCGGTGTTGGATATTACACTGATTACTGCAAGAAATTCGG
CGTTGATCCTGGCCAGAATTTGTCTTGCGTCTAGACCGGA

```

Sequência putativa do amplicon gerado na amplificação por PCR da ORF *AoChi5472* sem a região codificadora do peptídeo sinal (920 pb).

```

CCGGGAATTCGATGGAGAAATGCCATCCGTAAAGCCGATCGTGAAAATCGTGAAGGGCAA
GAAGCTGTGCGACAAGGGATGGGAGTGCAAAGGGTTATCAGAATATTGCTGCAACCAGAC
CATATCTGATTATTTCCAAACCTACCAATTCGAGAACCTTTTCTCAAAGCGTAACACGCC
TGTGGCTCACGCAGCCGGGTTCTGGGACTACCATTCTTTCATCACTGCGGCTGCTGTGTA
TCAGCCTAAGGGGTTTGGAACAACAGGAGGGAAGCTCATGGGCCAGAGGGAGGTTGCAGC
TTTTCTCGGCCATGTGGGGAGCAAAACCTCATGCGGTTATGGAGTGGCCACGGGCGGTCC
ATTGGCTTGGGGTCTTTGCTACAACAAGGAAATGAGTCCAAGCCAAACATACTGTGATGA
CAGCTTCAAATTCATCTATCCATGCACTCCTGGAATTTCTTATCATGGCCGTGGTGCCTT
GCCTCTTTACTGGAAC TACAATATGGAGAACTGGAGAGGCCTTGAAGGTAGATCTGTT
GAACCATCCAGAGTACATAGAAAACAATGCAACACTGGCGTTCCAGACTGCAATTTGGAG
GTGGATGACTCCGGTGAAGAAGCATCAGCCTTCCGCTCACGACGTCTTTGTTGGTAACTG
GAAGCCCACCAAGAACGATACCGAGGCCAAACGGATTCTGGTTTTGGCACCACCATGAA
CGTTCTCTATGGAGATCAGGTGTGTGGCAATGGCGATGACCATGAATCCATGAACAACGT
CGTCTCCATTACTTGTATTACCTTGACCTGATGGGCGTTGGCCGTGAAGAGGCAGGACC
CCATGAACTGCTCAGCTGTGGCCAACAAAAGGCTTTCAATCCATCATCTTCTTCTCCTCGTC
ATCTTCTGTCTAGACCGGA

```

**APÊNDICE E – SEQUÊNCIA PUTATIVA DAS QUITINASES *AoChi4849* E *AoChi5472*  
RECOMBINANTES PRODUZIDAS EM *P. pastoris* KM71H**

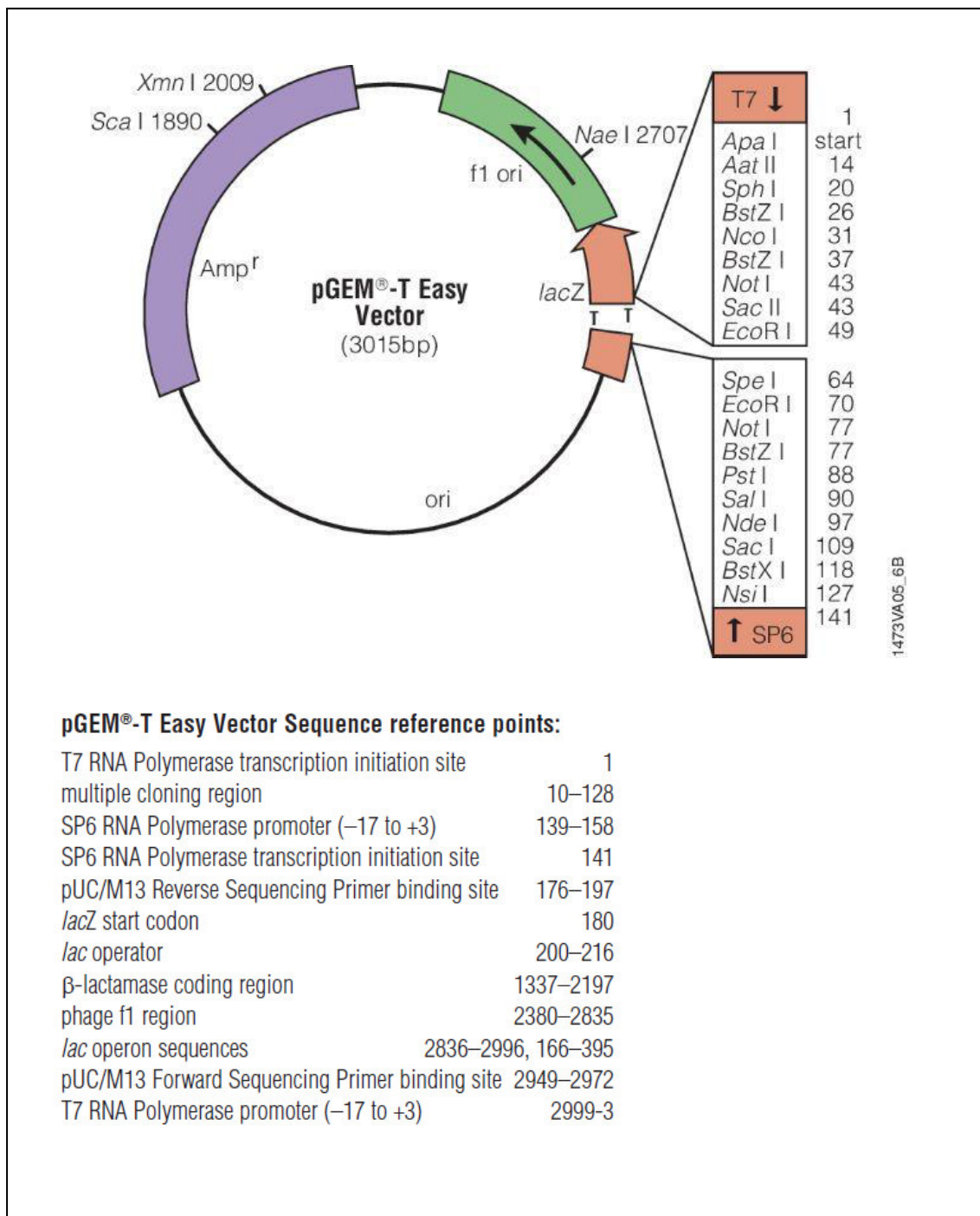
Sequência putativa da *AoChi4849* recombinante produzida em *P. pastoris* KM71H. Os resíduos de aminoácidos codificados pelo vetor de expressão estão sublinhados (275 resíduos de aminoácidos).

1	<u>EAEAEFQ</u> NCGCAPNLCCSQFGYCGTGKDYCGAGCKEGPCTSTPSPTPPGG	50
51	GSVANIIVTAAFFDGIKNQAAAASCVGKSFYTRDGFLLTAAKSFQFGSGSAD	100
101	QSKREIAAFFAHVTHETGHLCYTEEIDKSNAYCDQSNTQYRCVPGKKYYG	150
151	RGPLQLTWNYNYGACGKAVGFDGLNAPETVSNNPAVSFKSALWFWMTNVH	200
201	SVVNQGFGATIQQKINGALECGGKQPKVKARVGYTYDYCKKFGVDPGQNL	250
251	SCVLEQKLISEEDLNSAVDHHHHH-----	275

Sequência putativa da *AoChi5472* recombinante produzida em *P. pastoris* KM71H. Os resíduos de aminoácidos codificados pelo vetor de expressão estão sublinhados (328 resíduos de aminoácidos).

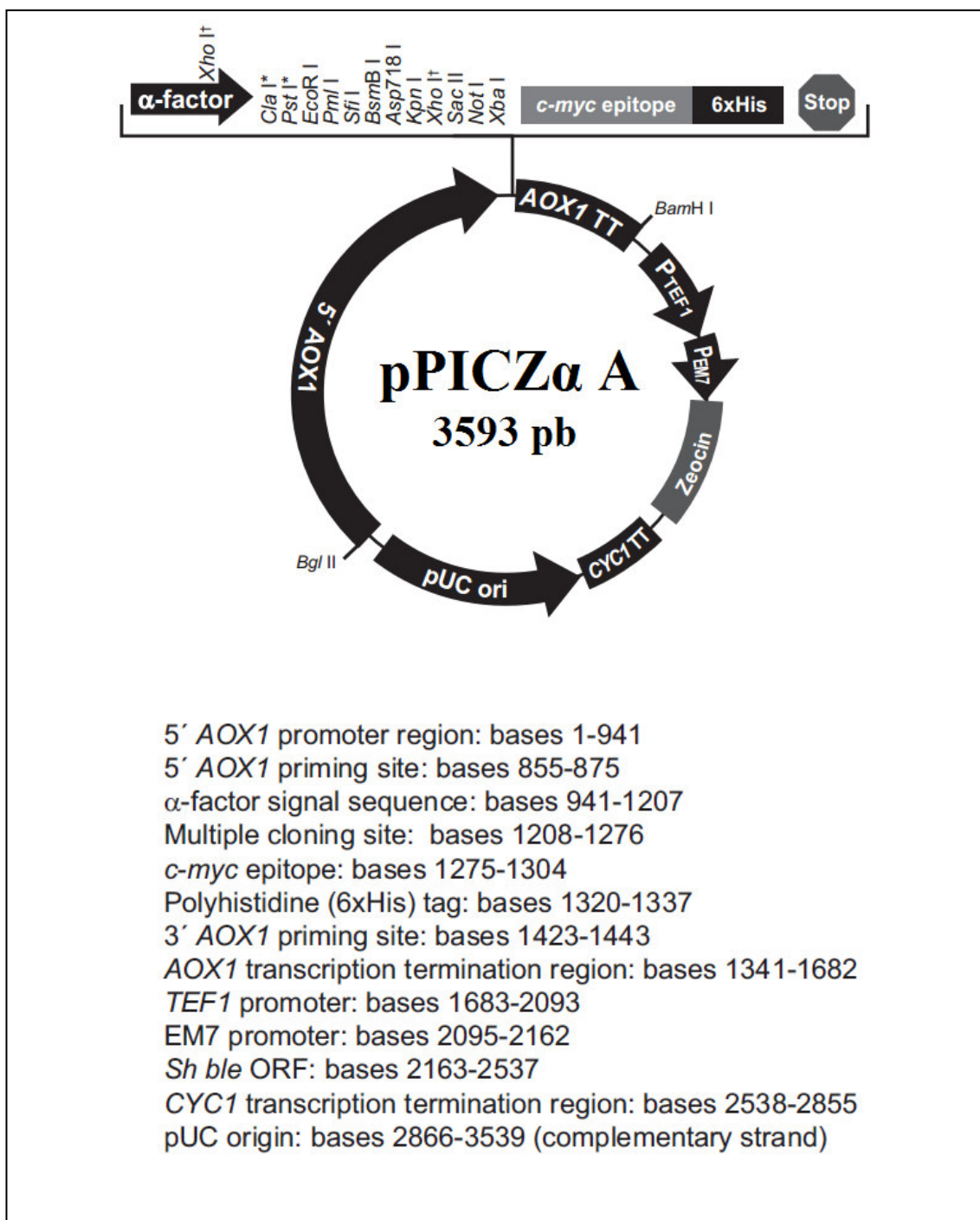
1	<u>EAEAEFD</u> GEMPSVKPIVKIVKGGKLCDKGWECKGLSEYCCNQTISDYFQT	50
51	YQFENLFSKRNTPVAHAAGFWDYHSFITAAAVYQPKGFGTTGGKLMGQRE	100
101	VAAFLGHVGSKTSCGYGVATGGPLAWGLCYNKEMSPSQTICDDSFKFIYP	150
151	CTPGISYHGRGALPLYWNYNYGETGEALKVDLLNHPEYIENNATLAFQTA	200
201	IWRWMTPVKKHQPSAHDVFGVGNWKPTKNDTEAKRIPGFGTTMNVLYGDQV	250
251	CGNGDDHESMNNVSHYLYLDLMGVGREGPHELLSCGQQKAFNPSSS	300
301	SSSSSVLEQKLISEEDLNSAVDHHHHH-----	328

## ANEXO A – MAPA CIRCULAR DO VETOR pGEM-T Easy COM DETALHES DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO E DO SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM



Fonte: (PROMEGA, 2009).

ANEXO B – MAPA CIRCULAR DO VETOR pPICZ $\alpha$ A COM DETALHES DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO E DO SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM



Fonte: (INVITROGEN, 2010).