



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MECIDINA DE SOBRAL**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JEDSON ANTONIO DE SOUZA ARAGÃO**

**ANÁLISE E APLICAÇÕES BIOTECNOLOGIAS DE PROTEÍNAS LIGANTES  
À QUITINA DE SEMENTES DE CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE (*Anacardium  
occidentale* var. *nanum*)**

**Sobral – CE**

**2015**

**JEDSON ANTONIO DE SOUZA ARAGÃO**

**ANÁLISE E APLICAÇÕES BIOTECNOLOGIAS DE PROTEÍNAS LIGANTES  
À QUITINA DE SEMENTES DE CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE (*Anacardium  
occidentale* var. *nanum*)**

Dissertação submetida á coordenação do curso de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em biotecnologia. Área de Concentração: Macromoléculas

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

**Sobral  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

---

A671a Aragão, Jedson Antonio de Souza.

Análise e aplicações biotecnológicas de proteínas çogantes à quitina de sementes de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* var. *nanum*). / Jedson Antonio de Souza Aragão. – 2015.  
79 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.  
Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.  
1. Quitinase. 2. Patógeno. 3. Anacardium. I. Título.

CDD 660.6

---

**JEDSON ANTONIO DE SOUZA ARAGÃO**

**ANÁLISE E APLICAÇÕES BIOTECNOLOGIAS DE PROTEÍNAS LIGANTES  
À QUITINA DE SEMENTES DE CAJUEIRO ANÃO-PRECOCE (*Anacardium  
occidentale* var. *nanum*)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (Orientador)  
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA.

---

Prof. Dr. João Garcia Alves Filho (Examinador)  
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA.

---

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Examinador)  
Instituto de Teologia Aplicada –INTA.

À minha mãe, Célia de Sousa, por ser  
meu exemplo e minha sustentação,

*dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Finalizada essa etapa da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos àqueles que me apoiaram nesta caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, Aquele que tornou tudo possível, me deu forças e fortaleceu minha fé em todos os momentos da minha vida.

À minha família, principalmente aos meus pais, Célia e José Felipe, ao meu irmão Jefferson Sousa e minha avó materna, Laide Lima, por serem minha base e quem com todo carinho, dedicação, amor e compreensão me deram forças e incentivo para realizar meus sonhos.

Ao meu orientador professor Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, pela oportunidade que me deu desde a graduação, pela contribuição em minha formação acadêmica, orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao professor Thales Granjeiro, pela grande atenção e colaboração nesse trabalho orientando parte dos estudos.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular, do Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) que me ajudaram direta e indiretamente na realização desse trabalho. Não tenho palavras para agradecer por tanta ajuda e carinho, além da amizade e dos momentos de descontração durante o trabalho. As companheiras de longa data, das quais compartilhei muitos momentos, alegrias e tristezas antes e durante o mestrado: Aurilene Gomes e Vitoria Virginia. As grandes amigas Nayanne Hardy e Mônica Valéria pela amizade e por todos os momentos que passamos, seja na faculdade ou no laboratório. Aos grandes amigos Raulzito Moreira e Daniel de Brito que mesmo estando longe sempre mostraram-se disponíveis quando precisei. Aos companheiros de trabalho Carlos Franciney, Pedro Cunha, Tatiana Farias, Paulo de Tarso, Rafael Bastos, Erivan Alves e Flávia Muniz, que sempre se mostraram disponíveis quando a ajuda era necessária. À técnica do NUBIS, Maria Auxiliadora que estava sempre disposta a ajudar.

À amiga Simone Torres, que sem sua ajuda não seria possível a realização de parte desse trabalho, e aos novos colegas do LABGEN: Suellen, Juscelino e Ednésio que foram de grande ajuda no trabalho.

Aos colegas e professores do mestrado em Biotecnologia, pelo convívio e troca de conhecimentos.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical, pela disponibilidade das amostras de folha de cajueiro.

Aos membros da banca examinadora, professores João Garcia Alves Filho e Victor Carneiro pelas contribuições ao trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Ceará, por contribuir na minha formação profissional.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**Obrigado!**

“Esse é só o começo do fim da nossa vida  
Deixa chegar o sonho, prepara uma avenida  
que a gente vai passar.” - Marcelo Camelo

## RESUMO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta nativa do Brasil com grande valor comercial. Isso contribui com a geração de milhares de empregos diretos e indiretos, especialmente na Região Nordeste, em época de estiagem. Programas de melhoramento genético vem selecionando cultivares de cajueiro melhores adaptados ao ambiente semiárido a fim de colocá-lo em um mercado cada vez mais competitivo. Entre os tipos de proteínas de sementes várias têm função de reserva, estrutural ou metabólica. Além disso, as plantas são dispostas de uma variedade de mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos. Uma das respostas de defesa mais estudada diz respeito à expressão de proteínas relacionadas com a patogênese nas quais se inclui o grupo das quitinases. A enzima quitinase (EC 3.2.1.14) hidrolisa o polímero de quitina para a N-acetil glucosamina por qualquer uma das endo ou exo clivagens da ligação  $\beta$  (1-4). As respostas moleculares nos perfis das plantas a nível transcricional têm demonstrado serem cruciais para o estabelecimento de um conjunto de mecanismos de defesa contra patógenos invasores. Usando ferramentas de bioinformática foram identificados, no transcriptoma de cajueiro CCP076, dez *contigs* apresentando alto grau de semelhança com quitinases, endoquitinases, e quitinases-like das famílias GH18 e GH 19 de *Ricinus communis*, *Cicer arietinum*, *Mangifera indica*, *Citrus sinensis*, *Euonymus europaeus*, *Vitis vinifera*, *Aegilops tauschii* e *Hevea brasiliensis*. Os ensaios enzimáticos das proteínas da castanha confirmaram a presença quitinases em seu proteoma. Ainda revelaram uma atividade catalítica ótima em pH 5. Um perfil de proteínas com sitio de ligação à quitina também foi encontrado. Dessa forma, é demonstrado um grande potencial biotecnológico nas quitinases provenientes da castanha de cajueiro CCP76.

**Palavras-Chave:** cajueiro, patógeno, quitinase.

## ABSTRACT

The cashew (*Anacardium occidentale* L.) is a plant native to Brazil with high market value. This contributes to the generation of thousands of direct and indirect jobs, especially in the Northeast, in the dry season. Breeding program has been selecting the best cashew cultivars adapted to semi-arid environment in order to put it in an increasingly competitive market. Among the types of seed proteins have several reservation function, structural or metabolic. Furthermore, plants are arranged in an array of defense mechanisms against pathogen attack. One of the most studied defense response with respect to the expression of pathogenesis related proteins which are included in the group of chitinases. The enzyme chitinase (EC 3.2.1.14) hydrolyse the polymer chitin to N-acetyl glucosamine by either endo or exo cleavage of  $\beta$  connection (1-4). The molecular profiles of responses in plants transcriptional level have been shown to be crucial for the establishment of a set of defense mechanisms against invading pathogens. Using bioinformatics tools were identified in the transcriptome cashew CCP076 ten *contigs* having high degree of similarity with chitinases, endochitinases and chitinase-like the GH18 family and GH 19 of *Ricinus communis*, *Cicer arietinum*, *Mangifera indica*, *Citrus sinensis*, *Euonymus europaeus* , *Vitis vinifera*, *Aegilops tauschii* and *Hevea brasiliensis*. The enzyme assays of chestnut chitinase protein confirmed the presence in their proteome. Also revealed a great catalytic activity at pH 5. A protein profile with chitin-binding site was also found. Of these, it is demonstrated great potential in biotechnological chitinase from CCP76 cashew nuts.

**Keywords:** cashew, pathogen, chitinase.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fruto e pseudofruto do cajueiro	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	Estrutura química de quitina	<b>25</b>
<b>Figura 3</b>	Estrutura tridimensional de quitinases GH18 e GH19 de plantas definidas por cristalografia disponíveis no Protein Data Bank (PDB)	<b>25</b>
<b>Figura 4</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como quitinase de <i>Ricinus communis</i> (XP_002515664.1)	<b>33</b>
<b>Figura 5</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como endoquitinase PR4-like de <i>Cicer arietinum</i> (XP_012570981.1)	<b>34</b>
<b>Figura 6</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como quitinase de <i>Mangifera indica</i> (ACD69683.1)	<b>34</b>
<b>Figura 7</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como uma quitinase-like de <i>Citrus sinensis</i> (XP_006488866.1)	<b>35</b>
<b>Figura 8</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como quitinase de <i>Euonymus europaeus</i> (AAP35272.1)	<b>35</b>
<b>Figura 9</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como endoquitinase PR4-like de <i>Vitis vinifera</i> (XP_010650683.1)	<b>36</b>
<b>Figura 10</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como endochitinase de <i>Aegilops tauschii</i> (EMT27212.1)	<b>36</b>
<b>Figura 11</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como quitinase de <i>Hevea brasiliensis</i> (CAA09110.1)	<b>37</b>
<b>Figura 12</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como endoquitinase PR4 de <i>Vitis vinifera</i> (XP_002274537.1)	<b>37</b>
<b>Figura 13</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como quitinase de <i>Vitis vinifera</i> (ABD64687.1)	<b>37</b>
<b>Figura 14</b>	Representação dos domínios conservados no <i>contig</i> identificado como albumina 2S de <i>Anacardium occidentale</i> (AAL91665.1).	<b>38</b>
<b>Figura 15</b>	Alinhamento de nucleotídeos realizado pelo programa Clustal versão 2.0.10, comparando Cajueiro anão-precoce e gigante na	<b>40</b>

procura de SNPs.

- Figura 16** Alinhamento de aminoácidos realizado pelo programa Clustal versão 2.0.10, comparando Cajueiro anão-precoce e gigante na procura de SNPs. **41**
- Figura 17** Estrutura Tridimensional das sequências de quitinasas GH19 de cajueiros anão-precoce CCP76 e Gigante mostrando posição da substituição do resíduo de aminoácido. **41**
- Figura 18** Estrutura tridimensional obtida por RMN de albumina 2S isolada de *Brassica napus* (PDB 1PNB). **45**
- Figura 19** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15 % de proteínas de amêndoas de cajueiro extraídas e fracionadas em pH5 e coradas com de Azul Brilhante de Coomassie R-250 **58**
- Figura 20** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15 % de proteínas de amêndoas de cajueiro extraídas e fracionadas em pH2 e coradas com de Azul Brilhante de Coomassie R-250. **60**

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Concentração de proteínas solúveis em mg/ml em diferentes tampões de extração	<b>52</b>
<b>Gráfico 2</b>	Atividade quitinásica total dos extratos proteicos em diferentes pH	<b>53</b>
<b>Gráfico 3</b>	Atividade quitinásica em unidades em cada 1mL (U/mL) dos extratos proteicos em diferentes pH	<b>53</b>
<b>Gráfico 4</b>	Atividade quitinásica total dos extratos proteicos em diferentes pH antes e depois da diálise	<b>55</b>
<b>Gráfico 5</b>	Atividade quitinásica em unidades em cada 1mL (U/mL) dos extratos proteicos em diferentes pH antes e depois da dialise	<b>55</b>
<b>Gráfico 6</b>	Cromatografia de afinidade realizada com matriz de quitina do extrato proteico em tampão acetato de sódio pH5	<b>56</b>
<b>Gráfico 7</b>	Atividade quitinásica total dos picos cromatográficos do extrato em tampão acetato de sódio pH 5,0	<b>57</b>
<b>Gráfico 8</b>	Atividade quitinásica (U/mL) dos picos cromatográficos do extrato em tampão acetato de sódio pH 5,0	<b>57</b>
<b>Gráfico 9</b>	Concentração de proteínas solúveis em mg/ml do extrato proteico e frações dialisadas em tampão Glicina-HCl pH 2,0.	<b>60</b>
<b>Gráfico 10</b>	Teste de concentração inibitória mínima realizada com a fração 60-90% contra <i>C. albicans</i>	<b>61</b>
<b>Gráfico 11</b>	Ensaio de atividade antibiofilme de albumina 2S contra <i>C. albicans</i>	<b>61</b>
<b>Gráfico 12</b>	Teste de concentração inibitória mínima realizada com a fração 60-90% contra <i>C. tropicalis</i> .	<b>62</b>
<b>Gráfico 13</b>	Ensaio de atividade antibiofilme de albumina 2S contra <i>C. tropicalis</i>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Principais características dos cajueiros dos tipos comuns e anos precoce.	<b>20</b>
<b>Tabela 2</b>	Estatísticas de montagem do transcriptoma de cajueiro CCP 76 usando o programa Velvet/Oases.	<b>32</b>
<b>Tabela 3</b>	Quitinases identificadas manualmente pelo Blastx no transcriptoma de semente de Cajueiro anão-precoce CCP76.	<b>39</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
A260	Absorbância a 260 nm
A260/280	Relação entre absorbância 260 e 280
ACC	Amêndoa da Castanha do Caju
BLAST	Ferramenta Básica de Alinhamento Local ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
CCP	Clone de Cajueiro de Pacajus
DMAB	P- dimetil amino benzaldeído
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylene diaminetetra acetic acid)
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	Gramas
GH	Glicosil Hidrolases
GO	Ontologia Gênica ( <i>Gene Ontology</i> )
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
KEGG	Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto ( <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> )
Kg	Quilograma
LCC	Líquido da Castanha de Caju
m	Metro
M	Molar
mRNA,	RNA mensageiro
m/v	Massa/volume
mA	Mili ampere
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NGS	Nova Geração de Sequenciamento ( <i>Next Generation Sequencing</i> )

PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Relacionado a patógeno ( <i>pathogenesis-related</i> )
Rpm	Rotações por minuto
TBE	Tampão contendo Tris, Ácido bórico e EDTA
TE	Tampão contendo Tris e EDTA
W	Wats

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
1.1 Aspectos Gerais do Caju.....	19
1.2 Importância econômica.....	21
1.3 Proteínas de Semente .....	22
1.4 Proteínas PR ( <i>Pathogenesis-Related</i> ).....	22
1.5 Quitinases.....	23
<b>2. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE PROTEÍNAS LIGANTES À QUITINA PRESENTES NOS TRANSCRIPTOMA DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE CCP76.....</b>	<b>27</b>
2.1 Transcriptoma.....	27
2.2 SNP-Single Nucleotide Polymorphism.....	28
<b>2.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2.2 Objetivos Específicos.....	29
<b>2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
2.3.1. Obtenção das sequências do transcriptoma do cajueiro.....	30
2.3.2 Montagem do transcriptoma .....	30
2.3.3 Identificação <i>in silico</i> de quitinases e triagem das sequências com CDS completo.....	30
2.3.4 Análise de SNPs.....	31
<b>2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>32</b>
2. 4.1 Montagem do transcriptoma utilizando o Velvet e Oases.....	32
2.4.1. Identificação e classificação dos transcritos.....	33
2.4.1.2 Identificação de SNP nos <i>contigs</i> identificados .....	40
<b>2.5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>3. AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DO CRESCIMENTO MICROBIANO DE ALBUMINA 2S DE CASTANHA DE CAJU (<i>Anacardium Occidentale</i> var. <i>nanum</i>).....</b>	<b>44</b>
3.1 Albumina 2s.....	44
<b>3.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
3.2.1 Objetivo Geral.....	46
3.2.2 Objetivos Específicos.....	46
<b>3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Extração de proteínas das Castanhas de CCP076.....	47
3.3.2 Determinação da concentração de proteínas.....	47
3.3.3 Atividade Quitinásica.....	47

3.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (PAGE-SDS).....	48
3.3.5 Cromatografia de afinidade em matriz de quitina.....	49
3.3.6 Precipitação com Sulfato de Amônio.....	49
3.3.7 Ensaio de atividade antimicrobiana (CIM).....	49
3.3.8 Ensaio de atividade antibiofilme.....	50
3.3.9. Quantificação da biomassa.....	50
<b>3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>51</b>
3.4.1 Extração de proteínas solúveis.....	51
3.4.2 Ensaio da atividade quitinásica.....	51
3.4.3 Cromatografia de afinidade em matriz de quitina.....	54
3.4.2 Avaliação de albuminas 2S presentes na castanha de CCP076.....	59
3.4.3 Atividade antimicrobiana.....	59
<b>3.5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma espécie de origem brasileira, encontrada principalmente em climas tropicais e subtropicais, e é a única espécie cultivada comercialmente do seu gênero (PAIVA; CRISÓSTOMO; BARROS, 2003). A variedade anão-precoce vem substituindo o cajueiro comum por proporcionar maior produtividade, facilitar a colheita e a condução dos pomares em razão do seu baixo porte. Além disso, o cajueiro anão-precoce apresenta maior uniformidade da castanha, do pedúnculo e da produção, permitindo uma exploração comercial mais rentável (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995; OLIVEIRA et al., 2002). O uso de clones representa uma forma de manejo econômico, ecológico e seguro, impedindo a invasão de pragas e doenças, além de proporcionar uma melhor utilização da variabilidade genética da espécie (PAIVA; BARROS, 2004).

Entre os tipos de proteínas de sementes, várias têm função protetora, ou estrutural ou metabólica. Embora as proteínas PR (*Pathogenesis-Related*) estejam envolvidas na defesa de plantas, elas não são necessariamente identificadas por sua ação antipatogênica, mas sim por seu simples acúmulo em plantas submetidas à situação de patogênese (VAN LOON, 1997). Entre as PR encontram-se as quitinases que parecem ter um papel direto na defesa do vegetal ao hidrolisar os polímeros de quitina, o principal componente da parede celular da maioria dos fungos (COLLINGE et al., 1993). Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações covalentes  $\beta$ -1,4 entre os resíduos de GlcNAc que constituem as cadeias de quitina. Essas enzimas podem ocorrer em vários organismos, desde animais, plantas, insetos até vírus e bactérias. (DAHIYA et al., 2006;).

O desenvolvimento de novas técnicas de sequenciamento tem proporcionado uma maneira mais rápida e eficiente de mapear e quantificar o transcriptoma em um método conhecido como RNA-Seq (WANG et al. 2010). A utilização da tecnologia do RNA-Seq oferece uma grande quantidade de informação sobre o transcriptoma como a avaliação dos níveis de expressão, mapeamento de genes expressos e descoberta de novos genes, sem haver a necessidade de um genoma previamente sequenciado (WANG et al. 2009).

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Aspectos Gerais do Caju

Pertencente a família Anacardiaceae, o cajueiro possui distribuição tropical e subtropical, incluindo cerca de 70 gêneros e 700 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 13 gêneros e cerca de 60 espécies. Diversas Anacardiaceae apresentam frutos ou pseudofrutos comestíveis, este é o caso do cajueiro (*Anacardium occidentale*), cujo fruto é a castanha de caju, mundialmente conhecida, sendo o seu pseudofruto originado do desenvolvimento do pedúnculo, e tem sido comercializado in natura ou na forma de doces, sucos ou sorvetes (SOUZA; LORENZI, 2008).

Existem dois tipos bem definidos, em relação ao porte da planta, o tipo comum e anão-precoce. O cajueiro comum apresenta porte grande, variação na distribuição dos ramos e formatos da copa, a castanha e o pedúnculo podem apresentar uma grande variabilidade. Em sua maioria, produz menos de 5 kg de castanha por safra podendo haver plantas com produção próxima a 200 kg. Sua produção é estabilizada apenas após 8 anos. O tipo anão-precoce tem como características um porte baixo, copa homogênea, diâmetro do caule e envergadura da copa bem inferior ao tipo comum. A propagação da maioria das plantas é feita por sementes ou por enxertia, com floração tendo início já no primeiro ano e apresentando características com menor variabilidade em relação ao tipo comum (BARROS, 2002).

O cajueiro é uma planta perene, de ramificação baixa e porte médio, cuja copa atinge altura média de 5 a 8 metros e diâmetro médio entre 12 e 14 metros no tipo comum. Podendo atingir até 15 m de altura e diâmetro da copa superior a 20 m, dependendo do genótipo e das condições de clima e solo. No caso do cajueiro anão-precoce, a altura média não ultrapassa 4 metros e a envergadura varia entre 6 e 8 metros. Suas folhas são simples, inteiras, alternas, de aspecto subcoriáceo, glabras e curto-pecioladas, medindo de 10 a 20 cm de comprimento por 6 a 12 cm de largura (BARROS, 2002) (Tabela 1).

O fruto (Figura 1) é um aquênio, conhecido popularmente como castanha, consiste de epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa. O peso é variável, encontrando-se castanhas de 3 a 12 g, e o aumento deste limite superior é um dos principais objetivos do melhoramento. Tem coloração esverdeada, de início, tornando-se avermelhada e por último apresenta cor acinzentada. Sua superfície é cerosa, brilhante e resistente,

ornamentada de inúmeras pontuações escuras. O pseudofruto (Figura 1) tem alto teor de água e é normalmente rico em vitamina C e em açúcares, quando maduro. O pseudofruto apresenta uma epiderme muito fina e brilhante, de coloração variável do amarelo ao vermelho, podendo ter pontuações (BARROS et al., 1993; FERRÃO, 1995).

Figura 1: Fruto e pseudofruto do cajueiro.



Fonte: Google imagens.

Tabela 1: Principais características dos cajueiros dos tipos comum e anão-precoce.

Características	Comum	Anão-precoce
Porte	Alto (8 - 15)	Baixo (<5)
Tamanho da copa	<7	5 a 7
Primeira Florada	2 a 5 anos	6 a 18 meses
Varição do peso da castanha (g)	3 a 33	3 a 13
Varição do peso do pedúnculo (g)	20 a 500	20 a 160
Produção: castanha/planta/safra(kg)	< 1 a > 100	Até 43

Fonte: (Cavalcanti et al, 2009)

O cajueiro é uma planta andromonóica, ou seja, o seu sistema reprodutivo constitui-se de flores masculinas, contendo estame, e hermafroditas na mesma planta. Sua inflorescência é uma panícula apresentando os dois tipos de flores, em quantidades e proporções que variam bastante, tanto entre plantas como entre panículas de uma mesma planta (CRISÓSTOMO et al., 2001; TODA FRUTA, 2014).

O sistema reprodutivo da espécie é predominantemente alogâmico, ou seja, a fecundação é preferencialmente cruzada, sendo que a viabilidade do pólen do cajueiro normalmente é alta. Existe a possibilidade de ocorrer polinização entre flores de uma mesma planta. Por causa disto, o plantio por sementes resulta em grande variação entre plantas, o que afeta não só o seu formato como também sua produção. A flor tem odor bastante ativo, indicando ser atrativa para os insetos (BARROS, 2013).

## **1.2 Importância Econômica**

A cajucultura ocupa no mundo, uma área estimada de 3,39 milhões de hectares, com uma produção mundial estimada em 3,1 milhões de toneladas. O Vietnã é o maior produtor mundial de castanha de caju. O Brasil é o décimo produtor mundial de castanha de caju, e possui uma área cultivada de 740.000 ha, com uma produção de 250 mil toneladas da castanha de caju e dois milhões de toneladas de caju, gerando em média divisas da ordem de US\$ 225 milhões anuais (OLIVEIRA, 2008; FAO, 2012).

O Brasil é apontado pelas mais renomadas instituições internacionais como um dos principais fornecedores de alimentos, fibras e biomassa para um mundo em crescente demanda e aumento populacional. O agronegócio nacional ganhou outra magnitude e mais complexidade. As exportações brasileiras ligadas ao agronegócio foram de US\$ 20 bilhões em 2000. Em 2010, passou de US\$ 76 bilhões. (LOVATELLI, 2011).

A cajucultura no Brasil é distribuída em várias regiões do País, tendo como principal produtor a região Nordeste, respondendo por 94% da produção nacional, onde os maiores plantios localizam-se principalmente nas faixas litorâneas e de transição dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. A castanha como matéria-prima alimenta um parque industrial formado por uma dezena de fábricas de grande porte e cerca de 80 pequenas fábricas, responsáveis pela obtenção da amêndoa de castanha de caju, destinada em sua maioria à exportação, gerando em média divisas da ordem de US\$ 225 milhões anuais. Atualmente, as sucessivas estiagens vêm prejudicando a produção de castanha de caju nos principais estados produtores. Em 2014 a produção foi de apenas 17.023 toneladas gerando US\$ 110 milhões (OLIVEIRA, 2008; SECEX, 2015).

### 1.3 Proteínas de Semente

Um dos primeiros trabalhos sobre proteínas de sementes foi publicado em 1891 por Osborne (*apud* Vickery, 1945) onde essas foram isoladas de acordo com a solubilidade em diversos solventes e as classificaram de acordo com as frações extraídas em água pura (albuminas), soluções salinas diluídas (globulinas), soluções alcoólicas (prolaminas) e soluções alcalinas ou ácidas diluídas (glutelinas) (HELDT, 2005).

Ainda não existe um sistema de classificação universalmente, mas Shewry (2000) considera mais válido dividir as proteínas primeiro em relação à sua função e, para as proteínas de reserva, utilizar a classificação de Osborne modificada. Essa classificação divide as proteínas de reserva em quatro grupos, definidos pelas frações de Osborne e por seus coeficientes de sedimentação, que representam a medida de seu tamanho molecular, a saber: prolaminas, albuminas 2S e globulinas 7S e 11S.

Entre os outros tipos de proteínas de sementes, várias têm função protetora, estrutural ou metabólica. Dentre os protetores, os inibidores de proteinases são, provavelmente, os mais abundantes e amplamente distribuídos, sendo particularmente comuns em sementes de leguminosas, proporcionando resistência contra herbivoria. Existem também endo-hidrolases, como as  $\beta$ -1,3-glucanases e endoquitinases, que parecem ter propriedades antifúngicas; lectinas, que se ligam à glicoproteínas do intestino e interferem na absorção dos nutrientes; proteínas inativadoras de ribossomo; proteínas inibidoras de poligalacturonase, entre outras. Outras proteínas estruturais ou metabólicas incluem componentes estruturais da parede celular, transportadores e proteínas estruturais associadas a membranas de células e organelas, e enzimas (SHEWRY; LUCAS, 1997).

### 1.4 Proteínas PR (*Pathogenesis-Related*)

As plantas são dispostas de uma variedade de mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos (SHARMA et al., 2011). Apesar da ausência de sistema imunitário, que as torna susceptíveis a organismos patogênicos (HUYNH et al., 1992), as plantas estão envolvidas numa variedade de mecanismos potentes de defesa que incluem a síntese de compostos de baixo peso molecular (SELITRENNIKOFF, 2001). Estas respondem induzindo a expressão de um vasto número de genes codificadores de proteínas que assumem um papel importante na defesa (COLLINGE et al., 1993).

Uma das respostas de defesa mais estudada diz respeito à expressão de proteínas relacionadas com a patogênese nas quais se inclui o grupo das quitinases (HUYNH et al., 1992). Descrita pela primeira vez em 1911 por Bernard em orquídeas, o mesmo autor observou atividade antifúngica sensível e termo resistente. Desde então, essa enzima é considerada como parte de mecanismos de defesa que as plantas possuem contra uma variedade de patógenos. O aumento significativo nos níveis de quitinase por numerosos agentes abióticos (etileno, ácido salicílico, soluções salinas, ozônio, luz UV) e por fatores bióticos (fungos, bactérias, vírus, viróides componentes da parede celular de fungos e oligossacarídeos) embasam a afirmação anterior (GUPTA et al., 2010.).

O termo *pathogenesis-related* (PR) foi mais tarde introduzido, em 1980, pelo grupo de trabalho de Antoniw e colaboradores (1980) tendo sido este definido como o conjunto completo de proteínas que são codificadas por uma planta hospedeira, induzidas em condições de patogenicidade ou relacionadas com a mesma (DATTA; MUTHUKRISHNAN, 1999). De acordo com a definição, qualquer proteína produzida pelo hospedeiro induzida por qualquer tipo de agente infeccioso, ou condição comparável, é agrupada neste grupo; ainda assim, as características de inclusão implicam critérios de identificação como as propriedades químicas ou a localização celular. Foi também introduzida a terminologia *PR-like proteins* de modo a designar as proteínas homólogas a PRs deduzidas a partir de sequências de aminoácidos ou previstas pela sequência nucleotídica de seu cDNA correspondente ou gene, mas cujo desenvolvimento da indução é feito controladamente, especificamente em determinados tecidos (EDREVA, 2005).

O desenvolvimento da pesquisa em mecanismos de defesa das plantas conduziu a um rápido e contínuo interesse nas quitinases, uma vez que foram as primeiras proteínas induzidas por patógenos cuja função foi identificada (DATTA; MUTHUKRISHNAN, 1999).

### **1.5 Quitinases: Definição e Classificação**

A enzima quitinase (EC 3.2.1.14) hidrolisa o polímero de quitina para a N-acetil glucosamina por qualquer uma das endo ou exo clivagens da ligação  $\beta$  (1-4) (VAN AALTEN et al., 2000). Essa é classificada em várias categorias com base no seu isolamento, características funcionais e estruturais. Ela pertence as famílias 18 e 19 de glicosil hidrolases (GH) (HENRISSAT; DAVIES, 1997), que são enzimas fundamentais

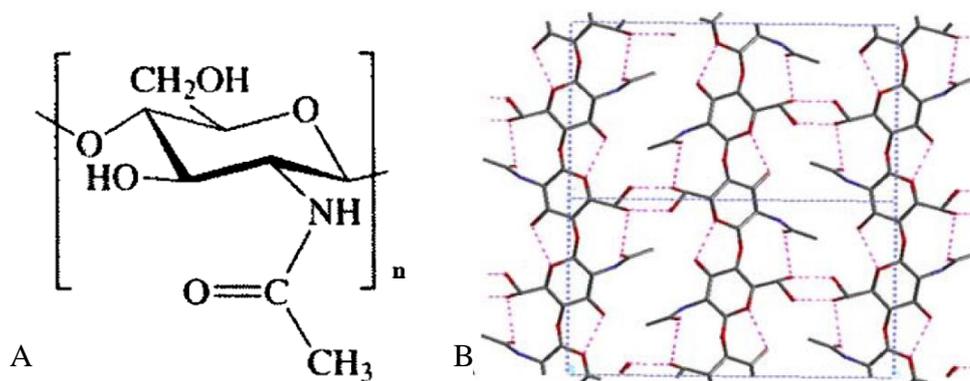
para o metabolismo de carboidratos (HENRISSAT, 1991). Estas duas famílias contêm endo e exo quitinases. Endoquitinases clivam aleatoriamente na cadeia de quitina gerando polímeros ou oligômeros de NacGlc, como a quitotetraose, quitotriose e a diacetilquitobiose. Enquanto as exoquitinases clivam a partir da extremidade redutora ou não redutor da cadeia de quitina liberando monômeros de NacGlc. (DAHIYA et al., 2006; SUZUKI et al., 1999).

A quitina (Figura 2) é um biopolímero insolúvel, linear e não ramificado de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose; GlcNAc), com os resíduos de GlcNAc unidos por ligações *O*-glicosídicas  $\beta$ -(1,4) [nomenclatura IUPAC: (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucano], principal componente estrutural da parede celular dos fungos e exoesqueleto dos artrópodes. É considerado um dos polímeros naturais mais importantes no mundo (RINAUDO et al., 2006).

Com base em similaridade de seqüências as quitinases podem ser classificadas em 6 classes (KESARI et al., 2015). Como mencionado anteriormente, as mesmas são agrupadas em duas grandes famílias: GH 18 (classes III e V, contêm *TIM barrel domain*) e GH19 (I, II, IV e VI). Segundo Kesari e colaboradoras (2015) as classes pertencentes a GH18 possuem baixa similaridade de seqüência com as agrupadas em GH19. GH18 é amplamente distribuída entre os seres vivos, já GH19 parece ocorrer principalmente em plantas e algumas bactérias (OHNUMA et al., 2011).

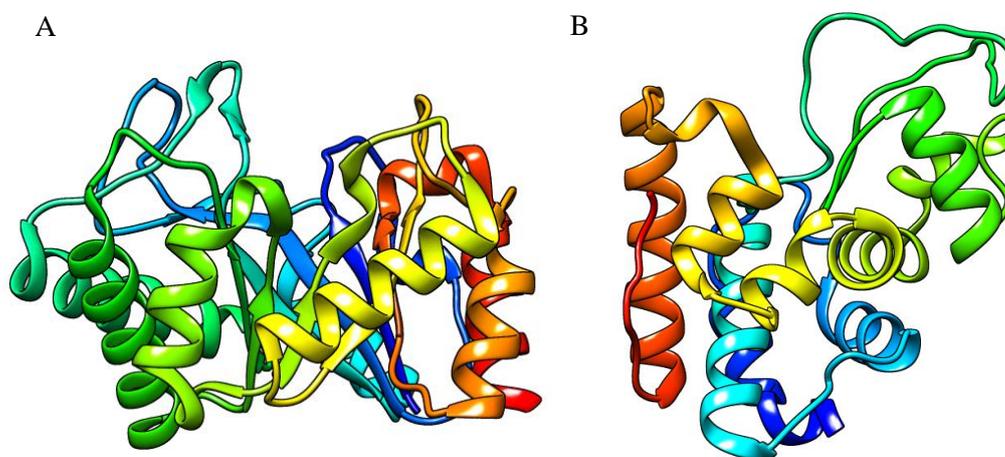
É provável que as quitinases das famílias GH18 e GH19 tenham evoluído de ancestrais diferentes, pois além de não compartilharem similaridade em suas seqüências de aminoácidos, possuem estruturas tridimensionais e mecanismos enzimáticos completamente diferentes. Assim, os domínios catalíticos de quitinases da família GH18 (Figura 3A) possuem uma estrutura tridimensional caracterizada por um barril ( $\beta/\alpha$ ), ou barril TIM (triose fosfato isomerase) (BANNER et al., 1975), enquanto que aqueles de quitinases da família GH19 (Figura 3B) têm um elevado conteúdo de  $\alpha$ -hélices devido à presença de resíduos não polares na região do núcleo e uma estrutura semelhante aquelas encontradas em quitosanases e lisozimas (CHUANG et al., 2008).

Figura 2. Estrutura química de quitina.



(A) Estrutura em cadeia monomero de quitina:  $\beta$ -(1-4)-N-acetil-D-glicosamina. (B) Organização espacial do polimero de quitina. Fonte: Rinaudo (2006).

Figura 3: Estrutura tridimensional de quitinasas GH18 e GH19 de plantas definidas por cristalografia disponíveis no Protein Data Bank (PDB).



(A) quitinase GH18 de *Crocus vernuse* cadeia A (PDB: 3SIM), (B) quitinase GH19 IV de *Norway spruce* (PDB: 3HBD). Fonte: Protein Data Bank.

## **CAPÍTULO I**

### **ANÁLISE *IN SILICO* DE PROTEÍNAS LIGANTES À QUITINA PRESENTES NOS TRANSCRIPTOMA DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE CCP76**

## 2. ANÁLISE *IN SILICO* DE PROTEÍNAS LIGANTES À QUITINA PRESENTES NOS TRANSCRIPTOMA DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE CCP76

### 2.1 Transcriptoma

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos (mRNAs, RNAs não codificados e micro RNAs) em um tecido, e sua quantificação é específica para um estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica (WANG et al., 2009). O processo de evolução das plantas envolve alterações celulares, moleculares, fisiológicas e bioquímicas para se adaptar e sobreviver a condições adversas, como estresse biótico causado por patógenos. As respostas moleculares nos perfis das plantas a nível transcricional têm demonstrado serem cruciais para o estabelecimento de um conjunto de mecanismos de defesa contra patógenos invasores (FU et al., 2012).

Para estudar o transcriptoma de um organismo o método que tem sido utilizado atualmente é a nova geração de sequenciamento de DNA, denominada RNA-seq. O mRNA é utilizado para a síntese de cDNA, que é então sequenciado em equipamento de altíssima produtividade. A principal vantagem de RNA-seq é a capacidade de sequenciar uma grande proporção de transcritos presentes em uma amostra, incluindo os de baixa expressão. Outra vantagem é a de não necessitar de conhecimento prévio da sequência, como no caso de microarranjo onde se utiliza sequências conhecidas para mensurar a expressão gênica. Entretanto, o genoma de referência é de extrema importância para estudos de transcriptoma porque permite que seja feita a identificação dos genes que estão sendo expressos em uma dada condição (CHEN et al., 2007).

A análise de transcriptoma permite detectar quais tipos de transcritos estão sendo expressos, incluindo RNA mensageiro (mRNA), variantes alternativas (derivado do processo de *splicing* alternativo), RNA não codificador e pequenos RNAs (WANG; et al., 2009).

Alves Filho (2013) utilizou a abordagem *De novo* para a montagem do primeiro esboço do transcriptoma de sementes de cajueiro (*A. occidentale* L.), utilizando dados sequenciados pela plataforma *Illumina*, que é descrita na literatura como eficiente para a verificação da expressão de genes, metilação do DNA, re-sequenciamento, bem como

para o sequenciamento de transcriptoma *De novo* (PARCHMAN et al., 2010; WANG et al., 2010).

Sequenciamento do transcriptoma usando tecnologias Next Generation Sequencing - NGS permite rápida e barata descoberta SNP dentro dos genes e evita regiões altamente repetitivas do genoma (MOROZOVA et al., 2008)

## 2.2 SNP-Single Nucleotide Polymorphism

As variações alélicas dentro de um genoma de uma mesma espécie podem ser classificados em três grandes grupos que incluem diferenças no número de repetições em série num local específico (microsatélites, ou simples repetição de sequência - SSRS ) (WEBER et al. 1987), inserções/deleções segmentares (*indels*) (OPHIR et al. 1997), e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (WANG et al., 1998).

*Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) são marcadores do tipo Polimorfismo de Única Base que se baseiam em alterações mais elementares da molécula de DNA, isto é, mutações em apenas uma das bases nitrogenadas da cadeia (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). As mutações mais recorrentes são as do tipo transição, quando há troca de purina por outra purina (A - G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C - T), e transversões, quando há a troca de uma purina por pirimidina e vice-versa (A/C, A/T, G/C, G/T) (BROOKES, 1999).

Assim, na prática, SNPs são marcadores bi-alélicos, podendo ocorrer tri-alélicos em uma proporção menor, de forma que o conteúdo informativo em um único SNP é limitado, em comparação com os marcadores microsatélites (SSR) que são polialélicos (GRIFFIN; SMITH, 2000; GUPTA et al., 2001; ORAGUZIE et al., 2007).

Em primeiro lugar descobriu no genoma humano, os SNPs provou ser universal, bem como as formas mais abundantes de variação genética entre indivíduos da mesma espécie (GHOSH et al., 2002). Os SNPs ocorrem tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras dos genomas. Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido na sequência proteica, são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína (GUIMARÃES; COSTA, 2002).

## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1 Objetivo Geral**

Identificar e descrever sequências de proteínas ligantes à quitina e identificar SNPS no transcriptoma de *A. occidentale* var. *nanum* CCP76

### **2.2.2 Objetivos Específicos**

- Realizar uma nova montagem do transcriptoma usado por Garcia Filho (2013)
- Identificar proteínas ligantes à quitina no transcriptoma de castanha de caju;;
- Descrever sequências de proteínas ligantes à quitina no transcriptoma de castanha de caju;
- Realizar análise de polimorfismo de única base nos genes identificados

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODO

### 2.3.1. Obtenção das sequências do transcriptoma do cajueiro

As sequências do transcriptoma do cajueiro foram previamente obtidas de trabalhos realizados por Alves-Filho (2013). Amostras de sementes De anão-precoce CCP 76 foram coletadas em Itapipoca-CE. O RNA das sementes (ALVES-FILHO, 2013) foi extraído a partir das amostras congeladas em nitrogênio líquido, no Núcleo de Biotecnologia de Sobral e encaminhadas para sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia Animal - Esalq-USP utilizando a plataforma *Illumina HiSeq2000*. O sequenciamento das bibliotecas de cDNA foi do tipo *paired-end* e produziu *reads* de 50 pb.

### 2.3.2 Montagem do transcriptoma

Os dados foram processados em um computador HP proliant com 8 núcleos de processamento e 16,7 Gb de memória RAM. Inicialmente as bibliotecas de *reads* brutos (arquivos em formato *fastq*) foram avaliadas pelo programa *FastQC* a fim de determinar a qualidade do sequenciamento. Os *reads* que apresentaram baixa qualidade foram, então, trimados (removidos) utilizando a ferramenta *FastX Toolkit*. A montagem *De novo* foi realizada através do programa *Velvet* seguido por *Oases*. Os parâmetros utilizados foram: k-mer 31, valor de cobertura de 30, corte de cobertura de 30 e tamanho mínimo do transcrito (arquivo de saída do *Oases*) de 300.

### 2.3.3 Identificação *in silico* de quitinases e triagem das sequências com CDS completo.

A identificação dos genes que codificam enzimas quitinases do cajueiro foi feita pelo algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (Com o programa *BLASTx*) utilizando as sequências do transcriptoma de sementes dos cajueiros anão-precoce CCP76 contra os bancos de dados do *Swiss-ProteTrEMBL*. Os parâmetros foram ajustados para conter apenas sequências com o *E-value* inferior ou igual a  $1 \times 10^{-5}$ .

As sequências dos bancos de dados foram obtidas pelo servidor *UniProt* e filtradas por pesquisa booleana para exibir apenas sequências de quitinases. Posteriormente foi feita uma busca por genes com a região CDS completa, através de BLAST manual, alinhando os *contigs* do cajueiro contra os genes depositados no *Genbank* do NCBI. Os genes de quitinases que apresentaram maior percentual de identidade com os genes depositados no banco de dados, que possuíam CDS completo, foram selecionados e tiveram suas sequências traduzidas, nos 6 *frames* de leitura, utilizando a ferramenta *translate tool* do *ExpASy* (<http://web.expasy.org/translate/>), e as sequências traduzidas foram novamente alinhadas, por alinhamento global, utilizando o software online *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), a fim de determinar seu grau de similaridade e verificar se alinhavam completamente.

### 2.3.4 Análise de SNPs

Os contigs de CCP76 e Cajueiro comum foram alinhados no software do MUMmer usando a ferramenta Nucmer. O arquivo de saída foi filtrado e utilizado a ferramenta “*show-SNPs*” para obter as alterações nucleotídicas. A partir do resultado obtido, uma triagem foi feita pelas sequências encontradas anteriormente da qual somente uma apresentou SNP entre os genótipos. Em seguida, foi feito um alinhamento global utilizando o Clustalw2 com as sequências de nucleotídeos e aminoácidos a fim de ver a posição da substituição. Também foi feita uma modelagem por homologia utilizando o SWISS-MODEL para analisar possíveis modificações na estrutura protéica.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 2. 4.1 Montagem do transcriptoma utilizando o Velvet e Oases

Os parâmetros utilizados para montagem para as bibliotecas de cajueiro anão CCP 76 foi de 31 para o valor de k-mer, a cobertura esperada (Exp\_cov) foi 30 e o valor de corte de cobertura (Cov\_cutoff) foi de 2.

Para a montagem do cajueiro anão CCP 76, foi utilizado um total de 42.786.272 reads e a montagem revelaram a presença de 2.243 contigs sendo que o maior deles possui 5.382 nucleotídeos de tamanho. O valor de N50 é 460 com a montagem feita utilizando 17,205 % dos reads. O programa Oases utilizou os dados processados pelo Velvet adicionando como parâmetro o menor transcrito possuindo 100 pb resultando em 68.811 transcritos (Tabela 2).

O resultado da montagem do *Velvet* foi otimizada após a utilização do programa *Oases*, o qual reduziu o número de *contigs*. O programa *Oases* foi desenvolvido especificamente para a montagem de transcriptomas *De novo* usando *reads* curtos e leva em consideração a montagem feita pelo *Velvet*. Garg e colaboradores (2011) sugerem que a montagem no *Velvet* seguido pelo *Oases* produz os melhores *contigs*/transcritos.

Ashrafi e colaboradores (2012) obtiveram 68.737 *contigs* na montagem *De novo* do transcriptoma de pimentão (*Capsicum annuum*), utilizando o programa *Velvet* com valor de k-mer de 31. No presente estudo, foram obtidos 68.811 *contigs* no cajueiro, utilizando parâmetros de montagem semelhantes aos utilizados por Ashrafi e colaboradores.

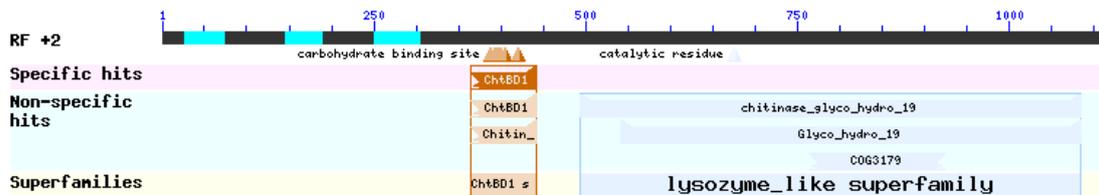
**Tabela 2** – Estatísticas de montagem do transcriptoma de cajueiro CCP 76 usando o programa Velvet/Oases.

<b>Dados de Montagem - CCP76</b>	
Tamanho do k-mer	31
Cobertura esperada	30
Corte de cobertura	2
Tamanho mínimo de contig	300
Nº de reads	42.786.272
Nº de nós	8.568



regiões conservadas. A primeira de um sítio de ligação a carboidrato de resíduos 386—388 (AGT), 392—400 (TACGGTTAT), 404—406 (GGC), 419—421 (TAT) e a segunda região com resíduos catalíticos 674—676 (GAA).

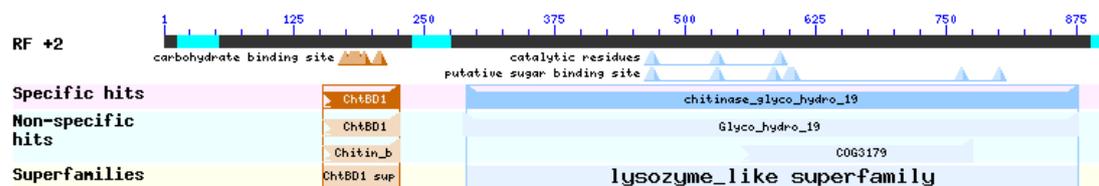
Figura 5: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como endoquitinase PR4-like de *Cicer arietinum* (XP\_012570981.1).



Fonte: NCBI

Também foi identificado um *contig* (Figura 6) com 1071 bases e 88% de similaridade com uma quitinase de *Mangifera indica* (ACD69683.1). Apresentando regiões conservadas que o caracteriza como pertencente à superfamília lisozima-like e da família quitinase GH 19 indo do resíduo 290—877. Ainda apresenta outras três regiões conservadas. A primeira de um sítio de ligação a carboidrato nos resíduos 173—175 (AGT), 179—187 (TTTGGTTAC), 191—193 (GGC), 206—208 (TAC); a segunda região com resíduos catalíticos no resíduos 467—469 (GAA), 530—532 (AAC), 590—592 (ACC) e um possível sítio de ligação a açúcar de resíduos 467—469 (GAA), 530 532 (AAC), 594—596 (CAG), 599—604 (TACAAC), 564—566 (AAT), 800—802 (AAG).

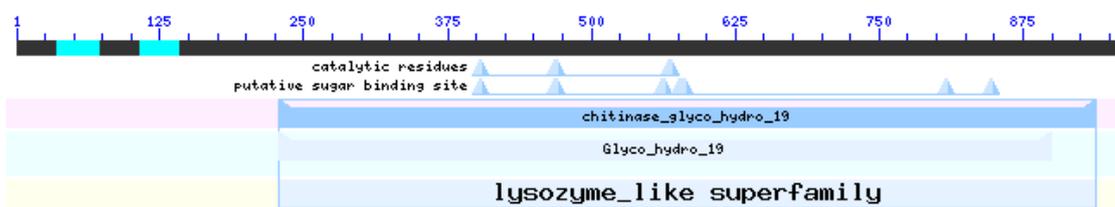
Figura 6: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como quitinase de *Mangifera indica* (ACD69683.1).



Fonte: NCBI

O terceiro identificado com 1157 bases, esse *contig* (Figura 7) obteve 84% de similaridade com uma quitinase-like de *Citrus sinensis* (XP\_006488866.1). Apresentando regiões conservadas que o caracteriza como pertencente à superfamília lisozima-like e da família quitinase GH19 indo do resíduo 228—938. Ainda apresenta outras duas regiões conservadas. A primeira de um possível sitio de ligação a açúcar nos resíduos 402—404 (AAA), 468—470 (GAA), 561—563 (CCT), 576—581 (TACAAC), 807—809 (TAT), 846—848 (TCC); e a segunda região com resíduos catalíticos no resíduos 402—404 (AAA), 468—470 (GAA), 567—569 (TAC).

Figura 7: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como uma quitinase-like de *Citrus sinensis* (XP\_006488866.1).



Fonte: NCBI

Um *contig* (Figura 8), com 433 bases, obteve 78% de similaridade com uma quitinase de *Euonymus europaeus* (AAP35272.1). Apresentando regiões conservadas que o caracteriza como pertencente à superfamília lisozima-like e da família quitinase GH19. Ainda apresenta outra região conservada com resíduos catalíticos na posição 104—106 (GAA), 170—172 (GAA), 551—553 (TCT).

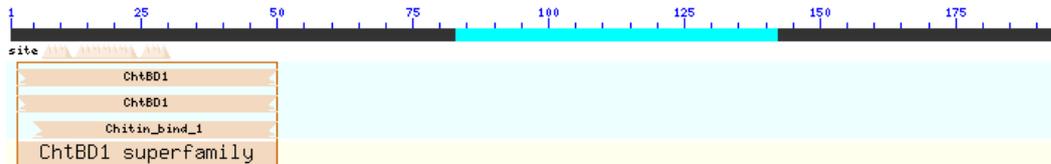
Figura 8: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como quitinase de *Euonymus europaeus* (AAP35272.1).



Fonte: NCBI

Com 210 bases, um quinto *contig* (Figura 9) obteve 73% de similaridade com uma endoquitinase PR4-like de *Vitis vinifera* (XP\_010650683.1). Apresentando regiões conservadas com um sítio de ligação a carboidrato nos resíduos 8—11 (GCCA), 14—23 (ATAGCCAAAT), 26—29 (ACTG).

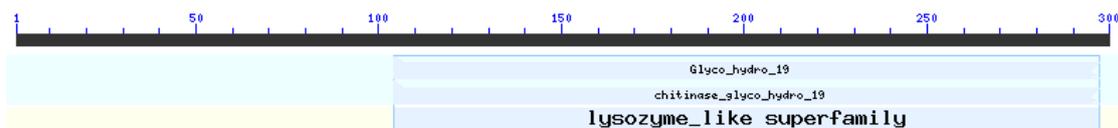
Figura 9: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como endoquitinase PR4-like de *Vitis vinifera* (XP\_010650683.1).



Fonte:NCBI

Também foi identificado um *contig* (Figura 10) com 297 bases que obteve 77% de similaridade com uma endoquitinase de *Aegilops tauschii* (EMT27212.1). Apresentando regiões conservadas do resíduo 104 ao 297 que o caracteriza como pertencente à superfamília lisozima-like e da família quitinase GH19.

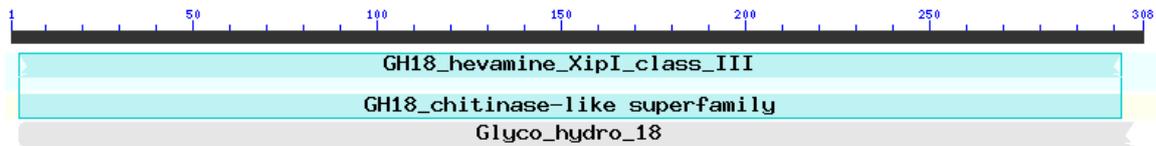
Figura 10: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como endoquitinase *Aegilops tauschii* (EMT27212.1).



Fonte: NCBI

Com 306 bases, outro *contig* (Figura 11) obteve 83% de similaridade com uma quitinase de *Hevea brasiliensis* (CAA09110.1). Apresentando regiões conservadas que o caracteriza como pertencente à superfamília lisozima-like e da família quitinase GH18.

Figura 11: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como quitinase *Hevea brasiliensis* (CAA09110.1).



Fonte: NCBI

Com 522 bases, esse *contig* (Figura 12) obteve 66% de similaridade com uma endoquitinase PR4 de *Vitis vinifera* (XP\_002274537.1). Apresentando regiões conservadas nos resíduos 56 ao 476 que o caracteriza como pertencente à superfamília lisozima-like e da família quitinase GH19. Ainda apresenta outra região conservada com resíduos catalíticos na posição 231—233 (GAA).

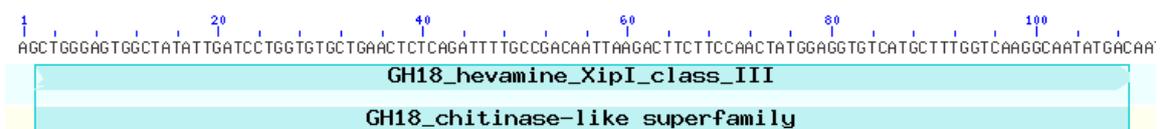
Figura 12: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como endoquitinase PR4 de *Vitis vinifera* (XP\_002274537.1).



Fonte: NCBI

Com 115 bases, esse *contig* (Figura 13) obteve 76% de similaridade com uma quitinase de *Vitis vinifera* (ABD64687.1). Apresentando regiões conservadas nos resíduos 2 ao 109 que o caracteriza como pertencente à superfamília lisozima-like e da família quitinase GH18.

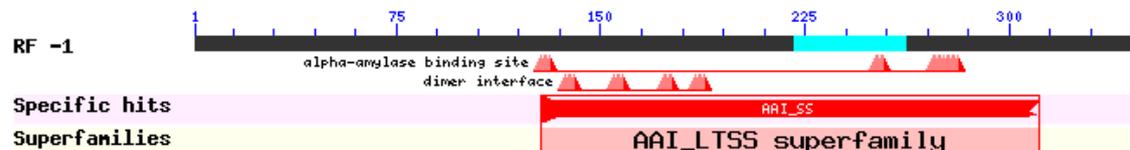
Figura 13: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como quitinase de *Vitis vinifera* (ABD64687.1).



Fonte: NCBI

Também foi identificada uma sequência que obteve similaridade com albumina vegetal. O *contig* identificado (Figura 14) com de 490 bases, obteve 100% de similaridade com uma sequência de uma albumina 2S de *Anacardium occidentale* (AAL91665.1). Este apresenta regiões conservadas que o caracteriza como pertencente à subfamília de inibidores de alfa-amilase (AAIs) e proteínas de armazenamento de sementes (SS) indo do resíduo 128--311. Ainda apresenta outras duas regiões conservadas. A primeira de um possível sítio de ligação alfa-amilase que estão nos resíduos de número 128—131(AAAC), 251—254 (CTCT), 272—281 (CCTTCTGTCT) e a segunda região de interface de dímeros de 128—131 (AAAC), 251—254 (CTCT), 272—281 (CCTTCTGTCT), 137—140 (GCCC), 155—158 (ACTG), 163—166 (TTCA), 185—188 (TTCA)

Figura14: Representação dos domínios conservados no *contig* identificado como albumina 2S de *Anacardium occidentale* (AAL91665.1).



Fonte: NCBI

A subfamília AAI\_SS é composta por proteínas que são simultaneamente inibidoras da alfa-amilase (AAI) tem função de armazenamento em sementes (SS). São encontradas principalmente nas sementes de plantas superiores. AAI desempenham um papel importante nas defesas naturais das plantas contra insetos e organismos patogênicos tais como fungos, bactérias e vírus. AAI impedem a digestão de amido e proteínas de plantas por inibição alfa-amilases e proteases digestivas. Também estão incluídos nesta subfamília são proteínas SS tais como albumina 2S, gama-gliadina, napina, e prolaminas. Estas proteínas aais e SS são também conhecidos alergénios em humanos. (STROBL et al., 1998; KUMARI; HOORN, 2011)

Tabela 3: Proteínas ligantes à quitina identificadas manualmente pelo Blastx no transcriptoma de semente de Cajueiro anão-precoce CCP76.

Nº de acesso	Proteína	Organismo	Tamanho	Similaridade	Família	Sítio	Locus	F L
XP_002515664.1	Quitinase	<i>Ricinus communis</i>	1457	86%	GH19	Açúcar, catalítico	410	-2
XP_012570981.1	Endoquitinase PR4-like	<i>Cicer arietinum</i>	1325	57%	GH19	Carboidrato, catalítico	1421	+2
ACD69683.1	Quitinase	<i>Mangifera indica</i>	1071	88%	GH19	Açúcar, catalítico, carboidrato	4849	+2
XP_006488866.1	Quitinase-like	<i>Citrus sinensis</i>	1157	84%	GH19	Açúcar, catalítico	5472	+3
AAP35272.1	Quitinase	<i>Euonymus europaeus</i>	433	78%	GH19	Catalítico	8370	+2
XP_010650683.1	Endoquitinase PR4-like	<i>Vitis vinifera</i>	210	73%	ChtB	Carboidrato	8715	-3
EMT27212.1	Endoquitinase	<i>Aegilops tauschii</i>	297	77%	GH19		11904	-2
CAA09110.1	Quitinase	<i>Hevea brasiliensis</i>	306	83%	GH18		17280	+3
XP_002274537.1	Endoquitinase PR4	<i>Vitis vinifera</i>	522	66%	GH19		17811	+3
ABD64687.1	Quitinase	<i>Vitis vinifera</i>	115	76%	GH18		56367	+2
AAL91665.1	Albumina 2S	<i>Anacardium occidentale</i>	490	100%	AAI_SS	Ligação alfa-amilase		-1

Fonte: NCBI

### 2.4.3 Identificação de SNP nos *contigs* identificados

Na busca por SNPs nos *contigs* identificados como quitinases foi observado a presença de uma alteração nucleotídica em apenas um dos genes identificados. Essa mutação foi observada no primeiro *contig* de cajueiro anão-precoce CCP76 (Figura 4) de 1457 bases e 86% de similaridade com uma sequência de uma possível quitinase de *Ricinus communis* quando comparado com o mesmo gene de cajueiro gigante. Na posição 1113 do *contig* de CCP76 há uma citosina, enquanto no *contig* correspondente de cajueiro comum há uma adenina na posição 1032 (Figura 15) em uma região codificante. Há uma predominância de SNPs em regiões codificantes, o que é observado no trabalho de Külheim et al, (2009). Segundo Gonzales – Martinez e colaboradores (2006), SNPs localizados em regiões codificantes têm grande importância por ser mais provável que estas variações nucleotídicas tenham algum tipo de significado funcional, em nível fenotípico, nos organismos.

Figura 15: Alinhamento de nucleotídeos realizado pelo programa Clustal versão 2.0.10, comparando Cajueiro anão-precoce e gigante na procura de SNPs.

```

CCP76          AGAACCCACGGCATGAGCCACTGGCGAGTTTCGCTTCGAAAAACAAATTCTCAAACCTGAT 1140
Gigante        AGAACCCACGGCATGAGCCACTGGCGAGTTTAGCTTCGAAAAACAAATTCTCAAACCTGAT 1059
*****

CCP76          ACGTCTGAAAAATATCCGAAATCGTCTCATTACAGCAGTACTTTGACCACGTGGCACACT 1200
Gigante        ACGTCTGAAAAATATCCGAAATCGTCTCATTACAGCAGTACTTTGACCACGTGGCACACT 1119
*****

```

A região destacada em vermelho mostra a localização dos SNP. Fonte: autor.

Essa alternância de nucleotídeo caracteriza uma transversão, quando a substituição do nucleotídeo é de uma purina para uma pirimidina nesse caso. A mutação observada nesse estudo não ocorre com maior frequência, as substituições por transição tem com maior ocorrência no genoma de diversos organismos (LEWIN, 2008). Embora as variações de transição ocorram numa frequência mais alta que as transversões em genomas eucariotos, possivelmente como resultado de mecanismos moleculares pelos quais são geradas, existem evidências que isso não é universal (KELLER et al., 2007). Em trabalhos realizados com cafeeiros, foram encontrados 80% de mutações causadas

por transversões e 20% decorrentes de transições (ZARATE et al., 2010), o que embasa ocorrência de uma transversão nesses *contigs*.

Essa mutação ocasionou uma mudança no códon codificante que resultou em uma alteração no aminoácido codificado de uma arginina (R), carregado positivamente, no CCP76 para uma leucina (L), apolar, no cajueiro gigante na posição 75 da proteína (Figura 16). Esse é um caso de mutação não sinônima, isto é, a mudança no códon gerou alteração do aminoácido. Essa alternância não ocorreu em uma estrutura funcional (Figura 17), dessa forma, presume-se que sua função não foi afetada.

Figura 16: Alinhamento de aminoácidos realizado pelo programa Clustal versão 2.0.10, comparando Cajueiro anão-precoce e gigante na procura de SNPs.

```

CCP76      MRGILVTLMAFLALLSLLTLGVNGDLSEKTVVKIVKGKKVCTRGWECATWSKYCCNETIS 60
Gigante    MRGILVTLMAFLALLSLLTLGVNGDLSEKTVVKIVKGKKVCTRGWECATWSKYCCNETIS 60
*****

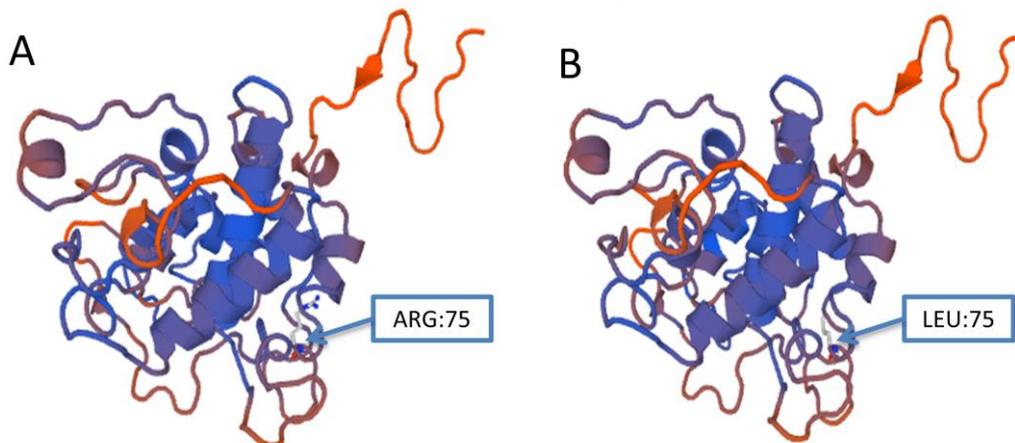
CCP76      DIFQTYQFENLFSRRNSPVAHAVGFWDYQSLITASTTFQPLGFGTTGGKLMQKELAAFL 120
Gigante    DIFQTYQFENLFSKLNNSPVAHAVGFWDYQSLITASTTFQPLGFGTTGGKLMQKELAAFL 120
*****

CCP76      AHVGSQTSCGYGVATGGPLAWGLCYNREMSPSQSYCDESYKFTYPCSPGAEYYGRGAIPI 180
Gigante    AHVGSQTSCGYGVATGGPLAWGLCYNREMSPSQSYCDESYKFTYPCSPGAEYYGRGAIPI 180
*****

```

A região destacada em vermelho mostra a localização dos SNP. Fonte:autor

Figura 17 – Estrutura Tridimensional das sequências de quitinases GH19 de cajueiros anão-precoce CCP76 e Gigante mostrando posição da substituição do resíduo de aminoácido.



(A) quitinase GH19 de CCP76 ,(B) quitinase GH19 Cajueiro Gigante. Fonte:Protein Data Bank.

## 2.5 CONCLUSÃO

Foram detectados 10 contigs com sequências semelhantes à quitinases de diversos organismos. Ainda foram identificados domínios conservados de sítios catalíticos e de ligação a carboidratos e açúcares. No *contig* identificado como quitinase de *Ricinus communis* observou-se a presença de um SNP havendo uma substituição de nucleotídeo do tipo transversão no qual resultou em uma mutação não sinônima. Foi identificado um contig com 100% de similaridade com uma albumina 2S de *Anacardium occidentale* apresentando regiões conservadas que o caracteriza pertencente à subfamília AAI\_SS e domínios conservados de sítio de ligação alfa-amilase e região de interface de dímeros.

## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO DE PROTEINAS DE CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale* var. *nanum*) LIGANTES Á QUITINA E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO INIBITÓRIO NO CRESCIMENTO MICROBIANO**

### 3 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale* var. *nanum*) LIGANTES Á QUITINA E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO INIBITÓRIO NO CRESCIMENTO MICROBIANO

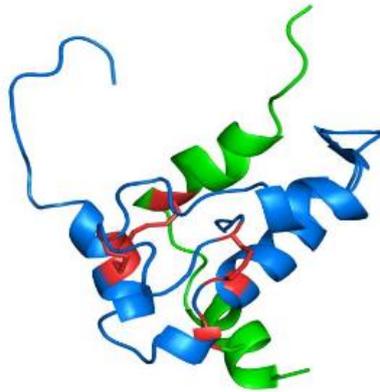
#### 3.1 Albumina 2S

A primeira albumina 2S foi isolada a partir de soja corresponde a uma cadeia polipeptídica rica em ácido aspártico com massa molecular aparente 4.4 kDa (ODANI, KOIDE; ONO, 1987). As albuminas 2S podem ser consideradas um dos maiores grupos de proteínas presentes nos tecido de reserva da semente, juntamente com as globulinas (BERROCAL-LOBO et al., 2002). São proteínas solúveis em água, amplamente distribuídas por sementes de dicotiledôneas e monocotiledôneas, são ricas em cisteína, arginina, glutamina e asparagina (MONSALVE et al., 2007). Seu nome é devido ao coeficiente de sedimentação próximo a 2S (DA SILVA et al., 1996), e está foi relatada em sementes de importância comercial, como a soja (LIN et al., 2006) e amendoim (LEHMANN et al., 2006).

Estas proteínas podem ser classificadas de acordo com a distribuição conservada das cisteínas ao longo da cadeia polipeptídica (KREIS et al., 1985) como pertencentes à superfamília das prolaminas, que incluem também inibidores de tripsina e  $\alpha$ -amilase do tipo cereal, puroindolinas e proteínas de transferências de lipídeos não específicos. Elas são produzidas no retículo endoplasmático rugoso e depositadas em vacúolos específicos, onde atuam principalmente como reserva proteica para o desenvolvimento do embrião até a formação da radícula (LEE et al., 2003). Contudo, estudos comprovam que as albuminas 2S também estão associadas á processos regulatórios durante o desenvolvimento do embrião, por apresentarem atividade antimitótica (GALVEZ; DE LUMEN, 1999)

As albuminas 2S podem ser compostas por duas cadeias polipeptídicas unidas por duas pontes dissulfeto, sendo que a cadeia curta apresenta aproximadamente 3 a 5kDa e a cadeia longa apresenta aproximadamente 8 a 10 kDa (Figura 1), sendo ambas codificadas por um mesmo gene (KOPPELMAN et al., 2004).

Figura18 - Estrutura tridimensional obtida por RMN de albumina 2S isolada de *Brassica napus* (PDB 1PNB).



A estrutura em verde indica a cadeia curta - com duas  $\alpha$  - hélices, enquanto a estrutura em azul indica a cadeia longa, com três  $\alpha$ -hélices. As ligações em vermelho indicam as pontes dissulfeto.

Fonte: Protein Data Bank - PDB

Além da 2S apresentar atividade contra tripsina, como já citado anteriormente muito destas proteínas apresentam potencial biotecnológico, podendo atuar como agentes emulsificantes (BURNETT et al., 2002) , fungicidas (RIBEIRO, 2010), bactericidas (NETO, 2009), Ribonuclease RNase (FANG; WONG; LIN; NG, 2010) atividade alergênica em humanos (NASCIMENTO et al., 2011).

As albuminas 2S podem estar associadas também à reações alérgicas. Embora o mecanismo ligado ao potencial alergênico das albuminas, estudo indicam que essa característica pode estar relacionado à região denominada região hiper variável, que corresponde aos aminoácidos 30 -50, sendo possível que este loop seja responsável por desencadear a produção de anticorpos do tipo IgG (Imunoglobulina do tipo G) e IgE (Imunoglobulina do tipo E), o que desencadeia a produção de histamina, causando a reação alérgica (MONSALVE et al., 2007).

## **3.2 OBJETIVOS**

### **3.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o perfil de proteínas ligante à quitina presentes em castanha de caju e o efeito inibidor microbiano de albumina 2S ligante a quitina.

### **3.2.2 Objetivos Específicos**

- Extrair proteínas das castanhas de caju;
- Fazer uma cromatografia de afinidade em matriz de quitina;
- Fazer eletroforese em gel de poliacrilamida com presença de SDS das porções retidas na matriz cromatográfica;
- Precipitar proteínas em sulfato de amônio;
- Fazer eletroforese em gel de poliacrilamida com presença de SDS das frações;
- Fazer um teste de concentração mínima inibitória contra microrganismos;
- Realizar ensaio de atividade antibiofilme.
- Quantificação da biomassa do biofilme

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.3.1 Extração de proteínas das Castanhas de CCP076

A fim de obter o melhor rendimento protéico para uma posterior análise da atividade quitinásica foram preparados nove tampões de extração com diferentes níveis de pH. Os tampões utilizados foram: tampão glicina-HCl pH2 e pH3; tampão acetato de sódio pH4 e pH5; tampão fosfato de sódio pH6 e pH7, tampão tris-HCl pH8; tampão glicina-NaOH pH9 e pH10, todos em uma concentração de 50mM.

A castanha do caju foi macerada com nitrogênio líquido. A farinha obtida, então, foi de lipídica em acetona e misturada em tampão de extração na proporção de 1:14 (M/V) e deixada sob agitação por 2 horas a 25 °C. Em seguida a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C e coletado o sobrenadante. Os extratos obtidos foram imediatamente utilizados para as análises ou armazenados a -20 °C.

#### 3.3.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas solúveis foi determinada usando a metodologia descrita por Bradford (1976). A cada 100 µL de amostra (diluída ou não) foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford, e a mistura agitada e deixada em repouso. As leituras de absorbância a 595 nm foram realizadas a seguir, em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (Thermo Fischer Scientific - Waltham, MA, USA). A concentração proteica foi estimada utilizando uma curva obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

#### 3.3.3 Atividade Quitinásica

A atividade quitinolítica foi determinada segundo o método colorimétrico descrito por Boller (1985), tendo como parâmetro a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina a partir da ação hidrolítica da proteína sobre a quitina coloidal, obtida a partir de quitosana (MOLANO et al., 1977), pela metodologia descrita por Boller (1992).

As amostras (250 µL) foram incubadas com quitina coloidal 1% (m/v) (250 µL) a 37 °C, por 1 h, com agitação constante. A reação foi interrompida por aquecimento a

100 °C, em banho-maria, por 5 min. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas (13.000 x g, 10 min, a 25 °C) e o sobrenadante (300 µL) foi transferido para novo tubo, contendo β- glucuronidase (10 µL). A mistura foi incubada a 37 °C por 1 h e a reação interrompida por aquecimento (100 °C, 5 min). Em seguida, tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2 (100 µL) e tetraborato de potássio 0,6 M (190 µL) foram adicionados à mistura, que foi novamente aquecida (100 °C, por exatos 5 min). Após resfriamento em banho de gelo, foi adicionada solução de p- dimetil amino benzaldeído [DMAB 10% (m/v) preparado em ácido acético contendo 12,5% de HCl 11,5 M] diluída 1x em ácido acético PA. A mistura foi incubada a 37 °C por 20 min e, a leitura da absorbância a 585 nm foi realizada.

Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação, foi utilizada uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de N-acetil-D-glucosamina, variando de 100 a 1.000 µM (REISSIG et al., 1955). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida por 1nmol de GlcNAc.

### **3.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (PAGE-SDS)**

A eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) foi realizada segundo protocolo de Laemmli (1970), com modificações para montagem dos géis (espessura de 2 mm) entre placas de vidro. O gel de concentração continha acrilamida 4% e SDS 1%, e foi montado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, enquanto que o gel de separação possuía acrilamida 15% e SDS 1%, montado em tampão Tris-HCl 3 M pH 8,8. As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,001%(m/v)], aquecidas a 100 °C por 7 min, resfriadas a temperatura ambiente. A corrida eletroforética foi realizada a voltagem constante de 120 V em tampão decorrida 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 com solução de Azul Brilhante de Coomassie R-250 0,2%(m/v), preparado em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v). Para detecção das bandas de proteínas, e descorados com uma solução de isopropanol 12,5% (v/v), ácido acético 10% (v/v).

### 3.3.5 Cromatografia de afinidade em matriz de quitina

A cromatografia foi realizada utilizando uma matriz de quitina bruta lavada com HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M e água. Após a montagem a coluna foi equilibrada em tampão acetato de sódio no mesmo pH de extração da amostra. Os picos retidos foram eluídos com ácido acético 0,1 M e 0,5M e logo em seguida foram dialisados contra tampão acetato de sódio 50 mM no mesmo pH do equilíbrio.

No processo cromatográfico, o fluxo de eluição foi de 1mL/min, cada alíquota com 3 mL. Todas elas foram analisadas por medida da absorbância a 280 nm (A280) em espectrofotômetro *Genesys 10UV Scanning* (Thermo Fischer Scientific - Waltham, MA, USA).

### 3.3.6 Precipitação com Sulfato de Amônio

O extrato proteico foi submetido à precipitação com sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), empregando três intervalos de saturação: 0-30% (m/m), 30-60% (m/m), 60-90% (m/m). A cada saturação com sulfato de amônio a solução foi deixada em descanso por uma noite (*overnight*), centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos e coletado o precipitado.

### 3.3.7 Ensaio de atividade antimicrobiana (CIM)

A atividade antibacteriana do extrato deverá ser verificada segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços, padronizada segundo a diretriz M07 – A 9ª edição, *Metodologia para Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012).

Para o teste com a albumina, cada poço da placa será preenchido com 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura SDB caldo estéril com exceção da primeira linha, a qual vai ser preenchida com 200  $\mu\text{L}$  da fração proteica na concentração de 1.640  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ . Serão feitas diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações proteicas. Em seguida 100  $\mu\text{L}$  de bactéria  $2 \times 10^6$   $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  serão adicionados aos poços da placa obtendo um volume final de 200  $\mu\text{L}$  com concentração bacteriana de  $1 \times 10^6$   $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os poços que contiver apenas inóculo e meio de cultura SDB caldo estéril

deverão ser utilizados como controle de crescimento da bactéria e poços que tiverem os tratamentos antimicrobianos sem a presença de inóculo serão utilizados como controle de turbidez. Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), será considerada a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano após 24 h de incubação.

### **3.3.8 Ensaio de atividade antibiofilme**

As placas de poliestireno de fundo chato serão montadas como descrito anteriormente. Entretanto, após 24 h de incubação aeróbica em estufa a 37 °C a biomassa do biofilme formado será quantificada através da coloração com Cristal Violeta (CV) como descrito a seguir.

### **3.3.9 Quantificação da biomassa**

Para a quantificação da biomassa com CV, as células planctônicas serão removidas e os poços lavados três vezes com água destilada. Após secagem da placa a temperatura ambiente, 200 µL de álcool metílico P.A. serão adicionados e deixados em contato por 15 minutos para fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 200 µL de CV 0,1% serão ainda adicionados por 10 minutos para permitir uma quantificação indireta da biomassa do biofilme através da coloração. Em seguida o CV será removido e repetir-se-á o processo de lavagem e secagem da placa onde serão adicionados 200 µL de ácido acético 33% por 10 minutos para dissolução do corante preso ao biofilme. A suspensão obtida em cada poço será transferida para uma nova placa de 96 poços e será realizada a medição da absorbância com o auxílio de um leitor de microplacas a 590 nm.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir de evidências da presença de quitinases no transcriptoma do Cajueiro anão-precoce CCP76 resolveu-se avaliar as condições nas quais as proteínas ligantes à quitina atuam. Os estudos sobre quitinases em *Anacardium occidentale* são escassos. O único trabalho envolvendo essa enzima foi publicado em 1991 por Marques e Xavier Filho. Esse trabalho avalia a atividade enzimática e inibitória do exsudato do cajueiro mostrando a presença de quitinase.

Devido a essa escassez de dados referentes à presença de quitinases e sua atividade catalítica em *Anacardium occidentale* foi iniciada uma investigação para determinar as condições ideais de funcionamento dessas proteínas nas sementes desse organismo.

#### 3.4.1 Extração de proteínas solúveis

A fim de obter o melhor rendimento proteico para uma posterior análise da atividade quitinásica foram preparados nove tampões de extração com diferentes níveis de pH. Os extratos proteicos apresentaram as seguintes concentrações: 0,38 mg/ml em tampão glicina-HCl pH2; 1,62 mg/ml em tampão glicina-HCl pH3; 1,17 mg/ml em tampão acetato de sódio pH4; 3,89 mg/ml em tampão acetato de sódio pH5; 5,79 mg/ml em tampão fosfato de sódio pH6; 12,65 mg/ml em tampão fosfato de sódio pH7; 15,24 mg/ml em tampão tris-HCl pH8; 15,17 mg/ml em tampão glicina-NaOH pH9; 16,18 mg/ml em tampão glicina-NaOH pH10 (Gráfico 1).

Silva e colaboradores (2012) observaram uma maior concentração de proteínas totais de *Eichhornia crassipes* utilizando tampões de extração com níveis de pH mais elevados corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Tonelli e colaboradores (2015) também conseguiram um maior rendimento proteico usando um tampão mais alcalino para extração proteica de sementes de *Albiziano poides*.

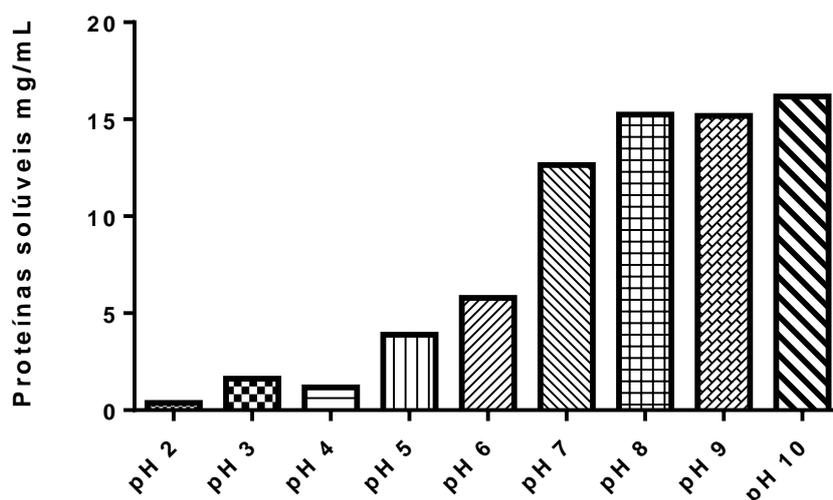
#### 3.4.2 Ensaio da atividade quitinásica

As condições para que uma quitinase seja ativa são bastante variáveis de acordo com o organismo em que atua ou é produzida de maneira heteróloga. A quitinase da classe III de *Bambusa oldhamii* tem sua atividade quitinásica estável em pH 3,0 e 4,0

(KUO et al., 2008). Já a endoquitinase de *Limonium bicolor*, produzida em *Pichia pastoris*, que tem sua atividade quitinásica mantida estável em uma faixa de pH 3,0 à pH 10,0 (LIU et al., 2010).

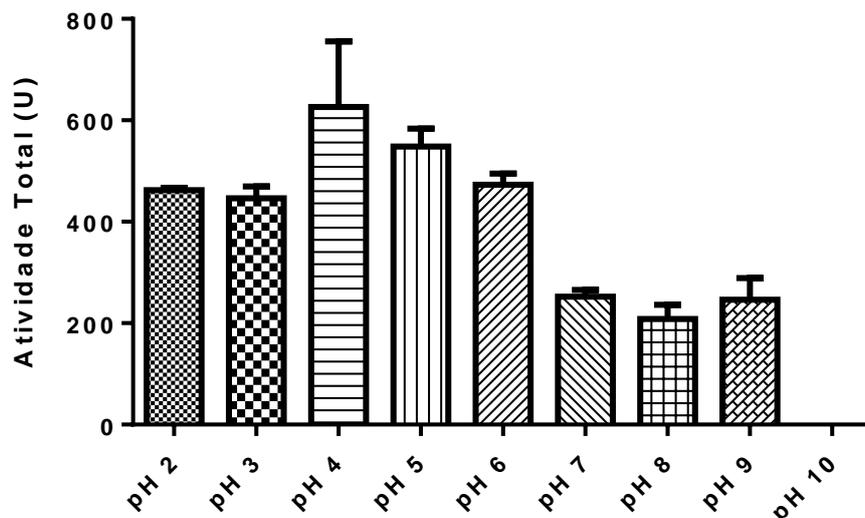
Desse modo, para chegar à condição ótima de atividade das quitinases presentes na amêndoa do caju CCP076 foi realizado um ensaio quitinolítico de todos os extratos proteicos brutos em seus respectivos valores de pH. Os extratos proteicos apresentaram as seguintes atividades totais: 580,50 U em tampão glicina-HCl pH2; 580,50 U em tampão glicina-HCl pH3; 446,55 U em tampão acetato de sódio pH4; 626,35 U em tampão acetato de sódio pH5; 548,64 U em tampão fosfato de sódio pH6; 473,09 U em tampão fosfato de sódio pH7, 252,59 U em tampão tris-HCl pH8; 208,38 U em tampão glicina-NaOH pH9; em tampão glicina-NaOH pH10 não houve atividade (Gráfico 1). Após observar os extratos com pH 4, 5 e 6 com os resultados mais promissores, na atividade quitinolítica total (Gráfico 2) e da atividade por ml obtido (Gráfico 3), as análises seguiram como descritas posteriormente. Antes de dar continuidade com a investigação, as amostras foram submetidas a uma diálise para certificar-se do pH presente na amostra, visto que foi observada uma mudança desse nos extratos proteicos (dados não mostrados).

Gráfico 1 – Concentração de proteínas solúveis em mg/ml em diferentes tampões de extração.



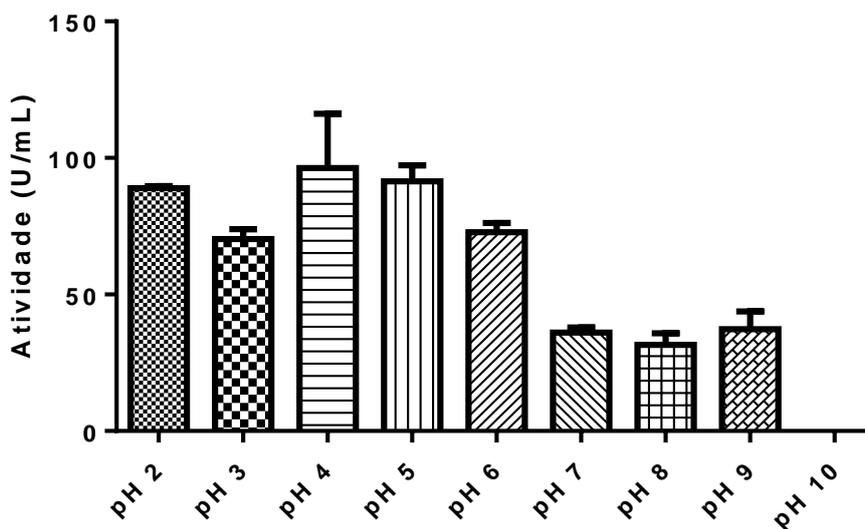
pH2 (tampão glicina-HCl), pH3 (tampão glicina-HCl), pH4 (tampão acetato de sódio), pH5 (tampão acetato de sódio), pH6 (tampão fosfato de sódio), pH7 (tampão fosfato de sódio), pH8 (tampão tris-HCl) pH9 (tampão glicina-NaOH) pH10 (tampão glicina-NaOH). Fonte: autor.

Gráfico 2– Atividade quitinásica total dos extratos proteicos em diferentes pH.



Valores de pH em que ocorreram a atividade quitinásica: pH2(tampão glicina-HCl), pH3 (tampão glicina-HCl), pH4 (tampão acetato de sódio), pH5 (tampão acetato de sódio), pH6 (tampão fosfato de sódio), pH7 (tampão fosfato de sódio), pH8 (tampão tris-HCl) pH9 (tampão glicina-NaOH) pH10 (tampão glicina-NaOH). Fonte: autor

Gráfico 3 – Atividade quitinásica em unidades em cada 1mL (U/mL) dos extratos proteicos em diferentes pH



Valores de pH dos tampões em que ocorreram a atividade quitinásica: pH2(tampão glicina-HCl), pH3 (tampão glicina-HCl), pH4 (tampão acetato de sódio), pH5 (tampão acetato de sódio), pH6 (tampão fosfato de sódio), pH7 (tampão fosfato de sódio), pH8 (tampão tris-HCl) pH9 (tampão glicina-NaOH) pH10 (tampão glicina-NaOH). Fonte: autor

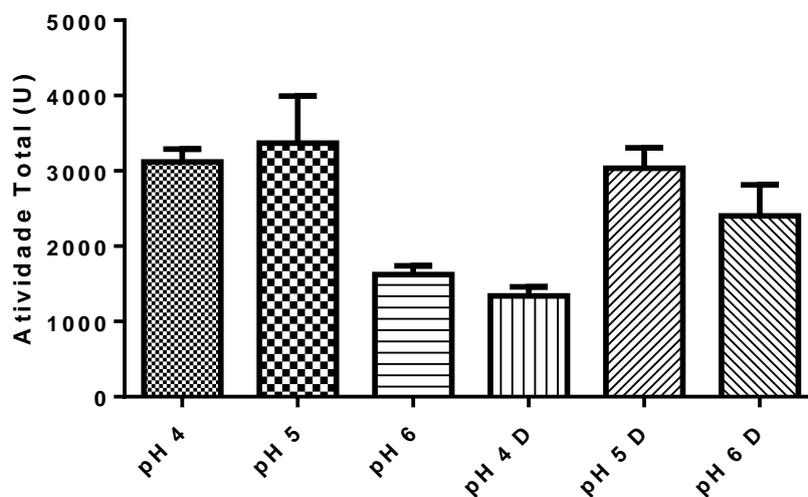
Novos ensaios quitinolíticos foram realizados com os extratos dialisados e uma alteração no padrão dos resultados foi observada (Gráfico 4). Houve uma significativa redução da atividade quitinolítica no pH 4 após a diálise –de 3117 U para 1339U - reduzindo o potencial de uso das enzimas nessa faixa de pH. O extrato no pH 5 manteve a mesma faixa de atividade de antes da diálise e no pH 6 houve um aumento da atividade enzimática indo de 1623 U para 2403 U. Quando feita uma proporção das unidades enzimáticas pelo volume do extrato (Gráfico 5), também se observou o extrato com pH 5 com a maior atividade quitinolítica. As proteínas relacionadas à patogênese, como as quitinases, apresentam propriedades físico-químicas típicas como estabilidade em pH baixo, corroborando com os resultados obtidos. Essas proteínas ainda são resistentes a ação de enzimas proteolíticas e possuem estabilidade térmica (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Quitinases extraídas de sementes de *Cucumis melo* e *Tamarindus indica* apresentaram atividade em pH 5 (WELBAUM et al., 2003; KUMAR et al.,2009). Endoquitinases de *Zea mays* e *Coix lachryma-jobi* mostram pH ótimo no mesmo valor e mesmo tampão desse estudo (ZHE-FU, 1992). Assim como, Chang e colaboradores (2014) que isolaram uma endoquitinase da família GH19 de *Glycine max* nas mesmas condições corroborando com os resultados obtidos nesse estudo. Quitinases de sementes de lentilha vermelha (*Lens culinaris*) demonstraram atividade enzimática e inibitória em pH 5 (WANG , 2007).

### **3.4.3 Cromatografia de afinidade em matriz de quitina**

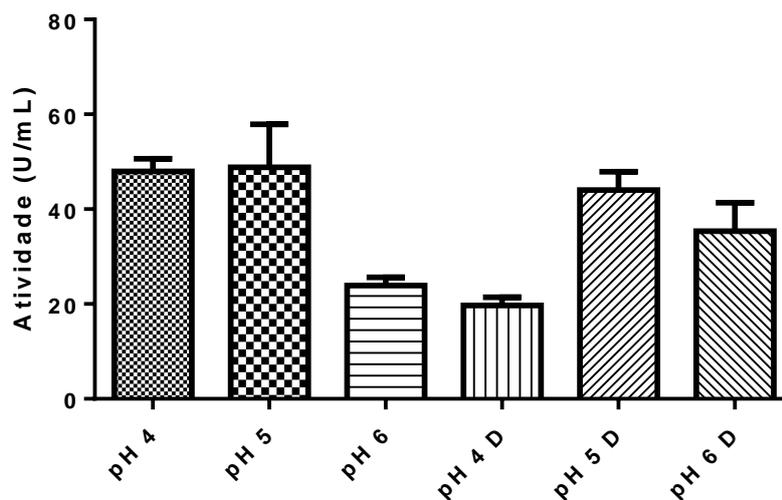
Após a eleição do pH 5 como o ideal para a atividade das quitinases presentes no proteoma da castanha, o extrato proteico sob essas condições foi submetido a uma cromatografia com matriz de quitina a fim de selecionar as proteínas com domínio de ligação à quitina das demais. A cromatografia apresentou um perfil com dois picos principais. O primeiro pico eluído com ácido acético a 0,1 M apresentou uma absorbância de 2,372 nm na fração 55, enquanto o segundo, eluído com ácido acético 0,5 M , apresentou absorbância de 218 nm na fração 85.

Gráfico 4– Atividade quitinásica total dos extratos proteicos em diferentes pH antes e depois da diálise.



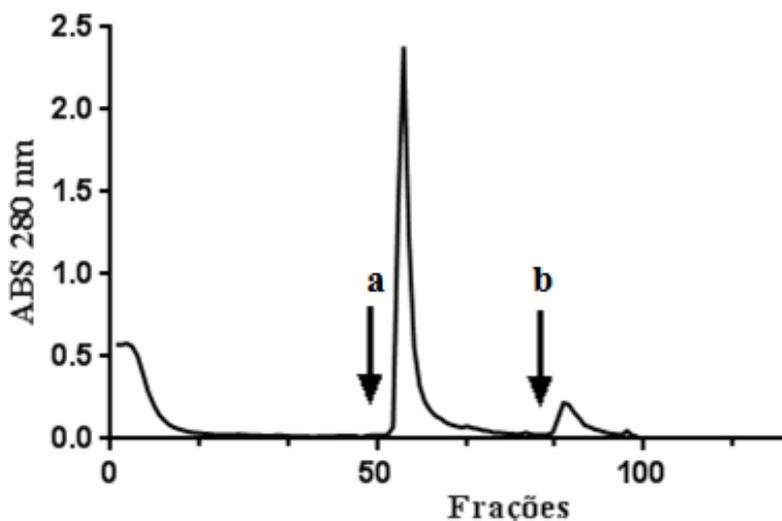
Valores de pH dos extratos proteicos em que ocorreram a atividade quitinásica: pH4:(tampão acetato de sódio), pH5 (tampão acetato de sódio), pH6 (tampão fosfato de sódio); pH4D extrato dialisado, pH5D extrato dialisado, pH6D:extrato dialisado. Fonte: autor

Gráfico 5– Atividade quitinásica em unidades em cada 1mL (U/mL) dos extratos proteicos em diferentes pH antes e depois da diálise.



Valores de pH dos extratos proteicos em que ocorreram a atividade quitinásica: pH4:(tampão acetato de sódio), pH5 (tampão acetato de sódio), pH6 (tampão fosfato de sódio); pH4D extrato dialisado, pH5D extrato dialisado, pH6D:extrato dialisado. Fonte: autor.

Gráfico 6: Cromatografia de afinidade realizada com matriz de quitina do extrato proteico em tampão acetato de sódio pH5.

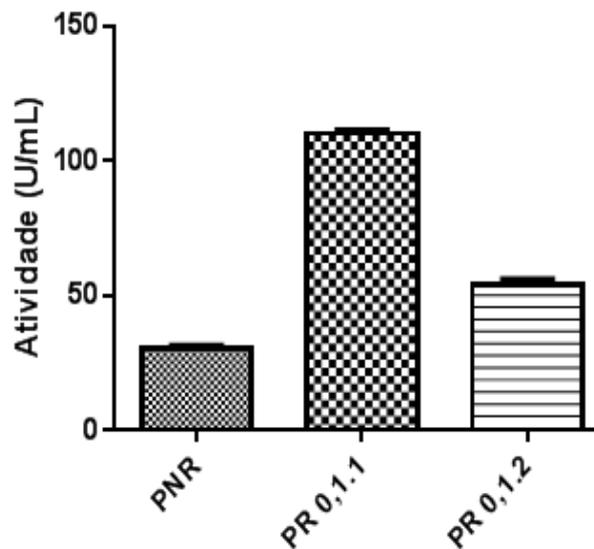


Equilíbrio: tampão acetato de sódio 50mM a pH 5; Eluição: ácido acético 0,1 M (a) e 0,5 M (b) em fluxo constante de 1 mL/min. Fonte: autor.

Esse perfil cromatográfico (Gráfico 6) evidencia a presença de dois tipos de proteínas ligantes a quitina com interações diferentes no sítio de ligação. A primeira fração proteica com uma ligação mais fraca e a segunda fração com uma interação mais forte. A fim de avaliar a atividade quitinolítica das proteínas retidas na matriz, além de sua afinidade à quitina, foi realizado um ensaio quitinásico nas frações cromatográficas. Foram submetidas à atividade o pico não retido e as frações eluídas com ácido acético 0,1M e 0,5M (Gráficos 7 e 8).

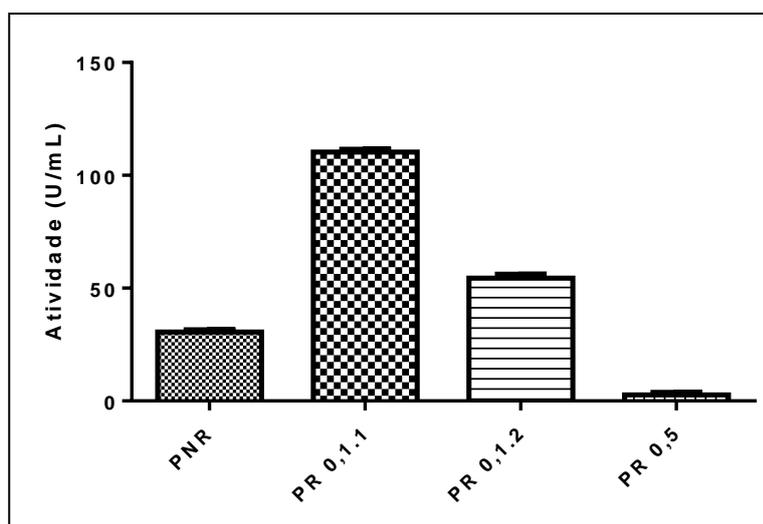
A fração não retida apresentou atividade catalítica, assim como, a primeira fração, eluída com ácido acético 0,1M, apresentou atividade quitinásica. A concentração protéica submetida à cromatografia pode ter sido superior a quantidade máxima de ligação da matriz deixando-a saturada, dessa forma, quitinases podem ter passado pela matriz sem ligar-se à quitina dando à fração não retida um perfil catalítico. A primeira fração apresentou atividade catalítica assim como afinidade ao substrato, evidenciando quitinases com dois domínios em sua estrutura. O perfil proteico da fração não retida e dos picos retidos é mostrado no SDS-PAGE (Figura 19).

Gráfico 7 - Atividade quitinásica total dos picos cromatográficos do extrato em tampão acetato de sódio pH 5,0.



PNR: Pico não retido na matriz de quitina; PR0,11: Pico retido na matriz de quitina e eluído com ácido acético 0,1M ; PR0,5: Pico retido na matriz de quitina e eluído com ácido acético 0,5M. Fonte: autor

Gráfico 8 - Atividade quitinásica (U/mL) dos picos cromatográficos do extrato em tampão acetato de sódio pH 5,0.

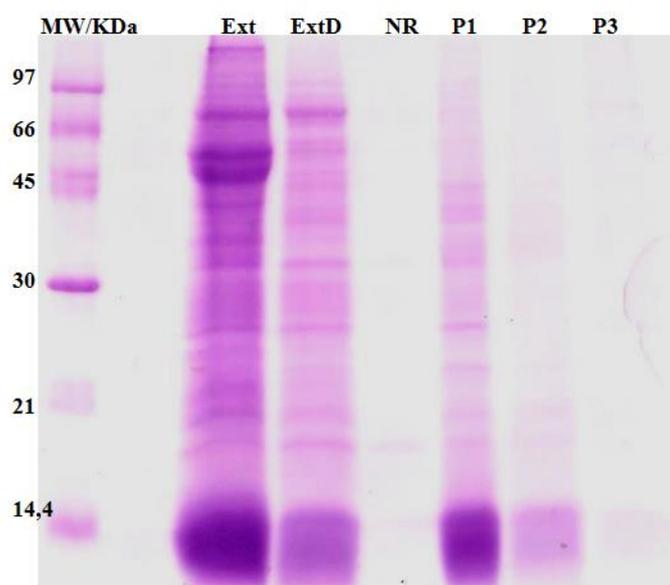


PNR: Pico não retido na matriz de quitina; PR0,11: Pico retido na matriz de quitina e eluído com ácido acético 0,1M ; PR 0,12: Pico retido na matriz de quitina e eluído com ácido acético 0,1M; PR0,5: Pico retido na matriz de quitina e eluído com ácido acético 0,5M. Fonte: autor

O segundo pico, retido na matriz de quitina e eluído com ácido acético 0,5M, não apresentou atividade quitinásica. Esse resultado é uma evidência da presença de quitinase-like (QTL) que corrobora com os resultados adquiridos *in silico*. No transcriptoma analisado foi identificado *contigs* com alto grau de similaridade com quitinases-like de *Cicer arietinum*, *Citrus sinensis* e *Vitis vinifera* embasando a afirmação anterior. Essas proteínas compartilham alta similaridade na estrutura e sequência com quitinases das famílias GH18 e 19, podendo não ter a ligação ou atividade catalítica devido à presença de substituições no domínio de ligação à quitina. (KESARI et al., 2015) A análise genética molecular revela que os acontecimentos da duplicação de genes, seguido de mutação no gene da quitinase existente resultaram na perda dessa atividade (BUSSINK et al., 2007).

As QTLs têm um grande potencial biotecnológico, elas são conhecidas por inibir o crescimento dos fungos pela inibição de xilanases fúngicas (PAYAN et al., 2003; KUMAR et al., 2010). Em outras proteínas tais DLQ evoluíram para reconhecer moléculas de quitina desempenhando assim um papel importante nos processos de crescimento e desenvolvimento (KESARI et al., 2015)

Figura 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% de proteínas de amêndoas de cajueiro extraídas e fracionadas em pH5 e coradas com de Azul Brillhante de Coomassie R-250.



MW/KDa: marcador de baixo peso molecular com bandas variando de 14,4 a 97 KDa. Ext: extrato proteico extraído em tampão acetato de sódio com pH5. ExtD: Extrato proteico dialisado. NR: pico não retido na matriz cromatográfica; P1: Pico eluído com ácido acético 0,1M; P2: pico eluído com ácido acético 0,1M; P3: Pico retido com ácido acético 0,5M. Fonte: autor.

#### 3.4.4 Avaliação de albuminas 2S presentes na castanha de CCP076

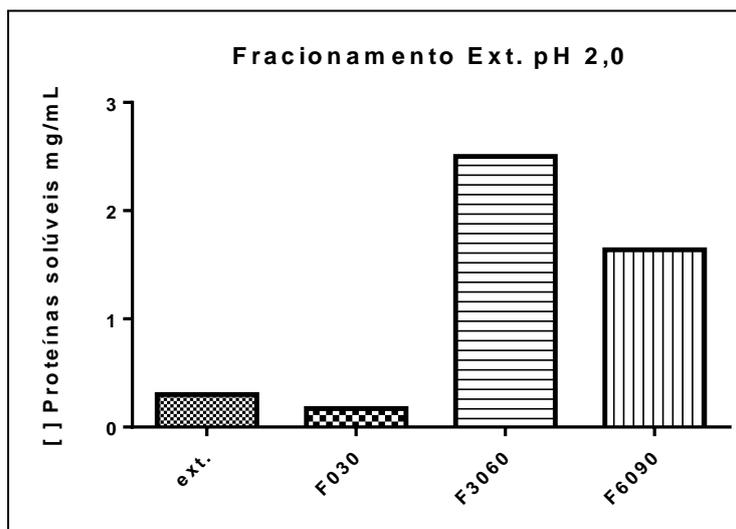
As proteínas foram extraídas em tampão glicina pH 2 e logo em seguida submetidas a um fracionamento por sulfato de amônio. Após o fracionamento, a concentração proteica foi mesurada e os precipitados foram submetidos a uma eletroforese SDS-PAGE (Figura 20). O extrato proteico bruto apresentou uma concentração de 0,3 mg/mL, a fração 0-30% apresentou uma concentração de 0,17 mg/mL; a fração 30-60% obteve uma concentração 2,5 mg/mL; e a fração 60-90% apresentou concentração de 1,64 mg/mL (Gráfico 9). Na raia com do gel SDS-PAGE com a fração 60-90% apresentou um perfil proteico similar a albumina 2S. Acredita-se pelo baixo peso molecular e pela abundância apresentada já que tratamos de uma proteína se reserva de semente.

#### 3.4.5 Atividade antimicrobiana

A eletroforese citada anteriormente (Figura 19) apresenta uma banda de baixo peso molecular na raia referente ao pico retido na maquiz de quitina. Essa banda assemelha-se com a apresentada no gel de acrilamida anteriormente citado (Figura 20). Dessa forma, sugerimos que trata-se da mesma proteína e essa sendo ligante á quitina. Muitos trabalhos reportam sobre diferentes proteínas ligantes à quitina capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos (HUANG; XIE; GONG, 2000; YANG; GONG, 2002; NG, 2004, TRINDADE et al., 2006). Dessa forma, a atividade antimicrobiana foi testada com a fração proteica fracionada com 60-90% de sulfato de amônio, uma vez que ela se mostrou aparentemente pura.

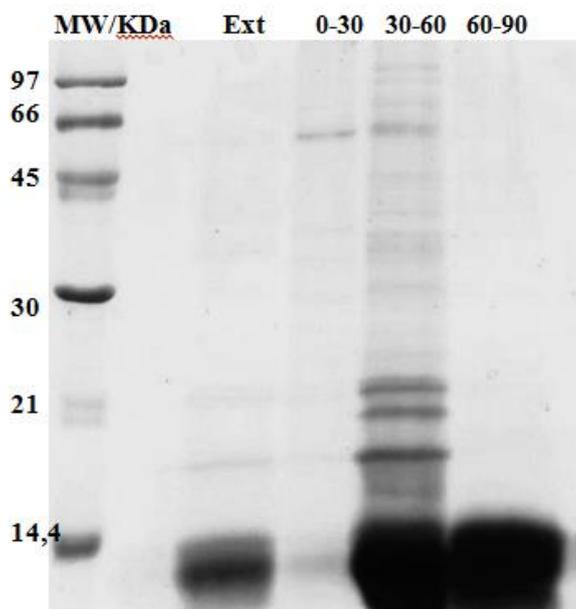
O teste de concentração inibitória mínima demonstrou atividade antifúngica em todas as concentrações testadas contra *C. albicans* e *C. tropicalis* sendo a concentração de 820 µg com maior efeito sobre os fungos (Gráficos 10 e 12). No ensaio de atividade antibiofilme houve um estímulo na produção de biofilme na presença da albumina 2S, mas a maior concentração, com 1.640 µg de proteína, houve uma redução na produção de biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis* em relação as outras concentrações (Gráficos 11 e 13).

Gráfico 10 – Concentração de proteínas solúveis em mg/ml do extrato proteico e frações dialisadas em tampão Glicina-HCl pH 2,0.



Ext: extrato bruto; F030: fração precipitada com 30% de sulfato de amônio ; F3060: fração precipitada com 60% de sulfato de amônio; F6090: fração precipitada com 90% de sulfato de amônio. Fonte: autor

Figura 20: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15 % de proteínas de amêndoas de cajueiro extraídas e fracionadas em pH2 e coradas com de Azul Brillante de Coomassie R-250.



MW/KDa: marcador de baixo peso molecular com bandas variando de 14,4 a 97 KDa; Ext: extrato de proteínas de amêndoas do caju; 0-30: fração de proteínas sedimentadas com 30% de sulfato de amônio; 30-60: fração de proteínas sedimentadas com 60% de sulfato de amônio. 60-90: fração de proteínas sedimentadas com 90% de sulfato de amônio. Fonte: Autor.

Gráfico 10: Teste de concentração inibitória mínima realizada com a fração 60-90% contra *C. albicans*.

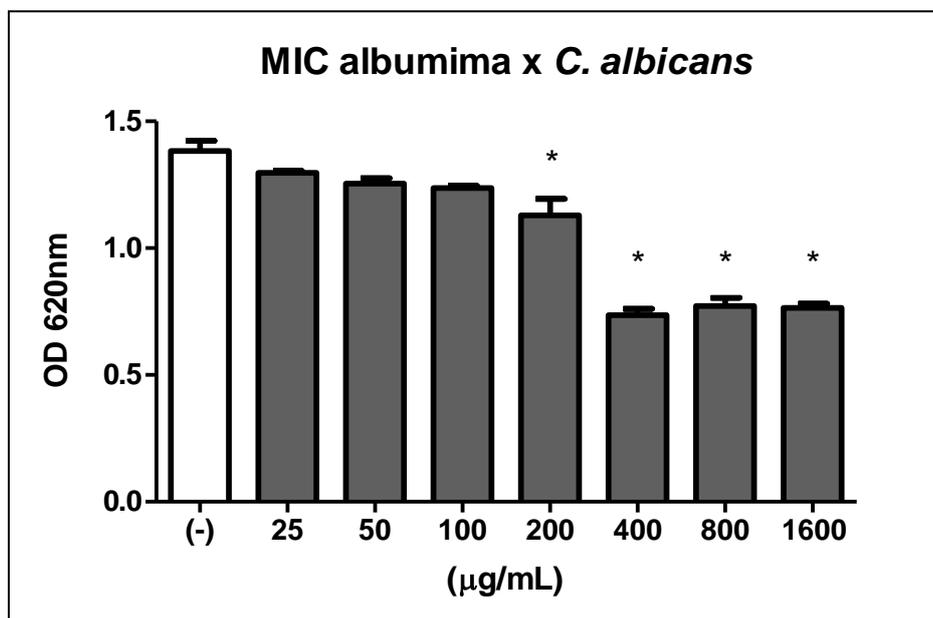


Gráfico 11: Ensaio de atividade antibiofilme de albumina 2S contra *C. albicans*

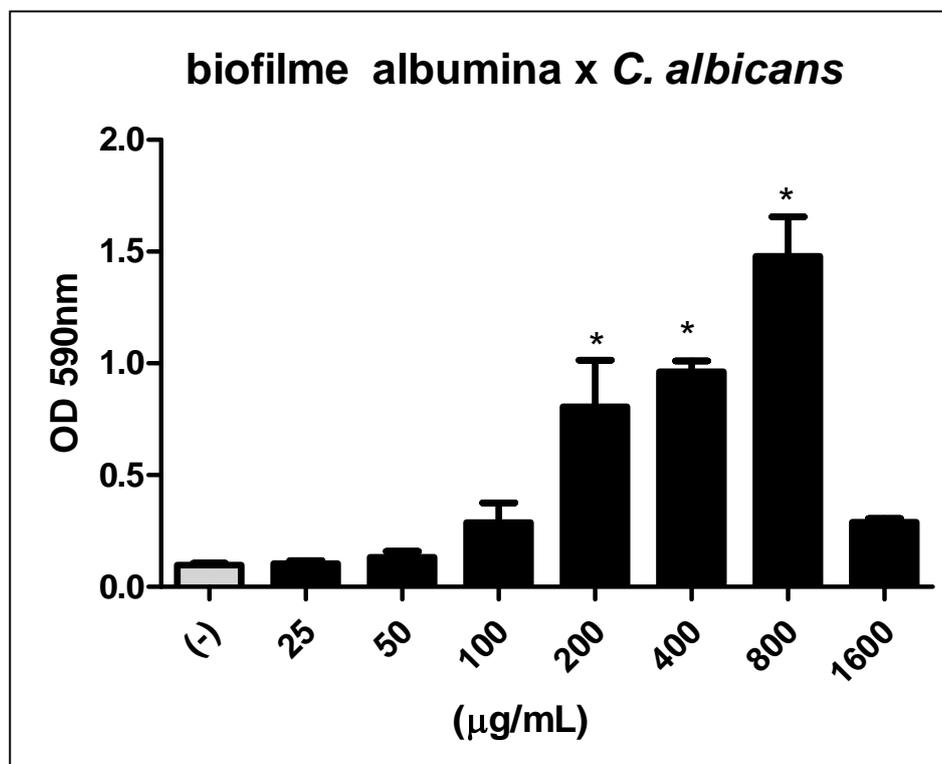


Gráfico 12: Teste de concentração inibitória mínima realizada com a fração 60-90% contra *C. tropicalis*.

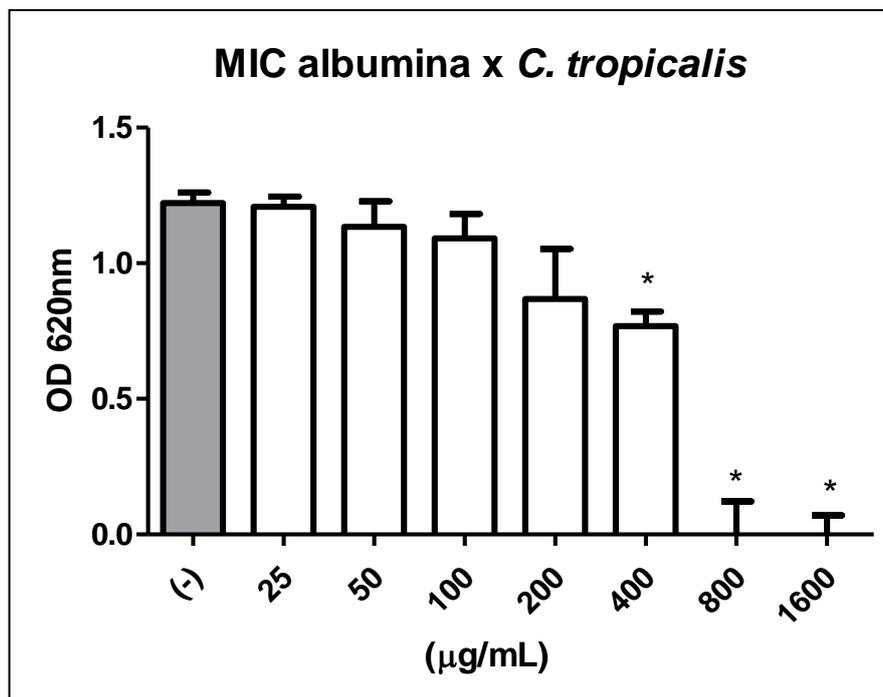
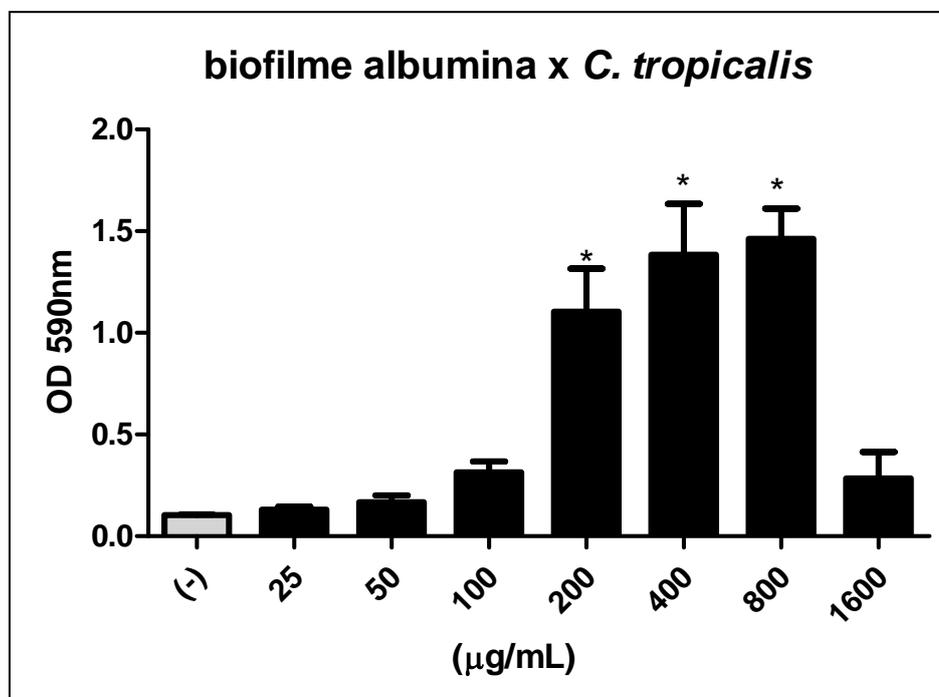


Gráfico 13: Ensaio de atividade antibiofilme de albumina 2S contra *C. tropicalis*



Albuminas 2S de sementes de *Moringa oleifera* também apresentaram atividade inibitória contra fungos. (BATISTA e VASCONCELOS, 2013). Nascimento e Machado (2006) demonstraram que albumina 2S de *Ricinus communis* apresenta atividade antifúngica e inibidora de  $\alpha$ -amilase corroborando com a análise feita nesse trabalho.

Em estudo de Queiroz (2014), houve uma redução do crescimento e a inibição da formação de biofilme de *C. albicans* na presença de alfa-amilase no meio de cultura, uma vez que esta enzima possui afinidade por substratos da matriz dessa composição. Portanto, essa enzima é capaz de romper a estrutura do biofilme. Os referidos dados podem ser explicados por Liaqat e Sabri (2011), o qual sugere a redução do metabolismo microbiano diminuindo a concentração de adesinas. Dessa forma, os resultados obtidos com a fração proteica contendo “albumina alfa-amilase” corroboram com os dados de Queiroz (2014) anteriormente referido.

### 3.5 CONCLUSÕES

As análises enzimáticas apresentaram um padrão catalítico satisfatório, onde o pH 5 mostrou atividade ótima para quitinases. Foi evidenciado um padrão para quitinases-like havendo proteínas ligantes à quitina não apresentando atividade catalítica. A fração proteica contendo albumina 2S na qual demonstrou uma interferência no crescimento na concentração de 400 µg para o MIC. Dessa forma, a albumina 2S de casca de caju CCP76 mostra-se com um grande potencial biotecnológico.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2008. 136 p

AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 999–1008, 2006.

ALVES-FILHO, J. G. **Análises transcriptômica e proteômica de sementes de cajueiro (*Anacardium occidentale* L) visando aplicações biotecnológicas**. 2013. 198 p. Tese. (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

ANTONIW, J. F.; RITTER, C. E.; PIERPOINT, W. S.; VAN LOON, L. C.; Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. **Journal of General Virology** 47: 79-87, 1980.

ASHRAFI, H. et al. De novo assembly of the pepper transcriptome (*Capsicum annuum*): a benchmark for in silico discovery of SNPs, SSRs and candidate genes. **BMC Genomics**, v. 13, n. 571, p. 1-15, 2012.

BANNER, D. W., BLOOMER, A. C., PETSKO, G. A., PHILLIPS, D. C., POGSON, C. I., WILSON, I. A., CORRAN, P. H., FURTH, A. J., MILMAN, J. D., O'ORD, R. E., PRIDDLE, J. D., WALEY, S. G. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. **Nature**, v.255, p. 609-614, 1975.

BARROS, L. de M. **Caju**. Produção: aspectos técnicos/editor técnico: Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza – CE). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 148 p.; (Frutas do Brasil; 30).

BARROS, L. de M. et al. **Hibridação artificial em cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 210; 2013.

BARROS, L. de M. et al. Seleção de clones de cajueiro anão para o plantio comercial no Estado do Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.11, p. 2197-2204, 2012

BARROS, L. M. et al. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão-precoce**. Fortaleza: Embrapa, 64 p, 1993.

BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P.; SILVA, V. V. (Org.). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1995. p. 73-93

BERROCAL-LOBO, M. et al. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiol**, v. 128, n. 3, p. 951-61, mar 2002.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases, in: S.J. Gurr, M.J. McPherson, D.J. Bowles (Eds.), **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**, Oxford University Press, New York, v. II, p. 23-30, 1992.

BOLLER, T.; GEHRI, A.; MAUCH, F.; VÖGELLI, U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. **Planta**, v. 157, p. 22-31, 1985.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H.I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and Peptide Letters** 12:257-261, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n.72, p. 248-254, 1976.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v.234, n.2, p.177-186, 1999.

BURKE, J.J.; O'MAHONY, P.J.; OLIVER, M.J. Isolation of Arabidopsis mutants lacking components of acquired thermotolerance. **Plant Physiology**, 123, 575-588, 2000.

BURNETT, G. R. et al. Characterization of the emulsification properties of 2S albumins from sunflower seed. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 247, n. 1, p. 177-85, mar 2002.

BUSSINK, A.; SPEIJER, D.; AERTS, J.; BOOT, R. Evolution of mammalian chitinase (-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. **Genetics**, v 177, p. 959-970, 2007

CAVALCANTI, J. J. V. ; BARROS, L. de M. . Avanços, desafios e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DE GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2009, FORTALEZA. **Anais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. p. 83-101.

CAVALCANTI, J.J.V.; BARROS, L.M. **Avanços, desafios, e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil**. In: I Simpósio Nordeste de Genética e Melhoramento de Plantas. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2009.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos** . 1. ed. Piracicaba:FEALQ. p. 81-124, 2005.

CHEN, J. et al. A comparison of microarray and MPSS technology platforms for expression analysis of Arabidopsis. **BMC Genomics**, v. 8, 2007

CHUANG, H.H.; LIN, H.Y.; LIN, F.P. Biochemical characteristics of C-terminal region of recombinant chitinase from *Bacillus licheniformis*– implication of necessity for enzyme properties. **FEBS Journal**, v. 275, p. 2240-2254, 2008.

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

COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K.; Plant chitinases. **Plant Journal**, 3: 31-40, 1993.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTACIMENTO – CONAB. **Panorama sobre a Cajucultura no Ceará**. Fortaleza-Ce, 2013.

CRISÓSTOMO, L. A.; SANTOS, F. J. de S.; OLIVEIRA, V. H. de.; RAIJ, B. V.; BERNARDI, A. C. de C.; SILVA, C. A.; SOARES, I. **Cultivo do Cajueiro Anão-precoce**: aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 20p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 8).

DA SILVA, J. G., JR. et al. Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, n. 1, p. 10-8, dec 1 1996.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G.; Biotchnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 776-782, 2006.

DARBY, N.J. ; FREEDMAN, R.B.; CREIGHTON, T.E. Dissecting the mechanism of protein disulfide isomerase: catalysis of disulfide bond formation in a model peptide. **Biochemistry**, 33, 7937-7947, 1994.

DATTA, S.K. & MUTHUKRISHNAN, S.; Pathogenesis-Related Proteins in Plants. **CRC Press LLC**, 1999.

DOBSON, C.M. Protein folding and mis folding. **Nature** 426, 884-890, 2003.

EBRAHIM, S.; USHA, K.; SINGH, B. ; Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism, Vol. 2: Science against microbial pathogens : communicating current research and technological advances (ed. by A Mendez-Vilas) **Formatex Research Center**, pp. 1043-1054, 2011.

EDREVA, A.; Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years.

**General and Applied Plant Physiology**, 31: 105-124, 2005.

FANG, E. F.; WONG, J. H.; LIN, P.; NG, T. B. Biochemical characterization of the RNA-hydrolytic activity of a pumpkin 2S albumin. **FEBS Letters**, v. 584, n. 18, p. 4089-4096, 2010

FAO. Food and Agricultural commodities production. **Food and Agriculture Organization**, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: outubro de 2014.

FERRÃO, J. E. M; **O Cajueiro**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1995. 299p.

FRAND, A.R.; CUOZZO, J.W.; KAISER, C.A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. **Trends Cell Biol.**, 10, 203-210

FU, X.Z., GONG, X.Q., ZHANG, Y.X., WANG, Y., LIU, J.H. Different Transcriptional Response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between Kumquat and Sweet Orange with Contrasting Canker Tolerance. **PLoS ONE**, 7( 7), 1-17, 2012.

GALVEZ, A. F.; DE LUMEN, B. O. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 495-500, may 1999.

GARG, R. et al. De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification. **DNA research**, v. 18, p. 53-63, 2011.

GHOSH, S.; MALHOTRA, P.; LALITHA, P. V.; GUHA-MUKHERJEE, S.; CHAUHAN, V. S.; Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, v 162, p 329–333, 2002.

GONZALEZ-MARTINEZ SC. et al. DNA sequence variation and selection of tag SNPs at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**. 172:1915-1926, 2006.

GRIFFIN, TJ, SMITH, LM, Single - nucleotide polymorphism analysis by MALDI - TOF mass spectrometry. *Trends in Biotechnology*, v.18, n.2, p.77-84, 2000.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: Sutis diferenças de um código. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* . Brasília, v.26, p. 24-27, 2002.

GUPTA, PK, ROY, JK, PRASAD, M, Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*, v.80, n.4, p.4524-4535, 2001.

GUPTA, V.K., A.K. MISRA, R.K. GAUR, P.K. JAIN, D. GAUR AND S. SHARMA.; Current Status of *Fusarium* Wilt Disease of Guava (*Psidium guajava* L.) in India. **Biotechnology**, 9: 176-195, 2010.

HAAS B.J.; CHIN M.; NUSBAUM C.; BIRREN B.W.; LIVNY J. How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? **BMC Genomics**, v. 13, 2012.

HELDT, H. **Plant biochemistry**. 3 ed. San Diego: Elsevier, 2005.

HENRISSAT, B. AND G. DAVIES, ;Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**., 7: 637-644, 1997.

HENRISSAT, B.; A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid Sequence similarities. **Biochemical Journal**, 280: 309-316, 1991.

HONG, S.W.; VIERLING, E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defetive in the acquisition of tolerance to high temperature stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 97, 4392-4397, 2000.

HUYNH, Q.K.; HIRONAKA, C.M.; LEVINE, E.B.; SMITH, C.E.; Borgmeyer, J.R.; Shah, D.M.; Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. **The Journal of Biological Chemistry** 267: 6635-6640, 1992.

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

**IUBMB** Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>> Acesso em: 11 de dezembro de 2014.

KASPRZEWSKA, A.; Plant chitinases--regulation and function. **Cellular & molecular biology letters**, 8: 809-824, 2003.

KELLER, I.; BENSASSON, D.; NICHOLS, R. A. Transition-transversion bias is not universal: a counter example from grasshopper pseudogenes. **Plos Genetics**, v.3, p.22, 2007.

KESARI, P.; PATIL, D. N.; KUMAR, P.; TOMAR, S.; SHARMA, A. K.; KUMAR, P.; Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. **Proteomics**, 15 , 1693–1705, 2015.

KOPPELMAN, S. J. et al. Reversible Denaturation of Brazil Nut 2S Albumin (Ber e1) and Implication of Structural Destabilization on Digestion by Pepsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 123-131, 2004.

KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S.; Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 27: 887-900, 1997.

KREIS, M. et al. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. **Journal of Molecular Biology**, v. 183, n. 3, p. 499-502, 1985.

KÜLHEIM, C. et al. Comparative SNP diversity among four Eucalyptus species for genes from secondary metabolite biosynthetic pathways. **BMC Genomics** 10:452-463, 2009.

KUMAR P.; PATIL, D. N.; DATTA, M.; CHAUDHARY, A.; TOMAR, S.; SHARMA, A. K.; Isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of chitinase from tamarind (*Tamarindus indica*) seeds. **Acta Crystallographica**, F65, 343–345, 2009.

KUMAR, S., SINGH, N., SINHA, M., DUBE, D.; Crystal structure determination and inhibition studies of a novel xylanase and  $\alpha$ -amylase inhibitor protein (XAIP) from *Scadoxus multiflorus*. **FEBS Journal**. 277, 2868–2882, 2010.

KUMARI, S.; HOORN, R. A.; A structural biology perspective on bioactive small molecules and their plant targets. **Current Opinion in Plant Biology**, v 5, p 480-8, 2011.

KUO, C. J.; LIAO, J. H.; HUANG, L. C.; CHANG, C. T.; SUNG, H. Y. Cloning and characterization of an antifungal class III chitinase from suspension-cultured bamboo(*bambusa oldhamii*) cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 56, p. 11507-11514, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.22, p. 680-685, 1970.

LEE, T. T. et al. Enhanced methionine and cysteine levels in transgenic rice seeds by the accumulation of sesame 2S albumin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 8, p. 1699-705, aug 2003.

LEHMANN, K. et al. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. **Biochem Journal**, v. 395, n. 3, p. 463-72, may 1 2006.

LEWIN, B. Genes IX. 9 ed. Porto Alegre. **Artmed**, 2008, 15-16, 60 p.

LIAQAT, I.; SABRI, A.N. Biofilm dental unit water line and its control. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 15-21, 2011.

LIN, J. et al. The Potential Allergenicity of Two 2S Albumins from Soybean (*Glycine max*): A Protein Microarray Approach. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 141, n. 2, p. 91-102, 2006.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The Heat-Shock Proteins. *A. Rev. of Genet.* 22, 631-677, 1988.

LIU, Z. H.; YANG, C. P.; QI, X. T.; XIU, L. L.; WANG, Y. C. Cloning, Heterologous Expression, and Functional Characterization of a Chitinase Gene, *Lbchi32*, from *Limonium bicolor*. *Biochemical Genetics*, v. 48, n. 7-8, p. 669-679, 2010.

LOBO, Marina Duarte Pinto. **Caracterização bioquímica, biológica e estrutural de uma quitinase recombinante de *Chromobacterium violaceum***, 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2012

LOVATELLI, C. Discurso de abertura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO AGRONEGÓCIO, 10., 2011, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Abag, 2011. Disponível em: <[http://www.abag.com.br/index.php?apg=cong\\_visor&ncong=2011](http://www.abag.com.br/index.php?apg=cong_visor&ncong=2011)> Acesso em: 27 out. 2011.

LUND, P. A.; R. J. ELLIS. The chaperone function: meanings and myths. In *The Biology of Extracellular Molecular Chaperones*. Chadwick, D.J.; Goode, J. editors. London. 23-44, 2008.

METZKER, M.L. Sequencing Technologies – the next generation. *Nature reviews*, v.11, p. 31-46, 2010.

MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E.A.; Rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analytical Biochemistry*, v. 83, p. 648-656, 1977.

MONSALVE, R. I. et al. The 2S Albumin Proteins. In: (Ed.). **Plant Food Allergens: Blackwell Publishing Ltd**, 2007. p.42-56.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A.; Applications of next- generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v 92, p 255–264, 2008.

NASCIMENTO, V. V. D. et al. In Silico Structural Characteristics and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Properties of Ric c 1 and Ric c 3, Allergenic 2S Albumins from Ricinus communis Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4814-4821, may 2011.

NETO, S. M. **Albuminas 2S bactericidas em sementes de gergelim (Sesamum indicum – L) : uma nova estratégia no controle de infecção hospitalar**. 2009.

NING, Y.; HU, X.; LING, J.; DU, Y.; LIU, J.; LIU, H.; PENG, Z. Candida albicans survival and biofilm formation under starvation conditions. **International Endodontic Journal**, v. 46, n.1, p. 62–70, 2013.

NISHIYAMA, Y.; NOISHIKI, Y.; WADA, M. X-ray Structure of Anhydrous  $\beta$ -Chitin at 1 Å Resolution. **Macromolecules**, v. 44, n. 4, p. 950–957, 2011.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T. Amino acid sequence of a soybean (Glycine max) seed polypeptide having a poly(L-aspartic acid) structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 22, p. 10502-5, aug 5 1987

OHNUMA, T.; ET AL. Crystal structure and mode of action of a class V chitinase from Nicotianatabacum. **Plant Molecular Biology**, v. 75, p. 291-304, 2011.

OLIVEIRA, V. H. CashewCrop. Revista **Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.30, n.1, p. 001-284, Mar. 2008

OLIVEIRA, V. H.; et al. **Cultivo do cajueiro anão-precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2002.

OPHIR, R.; GRAUR, D.; Patterns and rates of indel evolution in processed pseudogenes from humans and murids. **Gene**, vol. 205, p. 191–202, 1997.

ORAGUZIE, NC, et al, Association Mapping in Plants. New York, USA: Springer, v.IX, p.277,2007.

PAIVA, J. R.; BARROS, L. de M. **Clones de Cajueiro: Obtenção, Características e Perspectivas**. 1ª edição. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 25p.

PAIVA, J.R.; CRISÓSTOMO, J.R.; BARROS, L.M. **Recursos genéticos do cajueiro: coleta, caracterização e utilização**. Fortaleza: Embrapa, 2003. 43p.

PARCHMAN, T. L.; et al. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. **BMC genomics**, 11, 180, 2010.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V. V.; DESHPANDE, M. V.; Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme Microbiology Technology**, 26: 473-483., 2000.

PAYAN, F., FLATMAN, R., PORCIERO, S., WILLIAMSON, G.; Structural analysis of xylanase inhibitor protein I (XIP-I), a proteinaceous xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*, var. Soisson). **Biochemical Journal** 372, 399–405, 2003.

PEACOCK, J.M.; SOMAN, P.; JAYACHANDRAM, R.; RANI, A.U.; HOWARTH, C.J.; THOMAS, A. Effects of high soil surface temperature on seedling survival in pearl millet. **Experimental Agriculture** 29, 215-225, 1993.

PELLIZZARO, D.; POLYZOIS, G.; MACHADO, A.L.; GIAMPAOLO, E.T.; SANITÁ, P.V.; VERGANI, C.E. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 5, p. 547-554, 2012.

REISSIG, J.L.; STORMINGER, J.L.; LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, n. 2, p. 959- 966, 1955.

RIBEIRO, J. K. C. **Novas propriedades do SKTI (Inibidor de tripsina de soja): Inibição para elastase neutrofílica humana e efeitos no processo de injúria pulmonar aguda.** 2010. 86 (Doutorado). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

RINAUDO, M. ; Chitin and chitosan: Properties and applications, **Progress in Polymer Science.** 31(7), 603-632, 2006.

ROBERTAS, J. D., MONZINGO, A. F.; The structure and action of chitinases. **EXS.** 87, 125-135, 1999.

RUSTIGUEL, Cynthia Barbosa. **Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhiziumanisopliae*** , 2014. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão preto – SP, 2014.

SELITRENNIKOFF, C. L.; Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, 67: 2883-2894, 2001.

SHARMA, N.; SHARMA, K.P.; GAUR, R. K. & GUPTA, V.K.; Role of Chitinase in Plant Defense. **Asian Journal of Biochemistry** 6: 29-37, 2011.

SHEWRY, P.R. Seed Proteins. In: BLACK, M.; BEWLEY, J.D. (Eds.). **Seed technology and its biological basis.** England: Sheffield, 2000. p.42-84.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in Botanical Research**, v.26, p.135-192, 1997.

SHINSHI H, NEUHAUS JM, RYALS J, MEINS F JR ;Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. **Biology Plant Molecular** 14:357–368, 1990.

SIKORSKI, P.; HORI, R.; WADA, M. Revisit of  $\alpha$ -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1100–1105, 2009.

SILVA, A. A. L.; SOUSA, L. ; MARTINS, D. F. F.; Otimização do processo para obtenção de concentrado proteico de aguapé (*eichhornia crassipes*) usando técnicas quimiométricas e quantificação deste através do método da p-benzoquinona **Química: ciência, tecnologia e sociedade** , v1, p 41-48, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

STROBL, S.; MASKOS, K.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RÜTH, F. X.; GLOCKSHUBER, R.; A novel strategy for inhibition of  $\alpha$ -amylases: yellow meal worm  $\alpha$ -amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. **Structure**, v 6, p 911-21, 1998.

TEIXEIRA, Cícero Silvano. **Expressão de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia Pastoris*: purificação e caracterização parcial da proteína recombinante**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. I. An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. **Protein and Peptide Letters** 18,101-109, 2011.

TISSIERE, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. Protein-Synthesis in Salivary-Glands of *Drosophila-Melanogaster* - Relation to Chromosome Puffs. **Journal of Molecular Biology**, 84,389-392, 1974.

**TODA FRUTA**. Disponível em: <[www.todafruta.com.br](http://www.todafruta.com.br)>. Acesso em: 04 de dezembro de 2014.

TONELLI, F. C. P.; JÚNIOR N. M. C.; PARREIRA, A. G.; GONÇALVES, D. B.; SILVA, J. A., GRANJEIRO, P. A.; Métodos de extração de inibidor de protease de

sementes de *Albizianiopoides* Ip. 11-12. **Anais da V Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica**, v.1, n.1, São Paulo: Blucher, 2015.

VAN AALTEN, D.M.F., B. SYNSTAD, M.B. BRURBERG., E. HOUGH AND B.W. RIISE *ET AL.*; Structure of a two-domain chitotriose from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.**, 97: 5842-5847, 2000.

VAN LOON, L.C.; Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A.; The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VICKERY, H.B. The protein of plants. **Physiological Reviews**, v.25, p.347-376, 1945.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.** 42, 579–620, 1991.

VILAIN, S.; PRETORIUS, J. M.; THERON, J.; BROZEL, V. S. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2861-2868, 2009.

WANG , X. W. et al. De novo characterization of a white fly transcriptome and analysis of its gene expression during development. **BMC Genomics**, v. 11, p.400, 2010.

WANG, D. G.; FAN, J. B.; SIAO, C. J.; Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, vol. 280, p. 1077–1082, 1998.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science** 9, 244-252, 2004.

WANG, X. et al. A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles.

**African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 11, p. 2432-2436, 2009.

WANG, Y.-J.; YANG, Q. Cloning and Expression of a Novel Chitinase chi58

from *Chaetomium cupreum* in *Pichiapastoris*. **Biochemical Genetics**, v. 47, n. 7-8, p. 547-558, 9 jun 2009.

WANG, Z. et al. De novo assembly and characterization of root transcriptome using

Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **BMC Genomics**, v. 11, p. 726-740, 2010.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for

transcriptomics. **Nature Reviews**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WATANABE T, KANAI R, KAWASE T, TANABE T, MITSUTOMI M, SAKUDA S,

MIYASHITA K; Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. **Microbiology** 145:3353–3363, 1999.

WEBER, J. L.; MAY, P. E.; Abundant class of human DNA polymorphisms which can

be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v 44, p 388–396, 1989.

WELBAUM, G.E.; WITMER X.; NONOGAKI, H.; BEERS, E.P. BRADFORD, K.J.;

Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds. **Seed Science Research**, 13; 167–178, 2003.

ZARATE, L. A.; CRISTANCHO, M. A.; MONCADA, P. Strategies to develop

polymorphic markers for *coffea arábica* L. **Euphytica**, v. 173, p. 243-253, 2010.