

PREDIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MODELAGEM E ANÁLISE DO MECANISMO DE INTERAÇÃO DA QUITINASE *Mo-chi₁* [*Moringa oleifera*, LAM.], COM POLI- β -(1-4)-N-ACETIL-D-GLUCOSAMINE: UMA ABORDAGEM *IN SILICO*



Artigo Original
Original Article
Artículo Original

Physical-chemical prediction, modeling and analysis of the mechanism of interaction of chitinase Mo-chi₁ [Moringa oleifera, LAM.], with poly- β -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine: an in silico approach

Predicción fisicoquímicas, modelado y análisis mecanismo de interacción de la quitinasa Mo-chi₁, un poli- β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina [Moringa oleifera, LAM.]: Un enfoque in silico

Lara Cristhian Costa Bezerra¹, Evaristo Wagner Alves de Queiroz¹, José Ednézio da Cruz Freire^{*1}

¹ Curso de Graduação em Farmácia, Faculdade Maurício de Nassau (UniNassau), Fortaleza, Ceará, Brasil

*Correspondência: Faculdade Maurício de Nassau, Curso de Farmácia - Av. Aguanambi, 251 - José Bonifácio, Fortaleza - CE, 60040-080. e-mail: jednesio@gmail.com

Artigo recebido em 28/12/2017 aprovado em 24/02/2018 publicado em 31/03/2018.

RESUMO

Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar ligações β -(1,4) entre os resíduos de *N*-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc), presente em diversos organismos. Elucidar as propriedades físico-químicas da *Mo-chi₁* identificada na planta *Moringa oleifera* empregando ferramentas *in silico*. Após busca no *Chinese Herbal Plant Genome Database*, a sequência (ID: 10006495) foi analisada quanto ao peptídeo sinal, propriedades físico-químicas, pontes de sulfeto, domínios, estruturas secundárias, modelagem. O modo de interação entre *Mo-chi₁* e quitina foi predito com o programa AutoDock Vina. A *Mo-chi₁* possui peptídeo sinal com 19 aminoácidos de comprimento (clivado: Ala¹⁹ e Ile²⁰), formando polipeptídeo maduro de 379 resíduos. A madura possui *Mr* = 39,56 kDa, *pI* = 5.44, *II* = 35.61 e *GRAVY* = -0.135. Possui uma ponte de sulfeto (⁵Cys-Cys³⁹⁸). Pertencer à família das GH₁₈ com *E*-value de 7.43e⁻¹⁵³ (CDD) e de 2.3e⁻⁹⁰ (SMART). Detém predominância de β -folha (16,85–37%), seguidas de α -Helix (23,3–30,34%) e alças (39,5–52,81%). O estudo de docking molecular mostrou energia favorável a interação entre *Mo-chi₁* e GlcNAc com *E*-valor = -5.9 kcal.mol⁻¹. Embora a *Mo-chi₁* tenha apresentado propriedades físico-químicas semelhantes a outras quitinases GH₁₈, são necessários estudos mais refinados a fim de identificar seu real potencial.

Palavras chave: Análise *in silico*, *N*-acetilglucosamina, Glicosil hidrolases.

ABSTRACT

Chitinases are enzymes capable of hydrolyzing β -(1,4) bonds between *N*-acetyl- β -D-glucosamine residues (GlcNAc), present in several organisms. To elucidate the physicochemical properties of *Mo-chi₁* identified in the *Moringa oleifera* plant using *in silico* tools. After searching the *Chinese Herbal Plant Genome Database*, the sequence (ID: 10006495) was analyzed for signal peptide, physicochemical properties, sulfide bridges, domains, secondary structures, modeling. The mode of interaction between *Mo-chi₁* and chitin was predicted with the AutoDock Vina program. *Mo-chi₁* possesses signal peptide with 19 amino acids in length (cleaved: Ala¹⁹ and Ile²⁰), forming mature polypeptide of 379 residues. The mature has *Mr* = 39.56 kDa, *pI* = 5.44, *II* = 35.61 and *GRAVY* = -0.135. It has a sulfide bridge (⁵Cys-Cys³⁹⁸). Belong to the GH₁₈ family with *E*-value of 7.43e⁻¹⁵³ (CDD) and 2.3e⁻⁹⁰ (SMART). It has a predominance of β -sheet (16.85-37%), followed by α -Helix (23.3-30.34%) and loops (39.5-52.81%). The molecular docking study showed favorable energy for the interaction between *Mo-chi₁* and GlcNAc with *E*-value = -5.9 kcal.mol⁻¹. Although *Mo-chi₁* showed similar physicochemical properties to other GH₁₈ chitinases, more refined studies are needed to identify its true potential.

Keywords: *In silico* analysis, *N*-acetylglucosamine, Glycosyl hydrolases.

RESUMEN

Las quitinasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces β -(1,4) entre residuos de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc), presentes en varios organismos. Conocer las propiedades fisicoquímicas de Mo-chi₁ identificadas en la planta de *Moringa oleifera* utilizando herramientas in silico. Después de buscar en la base de datos del genoma chino de plantas herbales, se analizó la secuencia (ID: 10006495) para péptido señal, propiedades fisicoquímicas, puentes de sulfuro, dominios, estructuras secundarias, modelado. El modo de interacción entre Mo-chi₁ y quitina se predijo con el programa AutoDock Vina. Mo-chi₁ posee péptido señal con 19 aminoácidos de longitud (escindido: Ala¹⁹ e Ile²⁰), formando un polipéptido maduro de 379 residuos. El maduro tiene Mr = 39.56 kDa, pI = 5.44, II = 35.61 y GRAVY = -0.135. Tiene un puente de sulfuro (⁵Cys-Cys³⁹⁸). Pertenecen a la familia GH18 con un valor E de 7.43e⁻¹⁵³ (CDD) y 2.3e⁻⁹⁰ (SMART). Tiene un predominio de β -sheet (16.85-37%), seguido de α -Helix (23.3-30.34%) y loops (39.5-52.81%). El estudio de acoplamiento molecular mostró energía favorable para la interacción entre Mo-chi₁ y GlcNAc con un valor E = -5.9 kcal.mol⁻¹. Aunque Mo-chi₁ mostró propiedades fisicoquímicas similares a otras quitinasas GH18, se necesitan estudios más refinados para identificar su verdadero potencial.

Descriptor: Análisis in silico, N-acetilglucosamina, Glicosil hidrolas.

INTRODUÇÃO

Nos anos vindouros, a produção de drogas deve tornar-se mais eficaz a fim de manter a saúde de uma população mundial que possa atingir 8,5 bilhões de habitantes em 2030 e, cujas projeções para 2050 são de, aproximadamente 9,7 bilhões (ONU, 2016). Além da escassez dos recursos naturais como a água, alimentos, e o ataque de microrganismos patogênicos têm potencializado o surgimento de novas doenças em todo o mundo (PFISTER *et al.*, 2011; HOEKSTRA *et al.*, 2012; BRIMNER; BOLAND, 2003).

O controle químico tem sido amplamente utilizado na clínica médica, a exemplo das infecções paracoccidiodomicoses. No entanto, o controle baseado em agentes bióticos tem sido muito eficiente, além de não prejudicar a saúde humana, não poluir o ambiente e nem provocar resistência de patógenos (PRAPAGDEE; KUEKULVONG; MONGKOLSUK, 2008; ROMEIS *et al.*, 2012).

Em um contexto mundial, muito se tem feito a fim de amenizar a disseminação de doenças ocasionadas por fungos patogênicos, no entanto, os esforços não têm sido muito efetivos. É necessário buscar melhorias nas condições de saúde e na expectativa de vida da população, visando o bem estar

social, assegurando acima de tudo implementações no sistema nacional de saúde (VICTORIA *et al.*, 2011). Assim, dentre as alternativas que podem minimizar os efeitos deletérios causados pelos fungos, tem se destacado a bioprospecção de moléculas bioativas capazes de inibir o crescimento ou o desenvolvimento de fungos (RIZZELLO *et al.*, 2009).

Neste contexto destacar-se a *M. oleifera*, uma planta pertencente à família *Moringaceae*, nativa da Índia e amplamente cultivada nos trópicos de todo mundo. Portanto, esta planta detém importância econômica, industrial e médica. Em relação ao seu emprego na medicina popular, esta espécie tem sido objeto de muitos estudos científicos a fim de isolar compostos com diferentes propriedades biológicas (GANGULY; GUHA, 2008; SANTANA *et al.*, 2010; MANAHEJI *et al.*, 2011; MUANGNOI *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011; ROLIM *et al.*, 2011; SREELATHA; JEYACHITRA; PADMA, 2011). Entre esses compostos se destacam: moléculas coagulantes associadas a polieletrólitos de 3,0 kDa (OKUDA *et al.*, 2001), proteínas catiônicas com massa molecular entre 6,5 e 13,0 kDa (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005; GOYAL *et*

al., 2007) e, ainda ao peptídeo Flo que ao mesmo tempo em que flocula age como biocida para várias espécies de bactérias (CHEN, 2009).

No setor industrial, devido ao elevado teor de óleo de boa qualidade presentes nas sementes, a planta também representa importância. Dentre os principais constituintes do óleo da *M. oleifera*, o ácido oléico (78,6%) merece destaque, visto que confere características semelhantes à do azeite de oliva (ANWAR; BHANGER, 2003). Além dos atributos citados acima, foi determinado que o extrato etanólico obtido de folhas de *M. oleifera* apresentou atividade antiviral contra o HSV-1 (vírus *Herpes simplex* tipo 1), inibindo o desenvolvimento do vírus *in vitro*, prolongando o tempo médio de sobrevivência e reduzindo a mortalidade de camundongos infectados com o HSV-1. Moléculas com atividade larvicidas contra o mosquito *Aedes aegypti* e nematicida contra o *Meloidogyne incognita* foram analisadas, também. (LIPIUN *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2009; ONYEKE *et al.*, 2012).

Ademais, diversas moléculas presentes nas sementes da *M. oleifera* podem agir como agentes antimicrobianos (CHEN, 2009). Em ensaios laboratoriais foi mostrado que extratos (etanólico e aquoso) de sementes foram capazes de inibir o crescimento de bactérias das espécies *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pasturella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae* (CÁCERES *et al.*, 1991; VIERA *et al.*, 2010). Atividades antifúngicas foram também demonstradas contra as espécies *Alternaria solani*, *Basidiobolus haptosporus*, *B. ranarum*, *Candida albicans*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Microsporium canis*, *Rhizopus solani*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (NWOSU; OKAFOR, 1995;

ROCHA *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012; EL-MOHAMEDY; ABDALLAH; GHONAME, 2016).

Embora, muitas moléculas com capacidade de degradar a quitina, uma molécula presente na parede celular de muitas espécies de fungos, tenham sido identificadas com base em sua atividade catalítica, nenhum estudo foi realizado com enzimas quitinolíticas pertencentes à família das glicosil hidrolases (GH₁₈). De modo geral, essas enzimas podem ainda ser empregadas de diferentes maneiras incluindo, preparações de enzimas micolíticas, formação de protoplastos fúngicos e de oligossacarídeos de quitina biologicamente ativos. No setor biotecnológico, as quitinases podem ser usadas para diversas finalidades, especialmente nas áreas da saúde humana e de outros organismos (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). Nesse ínterim, doenças fúngicas geralmente são muito difíceis de serem erradicadas do tecido afetado, além de ocasionar amplo espectro de sinais clínicos (HOFFMANN *et al.*, 2011). Neste trabalho, realizamos análises empregando ferramentas de Bioinformática com o objetivo de melhor caracterizar a estrutura da proteína quitinase GH₁₈ – *Mo-chi*₁ – da planta *M. oleifera*, a fim de demonstrar seu feito bioprotetor contra fungos de interesse clínico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análise de sequência primária

A sequência de aminoácidos da enzima *Mo-chi*₁ (*Chinese Herbal Plant Genome Database*: nº 10006495) foi obtida em formato *fasta* (um tipo de linguagem computacional largamente usada pelos bioinformatas). A fim de determinar a existência ou ausência de sequência sinal (peptídeo sinal), foi utilizado o algoritmo inerente do servidor SignalP 4.0 (PETERSEN *et al.*, 2011). A sequência da proteína

madura (sem peptídeo sinal) obtido após análise SignalP foi usado para posteriores análises.

Caracterização físico-química

Dentre as análises seguidas foram inclusas: peso molecular teórica (MW), ponto isoeletrico (pI), índice de instabilidade (II), índice de hidropaticidade (GRAVY), a partir da plataforma ExPASy - ProtParam Server. (GASTEIGER *et al.*, 2005). Para avaliar a presença de pontes de dissulfeto usado *software* Dianna Web Server (FERRÈ; CLOTE, 2006).

Análise de domínio

A sequência de *Mo-chi₁* em formato *.fasta* foi submetido ao SMART Server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Este programa realiza predições de domínio ou região da proteína relacionada a algum tipo de função (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015).

Análise de estrutura secundária

Estrutura secundária da quitinase foi previsto usando vários servidores incluindo: CFSSP – Chou & Fasman *Secondary Structure Prediction Server* (KUMAR, 2013; CAN, 2015), SopMa - *Secondary Structure Prediction Method* (GOURJON; DELÉAGE, 1995), YASPIN - *Secondary Structure Prediction* (LIN *et al.*, 2005) e finalmente o software HNN *Secondary Structure Prediction Method* (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/aboutUs/publication>).

Construção e refinamento do modelo

O *software* Phyre² foi utilizado para construir a estrutura teórica da proteína *Mo-chi₁*. A estrutura obtida foi refinada com auxílio do programa WinCoot 0.8.1 (EMSLEY *et al.*, 2010). Phyre² é um conjunto de ferramentas usada para prever e analisar

estruturas de proteínas, além da função e mutações proteicas.

Avaliação do modelo

A qualidade do modelo refinado foi avaliada usando os servidores ERRAT e VERIFY_3D. A qualidade geral do modelo para a estrutura final foi determinada usando o servidor ProSA (*Protein Structure Analysis*).

Estudo Docking

O modelo refinado da proteína *Mo-chi₁* foi empregada com o intuito de entender como ocorre à interação entre essa proteína e o seu ligante *N*-acetilglucosamina (polímero de quitina). Para esse propósito a estrutura do ligante foi obtida a partir do banco de dados *ChemSpider* (<http://www.chemspider.com/>). Para as simulações de docking molecular foi usado o software AutoDock Vina (SOTRIFER *et al.*, 2000). Estas análises foram realizadas em dois momentos, inicialmente foi submetida à análise: *Blind Docking*, seguido, da análise *Specific Point docking*.

Inicialmente, a estrutura de *Mo-chi₁* foi submetida na análise de predição de regiões com altas probabilidades de ocorrerem interações utilizando o servidor CASTp (DUNDAS *et al.*, 2006) e FTMap (KOZAKOV *et al.*, 2015). As interações de docking usando AutoDock Vina foram projetadas regiões com altas probabilidades de ocorrerem interações. Um procedimento de encaixe flexível foi executado. O software AutoDock Vina versão 1.1.2, emprega um sistema de função de pontuação e um algoritmo global *Iterated Local Search* (ILS) durante os cálculos de ancoragem. Todas as ligações e torções do ligante focaram livres para rotacionarem enquanto a proteína era mantida rígida, exceto os aminoácidos

Ser²¹, Trp²², Trp²³, Phe⁴⁴, Gli⁸⁶, Asp¹²⁰, Asp¹²³, Asp¹²⁵, Glu¹²⁷, Trp²⁰⁵, Pro²⁷³, Asp²⁷⁵, Gln²⁸² e Ala³³⁹. Durante o preparo da proteína *Mo-chi₁* e o ligante *N*-acetilglucosamina, átomos de hidrogênio polar foram adicionados com auxílio do AutoDock Vina, e suas cargas parciais do átomo unido de Kollman foram atribuídas (MORRIS et al., 1998).

O espaço de busca para os cálculos de ancoragem, que foi selecionado com base no comprimento dos oligossacarídeos, foi definido por um cubo de 30 Å x 30 Å x 30 Å centrado no Glu¹²⁷ da *Mo-chi₁*. A exaustão foi definida para 12, e para todos os outros parâmetros, os valores padrão foram usados. Foram analisados os 10 principais resultados, classificados de acordo com a afinidade de ligação prevista (expressa em kcal/mol). Nesta tarefa, a semente 1000 foi usada atribuída ao arquivo config.txt. Uma semente é um número gerado aleatoriamente usado pelo programa AutoDock Vina para a sua posição inicial e parâmetro da pesquisa (KOEDEL et al., 2016). As conformações consolidadas acima previstas foram ainda classificadas com base em seus valores teóricos de energia de ligação. As imagens tridimensionais dos complexos ligando-proteína foram preparadas usando o PyMol *Molecular Graphics System*, versão 1.7.4 (Schrodinger, LLC).

Alinhamento múltiplo

O alinhamento múltiplo de sequências (*Multiple Sequence Alignment*) é um conjunto de técnicas utilizadas para inferir informações biológicas de um conjunto de sequências (SIMOSSIS; KLEINJUNG; HERINGA, 2003). Comparando de forma mais detalhada a proteína *Mo-chi₁* com outras proteínas pertencentes à família GH₁₈, todas obtidas a partir do servidor *Protein data bank*

(<https://www.rcsb.org/pdb/home/>). O alinhamento foi realizado com auxílio do servidor Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da sequência primária

Ao utilizar o servidor SignalP 4.1 a análise da sequência da *Mo-chi₁*, mostrou que essa possui 379 aminoácidos, onde 19 aminoácidos constituem um peptídeo sinal, a partir da região *N*-terminal. Verificações adicionais indicam que o sítio de clivagem existente está entre os resíduos Ala¹⁹ e Ile²⁰, apresentando *S-score* de 0.927 e *D-score* de 0.782.

Caracterização físico-química

A caracterização de uma cadeia polipeptídica pode fornecer dados importantes sobre a estrutura e as propriedades da proteína, contribuir para um melhor entendimento de suas funções bioquímicas e celulares. A família de quitinase compõe-se de um grupo diversificado de enzimas que diferem em atividades enzimáticas, sequência primária de aminoácidos, ponto isoelétrico (pI) e localização subcelular (HAMEL F, et al, 1997), bem como outras características estruturais, como o domínio de ligação à quitina e o domínio catalítico (MÉTRAUX J. P. et al, 1998).

Após realizada revisão bibliográfica, observou-se que não há dados significativos sobre propriedades físico-químicas ou atividades biológicas da *Mo-chi₁* disponíveis. Consequentemente, as propriedades físico-químicas, tais como: peso molecular, pI teórico, instabilidade e média de índices de hidropaticidade de *Mo-chi₁* foram preditas usando o servidor ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

A análise computacional nos mostrou que toda a proteína madura *Mo-chi₁* tem uma massa molecular de 39,56 kDa. Além disso, *Mo-chi₁* é uma proteína ácida (pI 5,44). Este valor pI está de acordo com o pI obtido em outros trabalhos para quitinases. O índice de instabilidade fornece uma estimativa indireta da estabilidade metabólica de uma proteína (GURUPRASAD, *et al.*, 1990). Este índice é baseado em uma escala de estabilidade em que os valores inferiores a 40 podem ser considerados classificados como uma proteína tão estável, enquanto valores superiores a 40 prevêem que a proteína pode ser instável (GURUPRASAD, *et al.*, 1990). Com base nessa análise *Mo-chi₁* poderia ser considerado uma proteína estável, pois seu índice de instabilidade mostrou um valor de 35,61 (<40). O valor de GRAVY para um péptido ou proteína é calculado como a soma dos valores de hidropatia de todos os aminoácidos divididos pelo número total de resíduos na sequência. O valor de GRAVY da *Mo-Chi₁* foi de -0.135, o que sugere baixa possibilidade de interações com moléculas de água.

Em termos de estabilidade térmica *Mo-chi₁* pode ser considerado como uma proteína estável.

Além disso, é possível que a estabilidade térmica dessa quitinase seja em parte devido à presença de ligações dissulfeto. De fato, a busca de possíveis ligações dissulfeto na estrutura *Mo-chi₁* usando o servidor DiANNA revelou a existência de uma interação de cistina entre os resíduos (Cys⁵-Cys¹⁹⁸).

Análise de domínio

De acordo com a análise realizada com CDD, SMART, *Mo-Chi₁* pertence à família 18 de Glicosil Hidrolases (GH₁₈), com um *E*-value de 7.43e⁻¹⁵³ (CDD), *E*-value de 2.3e⁻⁹⁰ (SMART), respectivamente.

Análise de estrutura secundária

As estruturas secundárias previstas de *Mo-chi₁*, utilizando os servidores CFSSP, HNN, SopMA e YASPIN (Tabela 1), mostraram predominância de β -folha (*Extended-strand*) 16,85 – 37%, seguidas de hélices (α -Helix) 23,3 – 30,34% e de alças (*Random coil*) 39,5 – 52,81%. Embora esses servidores usem algoritmos e abordagens diferentes para prever o padrão de estrutura secundária das seqüências primárias de aminoácidos, em todos os casos a presença de alças como elementos estruturais predominantes.

Tabela 1: Análise da estrutura secundária da enzima *Mo-chi₁* Acesso(*Chinese Herbal Plant Genome Database*: nº 10006495) usando diferentes servidores.

<i>Mo-chi₁</i>	Servidor	<i>α-Helix</i>		<i>Extended-strand</i>		<i>Random coil</i>	
		Nº de resíduos	Porcentagem (%)	Nº de resíduos	Porcentagem (%)	Nº de resíduos	Porcentagem (%)
	CFSSP	84	23,3	133	37	143	39,7
	HNN	105	30,34	65	16,85	190	52,81
	SopMa	95	26,5	123	34	142	39,5
	YASPIN	106	29,5	83	23	171	47,5

Construção e refinamento do modelo

O primeiro passo na predição de um modelo 3D para Mo -chi₁ através de modelos moleculares comparativos consistiu em uma busca extensa de modelos adequados no *Protein Data Bank*. Como resultado, as estruturas denominadas: 5GZT, 5GZV, 1RD6, 3B9E, 4TXG, 5HBF, 5DF0, 1ITX, 1KFW, 3AQU, 3OA5, 4A5Q, 3ALF, 4MNM, 1UR8, 4DWZ, 1WNO, 3G6L, 4URI, 3CHF, todas pertencentes à família GH₁₈ de quitinases de plantas, foram selecionadas de acordo com parâmetros como cobertura de consulta, *E-value*, identidade de sequência e resolução estrutural.

O modelo Mo -chi₁ 3D foi construído usando o servidor Phyre² e a qualidade da estrutura prevista foi verificada no servidor MolProbity. Observou-se que a grande maioria dos pares de ângulos estão distribuídos em regiões favoráveis ou permitidas no *plot* Ramachandran (Figura 1). Por outro lado, um passo de otimização adicional foi feito usando a ferramenta WinCoot para reorganizar os aminoácidos GLN⁵¹, ASP⁸⁹, LYS¹³³, LEU¹⁷⁵, SER¹⁸¹, THR²⁰⁷,

LEU²²³, ASN³⁴⁴, SER³⁵³, e ASN³⁵⁷ nas regiões permitidas do plano de Ramachandran (Tabela 2).

Avaliação do modelo

A qualidade geral do modelo (*Z-score*), o fator de qualidade geral e a Pontuação Média 3D-1D do modelo Mo -chi₁ foram avaliados com auxílio das ferramentas ProSA-web, ERRAT e VERIFY_3D, respectivamente. Usando o servidor ProSA-web, obteve-se um valor de -6,96 (ponto preto – Figura 2).

De acordo com este resultado, o modelo Mo -chi₁ pode ser classificado como um modelo de boa qualidade, sendo colocado em uma série de pontuações tipicamente encontradas para conformações nativas de proteínas com tamanhos semelhantes (200 – 300 resíduos de aminoácidos) em que as estruturas tridimensionais foram resolvidas por difração de raios-X. As interações não ligadas entre diferentes átomos foram analisadas pelo servidor ERRAT. O fator de qualidade geral para o modelo Mo -chi₁ foi de 93.123% (Figura 3).

Figura 1A. Gráfico de Ramachandran da Mo -chi₁ antes de ser otimizado;

Figura 1B. Gráfico de Ramachandran da Mo -chi₁ depois de ser otimizado.

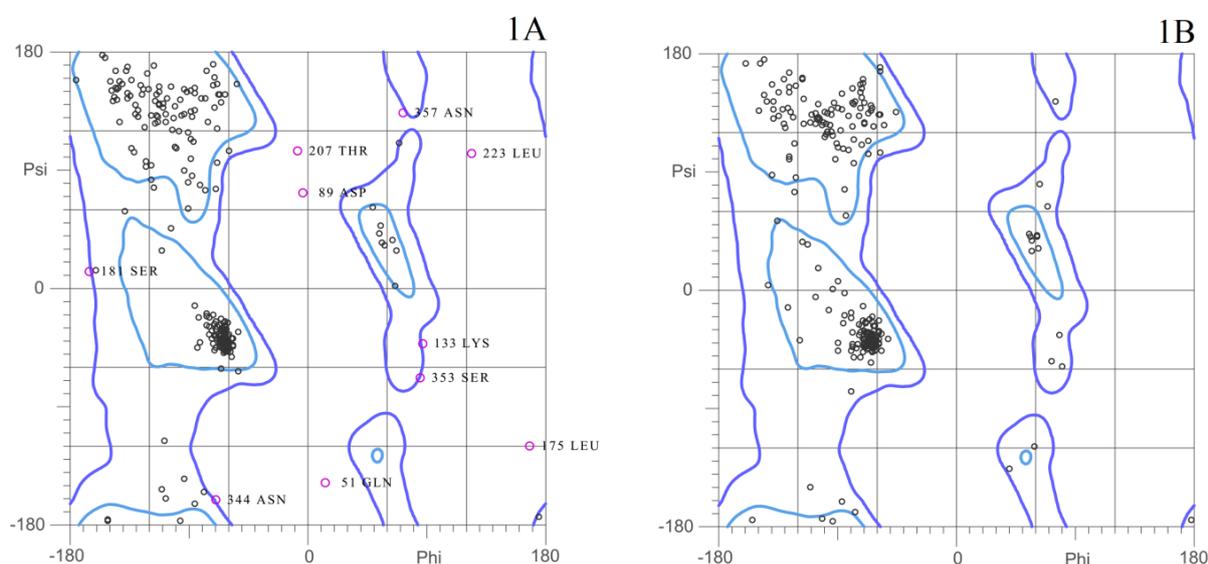
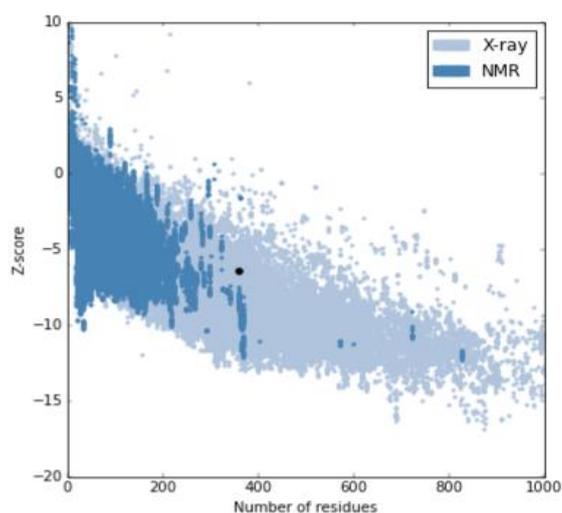


Tabela 2. Valores do gráfico de Ramachandran - Os valores entre parenteses correspondem a quantidade de resíduos.

	Ref.	Antes de Otimizar	Depois de Otimizar
Penalidades	-	105,9- 0%	0- 100%
Rotâmeros Pobres	< 0,3%	2,70%- (8)	0,01%- (3)
Rotâmeros favoráveis	>98%	92,23%- (273)	98,65%- (292)
Ramachandran fora das linhas	<0,05%	4,19%- (15)	0,28%- (1)
Ramachandran favoráveis	>98%	88,55%- (317)	91,90%- (329)

Figura 2. Análise do servidor (ProSA-web) - O Z-score (-6,96) de *Mo-chi₁* cai na gama de valores comumente encontrados para proteínas PDB cujas estruturas foram determinadas por RMN (região azul escuro) e cristalografia de raios-X (região azul claro). Observe o ponto preto no gráfico que representa a pontuação Z de *Mo-chi₁*. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o modelo *Mo-chi₁* proposto aqui é de alta qualidade e confiança.

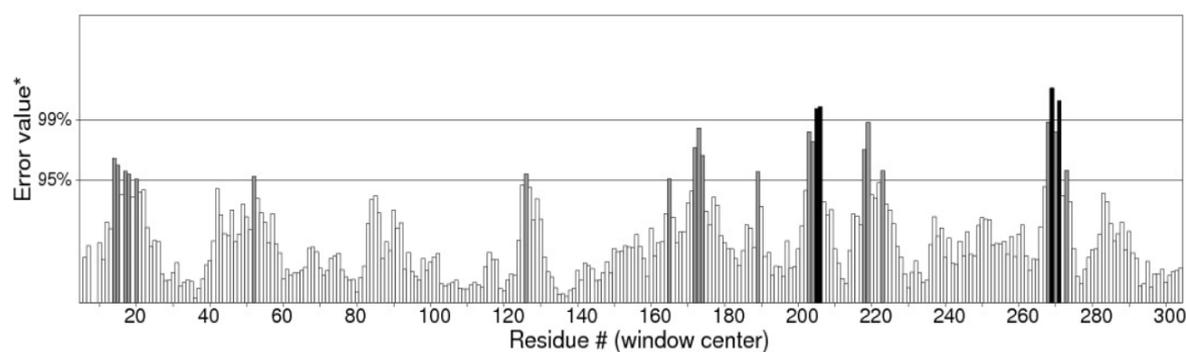


Esse valor sugere que o modelo previsto pode ser considerado como sendo de qualidade aceitável, de acordo com a escala de limite de confiança ERRAT (<95%). Os resultados Verify3D para o modelo *Mo-chi₁* revelaram que 90,56% dos resíduos de aminoácidos apresentaram um escore 3D-1D médio superior a 0,2, o que indica um modelo bem construído com todos os resíduos posicionados em sua conformação dobrada (Figura 4). O modelo final foi depositado no *Protein Model Database* sob o número de acesso PM0081298

(<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB/>). Embora, algumas regiões do modelo obtido para *Mo-chi₁* esteja com pontuação abaixo de 0,2, quando comparado com o modelo da quitinase (PDB: 1WAW), é possível identificar que todas as regiões com pontuação baixa parecem ser uma característica da química desta proteína (Figura 5). É possível notar que nas quatro regiões, em ambas as proteínas: (I) são formadas por α -hélice, (II) formadas por tanto por alça e, imediatamente por β -folha, (III) rmadas por alça e (IV) rmadas somente por alças.

Figura 3. Análise de qualidade global do modelo Mo-chi1 de acordo com o servidor ERRAT - As regiões menos favorecidas são sombreadas em preto e as regiões mais favorecidas estão em branco. O método de avaliação de ERRAT retornou um valor de 93.123% para a estrutura prevista de Mo-chi₁. Estes dados sugerem um modelo de boa qualidade que está de acordo com a outra análise discutida aqui.

Program: ERRAT2
 File: /var/www/SAVES/Jobs/5076946//erratt.pdb
 Chain#:1
 Overall quality factor**: 93.123



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Figura 4. O gráfico de modelo 3D da Mo-chi1 de acordo com o servidor Verify3D - O gráfico de modelo 3D da Mo-chi₁ de acordo com o servidor Verify3D - Qualidade 3D do modelo Mo-chi₁. O eixo vertical representa a pontuação média do perfil 3D-1D para resíduos em uma janela deslizante de 20 resíduos. O eixo horizontal representa o número de resíduos na sequência primária da proteína. Os primeiros e os últimos 9 resíduos da sequência primária não são submetidos a análises. De acordo com o enredo, a estrutura de Mo-chi₁ não mostra nenhum erro na distribuição de resíduos de aminoácidos ao longo do espaço tridimensional.

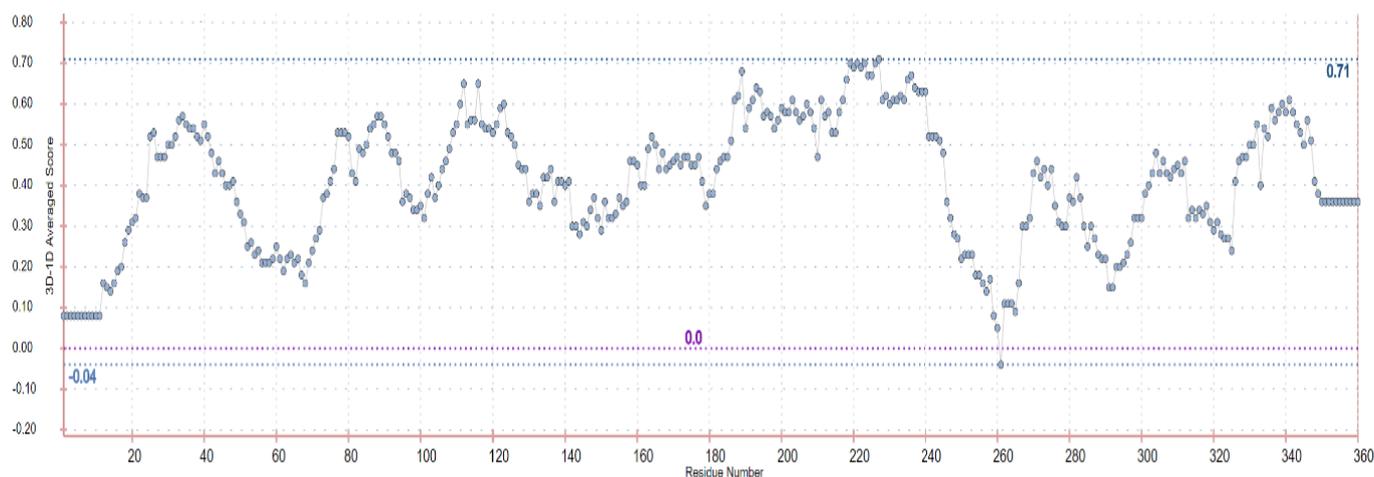
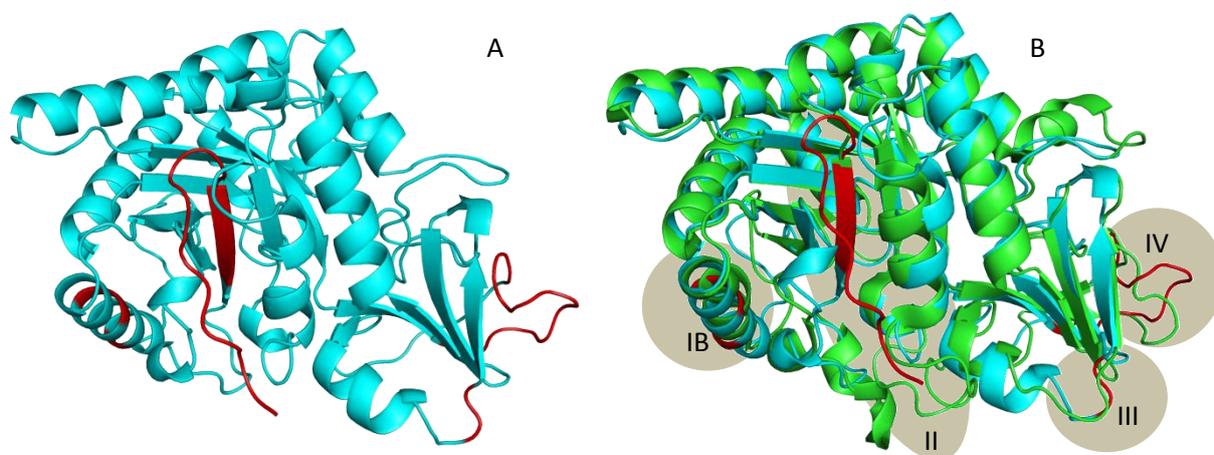


Figura 5. Modelo 3D da Mo-chi1 de acordo com o servidor Verify3D - Regiões da estruturas com baixa pontuação com base no gráfico 3D do modelo *Mo-chi*₁ (ciano). (A) Regiões com erros estruturais destacadas em vermelho. (B) Justificativa de incoerência do algoritmo com base na estrutura 1WAW (verde), destacados em (I) α -hélice, (II) alça e β -folha, (III) Alça e (IV) alças.



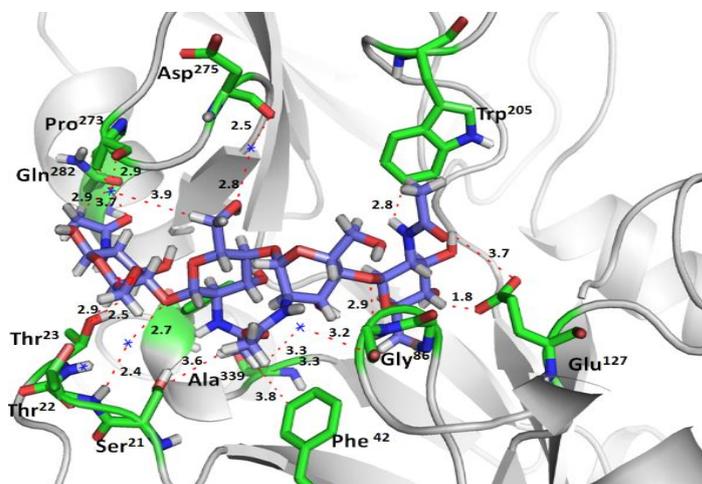
Estudo Docking

O estudo *docking* consiste na busca dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela interação entre *Mo-chi*₁ e a *N*-acetil- β (1-4)-*D*-glucosamina. Usando o modelo 3D predito e refinado. Os resíduos de aminoácidos conservados localizados no sítio ativo da *Mo-chi*₁, foram selecionados de acordo com o banco de dados públicos *CAZypedia* (https://www.cazypedia.org/index.php/Main_Page).

Nas quitinases clássicas GH₁₈, o local ativo da enzima

é composto pela sequência Asp-X-X-Asp-X-Asp-X-Glu, onde "X" significa qualquer dos outros resíduos conhecidos de aminoácidos. No caso de *Mo-chi*₁, a sequência conservada é: Asp¹²⁰-X-X-Asp¹²³-X-Asp¹²⁵-X-Glu¹²⁷. O melhor valor de interação obteve *E*-value = -5.9 kcal.mol. Este resultado demonstrou que os aminoácidos do sítio ativo de *Mo-chi*₁ eram propensos a interagir com moléculas Ser²¹, Thr²², Thr²³, Phe⁴², Gly⁸⁶, Glu¹²⁷, Trp²⁰⁵, Gln²⁸², Ala³³⁹, Phe³⁴² (Figura 6-7).

Figura 6. Interação molecular entre *Mo-chi*₁ e quitina - Nos resíduos Asp²⁷⁵, Pro²⁷³ Gly⁸⁶ necessitam de moléculas de água para formar ligações com *N*-acetil- β (1-4)-*D*-glucosamina. Ser²¹, Thr²², Thr²³, Phe⁴², Glu¹²⁷, Trp²⁰⁵, Gln²⁸², Ala³³⁹, Phe³⁴² possuem interação direta com o ligante de quitina com distância de 1,8 a 3,8 Å.



..* . *:*:** :*****:* . . * :*:*:** : **.* . * .***

Mo-chi₁ GLDLDWEEFPQGPKEMLNGLLLKEWRLAIEKETATGRAPLLLTAAYYSVDITLLGAHR
 1HJV GLDLAWLYPGRD-KQHFTTLIKEMKAEFIKEAO-PGKKQLLSAAL--S--AGKVTIDS
 1HJW GLDLAWLYPGRD-KQHFTTLIKEMKAEFIKEAO-PGKKQLLSAAL--S--AGKVTIDS
 2DT0 GLDLAWLYPGRD-KRHLTALVKEMKAEFAREAQ-AGTERLLLSAAV--S--AGKIAIDR
 2O92 GLDLAWLYPGRD-KRHLTALVKEMKAEFAREAQ-AGTERLLLSAAV--S--AGKIAIDR
 2DT2 GLDLAWLYPGRD-KRHLTALVKEMKAEFAREAQ-AGTERLLLSAAV--S--AGKIAIDR
 2FDM GLDLAWLYPGRD-KRHLTALVKEMKAEFIREAQ-AGTEQLLSAAV--S--AGKIAIDR
 ***** : * . . : : * : * : : : * : * * : * : : . . :

Mo-chi₁ SYPVRSINQYTDWISPMCEFDYHGSWDTSETCAHAALYDPKG-----NLSTSYGLQSWIR
 1HJV SYDIAKISQHLDFISIMTYDFHGAWRGT-TGHHSPFLFRGQEDASPDRFSNTDYAVGYMLR
 1HJW SYDIAKISQHLDFISIMTYDFHGAWRGT-TGHHSPFLFRGQEDASPDRFSNTDYAVGYMLR
 2DT0 GYDIAQISRHLDFISLLTYDFHGAWRQT-VGHHSPFLFRGNSDAS-SRFSNADYAVSYMLR
 2O92 GYDIAQISRHLDFISLLTYDFHGAWRQT-VGHHSPFLFRGNSDAS-SRFSNADYAVSYMLR
 2DT2 GYDIAQISRHLDFISLLTYDFHGAWRQT-VGHHSPFLFRGNSDAS-SRFSNADYAVSYMLR
 2FDM GYDIAQISRHLDFISLLTYDFHGAWRQT-VGHHSPFLFAGNEDAS-SRFSNADYAVSYMLR
 . * : . * : : * : * : : : * : * : * : : : . : * : : : * :

Mo-chi₁ AGVLPEKLVMLPLPLYGKTKWLKEPIRSHGICSPAIDVG-----PGDGILTFQSVEEFNE
 1HJV LGAPASKLVMGIPTFGRSFTLASSET--GVGAPISGPGIPGRFTKEAGTLAYYEICDFLR
 1HJW LGAPASKLVMGIPTFGRSFTLASSET--GVGAPISGPGIPGRFTKEAGTLAYYEICDFLR
 2DT0 LGAPANKLVMGIPTFGRSFTLASSKT--DVGAPISGPGIPGRFTKEKGILAYYEICDFLH
 2O92 LGAPANKLVMGIPTFGRSFTLASSKT--DVGAPISGPGIPGRFTKEKGILAYYEICDFLH
 2DT2 LGAPANKLVMGIPTFGRSFTLASSKT--DVGAPISGPGIPGRFTKEKGILAYYEICDFLH
 2FDM LGAPANKLVMGIPTFGRSFTLASSKT--DVGAPVSGPGVPGRFTKEKGILAYYEICDFLH
 * . . ***** : * : : : * . . : : * : * . * * * : : : * * : : : * :

Mo-chi₁ KNNATIVYDKDITVSAYSFAGSTWIGYDDPKSSTAKIAFAQALGLRGYFFWALSFDNNWKI
 1HJV GA--TVHRILGQOVYPYATKGNQWVGYDDQESVKSQVQYLDKDRQLAGAMVWALDLDLDFQGS
 1HJW GA--TVHRILGQOVYPYATKGNQWVGYDDQESVKSQVQYLDKDRQLAGAMVWALDLDLDFQGS
 2DT0 GA--TTHRFRDQOVYPYATKGNQWVAYDDQESVKNKARYLKNRQLAGAMVWALDLDLDFRGT
 2O92 GA--TTHRFRDQOVYPYATKGNQWVAYDDQESVKNKARYLKNRQLAGAMVWALDLDLDFRGT
 2DT2 GA--TTHRFRDQOVYPYATKGNQWVAYDDQESVKNKARYLKNRQLAGAMVWALDLDLDFRGT
 2FDM GA--TTHRFRDQOVYPYATKGNQWVAYDDQESVKNKARYLKNRQLAGAMVWALDLDLDFRGT
 * . . * : * . * : * * : * . . * : : * * : : * * : * :

Mo-chi₁ SA-QASEAWNVDV-----
 1HJV FCGQDLRFPLTNAIKDALAAT
 1HJW FCGQDLRFPLTNAIKDALAAT
 2DT0 FCGQNLTFPLTSAVKDVLARV
 2O92 FCGQNLTFPLTSAVKDVLARV
 2DT2 FCGQNLTFPLTSAVKDVLARV
 2FDM FCGQNLTFPLTSAVKDVLAEV
 . . : :

CONCLUSÃO

Um modelo tridimensional de uma quitinase de *M. oleifera*, nomeada de Mo-chi₁, foi construído neste trabalho utilizando métodos de modelagem molecular. Diferentes ferramentas bioinformáticas demonstraram que Mo-chi₁ é uma típica quitinase vegetal da família (GH₁₈) que

compartilha as mesmas propriedades físico-químicas que as outras quitinases de plantas conhecidas (GH₁₈). Análise de docking molecular usando seu substrato natural (quitina) mostrou que a interação entre este ligante e a Mo-chi₁ foi similar a outras proteínas quitinolíticas GH₁₈ co-cristalizadas com quitina. Entretanto, são necessários estudos mais

aprofundados a fim de evidenciar o real potencial biotecnológico dessa quitinase GH₁₈ de *M. oleifera*.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem as instituições educacionais: Universidade Federal do Ceará e

REFERÊNCIAS

ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6558–6563, 2003.

BRIMNER, T. A.; BOLAND, G. J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 100, n. 1, p. 3–16, nov. 2003.

CÁCERES, A.; CABRERA, O.; MORALES, O.; MOLLINEDO, P.; MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 3, p. 213–6, 1991.

CAN, M. Conformational parameters for amino acids in helical, β -Sheet, and random coil regions calculated from proteins: After 40 years. **Southeast Europe Journal of Soft Computing**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2015.

CHEN, M. Elucidation of bactericidal effects incurred by *Moringa oleifera* and chitosan. **Journal of the U.S. SJWP**, v. 4, n. 65, p. 65–79, 2009.

DUNDAS, J.; OUYANG, Z.; TSENG, J.; BINKOWSKI, A.; TURPAZ, Y.; LIANG, J. CASTp: Computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. WEB. SERV. ISS., p. 116–118, 2006.

EL-MOHAMEDY, R. S. R.; ABDALLAH, A. M.; GHONAME, A. A. Field application of chitosan and *Moringa oleifera* extracts as fungicides alternatives to control early blight and improvement growth and yield quality of potato. **Plant Pathology Journal**, v. 15, n. 4, p. 135–143, 2016.

Faculdade de Maurício de Nassau, que igualmente contribuíram para apoiar este trabalho.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica**, v. 66, n. Pt 4, p. 486–501, 2010.

FERRÈ, F.; CLOTE, P. DiANNA 1.1: An extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 182–185, 2006.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; NETO, J. G. M. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 207–16, 2009.

GANGULY, R.; GUHA, D. Alteration of brain monoamines & EEG wave pattern in rat model of Alzheimer's disease & protection by *Moringa oleifera*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 6, p. 744–51, 2008.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; BERNHARD T.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **BBA - General Subjects**, v. 1243, n. 3, p. 477–481, 1995.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server**; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607.

GEOURJON, C.; DELÉAGE, G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 11, n. 6, p. 681–684, 1995.

- GHEBREMICHAEL, K. A.; GUNARATNA, K. R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, v. 39, n. 11, p. 2338–2344, 2005.
- GIFONI, J. M. OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, J. T.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L. GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B. VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, p. 406–415, 2012.
- GOYAL, B. R. AGRAWAL, B. B.; MEHTA, A. A. Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. ó An overview. **Natural Product Radiance**, v. 6, n. 4, p. 347–353, 2007.
- GURUPRASAD K.; REDDY B. V. B.; M. PANDIT, W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 4, no. 2, pp. 155–161, 1990.
- HAMEL, F., BOIVIN, R.; TREMBLAY, C.; BELLEMARE, G. Structural and evolutionary relationship among chitinases of flowering plants, **Journal of Molecular Structure**, v. 44, no. 6, pp. 614–624, 1997.
- HOEKSTRA, A. Y.; MEKONNEN, M. M.; CHAPAGAIN, A. K.; MATHEWS R. E.; RICHTER, B. D. monthly water scarcity: blue water footprints versus blue water availability. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e32688, 2012.
- HOFFMANN, C. C.; DANUCALOV, I. P.; PURIM, K. S. M.; QUEIROZ-TELLES, F. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anatómoclínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 138–141, 2011.
- KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling predicion and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, 845-858, 2015.
- KOEBEL, M. R.; SCHMADEKE, G.; POSNER, R. G.; SIRIMULLA, S. AutoDock VinaXB: Implementation of XBSF, new empirical halogen bond scoring function, into AutoDock Vina. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2016.
- KOZAKOV, D.; GROVE, L. E.; HALL, D. R.; BOHNUUD, T.; MOTTARELLA, S. E.; LUO, L.; XIA, B.; BEGLOV, D.; VAJDA, S. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. **Nature Protocols**, v. 10, n. 5, p. 733–755, 2015.
- KUMAR, A. T. CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server. **WIDE SPECTRUM: Research Journal**. v. 1, n. 9, p.15–19, 2013.
- LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D257–D260, 2015.
- LIN, K. SIMOSSIS V. A.; TAYLOR W. R.; HERINGA J. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 152–159, 2005.
- LIPIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R.; TAWEECHOTIPATR, P.; PRAMYOTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAKI, K. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against *Herpes simplex* virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research**, v. 60, n. 3, p. 175–180, 2003.
- MANAHEJI, H.; JAFARI S.; ZARINGHALAM, J.; REZAZADEH, S.; TAGHIZADFARID, R. Analgesic effects of methanolic extract of the leaf or root od *Moringa oleifera* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 2, p. 216-222, 2011.
- MÉTRAUX, J. P.; STREIT, L.; STAUB, T.; A pathogenesis-relatedprotein in cucumberis a chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, vol. 33, no. 1, pp. 1–9, 1988.
- MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. AutoDock-related material automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.
- MUANGNOI, C.; CHINGSUWANROTE, P.; PRAENGAMTHANACHOTI, P.; SVASTI, S.; TUNTIPOIPAT, S. *Moringa oleifera* pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell lines. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 445-455, 2012.

- NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 703–710, 1995.
- NWOSU, M.; OKAFOR, J. I. Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 38, p. 191–5, 1995.
- OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 405–10, 2001.
- ONYEKE, C. C.; AKUESHI, C. O. Infectivity and reproduction of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood on African yam bean, *Sphenostylis stenocarpa* (Hochst Ex. A. Rich) Harms accessions as influenced by botanical soil amendments. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 67, p. 13095–103, 2012.
- PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 473–483, 2000.
- PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, J. T.; ROCHA, R.; SOUSA, D.; VASCONCELOS, I. M. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 11, p. 1078–1085, 2011.
- PETERSEN, T. N.; BRUNAK S.; HEIJNE G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.
- PFISTER, S.; BAYER, P.; KOEHLER, A.; HELLWEG, S. Projected water consumption in future global agriculture: scenarios and related impacts. **The Science of the Total Environment**, v. 409, n. 20, p. 4206–4216, 2011.
- PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 330–7, 2008.
- RIZZELLO, C. G.; LAVECCHIA, A.; GRAMAGLIA, V.; GOBBETTI, M. Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2–3, p. 189–196, 2009.
- ROCHA, M. F. G.; AGUIAR, F. L. N.; BRILHANTE, R. S. N. Extratos de *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp. sobre *Candida albicans* e *Microsporium canis* isolados de cães e gatos e análise da toxicidade em *Artemia* sp. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1807–1812, 2011.
- ROLIM, L. A.; MACEDO M. F.; SISENANDO, H. A.; NAPOLEÃO, T. H., FELZENSZWALB, I., AIUB, C. A.; COELHO, L. C.; MEDEIROS, S. R.; PAIVA, P. M. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 56–58, 2011.
- ROMEIS, J. RAYBOULD, A.; BIGLER, F.; CANDOLFI, M. P. HELLMICH, R. L.; HUESING, J. E.; SHELTON, A. M. Deriving criteria to select arthropod species for laboratory tests to assess the ecological risks from cultivating arthropod-resistant genetically engineered crops. **Chemosphere**, v.90, n. 3, p. 901–909, 2012.
- SANTANA, C. R.; PEREIRA, D.F.; ARAUJO, N. A.; CAVALCANTI, E. B.; SILVA, G. F. Caracterização físico-química da moringa (*Moringa oleifera* Lam). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 55–60, 2010.
- SIMOSSIS, V; KLEINJUNG, J; HERINGA, J. An overview of multiple sequence alignment, **Current protocols in bioinformatics**, pp. 3–7, 2003.
- SOTRIFFER, C; FLADER, W; WINGER, R. H; RODE, B. M; LIEDL, K. R; VARGA, J. M. Automated docking of ligands to antibodies: methods and applications. **Methods**, v. 20, n. 3, p. 280–291, 2000.
- SREELATHA, S.; JEYACHITRA, A.; PADMA, P. R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1270–1275, 2011.
- VICTORIA, G. C; BARRETO, M. L.; LEAL, M. C.; MONTEIRO, C. A., SCHMIDT, M. I.; PAIM, J; BASTOS, F. I; ALMEIDA, C; BAHIA, L; TRAVASSOS, C; REICHENHEIM, M; BARRO, F. C. Condições de saúde e inovações nas políticas de

saúde no Brasil: O caminho a percorrer. **Saúde no Brasil**, p. 90-102, 2011.

VIERA, G. H. F; MOURÃO, J. A; ANGELO, A. M; COSTA, R. A; VIEIRA, R. H. S. F. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129–132, 2010.