



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2022

### DETECÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE UMA NOVA EXOGLUCANASE DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOTENOL

**Paloma Tavares Macedo<sup>1</sup>; Raquel Guimarães Benevides<sup>2</sup>; Alison Borges Vitor<sup>3</sup>**

1. Bolsista PROBIC, Graduanda em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [palomatmacedo@hotmail.com](mailto:palomatmacedo@hotmail.com)
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [raquelgb@gmail.com](mailto:raquelgb@gmail.com)
3. Participante do projeto ou núcleo tal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [alisonborgesvictor@gmail.com](mailto:alisonborgesvictor@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** cDNA; bioinformática, aplicação biotecnológica.

## INTRODUÇÃO

A possibilidade de modificar o modelo vigente – baseado na utilização de combustíveis fósseis – é possível devido ao desenvolvimento de novas tecnologias que buscam reduzir os impactos ambientais através da manipulação dos recursos genéticos de maneira mais racional, associando-se às análises de proteomas *in silico* de fungos relacionados filogeneticamente disponíveis em bancos de dados *online* (DUAN; FEANG, 2010; ROBAK; BALCERECK, 2018; DING *et al.*, 2019).

Nesse sentido, o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* é caracterizado como uma espécie que exibe viabilidade nos processos de geração de biocombustíveis, devido à produção de enzimas hidrolíticas denominadas celulasas que atuam sinergeticamente degradando os compostos poliméricos constituintes da parede vegetal (SOLÍS *et al.*, 2016). Desta maneira, o objetivo deste trabalho consistiu em analisar uma nova exoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* obtida através de extração de RNA e síntese de cDNA, caracterizando-a estruturalmente por modelagem comparativa.

## METODOLOGIA

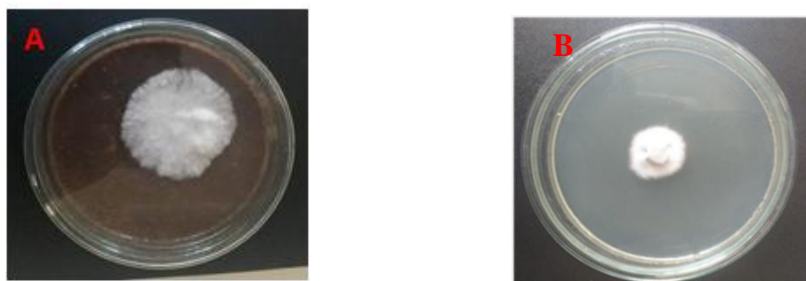
O fungo *Moniliophthora perniciosa* foi reativado em meio de cultura Ágar Batata e Dextrose, durante 7 dias a 27 °C e o micélio foi transferido para o meio líquido contendo  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  – 7 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,5 g –  $\text{MgSO}_4$  – 0,5 g;  $\text{CaCl}_2$  – 0,3 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,184g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,178 g;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,158 g; Carboximetilcelulose (CMC, como única fonte de carbono) – 5 g;  $\text{H}_2\text{O}$  – 1L; ou o meio semissólido (WY) contendo 40 g de farelo de trigo; 6 g de extrato de levedura; 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,2 g de KCl e água destilada q.s.p. 1 L, sendo as frações de micélio incubadas a 25 °C, entre 7 a 15 dias.

Para a extração de RNA utilizou-se o Kit *TRIZOL* (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* foram desenhados de acordo com duas sequências de Glicosil Hidrolase 6 (GH6) selecionada a partir do sequenciamento completo do genoma de *M. perniciosa* e analisados utilizando-se a ferramenta *on-line OligoAnalyzer 3.1 Integrated DNA Technologies®* (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). Para a síntese do DNA complementar (cDNA) realizou-se a técnica de transcriptase reversa, utilizando-se a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase*, conforme as instruções do fabricante. Para amplificação, foi realizada a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), utilizando-se o kit *Qiagen® Master Mix*, de acordo com o fabricante.

A análise *in silico*, por sua vez, envolveu o estudo por modelagem comparativa de proteínas, obtendo-se modelos tridimensionais hipotéticos e homólogos ao molde de uma sequência estruturalmente determinada.

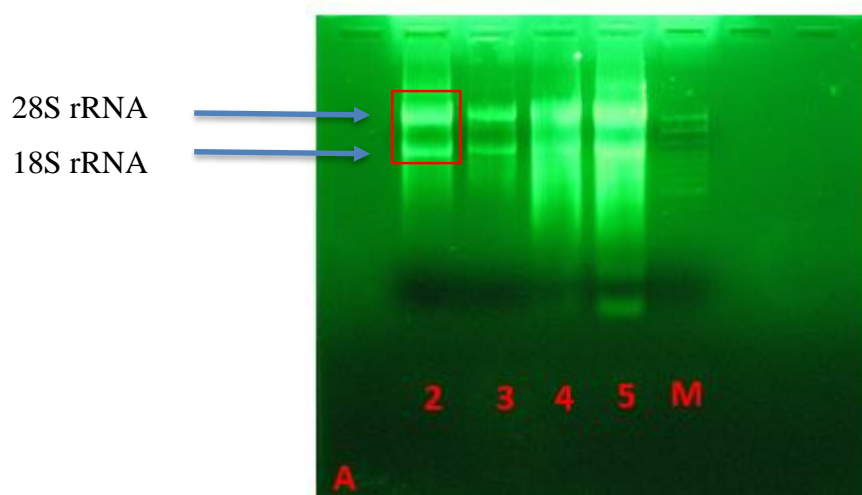
## RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

O meio semissólido WY – que apresenta em sua constituição farelo de trigo – favoreceu o crescimento e desenvolvimento micelial do *Moniliophthora perniciosa* de forma mais uniforme quando comparado ao meio CMC – substrato sintético cuja fonte de carbono é o carboximetilcelulose, como indica a figura 1.



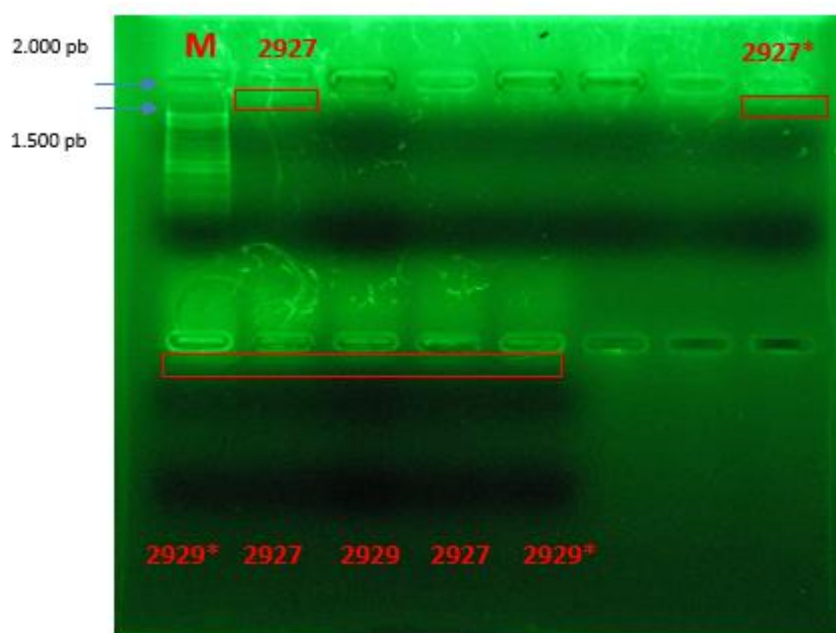
**Figura 1:** Cultivo do fungo *Moniliophthora perniciosa* em meio WY em A no 8º dia de cultivo; em B: no 14º dia. Em B, em meio CMC no 8º dia. Fonte: Acervo pessoal.

As bandas associadas às subunidades 28S e 18S mantiveram-se mais íntegras e detectáveis a partir do cultivo do fungo no meio semissólido, como indica a Figura 2.



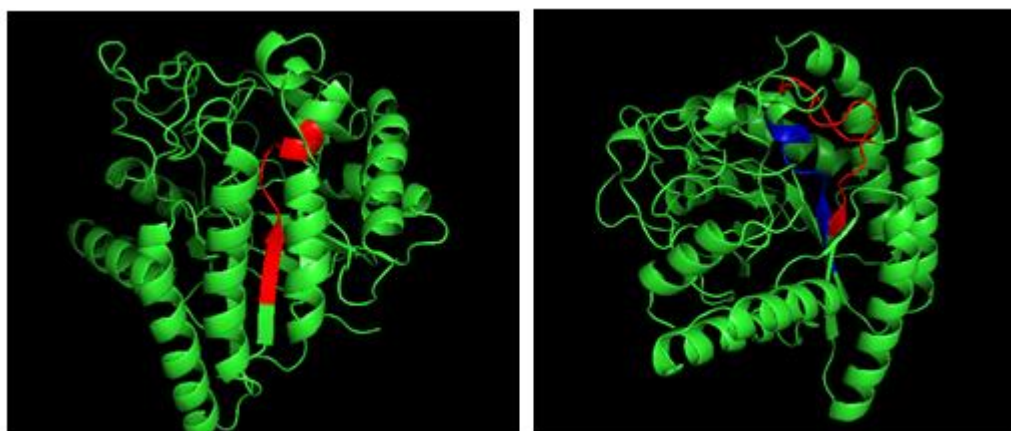
**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose (1%). Em A, extração de RNA – protocolo *Trizol* – em meio WY. Os números indicam os poços; (M) é o marcador molecular 1kb Ladder (Omega y7uBiotek®).

Observou-se a presença de bandas pouco definidas (Figura 3) ao utilizar os *primers* 2927 e 2929, sob três temperaturas de anelamento diferentes: 62,4 °C; 63,4 °C e 64, 2°C. É importante ressaltar que foram analisadas 12 amostras, das quais 6 destas foram preparadas utilizando-se os *primers* específicos como senso e anti-senso e, para as demais, o oligo (dT) como *primer reverse*. Em relação aos fragmentos amplificados, infere-se que estes apresentam em torno de 2.000 pb e 1.500 pb, o que indica que há correspondência com a sequência do genoma, contendo 1.335 pb (Seq\_2927) e 1.320pb (Seq\_2929).



**Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando SYBR™ Green (ThermoFisher Scientific®), exibindo (M) o marcador molecular 1kb Ladder (Omega y7uBiotek®) e as amplificações por par de *primer* (2929, 2927). O (\*) corresponde às sequências em que o oligo (dT) foi utilizado.

Obteve-se os modelos tridimensionais das seqüências em estudo com base no molde PDB 5xcy.1.A, o que está intimamente relacionado com o grau de similaridade entre as estruturas das seqüências da proteína alvo e a estrutura sequencial da proteína-molde, como indica a Figura 4.



**Figura 4:** Em A, o modelo da proteína hipotética Seq\_2927 construído com base no molde PDB 5xcy.1.A. Em vermelho, a representação da assinatura do sítio ativo. Em B, o modelo da proteína hipotética Seq\_2929 construído com base no mesmo molde. Nesse caso, há duas assinaturas do sítio ativo, expresso em azul e vermelho.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de materiais lignocelulósicos no meio WY viabilizou um melhor crescimento e desenvolvimento da massa micelial, repercutindo no favorecimento da extração de RNA. No entanto, em função da visualização de bandas pouco definidas no que concerne à amplificação de cDNA, torna-se fundamental a realização de outros testes a fim de obter resultados mais satisfatórios que poderão direcionar estudos biotecnológicos futuros. A partir da análise *in silico* foi possível prever modelos hipotéticos para as seqüências de interesse, o que configura um recurso que poderá ser utilizado para elucidar problemas associados às seqüências de interesse, buscando otimizar futuras análises moleculares.

## REFERÊNCIAS

DUAN, C.-J.; FENG, J.-X. Mining metagenomes for novel cellulase genes. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 12, p. 1765–1775, 2010.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v.56, n. 2, p. 174–187, 2018.

DING, C., WANG, X. LI, M. Evaluation of six white-rot fungal pretreatments on corn stover for the production of cellulolytic and ligninolytic enzymes, reducing sugars, and ethanol. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103, p. 5641–5652, 2019.

SOLÍS, N.; CHIRIBOGA, C.; ÁVALOS, R.; RUEDA, D.; ALBÁN, C.; MANJUNATHA, B.; BRYAN, R. M.; SELVANAYAGAM, B. Use of Cellulase enzyme obtained from *Monilia (Moniliophthororori)* for treatment of solid waste of Cob, Rice husks and Cocoa shell. **J App Pharm Sci**, v. 6 n. 03, p. 066-070, 2016