



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MONIZY DA COSTA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA E PURIFICAÇÃO DE  
UMA TRIPSINA SÍMILE PRESENTE NAS SEMENTES DA ESPÉCIE  
VEGETAL *Chamaecrista nictitans (L.) moench***

Maceió  
2019

MONIZY DA COSTA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA E PURIFICAÇÃO  
DE UMA TRIPSINA SÍMILE PRESENTE NAS SEMENTES DA  
ESPÉCIE VEGETAL *Chamaecrista nictitans (L.) moench***

Defesa de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção de grau de mestre em ciências.

Área de concentração: Bioquímica e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Maceió  
2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

S586i Silva, Monizy da Costa.

Identificação de um inibidor de tripsina e purificação uma tripsina símile presente nas sementes da espécie vegetal *Chamaecrista nictitans (L.) moench* / Monizy da Costa Silva. – 2019.

85 f. : il., grafs., tabs.

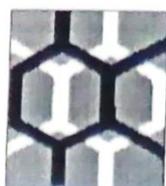
Orientador: Hugo Juarez Viera Pereira.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 71-85.

1. *Chamaecrista nictitans*. 2. Tripsina – Inibidor de proteases. 3. Tripsina símile – Purificação. 4. Serinoproteases. I. Título.

CDU: 577.15



# PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

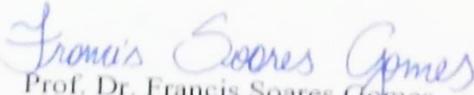


## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de MONIZY DA COSTA SILVA, intitulada: “IDENTIFICAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA E PURIFICAÇÃO DE UMA TRIPSINA SÍMILE PRESENTE NAS SEMENTES DA ESPÉCIE VEGETAL *Chamaecristanictitans (L.) moench*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 28 de Fevereiro de 2019, às 14h, na sala de aulas da Pós-Graduação do IQB/UFAL.

### COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira  
(Orientador - PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Francis Soares Gomes  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. José Maria Rodrigues da Luz  
(PMBqBM/ESENFAR).

*Dedico aos meus pais, José Cícero e Cícera Maria. E de maneira especial a duas pessoas que marcaram minha vida e hoje já não as tenho fisicamente, minha irmã **TATIANE COSTA** e minha sobrinha **MÉRCIA THAYNÁ**, pois mostraram ser grandes guerreiras!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter segurado em minhas mãos, nos momentos de dor, por ter me sustentado e me dado forças para continuar. Por sua presença viva em minha vida me mostrando que nunca estive só.

Aos meus pais, nem tenho palavras para agradecer, vocês são o que eu tenho de mais valioso nessa vida. Obrigada por todo carinho a me transmitido, pela dedicação, pelas noites que passaram em claro para cuidar de mim. Sou grato por todo ensinamento e amor que recebo diariamente e por entenderem a minha ausência. Se hoje sou essa pessoa, saiba que devo a vocês. A vocês dedico o que tenho de melhor, meu AMOR.

Agradeço as minhas irmãs, Michelly Costa, Míriam Costa e Tatiane Costa (em memória), por cuidarem dos nossos pais, por todo amor a me transmitido, por nossa amizade e companheirismo. Costumo dizer que somos abençoadas por termos pais como os nossos e vivermos em união, principalmente nos momentos difíceis. Amo muito vocês! Agradeço as minhas sobrinhas Francielly, Mirelly, Valentina e Thayná (em memória), por todo amor e carinho. Saiba que me orgulho muito de vocês, minhas filhas!

Não poderia deixar de prestar meus agradecimentos ao meu namorado, meu melhor amigo e companheiro, Ricardo Costa. Que, como sempre falo, é um ser de luz. Agradeço por sempre está comigo, me ajudando, me auxiliando, segurando minha mão, me dando forças para prosseguir, me mostrando que é possível. Obrigada por está comigo nos momentos bons, mas também nos momentos difíceis. Agradeço-te por secar minhas lágrimas e está comigo nas horas que mais precisei, por ser essa pessoa tão especial. Também agradeço aos seus pais, Socorro e Paulo e sua irmã, Allais, por todo carinho.

Agradeço aos meus cunhados, Francisco e Cícero, e aos demais familiares e amigos, por me ajudarem sempre que preciso.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Hugo Juarez, pela paciência e dedicação nos momentos de orientação, pela transmissão dos seus valiosos conhecimentos.

Agradeço aos professores, Francis e Edma, pelo conhecimento transmitido. Bem como aos professores Mario, Sônia e Luciano, e seus alunos, pelas parcerias.

Agradeço aos colegas de laboratório, Camila, Andrea, Tatielly, Dávida, Roberta, Janaina, Alexssandra, Marta, Fabiana, Laís, Elisabeth, Gabriela, Juliana, Saron, Lucélia, Claudio, Thomas, Josiel, Regis, Abner, Christian, Ícaro e demais, pela ajuda nos experimentos, pelas boas conversas e momentos de descontrações.

Agradeço ao Cledson Barbosa, pela amizade e várias ajudas, durante a execução deste trabalho, pelas boas risadas nos nossos momentos de descontração.

Agradeço as agências de fomento CNPq e CAPES por prover os recursos que tornaram possível a execução desse projeto de pesquisa.

## RESUMO

A espécie *Chamaecrista nictitans* pertence à família das Fabaceae, é classificada como uma planta invasora, podendo agredir vários tipos de plantações, no entanto, estudos relatam que seu extrato apresenta propriedades antivirais, e atuam no tratamento de cálculos renais. Não há nenhum estudo em relação às atividades proteolíticas presentes nesta planta. Algumas moléculas encontradas em vegetais são alvos de várias pesquisas na área da biotecnologia. Os inibidores de proteases são compostos que inibem a atividade enzimática, dentre estes os inibidores de serinoproteases formam a classe com maior percentual de espécie catalogadas, sendo os da família Kunitz e Bowman-Birk os mais estudados. Alguns metabólitos secundários podem inibir a ação das proteases. As tripsinas, sintetizadas pelo pâncreas, integram a classe das hidrolases e são responsáveis por clivarem ligações peptídicas dos resíduos de Arg e Lys, nas regiões C-terminais. Estão presente nos eucariontes, procariontes e vírus, contudo a sua presença em vegetais é pouco descrita na literatura e apresentam muitas aplicações biológicas e industriais. Observando a importância de inibidores de proteases e tripsina em vegetais e a importância biotecnológica dessa enzima, o presente trabalho tem como principal objetivo identificar inibidores de proteases e realizar a purificação de uma tripsina similar presente nas sementes da espécie *C.nictitans*. Para tanto foi realizado a identificação de inibidores proteicos e a purificação parcial da tripsina similar, presente nas sementes desta espécie, através da utilização de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão molecular. Por meio das análises dos géis de poliacrilamida foi observado um extrato complexo, caracterizado por inúmeras bandas de proteínas e também a presença de uma atividade inibidora de tripsina. A partir do fracionamento foi possível resolver uma fração com atividade inibidora de tripsina e outra com atividade tripsina similar, nas frações 20-40% e 40-60%, respectivamente, da precipitação salina. Os métodos utilizados para purificar a enzima obtiveram alta recuperação e considerável resolução. Através de zimografia de inibição foi possível perceber que o inibidor contido no extrato, não apresenta características proteicas, uma vez que não inibiu a hidrólise da caseína presente no gel, sugerindo ser um metabólito secundário não proteico. Foi obtida a descrição de uma atividade inibidora de tripsina e uma purificação parcial da tripsina similar, presente nas sementes da *C. nictitans*, utilizando precipitação salina e cromatografia de exclusão molecular. Este trabalho apresenta uma relevante descoberta científica e contribuir com as futuras pesquisas sobre enzimas que apresentam aplicações biotecnológicas oriundas de plantas.

**Palavras-chave:** *Chamaecrista nictitans*, inibidor de proteases, serinoproteases, tripsina similar.

## ABSTRACT

The species *Chamaecrista nictitans* belongs to the family Fabaceae, is classified as an invasive plant, and can attack several types of plantations, however, studies report that its extract has antiviral properties, and act in the treatment of kidney stones. There is no study regarding the proteolytic activities present in this plant. Some molecules found in plants are the targets of several researches in the field of biotechnology. Protease inhibitors are compounds that inhibit enzymatic activity, among which the serinoprotease inhibitors form the class with the highest percentage of catalographic species, the Kunitz and Bowman-Birk families being the most studied. Some secondary metabolites may inhibit the action of proteases. Trypsins, synthesized by the pancreas, are in the class of hydrolases and are responsible for cleaving peptide bonds of Arg and Lys residues in the C-terminal regions. They are present in eukaryotes, prokaryotes and viruses, but their presence in plants is poorly described in the literature and has many biological and industrial applications. The main objective of the present work is to identify protease inhibitors and to carry out the purification of a trypsin similar to *C. nictitans* seeds, observing the importance of protease and trypsin inhibitors in plants and the biotechnological importance of this enzyme. For both, the identification of protein inhibitors and the partial purification of trypsin, present in the seeds of this species, through the use of ammonium sulfate precipitation and molecular exclusion chromatography were performed. A complex extract, characterized by numerous protein bands and the presence of a trypsin inhibitory activity, was observed through the polyacrylamide gels. From the fractionation, it was possible to solve a fraction with trypsin inhibitory activity and another with trypsin activity, in the fractions 20-40% and 40-60%, respectively, of the salt precipitation. The methods used to purify the enzyme obtained high recovery and considerable resolution. By inhibition zimography it was possible to notice that the inhibitor contained in the extract does not present protein characteristics, since it did not inhibit the hydrolysis of the casein present in the gel, suggesting to be a secondary non-protein metabolite. A description of a trypsin inhibitory activity and partial purification of simian trypsin present in *C. nictitans* seeds using saline precipitation and molecular exclusion chromatography was obtained. This work presents a relevant scientific discovery and tends to contribute to future research on enzymes that present biotechnological applications from plants.

**Keywords:** *Chamaecrista nictitans*, protease inhibitor, serinoproteases, trypsin simile.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Partes representativas da <i>Chamaecrista nictitans</i> .....	20
Figura 2: Esquema mostrando a atuação das Peptidases.....	35
Figura 3: Resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das serinoproteases.....	38
Figura 4: Estrutura tridimensional da tripsina bovina.....	39
Figura 5: Mecanismo de ação da tripsina.....	41
Figura 6: Hidrólise do N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA).....	50
Figura 7: Ensaio de inibição enzimática com extrato da semente da espécie <i>C. nictitans</i> .....	54
Figura 8: Curva de tempo para extrato das sementes de <i>C. nictitans</i> .....	55
Figura 9: Atividade enzimática das frações da precipitação salina das sementes da espécie vegetal <i>C. nictitans</i> .....	56
Figura 10: Gel de poliacrilamida em SDS-PAGE.....	58
Figura 11: Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S100 (50mL).....	59
Figura 12: Eletroforese SDS-PAGE a 12%.....	61
Figura 13: Cromatograma da cromatografia de troca-iônica DEAE-Sephadex.....	63
Figura 14: Precipitação Salina do extrato bruto das sementes da espécie vegetal <i>C. nictitans</i> .....	64
Figura 15: Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular.....	65
Figura 16: Eletroforese SDS-PAGE.....	66
Figura 17: Cromatografia de troca-iônica DEAE- Sephadex.....	67
Figura 18: Precipitação trifásica do extrato bruto das sementes da espécie vegetal <i>C. nictitans</i> .....	68
Figura 19: Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S100 (50mL).....	69
Figura 20: Eletroforese SDS- PAGE a 12%. As linhas 1-5 correspondem as frações 42-46.....	70
Figura 21: Zimografia de inibição com o extrato.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Famílias de inibidores de proteases.....	22
Tabela 2: Classificação das enzimas de acordo com a reação catalisada.....	26
Tabela 3: Fontes de proteases e aplicações industriais.....	28
Tabela 4: Classificação de peptidases de acordo com o sítio ativo catalítico.....	36
Tabela 5: Diversidade de serino peptidase e resíduos presentes no sítio ativo.....	37

## LISTA DE SIGLASE ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
Asp	Aspartato
BApNA	N-Benzoil-L-arginina-p-nitro-anilida
Cm	Centímetro
CrataBL	<i>Crataeva tapia</i> Bark Lectin
DEAE	Dietilaminoetil
DFP	Diisopropil fluorofosfato
EcTi	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> inibidor de tripsina
G	Gramas
Glu	Glutamato
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
LAMP	Laboratório de análises metabolônica e proteômica
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kDa	Quilodaltons
Lys	Lisina
M	Molar
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
m/v	Massa por volume
Min	Minutos
MPs	Metaloproteases
NH <sub>4</sub> (SO <sub>2</sub> )	Sulfato de amônio
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
SBTI	Inibidor de tripsina da soja
SFTI-1	Inibidor de tripsina isolado da semente do Girassol
Ser	Serina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SKTI	Inibidor de tripsina de soja
pH	Potencial Hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
Trp	Triptofano
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
U	Unidades
uL	Microlitros
° C	Grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
2.1	FAMÍLIA FABACEAE	18
2.1.1	<i>Chamaecrista nictitans</i>	19
2.2	INIBIDOR DE PROTEASES	21
2.2.1	Inibidores de Serinoproteases	22
2.3	ENZIMAS	25
2.3.1	Fontes alternativas de proteases	27
2.3.2	Proteases vegetais	29
2.3.3	Utilização de proteases na área biotecnológica	30
2.3.4	Classificação das proteases	34
2.3.5	Serinoproteases	36
2.4	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	43
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS:</b>	<b>48</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS:	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	48
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	49
4.2	PREPARO DO EXTRATO BRUTO	49
4.3	ENSAIO INIBITÓRIO E ENZIMÁTICO	49
4.4	CURVA DE TEMPO DO EXTRATO BRUTO DAS SEMENTES	50
4.5	PRECIPITAÇÃO SALINA	51
4.6	PRECIPITAÇÃO TRIFÁSICA	51
4.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR EXCLUSÃO MOLECULAR	51
4.8	CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	52
4.9	ELETROFORESE (SDS-PAGE)	52
4.10	ZIMOGRÁFIA	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
5.1	ENSAIO INIBITÓRIO	54
5.2	FRACIONAMENTO SALINO ( <i>SALTING OUT</i> )	56
5.3	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR COM NaCl	58
5.4	ELETROFORESE SDS- PAGE	61
5.5	CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	62

<b>5.6</b>	<b>ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DE INIBIÇÃO DO NOVO EXTRATO E DAS FRAÇÕES DO FRACIONAMENTO SALINO.....</b>	<b>63</b>
<b>5.7</b>	<b>CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR .....</b>	<b>64</b>
<b>5.8</b>	<b>CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA .....</b>	<b>66</b>
<b>5.9</b>	<b>PRECIPITAÇÃO TRIFÁSICA .....</b>	<b>67</b>
<b>5.10</b>	<b>CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR .....</b>	<b>68</b>
<b>5.11</b>	<b>ELETROFORORESE SDS- PAGE .....</b>	<b>70</b>
<b>5.12</b>	<b>ZIMOGRFIA DE INIBIÇÃO DO EXTRATO.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Fabaceae, também conhecida como legumiosas, é caracterizada como a terceira maior família de *Angiospermas* (MATEOS-MARTINS, 2014). É classificada como a principal fonte fornecedora de proteínas vegetais (BRAGANÇA, 2011). O gênero *Chamaecrista* situa-se entre os 10 maiores gêneros desta família. *Chamaecrista nictitans* pertence à família Fabaceae e é classificada como uma planta invasora e costuma habitar terrenos arenosos, afetando vários tipos de plantações (SOUZA, 2015).

Estudos descrevem sobre propriedades antivirais no extrato bruto (HERRERO et al., 2004; MATEOS-MARTÍN, et al., 2014) e sua utilização no tratamento de cálculos renais (CARVALHO, 1996). Todavia, mesmo fazendo parte de uma família rica em inibidores de tripsina, esta planta não apresenta qualquer relato na literatura sobre a presença de macromoléculas, incluindo as serinoproteases e/ ou possíveis inibidores das mesmas.

Os inibidores de protease são compostos que bloqueiam ou reduzem a atividade catalítica de enzimas proteolíticas, são amplamente distribuídos entre plantas, animais e microorganismos (DOKKA, SEVA e DAVULURI, 2015). Os inibidores de serinoproteases formam a classe com maior quantidade de inibidores conhecidos e estudados, representados, principalmente, pelas famílias Kunitz e Bowman- Birk.

Essas biomoléculas podem desempenhar importantes papéis na cura e/ou prevenção de diversas patologias (SCRAFONI et al., 2008), como trombose, inflamação (RABÊLO, 2016), doenças cardiovasculares e degenerativas, incluindo a doença de Alzheimer e câncer (OLSON, 2015; RANASINGHE, 2018). Também é observada sua atuação na área da biotecnologia, sendo utilizado, por exemplo, em processos cromatográficos (PEREIRA, 2007).

Enzimas são catalisadores biológicos indispensáveis à existência da vida, que desempenham funções centrais em processos metabólicos essenciais à manutenção da homeostase além de atuarem em diversos processos industriais (NELSON e COX, 2014). Dentre estas encontram-se às proteases, enzimas que atuam clivando ligações peptídicas entre os resíduos

de aminoácidos das proteínas (WARNER, 2017), são classificadas em cinco grupos: serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina-peptidases.

Estas biomoléculas formam o grupo de enzimas hidrolíticas de maior interesse industrial. Observa-se que o mercado mundial de proteases representa 60% do mercado enzimático (JELLOULI et al., 2009; ABIDI et al., 2011; SOUZA et al., 2015; AZEVEDO et al., 2018). Estas enzimas atuam em diversos setores industriais, com importantes aplicações, por exemplo, nas industriais de detergentes, alimentícia, farmacêutica, de pesquisa química, dentre outras (ORLANDELLI, 2012; ARZU, 2015). Nos vegetais, podem atuar na remoção de proteínas indesejáveis, abundantes, mal dobradas e/ ou danificadas, além de atuarem como componentes essenciais na ativação e maturação de proteínas-chave específicas através de clivagem proteolítica específica (PESQUET, 2012).

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que possuem os resíduos de serina, histidina e aspartato no seu sítio catalítico (NELSON e COX, 2014; MENDES, 2016). Estas biomoléculas são indispensáveis em muitos processos fisiológicos, tais como: digestão de proteínas, coagulação sanguínea, fibrinólise, resposta imune, transdução de sinal, ativação de hormônios (BORGES-VELOSO, 2015).

Dentre as enzimas que compõem a classe das serinoproteases, a tripsina, quimotripsina e elastase, são as três subclasses mais importantes e estudadas. As tripsinas apresentam um resíduo de aspartato no sítio ativo, que atua especificamente na hidrólise de ligações peptídicas dos resíduos de lisina e arginina (YAN, 2015). Estas enzimas são amplamente encontradas nos organismos eucariontes, procariontes e vírus, porém sua existência em vegetais é pouco relatada na literatura.

Mediante as diversas aplicações das serinoproteases, mas precisamente das tripsinas e dos seus inibidores, o presente trabalho tem como principal objetivo identificar a presença de um inibidor de tripsina e purificar uma tripsina símile presente nas sementes da espécie vegetal *Chamaecrista nictitans* (L) *moench*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Fabaceae

Também conhecida como família Leguminaceae, à família Fabaceae, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo classificada como a terceira maior família de plantas terrestres em número de espécies (MATEOS-MARTINS, 2014). São conhecidos aproximadamente 750 gêneros e 19.000 espécies (CHRISTENHUSZ, 2016). O gênero *Chamaecrista* situa-se entre os 10 maiores gêneros desta família. *Astragalus*, *Acácia*, *Indigofera*, *Crotalaria* e *Mimosa*, são classificados como os cinco maiores gêneros que constituem essa família (MAGALLON, 2001; APG, 2016).

Pode ser encontrada em praticamente todas as regiões continentais, com exceção das regiões polares, árticas e antárticas. No Brasil, observa-se maior predominância nas regiões da floresta amazônica e do cerrado, onde possuem espécies exclusivas destes ecossistemas. O território brasileiro consta com aproximadamente 222 gêneros e 2822 espécies (ZAPPI, 2015).

Esta família apresenta três subfamílias com características morfológicas muito distintas: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Faboideae*, também conhecida como *Papilionoideae*. Vale salientar que as mesmas são compostas por espécies vegetais com características bem distintas, englobando desde espécies de árvores de grande porte (tamanho) até pequenas herbáceas, onde a maioria delas apresenta características perenes (JUDD, 2009).

As plantas desta família apresentam inflorescências indeterminadas, podendo, em algumas ocasiões, serem reduzidas a uma única flor. Seus frutos são do tipo legume, normalmente seco e deiscente. Apresentam folhas alternas e flores com sépalas fundidas e cinco pétalas livres (HERENDEEN e WING, 2001).

A literatura descreve sobre sua importância econômica, em decorrência da presença de várias plantas com importância alimentícia, podendo citar o feijão (*Cajanus*), ervilha (*Pisum sativum*), o grão de bico (*Cicer arietinum*), amendoim (*Arachis*) e alfafa (*Medicago sativa*) como as mais utilizadas na culinária (JUDD, 2009). Muitas espécies também são utilizadas na

ornamentação, em indústrias madeira, na fabricação de gomas, corantes, medicamentos, resinas e pesticidas. DA MATA ATAÍDE (2017) cita sobre a importância das enzimas proteolíticas nos processos de germinação dessas espécies, por hidrolizarem as proteínas de reserva sintetizadas durante o crescimento das sementes.

Pesquisas também relatam sua utilização na prática de adubação verde e na alimentação de animais, devido ao alto conteúdo proteico (MOREIRA e BRAGANÇA, 2011). Com relação aos gêneros possuidores de plantas daninhas, destacam-se: *Chamaecrista*, *Senna*, *Abrus*, *Aeschynomene*, *Alysicarpus*, *Crotalaria*, *Desmodium*, *Indigofera*, *Sesbania*, *Zornia*, *Acacia* e *Mimosa*.

### 2.1.1 *Chamaecrista nictitans*

A planta *Chamaecrista nictitans*, também denominada como *Cassia nictitans*, pertence à família vegetal Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae. O gênero possui cerca de 330 espécies, das quais 266 estão localizadas nas Américas (IRWIN e BARNEBY 1982; LEWIS 2005). O território brasileiro conta com aproximadamente 256 destas espécies, distribuídas entre as cinco regiões, sendo a região Nordeste a detentora da maior concentração, apresentando aproximadamente 97 espécies identificadas (CORREIA e CONCEIÇÃO, 2017).

Na Caatinga foram identificadas vinte e nove espécies do gênero *Chamaecrista*. O estado da Bahia está entre os três estados com maior predominância do gênero, sendo considerado o centro de radiação, uma vez que já foram registrados aproximadamente 90 diferentes gêneros de *Chamaecrista* na região (QUEIROZ, 2009).

*C. nictitans* engloba-se no grupo das ervas ou subarbustos, seu comprimento varia entre 10 a 80 cm de altura, suas folhas são alternadas, uniformemente pinadas, com 10 cm de comprimento e 3,0 cm de largura, apresentam flores de coloração amarela, com cinco pétalas, na maioria das vezes, desiguais, seus frutos são em forma de vargens secas e se abrem para liberar sementes (Figura 1), apresentam vida longa e reprodução com curto tempo. Vale salientar sobre sua ampla adequação climática, o que justifica sua

presença em diferentes localizações (LEE, 1989; MILLER e MILLER, 2005; PIER, 2013).

**Figura 1: Partes representativas da *Chamaecrista Nictitans*: A: Partes aéreas; B: Flor; C: Vargens; D: Sementes.**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Conhecida popularmente como “mata pasto, falsa dormideira, peninha ou falsa sensitive”, é classificada como uma planta daninha e invasora e costuma habitar terrenos arenosos, afetando principalmente pastagens, pomares, beira de estradas e terrenos baldios. Infesta uma diversidade de culturas como, arroz, café, cana-de-açúcar, eucalipto, milho, soja, trigo, uva, maçã, pastagens, entre outras (SOUZA, 2015). Vegetal, principalmente, durante o período quente do ano, com florescimento concentrado principalmente durante os meses de março, junho, agosto, setembro e outubro.

Todavia, vale ressaltar que estudos descritos na literatura apontam sobre sua utilização medicinal, uma vez que, já foi constatado que seu extrato bruto apresenta propriedades antivirais, sendo detectada sua ação contra o vírus herpes simplex 1 (HERRERO URIBE e CHAVES OLARTE, 2004). A atividade antiviral também foi estudada por Mateos-Martín et al. (2014), que confirmaram a presença de compostos fenólicos através de experimentos utilizando espectrometria de massa (LC-ESI-MS/M). Carvalho (1996) descreve

sobre sua utilização no tratamento de cálculos renais. *C. nictitans* também é usada para estabilizar solos, fixar nitrogênio ou como forragem.

Não existe, na literatura, nenhum trabalho referente à identificação e caracterização bioquímica das macromoléculas presentes nesta espécie e que pode contribuir com os mecanismos de ações demonstrados pela mesma.

## **2.2 Inibidor de Proteases**

Os inibidores de proteases são compostos que bloqueiam ou reduzem a atividade catalítica de enzimas proteolíticas, são amplamente distribuídos entre plantas, animais e microorganismos (DOKKA, SEVA e DAVULURI, 2015). Dentre os órgãos vegetais que apresentam estas moléculas destacam-se as sementes, por ser a principal fonte de reserva de proteínas, importante para o processo de germinação (GONÇALVES et al., 2002).

A concentração de inibidores em vegetais sofre variações, pois dependem de alguns fatores como, estágio de maturação, localização nos tecidos, tempo de colheita e de armazenamento. Uma característica observada é referente à sua variedade nas plantas, uma vez que, diferentes classes de inibidores podem ser localizados em um único órgão ou tecido vegetal (RIBEIRO, 2010; BRZIN e KIDRIC, 1995).

De acordo com a estabilidade gerada pela sua ligação com a enzima, os inibidores se classificam em reversíveis ou irreversíveis. A inibição irreversível ocorre por meio de ligações covalentes entre a molécula do inibidor e da enzima, alterando de forma definitiva o sítio de ligação ou o sítio catalítico da enzima (NELSON e COX, 2014).

A inibição reversível pode atuar de forma competitiva ou não competitiva. No primeiro caso o inibidor se liga reversivelmente ao mesmo sítio de ligação do substrato, sendo este efeito revertido com o aumento da concentração de substrato. Enquanto que, na inibição não competitiva, o inibidor se liga de forma reversível a enzimas, mas em um sítio próprio de ligação, possibilitando a ligação do substrato a enzimas, todavia é observada uma alteração na conformação da enzima que impede a formação do produto da reação (NELSON e COX, 2014).

Três aspectos podem ser levados em consideração para classificar estas biomoléculas: O mecanismo de reação desenvolvido, sua origem e/ ou sua similaridade. De acordo como o mecanismo desenvolvido, estes podem ser classificados em três grupos: Os que reagem com mais de uma classe de proteases, os específicos para uma das classes e os que apresentam alta especificidade por uma única protease (PERONA e CRAIK, 1995; TREMACOLDI, 2009).

Estas biomoléculas também são agrupadas de acordo com a classe de enzima que conseguem inibir, sendo classificados como inibidores de serinoproteases, cisteínicas, aspárticas e de metalo-proteases, destes, os inibidores de serinoproteases são os mais estudados (RICHARDSON, 1991; RYAN, 1990). A tabela 1 mostra as diferentes classes de inibidores classificados.

**Tabela 1: Famílias de inibidores de proteases**

PROTEASE	CLASSE DO INIBIDOR	FAMÍLIA DO INIBIDOR
<b>Serino</b>	Inibidores de Serinoproteases	Bowman-Birk
		Kunitz
		Batata I
		Batata II
		Superfamília de Cereais
<b>Aspartica</b>	Inibidores de Asparticoproteases	Taumatina
		Ragi I-2/milho
<b>Cisteínica</b>	Inibidores de Cisteínoproteases	Inibidores de Asparticoproteases
<b>Metallo</b>	Inibidores de Metaloproteases	Fitocistatinas
		Inibidores de carboxipeptidases A e B

Fonte: Adaptado de RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991.

### 2.2.1 Inibidores de Serinoproteases

Os inibidores de serinoproteases formam a classe com maior quantidade de inibidores conhecidos e estudados, onde são agrupados de acordo com a similaridade de sequência primária, massa molecular, número de resíduos de cisteína e pontes dissulfeto (TREMACOLDI, 2009).

As serinoproteases podem ser inibidas pelos inibidores diisopropil fosfluoreto (DFP) e fenilmetilsufonilfluoreto (PMSF), já o inibidor de tripsina da soja (SBTI) é específico para as tripsinas (SOUZA, 2018).

Dentre as classes de inibidores de serinoproteases, os das famílias Kunitz e Bowman-Birk, encontrados em todas as subfamílias Leguminosae, são os mais estudados e por esse motivo são os que apresentam maior detalhamento de sua constituição química e funções biológicas (RIBEIRO, 2010).

Os inibidores de Kunitz são proteínas que possuem massa molecular que variam entre 18 e 26 kDa, apresentam 180 resíduos de aminoácidos, e podem apresentar uma ou duas cadeias polipeptídicas, no entanto possuem poucos resíduos de cisteína envolvidos em pontes dissulfeto. A maioria dos inibidores que constituem esta família apresenta apenas um sítio reativo. Todavia, estudos relatam sobre alguns inibidores que foram caracterizados com dois sítios reativos, destes podem citar o inibidor Kunitz, purificado da soja, denominado SKTI, que apresentou alta atividade inibitória sobre a tripsina, mas também foi capaz de suprimir, fracamente, a atividade da quimotripsina, sugerindo a presença de dois sítios reativos na estrutura da proteína (BOSTERLING e QUAST, 1981; NORIOKA, 1988; PATERSON, 2000; VAGADIA, 2017).

Em relação à especificidade, os membros da família Kunitz possuem maior atividade inibitória contra serinoproteases, principalmente tripsina e quimotripsina. Contudo, eles podem inibir outras proteases, incluindo a protease aspártica Catepsina D e a protease cisteínica papaína (HABIB e FAZILI, 2007; RABÊLO, 2016)

O primeiro inibidor de proteases a ser caracterizado foi o de tripsina da soja (KUNITZ, 1947), sendo este isolado, cristalizado e complexado com tripsina de porco, servindo como o primeiro modelo clássico metodológico para a bioquímica de inibidores de proteases. Atualmente, é conhecida a sequência completa de aminoácidos da maioria dos inibidores já identificados (AZARKAN, 2006).

A segunda classe de inibidores de serinoproteases mais estudada é a composta pelos inibidores da família Bowman- Birk, facilmente encontrada em sementes de leguminosas. Esses inibidores são moléculas que possuem baixo peso molecular que varia entre 8 a 10 kDa, possuem uma única cadeia polipeptídica, composta por 14 resíduos de cisteína, responsáveis pela formação de sete ligações dissulfeto intracadeia e apresentam dois sítios

reativos (CHAUDHARY et. al., 2008; SCARAFONI et. al., 2008). Apresentando ação inibitória para tripsina e quimotripsina (BIRK, 1985).

Nos vegetais, os inibidores proteolíticos são metabolicamente importantes, pois além de regularem os processos proteolíticos, também são fontes de reserva e participam dos mecanismos de defesa em plantas, atuando contra o ataque de um grande número de insetos, fungos e outros microorganismos patogênicos (MAGNI et al. 2012; ZHU-SALZMAN, 2015).

A literatura descreve sobre a atuação de metabólitos secundários como inibidores, ou como ativadores na biossíntese de inibidores de proteases, podendo citar, por exemplo, a atuação do metil jasmonico, um metabolito secundário presentes em muitas plantas, ou a sistemina, um peptídeo octadecamérico, observado em muitas células do tomate e atuam nos fatores de herbivoria (Dos SANTOS SOARES, 2007).

Alguns peptídeos também podem atuar como excelentes inibidores, podendo destacar a atuação do inibidor de tripsina SFTI-1, isolado das sementes de girassol, *Helianthus annuus*, classificado como o menor inibidor de protease, constituído por 14 aminoácidos, com uma massa molecular de 1,5 kDa, pertence à família de inibidores do tipo Bowman Birk, é estabilizado por uma ponte dissulfeto e tem como principal característica a vantagem de ser resistente a proteólise (Dos SANTOS SOARES, 2007, PEREIRA, 2007).

Estas biomoléculas podem desempenhar importantes papéis na cura e/ou prevenção de diversas patologias (SCARAFONI et al., 2008), podendo vir a ser ferramentas importantes no tratamento de muitas enfermidades humanas tais como hemorragia, inflamação e câncer (RABÊLO, 2016).

Atualmente, as cinco classes de proteases são aplicadas para o desenvolvimento de fármacos. Dentre as quais, a inibição das serinopeptidases tem sido alvo de muitos estudos, pois demonstra um alto potencial no combate a doenças inflamatórias como asma e artrite reumatóide, além da atuação sobre a cascata de coagulação sanguínea, sendo isolados, purificados e caracterizados a partir de várias fontes vegetais (OLSON, 2015; DOKKA, SEVA e DAVULURI, 2015).

Vários estudos demonstram que a inibição de proteases é uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de diversas enfermidades, podendo atuar nas infecções virais e parasitárias; nas condições

inflamatórias, imunológicas e respiratórias (SONG, 1999; DOUMAS; KOLOKOTRONIS e STEFANOPOULOS, 2005; BERMÚDEZ-HUMARÁN, 2015; CHAN, 2017), e desordens cardiovasculares e degenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, e câncer (OLSON, 2015; RANASINGHE, 2018). Também é observado que as mesmas apresentam ação antimicrobiana (DOUMAS; KOLOKOTRONIS; STEFANOPOULOS, 2005; BARANGER, 2008, SATHEESH, 2011) e antifúngica (TERRA, 1993; JOSHI, 1998, BARANGER, 2008).

Por regularem os processos que envolvem proteases, tais como, a quebra de proteínas intracelulares, transcrição, ciclo celular, invasão celular e apoptose, através da degradação seletiva de substratos alvo, estas biomoléculas são utilizadas no tratamento de diversas patologias (COLARES, 2017).

Os inibidores de proteases também apresentam atuação na área da biotecnologia, sendo utilizado, por exemplo, em processos cromatográficos, como ligantes em cromatografias de afinidades, para purificação de proteínas (PEREIRA, 2007).

Outra biomolécula essencial para a manutenção e desenvolvimento dos organismos vivos são as enzimas, caracterizadas como catalisadores biológicos. Abaixo está descrito algumas informações sobre estas moléculas biológicas.

### **2.3 Enzimas**

Muitos processos químicos ocorrem de forma espontânea, outros, no entanto, necessitam da presença de catalisadores para obter maior eficiência reacional. Estas moléculas diminuem a barreira energética necessária para a formação do produto, através da interação que ocorre entre o catalisador e o substrato no seu estado de transição (ILLANES, 2008; SILVA, 2013).

Os organismos vivos também realizam processos reacionais, mas comumente denominados de processos metabólicos, necessários para sustentação da vida. Para um maior e melhor desenvolvimento das reações bioquímicas torna-se necessário a presença de catalisadores biológicos, intitulados de enzimas, que apresentam elevada especificidade.

Estas macromoléculas são indispensáveis à existência da vida sob diferentes aspectos, uma vez que, desempenham funções centrais em processos metabólicos essenciais à manutenção da homeostase e dinâmica celular, além de atuarem em diversos processos industriais (NELSON e COX, 2014).

Com exceção de um pequeno grupo de RNAs, denominados como ribozimas, todas as enzimas são classificadas como proteínas. Oliveira (2015) cita que estas biomoléculas evoluíram para preservar e executar, de forma eficiente, a funcionalidade e a integridade dos sistemas biológicos. Por serem específicas a cada substrato, as enzimas atuam na catálise de reações biológicas, regulando a velocidade das reações, sem alterar sua própria estrutura e aceleram a velocidade da reação (MONTEIRO et al., 2009).

Para desenvolverem boa atividade catalítica, as enzimas necessitam manter a integridade da sua conformação proteica nativa. Desta forma a atividade catalítica tende a ser perdida ou diminuída caso estas moléculas sejam desnaturadas ou dissociadas em subunidades. Por esse motivo, diz-se que as estruturas proteicas primárias, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para o desenvolvimento das funções desempenhadas pelas mesmas (FEDATTO, 2004).

Devido ao crescente número de enzimas descobertas nas últimas décadas, a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) adotou uma normativa de nomenclatura das enzimas, sendo estas classificadas de acordo com as funções desempenhadas. Mediante ao tipo de reação química que catalisam, estas biomoléculas se classificam em seis classes, como descritas na tabela 2.

**Tabela 2: Classificação das enzimas de acordo com a reação catalisada.**

CLASSE ENZIMÁTICA		ATUAÇÃO
<b>Classe 1</b>	Hidrolases	Quebram ligações por meio de adição de moléculas de água.
<b>Classe 2</b>	Oxirredutases	Catalisam reações de oxiredução.
<b>Classe 3</b>	Transferase	Transferem grupos químicos entre moléculas.
<b>Classe 4</b>	Liases	Removem água, amônia e dióxido de carbono através da quebra de ligações duplas.
<b>Classe 5</b>	Ligases	Ligam substratos para gerar produtos.
<b>Classe 6</b>	Isomerases	Transformam uma molécula em seu isômero.

Fonte: NELSON; COX, (2014)

### 2.3.1 Fontes alternativas de proteases

Segundo Li e colaboradores (2013), as proteases constituem uma classe de enzimas com elevada importância, pois apresentam muitas aplicações comerciais e fisiológicas, sendo classificadas como a maior família de enzimas, compondo uma estimativa de 2% do genoma humano. Proteases, também conhecidas como proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas são classificadas como biocatalisadores que atuam clivando ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, através de reações de hidrólise (SANTOS, 2016).

Estas biomoléculas atuam não somente na hidrólise de dieta protéica, mas também são indispensáveis na organização e manutenção das funções fisiológicas dos mais diversos organismos vivos, tornando-se essenciais no desenvolvimento das funções metabólicas e regulatórias. Atuam, por exemplo, nas rotas metabólicas de proteínas, na coagulação sanguínea, no crescimento e na migração de células, na formação de tecidos, em processos inflamatórios, e auxiliam no transporte de proteínas através das membranas (WARNER, 2017).

As proteases também atuam nos mecanismos invasivos de tumores e de infecção de vírus e microorganismos patogênicos, podendo citar, por exemplo, herpes (AOKI et al., 1995), AIDS (KAPLAN et al., 1993), e doença de Alzheimer (ESTEVE, 2017). Estas características as tornam alvos para utilização em produtos tecnológicos.

Com o desenvolvimento tecnológico, vários campos da biotecnologia ganharam maior atenção. A proteômica, por exemplo, passou a ser uma tecnologia utilizada para agregar valor, funcionalidade e expandir o leque de aplicações de materiais com pouca utilização convencional, subprodutos e resíduos de setores industriais (SILVA, 2013). A tabela 3 mostra a origem de algumas proteases e suas possíveis aplicações industriais.

**Tabela 3: Fontes de proteases e aplicações industriais.**

<b>FONTE</b>	<b>ENZIMA</b>	<b>APLICAÇÃO INDUSTRIAL</b>
<b>Animal</b>	Tripsina, quimiotripsina, elastase	Indústria de medicamentos, de couro, alimentícia, hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
<b>Vegetal</b>	Papaína, ficina e bromelina	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, medicamentos e amaciantes de carne.
<b><i>Aspergillus oryzae</i></b>	Proteases ácida e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria de cervejeira e de panificação.
<b><i>Aspergillus melleus</i>, <i>Endothia parasítica</i>, <i>Mucor miechei</i> e <i>Mucor pusillus</i>.</b>	Proteases alcalinas	Coagulação do leite para produção de queijo
<b><i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i></b>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescado e derivados lácteos.
<b><i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i></b>	Proteases neutras	Produção de bebidas e panificação

Fonte: Adaptado de Giongo (2006)

As proteases formam a classe de enzimas mais comercializadas mundialmente e podem ser oriundas de fontes vegetais, animais ou microbianas. Uma das primeiras aplicações destas enzimas foi na produção de queijo, utilizando, inicialmente sumo de plantas e posteriormente extrato de estômago de animais (RAWLINGS et al., 2007). Além da produção de queijo e derivados do leite, as proteases são também aplicadas nas indústrias de alimentos, têxtil, couro, farmacêutica, cosmético, bem como na formulação de detergente e nos processos de biorremediação (de SOUZA, 2016).

É observado um crescente número de estudos sobre isolamento e caracterização de proteases vegetais, e estes demonstram várias atuações dessas enzimas no desenvolvimento e manutenção das plantas, tais como na germinação de sementes, favorecendo o crescimento e desenvolvimento de plântulas e atuam na renovação de proteínas (RICHARDSON, 1991; TREMACOLDI, 2009).

O uso industrial de proteases animais data o final do século XIX e início do século XX, com a utilização das seguintes enzimas: tripsina, na indústria de detergentes; pectinases, na indústria dos insumos industriais e glucoamilase, na produção de dextrose a partir do amido (FEDATTO, 2004).

Muitos mamíferos, tais como os bovinos, suínos ou ovinos, são grandes produtores de proteases animais. Contudo, em decorrência das exigências industriais, principalmente com relação ao custo financeiro e ao lucro, têm-se buscado outras fontes para extração dessas enzimas (CAPRARA, 2015).

As vísceras de peixes são fonte de enzimas proteolíticas, e estudos relatam vantagens sobre seu uso em processos industriais, pois podem apresentar baixo custo, caso sejam manejadas corretamente (VOJCIC et al., 2015; SANTOS, 2016).

As peptidases de origem microbiana são as mais utilizadas em processos industriais devido as suas características e facilidade de obtenção. Sua produção é beneficiada por alguns fatores, tais como: seu pequeno tempo de geração, a diversidade e facilidade de manipulação fisiológica e genética desses seres vivos (VERMELHO et al., 2008; DE CASTRO et al., 2015). Todavia, mesmo apresentando maiores custos de produção em comparação com as proteases de origem microbiana, as indústrias farmacêuticas e de alimentos priorizam em muitos processos as proteases vegetais, visto que estas apresentam aspectos vantajosos, dos quais pode citar a diminuição relacionada a problemas com patogenicidade (HOU et al., 2017).

Em decorrência dos avanços das pesquisas que visam estudar e desvendar as características catalíticas destas enzimas, sua utilização, em processos biotecnológicos, vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas, podendo ser observada sua aplicação nas indústrias de detergentes, bebidas, alimentos, processamento de couros, têxtil, medicamentos e química fina, (FEDATTO, 2004; CAPRARA, 2015). Também se mostram importante para os setores ambientais, pois diferentemente dos catalisadores inorgânicos, estas não apresentam aspectos negativos para o meio ambiente e os seres vivos, por serem biodegradáveis (TREMACOLDI, 2009).

### 2.3.2 Proteases vegetais

As atividades expressas por enzimas proteolíticas são essenciais nos processos de manutenção do metabolismo e desenvolvimento de todo organismo vivo. Nos vegetais, estas enzimas são importantes por removerem proteínas indesejáveis, abundantes, mal dobradas e/ ou danificadas, bem como

por atuarem na ativação e maturação de proteínas específicas através de clivagem proteolítica (PESQUET, 2012).

Estas enzimas apresentam muitas aplicações nos vegetais, uma vez que é observada sua ação durante vários processos metabólicos importantes para o desenvolvimento da espécie, podendo destacar sua atuação durante a etapa de germinação da planta, pois ativam processos metabólicos, e na mobilização de proteínas, para fornecer nutrientes tais como nitrogênio e enxofre, necessários para as vias de biossíntese (PESQUET 2012).

Mckee (1962) descreve que os primeiros dados publicados referentes à atividade proteolítica, em plantas, ocorreram no fim da década de 70, todavia imagina-se que tais processos já ocorriam anteriormente, quando as pessoas utilizavam folha e látex de plantas como amaciantes de carnes.

Estudos descritos na literatura mostram o isolamento de proteases de frutos e látex de várias plantas, tais como papaína, bromelina, ficina e quimopapaína. Dentre os processos fisiológicos desempenhados por essas biomoléculas, a germinação de sementes apresenta maiores registros de pesquisas. Também são encontrados relatos sobre a presença de proteases em folhas, flores e frutos de várias espécies vegetais (TREMACOLDI, 2009; PESQUET, 2012). As enzimas proteolíticas de origem vegetal que denotam maior interesse de estudo são a papaína, extraída do látex do mamão; a bromelina, presente no abacaxi; e a queratinase, produzida por alguns grupos botânicos (TREMACOLDI, 2009).

É observada ampla comercialização de proteases cisteínicas de origem vegetal, tais como papaína, bromelina e ficina, utilizadas na indústria alimentícia, como aditivos, para processos como fermentação, precipitação do leite e alisamento de carne, podendo também ser usadas na preparação de hidrolisados de proteínas, altamente solúveis, para indústria de queijo e bebidas (ALICI e ARABACI, 2018).

### 2.3.3 Utilização de proteases na área biotecnológica

Em virtude do grande avanço tecnológico e a crescente procura por produtos industrializados, tem-se observado um aumento considerável nas

pesquisas que buscam desenvolver técnicas e/ ou métodos que possibilitem maior produção industrial (SOUZA, 2010).

Um critério fundamental que deve ser observado, nos campos que utilizam biocatálise, é a estabilidade da enzima frente a distintas faixas de pH e temperatura, pois a atividade enzimática necessária para catalisar uma reação química é estritamente dependente da sua estrutura terciária, sendo assim, sua função catalítica depende dos resíduos de aminoácidos presentes na estrutura tridimensional, assim como das interações existentes entre estes. (ILLANES, 2008; SILVA, 2013).

O uso de enzimas em processos tecnológicos é apontado como uma alternativa que tende a aumentar a produção e conseqüentemente gerar maior percentual de lucro para as empresas, uma vez que, estas macromoléculas apresentam características favoráveis para a reação, das quais destaca-se a alta especificidade pelo substrato, que favorece a diminuição da energia de ativação e conseqüentemente aumenta a velocidade reacional, também é observado que não são gerados produtos intermediários, diferente do que acontece com o uso de catalisadores sintéticos (BOUGATEF, 2013).

Além do aspecto econômico, melhorias ambientais também são observadas a partir da substituição de catalisadores sintéticos por enzimas. Neste contexto podemos citar a adição de proteases na formulação de detergentes, assegurando melhor qualidade ao produto, em decorrência da grande interação existente entre a enzima e o substrato hidrolisável (SANTOS, 2016).

As peptidases executam ampla variedade de funções nos mais diversos setores industriais, com importantes aplicações na formulação de detergentes, na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, de cosméticos e de produtos de higiene pessoal, bem como em rações para animais, papel, pesquisas biotecnológicas e processos de biorremediação. O mercado mundial de proteases representa 60% do mercado de enzimas (JELLOULI et al., 2009). Nessa perspectiva, as proteases são o principal grupo de enzimas utilizadas, devido a seu extenso leque de aplicações (ORLANDELLI, 2012; ARZU, 2015).

Dentre os vários setores industriais que fazem uso de proteases, destacam-se as indústrias de detergentes e o setor de alimentos e bebidas, que se mostram como os maiores setores de crescimento na demanda por

peptidases para os próximos últimos anos (RAO, 1998; CAPRARA, 2015; SANTOS, 2016). Estes, por sua vez, buscam enzimas que atendam aos critérios exigidos, tais como: especificidade e estabilidade ao pH, temperatura e agentes químicos (GESSESSE, 2003).

### 2.3.3.1 Indústria de detergentes

Os detergentes são compostos por moléculas anfipáticas, desta forma são formados por uma porção apolar, constituída de uma cadeia longa com extremidade hidrofóbica, e outra polar e hidrofílica (BOUACEM, 2015).

Os primeiros relatos sobre a utilização de proteases em detergentes datam de 1913, onde estes eram formados a partir de uma mistura de carbonato de sódio e extrato de pâncreas (RAO, 1998). Maurer (2004) cita que atualmente o maior percentual de proteases é de origem microbiana e seu uso teve início a partir de 1956 com a utilização da enzima proteolítica presente na bactéria *Bacillus licheniformis*, a subtilisina, que atua na remoção de manchas específicas, buscando degradar os resíduos orgânicos de origem proteica (SANTOS, 2016; SANTOS, 2018).

Este setor industrial corresponde ao maior segmento que utiliza enzimas como aditivos, correspondendo aproximadamente 25% do total das vendas mundiais de enzimas (SAVITHA, 2011). Estas enzimas apresentam tal aplicabilidade, pois facilitam a remoção de manchas de gorduras, normalmente ligadas a resíduos proteicos ou derivadas de sangue, carne e leite, além de ser biodegradável, o que possibilita um maior desempenho e conseqüentemente reduzem o custo do processo (da SILVA ESPÓSITO, 2010; SANTOS, 2016). Atualmente, cerca de 80% dos detergentes comercializados apresentam, pelo menos, uma enzima proteolítica como aditivo biotecnológico (SANTOS, 2016).

Para a utilização de proteases na formulação de detergentes é necessário que as mesmas possuam atividade enzimática significativa e estabilidade dentro de uma ampla faixa de pH e temperatura, além de serem compatíveis com os vários componentes do detergente, juntamente com agentes oxidantes e sequestrantes, também deve ser verificada a concentração necessária para desenvolver uma atividade enzimática (BOUACEM, 2015, SANTOS, 2018).

A adição de enzimas proteolíticas na formulação de detergentes apresenta muitas vantagens, podendo destacar, a alta economia energética e baixa emissão de gás carbônico, pois substituem os agentes surfactantes, além de serem biodegradáveis. Com uso desses biocatalisadores, a temperatura de lavagem pode ser reduzida cerca de 50, aproximadamente (SANTOS, 2016).

#### 2.3.3.2 Indústria de alimentos

A utilização destas enzimas possibilita melhorias no processamento de alimentos, pois melhoram o valor nutricional e funcional, uma vez que são obtidas maior absorção e modificações da textura e sabor do produto, também são observadas melhoria na capacidade antioxidante (VAN BOEKEL, 2010). Nos setores alimentícios, as proteases são usadas no processamento de laticínios, massas, fabricação de pães e hidrolisados proteicos. Também atuam como amaciantes de carnes, hidrolisando proteínas do tecido conjuntivo e das fibras musculares (SAVITHA, 2011).

As proteases atuam na produção de queijos, prevenindo a coagulação do leite durante a produção, pois as mesmas hidrolisam a caseína, proteína do leite. Observa-se um aumento considerável no uso destas biomoléculas nos processos de fabricação de cervejas, sendo utilizadas para reduzir a viscosidade (WARD, RAO e KULKARNI, 2009).

Assim como na indústria de detergentes, o uso de enzimas proteolíticas nas indústrias alimentícias contribui de forma significativa para o melhoramento econômico da empresa, pois tende a agregar valor, funcionalidade e aplicabilidade de produtos sem valor comercial, tendo em vista que estas biomoléculas possuem características não vistas nos demais agentes químicos utilizados. Dentre as características podemos citar: especificidade, ausência de toxicidade e baixas concentrações (LLORENTE et al., 2014).

#### 2.3.3.3 Indústria farmacêutica

As proteases têm um lugar importante em aplicações farmacêuticas, visto que muitos extratos vegetais, constituídos de quantidades elevada enzimas proteolíticas, têm sido usados há muito tempo como composto em

remédio. É sabido que estas biomoléculas são utilizadas em diversos processos farmacológicos para fins terapêuticos, atuando na regulação de diversos processos fisiológicos, os quais podem citar a atuação das seguintes enzimas: a plasmina, enzima presente no sangue que degrada muitas proteínas do plasma sanguíneo, mais notavelmente os coágulos de fibrina. A pepsina, quimotripsina e tripsina, enzimas digestivas que auxiliam na digestão, sendo estas utilizadas na composição de fármacos que buscam atender essa necessidade (MONTEIRO et al., 2009). A bromelina é empregada em processos inflamatórios, digestão e tratamento auxiliar de queimaduras de grau elevado e a papaína é utilizada na digestão, principalmente em pacientes com dispepsia crônica e gastrite (RAY, 2012; JISHA et al., 2013; CRAIK et al., 2011).

As peptidases têm sido usadas no tratamento de muitas enfermidades delicadas, tais como, no tratamento de infarto agudo do miocárdio e outras doenças relacionadas à formação de coágulos sanguíneos. Também são utilizados na formulação de trombolíticos, fármacos empregados para dissolver os trombos (BALAMI et al., 2013; SANTOS, 2018 ).

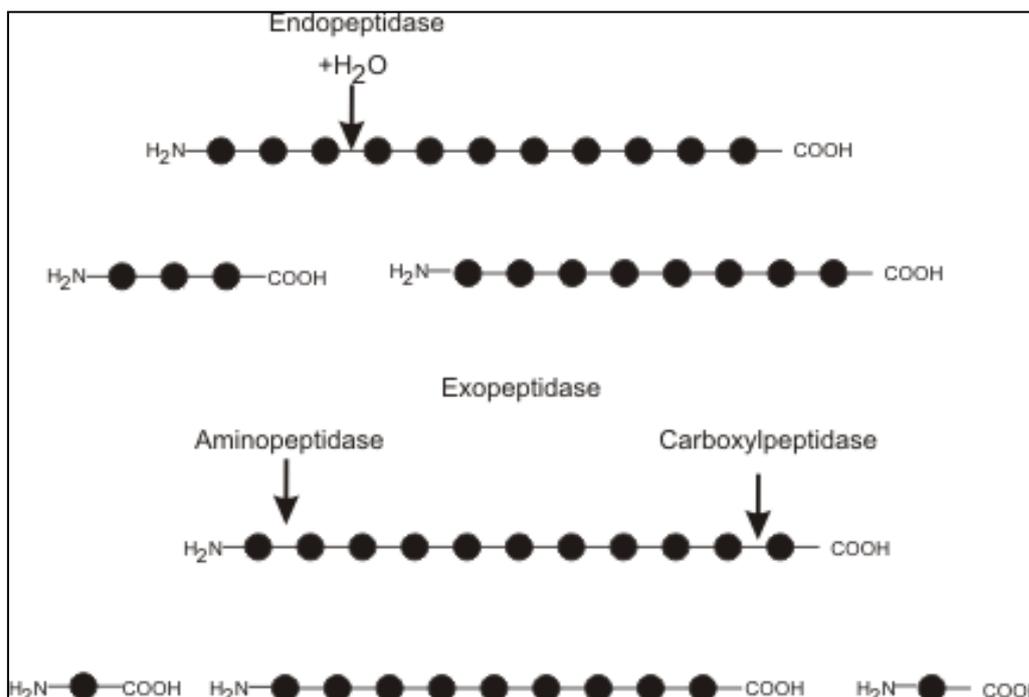
#### 2.3.4 Classificação das proteases

As proteases são classificadas de acordo com alguns critérios, tais como: tipo de reação catalisada e natureza química do sítio (VERMELHO et al., 2008).

De acordo com o Comitê Internacional de Enzimas (Enzyme Commission) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, estas enzimas pertencem à classe das hidrolases (3), pois utilizam água no processo de clivagem, e a subclasse das peptídeo-hidrolases (3.4) ou peptidases, por atuarem na clivagem de ligações peptídicas.

Com relação a sua atuação em relação à posição de clivagem das ligações peptídicas, as mesmas são classificadas em exopeptidases e endopeptidases (Figura 2).

**Figura 2: Esquema mostrando a atuação das Peptidases.**



Fonte: adaptado de [cursobioquimica.iq.usp.br](http://cursobioquimica.iq.usp.br)

As endopeptidases são enzimas que clivam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, enquanto que as exopeptidases clivam ligações peptídicas localizadas nas regiões finais da cadeia. Esta última é subdividida em aminopeptidases, as que agem na região N-terminal da proteína e as carboxipeptidases, que atuam na região C-terminal (FEDATTO, 2004).

As hidrolases-peptidases também podem ser classificadas, levando em consideração os grupos químicos presentes no sítio ativo envolvidos no mecanismo catalítico. As carboxipeptidases são subdivididas em serina, metalo e cisteína-carboxipeptidases. Enquanto, as endopeptidases são subdivididas em serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina-endopeptidases. A Tabela 4 apresenta a classificação das proteases baseada na estrutura química do sítio ativo, onde também são mostradas as proteases cujas suas estruturas de atuação ainda não foram elucidadas, sendo classificadas em um subgrupo específico (VERMELHO et al., 2008).

**Tabela 4: Classificação de proteases de acordo com o sítio ativo catalítico.**

PROTEASES	EC SUBCLASSES
<b>Carboxipeptidases</b>	
Serina	3.4.16
Metalo	3.4.17
Cisteína	3.4.18
<b>Endopeptidases</b>	
Serina	3.4.21
Cisteína	3.4.22
Aspártico	3.4.23
Metalo	3.4.24
Treonina	3.4.25
Endopeptidases com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

Fonte: Adaptado de ZANIM; MORAES, (2004).

Com relação à atuação em diferentes pHs, as proteases são classificadas em ácidas, básicas e neutras. As ácidas incluem as aspárticos-proteases, que apresentam atividade ótima na faixa de pH entre 2,0 a 6,0. As peptidases neutras são representadas pelos grupos das cisteíno-proteases, metalo-proteases e algumas serino-proteases e atuam nos pHs entre 6,0 a 8,0, enquanto as peptidases básicas apresentam maior atividade na faixa de pH de 8,0 a 13,0 e possuem como principais representantes as serino-proteases (MENDES, 2016).

### 2.3.5 Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que possuem os resíduos de serina, histidina e aspartato no seu sítio catalítico. O resíduo de serina, presente nestas enzimas, desempenha um papel fundamental no processo de hidrólise, agindo como nucleófilo, o aspartato como eletrófilo e a histidina como base (Nelson e Cox, 2014).

Estas, por sua vez, formam a maior superfamília das peptidases, sua presença é observada em diversos organismos, desde vírus e bactérias até eucarióticos (RAWLINGS, BARRETT, 1994). São possuidoras do maior percentual de famílias identificadas e caracterizadas, sendo agrupadas segundo sua similaridade estrutural e evidências funcionais (PAGE; DI CERA, 2008).

Os inibidores mais comumente utilizados para inativar ou reduzir a ação da serina presente no sítio ativo são PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) e DFP (Diisopropil fluorofosfato), sendo estes usados em ensaios de inibição enzimáticos para constatar a presença de enzimas do tipo serinoproteases (REIS, 2009; SANTOS, 2018).

Estas biomoléculas são indispensáveis em muitos processos fisiológicos, tais como: digestão de proteínas, coagulação sanguínea, fibrinólise, imunidade, transdução de sinal, ativação de hormônios (BORGES-VELOSO, 2015). A tabela abaixo (Tabela 5) demonstra algumas das enzimas pertencentes a esta família, juntamente com seus resíduos catalíticos.

**Tabela 5: Diversidade de serino peptidase e resíduos presentes no sítio ativo**

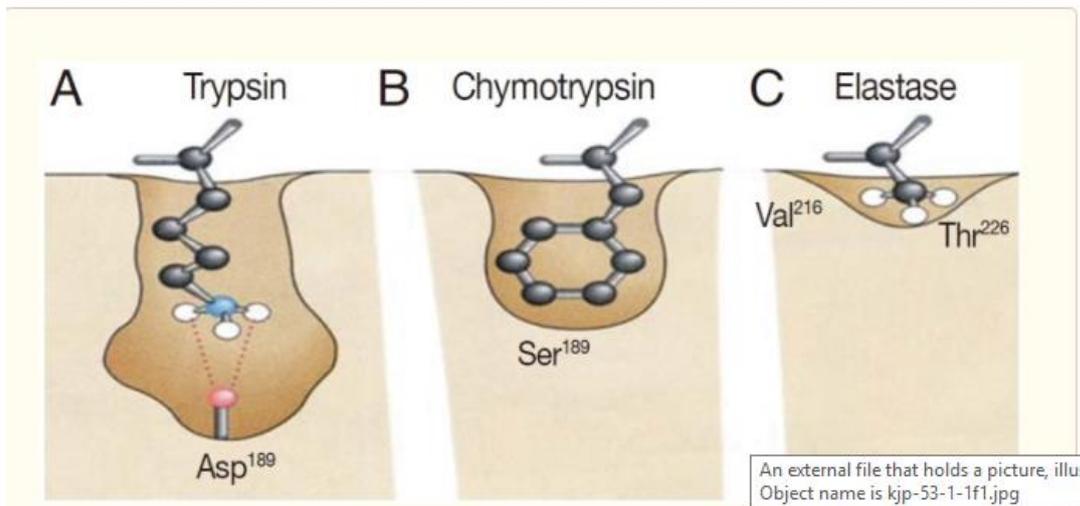
ENZIMA	RESÍDUOS CATALÍTICOS
Tripsina	His, Asp, Ser
Quimotripsina	Ser, His, Asp
Elastase	His, Asp, Ser
Subtilisina	Asp, His, Ser
Prolil oligopeptidase	Ser, Asp, His
Lex A peptidase	Ser, Lys, His
A ala- D ala carboxipeptidase	Ser, Lys
Citomegalovírus	His, Ser, His
Lon peptidase	Ser, Lys
Clp peptidase	Ser, His, Asp
Amino peptidase Dmp A	Ser
L, D- carboxipeptidase	Ser, Glu, His
Rhomboid	His, Ser
Lactoferrin	Lys, Ser

Fonte: Adaptada de PAGE; DI CERA, 2008.

#### 2.3.5.1 Tripsina

A depender da especificidade com seus substratos, as serinoproteases podem ser subdivididas em subclasses, dentre estas é observado a existência de três principais: tripsina, quimotripsina e elastase (Figura 3). A maioria dos membros das serinoproteases possui três resíduos fundamentais nos seus sítios ativos: uma serina (Ser), uma histidina (His) e um aspartato (Asp) (SHARIFLOO, 2018).

**Figura 3: Resíduos presentes no sítio ativo das serinoproteases.**



Fonte: YANG, 2015.

A tripsina (3.4.21.4) contém um resíduo de aspartato (Asp) carregado negativamente no sítio ativo, que atua especificamente na hidrólise de ligações peptídicas dos resíduos de lisina (Lys) e arginina (Arg), aminoácidos carregados positivamente, presentes na extremidade carboxiterminal. Estas enzimas apresentam um peso molecular que varia de 22 a 30 KDa (YAN, 2015).

A quimotripsina apresenta especificidade para ligações peptídicas possuidoras de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na cadeia lateral, como a fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr) e Triptofano (Trp). Enquanto a elastase, por possuir um sítio ativo menor, torna-se específica para clivar ligações formadas por resíduos pequenos e neutros, tais como alanina (Ala), glicina (Gly) e valina (Val), em decorrência de seu sítio ativo ser formado por resíduos de arginina (Arg) e lisina (Lys) (BIBO-VERDUGO, 2015).

A presença de tripsina em pacientes submetidos à pancreatemia levou à investigação da sua produção em outros locais do corpo humano (ITKONEN et al., 1996). Atualmente, é documentada a presença de tripsina, em menor concentração, em células epiteliais da pele, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon, pulmão, rim, fígado, ductos biliares, bem como em leucócitos e células esplênicas e neuronais (KOSHIKAWA et al., 1998). Atualmente são caracterizadas quatro isoformas de tripsogênio, onde três estão dispostas nas células epiteliais e uma encontrada no cérebro, apresentando grande homologia (WIEGAND et al., 1993).

Vale resaltar que a presença de tripsina em vegetais é algo novo e com poucos relatos na literatura, por esse motivo ainda não se tem detalhamento sobre a sua atuação nos vegetais, apenas sugestões que afirmam que sua atuação pode está ligada aos processos de germinação e crescimento, para a aquisição de material de origem protéica durante o desenvolvimento da planta (SHAMSI, 2017; NISHIKATA, 1984).

A estrutura terciária da tripsina é constituída unicamente por uma cadeia polipeptídica, possuidora de dois domínios de estruturas similares unidos de forma assimétrica, possuindo uma interface que forma a tríade catalítica (His, Asp e Ser) (REIS 2009). A Figura 4 mostra a representação da estrutura tridimensional da tripsina, onde se observa a presença de dois domínios na estrutura terciária desta enzima, um representado em azul escuro (1-105 aa), e o outro domínio em vermelho (106-223 aa). A porção N-terminal da molécula é mostrada em laranja, e C-terminal em cor azul claro. A tríade catalítica é constituída por Serina (Ser) em amarelo; Histidina (His) em lilás e Aspartato (Asp) em verde (REIS, 2009; SANTOS, 2016).

**Figura 4: Estrutura tridimensional da tripsina bovina**



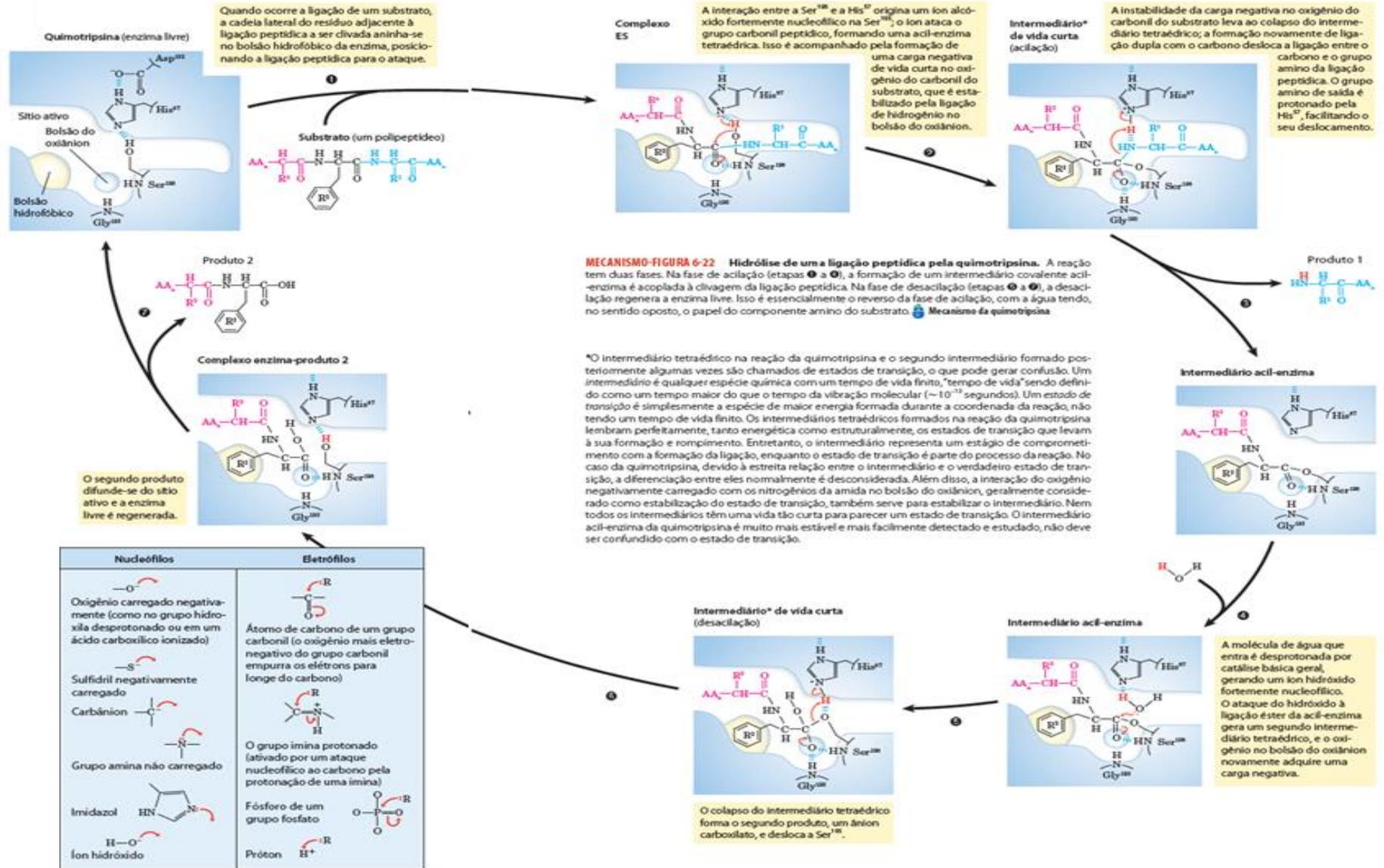
Fonte: Adaptado de REIS, 2009

A tripsina é uma enzima indispensável no processo de digestão alimentar. Os alimentos previamente digeridos pela pepsina, ao chegarem ao intestino, impulsionam a liberação do zimogênio da tripsina, o tripsinogênio, que é clivado através da ação de enteropeptidases, liberando-o na sua forma ativa, a tripsina, que por sua vez irá dar continuidade a hidrólise das proteínas (STRYER, BERG e TYMOZKO, 2006). Além de atuar hidrolisando as proteínas da dieta, a tripsina atua ativando as outras enzimas, inclusive seu zimogênio (BANIK e PRAKASH, 2004).

Vale salientar sobre a necessidade da tripsina se manter inativada, sendo disponibilizada apenas quando necessário para a atuação nas funções fisiológicas, pois caso contrário ocorreria à autólise enzimática e conseqüentemente impulsionaria o desenvolvimento de patologias como a pancreatite (SAHIN-TOTH, 2006).

O mecanismo de ação da tripsina ocorre através de duas fases: uma de acilação, onde a ligação peptídica é quebrada e uma ligação éster é formada entre o carbono de carbonila e a enzima, e outra fase de desacilação: a ligação éster é hidrolisada e a enzima não-acilada é regenerada (Figura 5). Para tanto, inicialmente ocorre o acoplamento do sítio ativo da enzima ao substrato através de um ataque nucleofílico promovido pelo resíduo de serina ao grupo carbonila da ligação peptídica do substrato. Em seguida este ataque nucleofílico irá instabilizar o oxigênio do grupo carbonila, que ganhará uma carga negativa por um curto período, este é estabilizado pelo hidrogênio do bolsão oxianion. Isto levará ao colapso do intermediário tetraédrico e a formação do complexo acil-enzima. Logo após o grupo amino irá se dissociar da cadeia, formando o primeiro produto da hidrólise. Em seguida a água entrará no sítio ativo para promover um ataque nucleofílico promovendo a formação de um novo complexo acil-enzima para dissociação do grupo carboxil, o segundo produto da hidrólise (HEDSTROM, 2002).

Figura 5: Mecanismo de ação da tripsina



Fonte: NELSON e COX, 2014

A utilização de tripsina em produtos industrializados data de muitos anos atrás e dentre os processos enzimáticos que utilizam a tripsina, pode-se citar sua inclusão na formulação do detergente e outros produtos de limpeza (BANIK; PRAKASH, 2004), sendo que, segundo os relatos descritos na literatura, sua primeira aplicação, ocorreu por volta de 1913, pelo químico alemão Otto Röhm (HERBOTS et al., 2008; VOJCIC et al, 2015; SANTOS, 2016). Esta enzima também apresenta aplicabilidade nos setores farmacológicos e de análise química (GUPTA, BEG e LORENZ, 2002; GUDMUNDSDÓTTIR, HILMARSSON, e STEFANSSON, 2013; MENDES, 2016). Vários fatores favorecem o uso de tripsinas na indústria de detergentes, podendo priorizar: Bom desempenho da enzima em pH alcalino e em diferentes temperaturas (NIYONZIMA, 2015).

Estas biomoléculas também são empregadas em processos químicos, sendo observada sua aplicação nas análises de espectrometria de massas. Este método é empregado para determinar a massa molecular de proteínas, além de possibilitar o sequenciamento dos aminoácidos que constituem a estrutura primária que formam a cadeia polipeptídica. Para tanto é necessário que as bandas protéicas presentes no gel de eletroforese sejam hidrolisadas, através de um tratamento enzimático, com tripsina. A partir da análise dos sinais gerados é possível correlacionar os resultados obtidos com bancos de dados presentes na literatura, e então determinar a massa, a classe e subclasse da proteína de interesse (UPADHYAY et al., 2015; BAJAJ et al., 2015).

A tripsina também vem sendo utilizada no setor farmacológico, associada a outras moléculas, como suplemento alimentar, ou como compostos terapêuticos usados no tratamento de doenças pancreática (KIM, 2014), ou ainda para degradar proteínas bacterianas e virais como demonstrado nos estudos com tripsina do Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) que mostrou eficiência contra o Herpes vírus tipo 1 e o vírus da influenza (GUDMUNDSDÓTTIR, HILMARSSON e STEFANSSON, 2013).

Nas últimas décadas têm se observado um alto interesse em estudos que buscam isolar e caracterizar essas enzimas oriundas de fontes alternativas, que possam substituir ou complementar as tripsinas bovinas, ovinas e/ ou suínas, muito comercializadas (FRANÇA, 2013; BOUGATEF et al,

2013). É visto na literatura inúmeros trabalhos referentes a isolamentos e caracterização de tripsinas advindas de fontes sem valor econômico aplicável, tais como vísceras de peixes e resíduos de animais aquáticos, insetos e alguns répteis (SHAMSI, 2017; SANTOS, 2016; SANTOS, 2018). Todavia, é observada uma escassez nos trabalhos referente à purificação destas enzimas em espécies vegetais.

## **2.4 Purificação de proteínas**

Para a obtenção de bons resultados nos processos de purificação é necessário procurar métodos que busquem preservar a concentração proteica durante as etapas de extração, isolamento e purificação, além de fornecer um ambiente estabilizador para a proteína de interesse, neste caso a enzima, e evitar a rápida perda da atividade catalítica (NELSON e COX, 2014).

Para avaliar as características bioquímicas e possíveis funções biológicas de uma proteína é necessário realizar sua separação dos demais constituintes da amostra (células, órgãos ou tecidos de material biológico). Na etapa inicial é de extrema importância realizar a escolha correta do método de extração, optando por metodologias que não perturbem a integridade estrutural da molécula que será estudada (SOUZA, 2018).

Critérios como temperatura e formas de extração devem ser observados, visto que as proteínas podem se desnaturar em temperaturas elevadas e na presença de tampão inadequados.

Durante o processo de purificação, o extrato bruto precisa passar por metodologias que possibilitem eliminar o maior número de contaminantes (moléculas indesejáveis) da solução, o que favorecerá o processo de purificação. Muitos métodos têm sido utilizados para este fim, dentre os quais pode-se mencionar os processos de fracionamentos realizados, como uma etapa de pré-purificação das proteínas oriundas de fontes animal, vegetal ou microbiana (CAPRARA, 2015).

Após passar por processo de centrifugação, o extrato bruto é submetido a etapas de fracionamento, também conhecido como método de precipitação, que visam separar a amostra em diferentes frações, a fim de concentrar a proteína alvo em uma única fração. Dentre os métodos utilizados para a

precipitação de proteínas pode-se citar: adição de sais, mudança de pH, adição de solventes ou polímeros orgânicos e desnaturação seletiva. (NELSON e COX, 2014).

Existem várias metodologias diferentes sobre fracionamentos para purificação de proteínas, como fracionamento utilizando sal, principalmente sulfato de amônio, fracionamento com solventes orgânicos, destacando-se o uso de acetona e etanol, ou ainda o fracionamento trifásico. A maior parte dos trabalhos sobre purificação de proteínas opta pelo fracionamento salino, em decorrência das suas características favorecerem o rendimento do trabalho. Dentre as características destacam-se a alta solubilidade em água, baixa densidade de suas soluções, além de prevenir o crescimento de bactérias na solução (COSTA, 2018; SOARES, 2018). Todavia esta escolha depende muito da constituição de cada extrato bruto.

A precipitação com sulfato de amônio permite que o processo ocorra através da diminuição da solubilidade mediante a dissolução do sal, etapa conhecida como "salting out". Nesta etapa os íons competem com a proteína pelas moléculas de água, diminuindo a camada de hidratação, levando a um aumento nas interações proteína-proteína, possibilitando que as mesmas precipitem (NELSON e COX, 2014).

Concluída essa etapa, é necessário realizar um processo de diálise, onde a solução fracionada é inserida em uma membrana porosa e colocada em uma solução (água e/ou tampão) para remoção do sal e compostos menores que a proteína alvo. Este processo é essencial para evitar problemas na resolução e recuperação da atividade da proteína, principalmente de enzimas, nos métodos posteriores (SANTOS, 2016; COSTA, 2018).

Dentre os vários métodos de purificação conhecidos e empregados atualmente, as cromatografias líquidas demonstram maior refinamento e efetividade para a purificação de proteínas. Dentre estas destacam-se: cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como gel filtração, troca iônica e afinidade, que apresentam como princípio metodológico diferença de tamanho, carga iônica ou interação com o substrato da matriz, respectivamente.

A cromatografia de exclusão molecular, também denominada de gel filtração é formada por uma matriz sólida, conhecida como fase estacionária,

composta por esferas (*Bids*), de tamanhos variados, que tendem a separar as proteínas aplicadas na coluna pela diferença de tamanho. Neste processo cromatográfico as moléculas de maior peso molecular são eluídas mais rapidamente, enquanto que as menores percorrem um caminho mais prolongado e demorado, em decorrência da possibilidade de conseguirem penetrar nos poros compatíveis com o seu tamanho.

Para uma melhor eficiência do método, alguns fatores devem ser levados em consideração, como: volume da amostra aplicada, tamanho dos *Bids* (esfera), altura da coluna e fluxo da cromatografia. Quanto maior a altura e menor o diâmetro da coluna, e menor o volume de amostra aplicada, melhor será a resolução e recuperação do método. A preocupação com o baixo volume de amostra aplicada e a alta concentração protéica da amostra, esta relacionado com a diluição da amostra pelo método, tendo em vista que na cromatografia por exclusão molecular essa característica é evidente, em extratos ou frações de baixas concentrações protéicas, é quase impossível se obter concentrações suficientes da proteína de interesse ao final da cromatografia para passos subsequentes.

A viscosidade da amostra é um fator que também pode comprometer a eficácia do método, pois normalmente amostras muito viscosas não conseguem penetrar na fase estacionária da coluna, podendo comprometer a integridade da mesma. Portanto, é aconselhável uma prévia centrifugação da amostra, evitando que partículas sólidas venham interromper o fluxo cromatográfico. Em cromatografias de gel filtração, muitos pesquisadores optam por utilizar uma pequena concentração salina no tampão de equilíbrio e eluição, assegurando ao máximo que o critério de separação seja exclusivamente a massa das proteínas (COSTA, 2018; SANTOS, 2016; NGOC et al., 2015).

Outro método cromatográfico muito empregado são as cromatografias de troca iônica, que consistem em separar proteínas mediante a diferença de cargas. Para isso, sugere-se que a eluição da proteína pode ocorrer variando o pH ou a concentração de sal da fase móvel de modo a criar um gradiente de concentração de sal ou pH (NELSON e COX, 2014).

A resina que compõe a fase estacionária da coluna pode ser composta de compostos inorgânicos, polissacarídeos ou resinas sintéticas, estas

possuem grupos carregados ligados, os ligados a grupos aniônicos, são denominadas como trocadoras de cátions e aqueles ligados a grupos catiônicos são conhecidas como trocadoras de ânions. Nesse tipo de cromatografia não existe uma preocupação com o volume de amostra aplicado na coluna, desde que seja observada a capacidade da mesma, tendo em vista que o princípio desta técnica consiste em concentrar a proteína de interesse. Pois quando se aplica a amostra protéica, as proteínas de cargas contrárias ficarão retidas, enquanto que as demais são eluídas durante a lavagem da coluna.

Vale salientar sobre a importância e necessidade do equilíbrio da coluna antes da aplicação da amostra, para obter uma maior adequação do ambiente químico no interior da coluna para adsorção das proteínas. Esta técnica possui a vantagem de possibilitar a separação de amostra diluída e com um volume maior, quando comparado com o volume utilizado na exclusão molecular, sendo caracterizada como um método bastante simplificado, com alto controle do processo, elevada capacidade, e alto poder de resolução (NELSON e COX, 2014).

Dentre os três métodos cromatográficos citados, a cromatografia por afinidade é a que apresenta maior recuperação e se mostra mais eficaz para a separação de proteínas, visto que se baseia no biorreconhecimento, favorecendo uma interação entre o substrato presente na fase estacionária e a proteína alvo, para tanto, esta proteína deve possuir interação atrativas pelos grupos aderidos à coluna. Todavia, esta metodologia não é tão aplicada, comparada aos outros dois métodos, devido ao elevado custo financeiro.

Semelhante ao que se observa nas cromatografias de troca iônica, nas cromatografias por afinidade também existe a necessidade de eluição da proteína de interesse ligada na matriz, para isso é utilizado uma pequena variação no pH, adição de sal, ou a adição de um competidor. A literatura lista muitas serinoproteases, de diferentes fontes, que foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade. Alici e Arabaci (2018) purificaram uma serinoprotease do morango usando cromatografia por afinidade de ácido Sepharose-4B-L-tirosina-p-aminobenzóico, Vargas (2011), utilizando cromatografia de afinidade, com resina p-nitroamidina, realizou uma purificação parcial de tripsina-like presente no intestino de *Anticarsia gemmatalis* e Mendes

(2016) com a utilização de uma cromatografia de afinidade purificou a tripsina do peixe-zebra (*Danio rerio*).

Esta técnica também é utilizada na purificação de proteínas como as lectinas, proteínas que apresentam um ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos iguais ou diferentes, e que por esse motivo apresentam uma maior e específica interação com a matriz (de VASCONCELOS et al., 2015; COSTA, 2018).

### 3 OBJETIVOS:

#### 3.1 Objetivos gerais:

- Identificar a presença de um inibidor de tripsina e purificar uma tripsina símile presente nas sementes da espécie vegetal *Chamaecrista nictitans* (L) moench.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Preparar o extrato de sementes de *C. nictitans*;
- Identificar a presença da atividade de tripsina- símile e de inibição no extrato;
- Fazer separação de frações do extrato por meio de precipitação de proteínas;
- Isolar a tripsina símile de sementes de *C. nictitans*.
- Confirmar pureza e massa molecular aproximada da(s) tripsina(s);
- Fazer testes de inibição da enzima com inibidores comerciais;
- Definir a natureza química do inibidor.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção das amostras**

As sementes da *Chamaecrista nictitans* foram coletadas no município de São Sebastião- AL, armazenadas em embalagens plásticas e conduzidas ao Laboratório de Metabolismo e Proteômica - LAMP, da Universidade Federal de Alagoas.

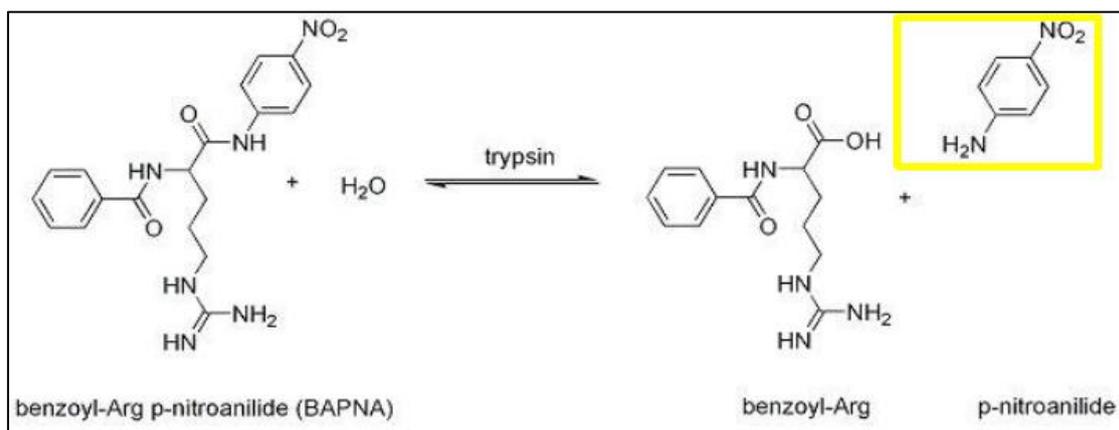
### **4.2 Preparo do extrato bruto**

As sementes, após serem secas, a temperatura ambiente, foram pesadas e trituradas com o auxílio de gral e pistilo, em seguida foi adicionado tampão de extração na proporção de 1:2 (Tris-HCl 50mM, pH 8,1) e a solução foi mantida sob agitação durante doze horas. Decorrido o tempo, a solução foi filtrada e centrifugada a 15.000g, durante 15 min, a 4°C, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K). O sobrenadante foi recolhido e acondicionado em tubo falcon e mantido em temperatura de – 20°C. O sobrenadante coletado foi denominado de extrato bruto.

### **4.3 Ensaio inibitório e Enzimático**

Para analisar a presença de inibidores de tripsina e tripsina- símile, presente no extrato da *Chamaecrista nictitans* foi realizado ensaio inibitório e ensaio enzimático, utilizando substrato cromogênico específico para tripsina, N- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BApNA), preparado em DMSO à concentração de 50 mM. Um dos produtos da hidrólise do substrato é o p-nitroalnilina, cuja coloração amarela é monitorada a 410 nm.

**Figura 6: Hidrólise do N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA).**



Fonte: Hinterwirth; Lindner; Lämmerhofer, 2012.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Para verificar a presença de inibidores, foram utilizadas quantidades diferentes do extrato bruto (10,20 e 40  $\mu$ L). Na reação foi utilizado 5  $\mu$ L de tripsina bovina (1mg/mL), mais o respectivo valor da quantidade do extrato bruto (10,20 e 40  $\mu$ L) e o volume de tampão de extração (Tris-HCl pH 8, 50mM) necessário para completar o volume final de 400  $\mu$ L. As soluções foram incubadas, em temperatura ambiente, durante 15 min e decorrido o tempo foi adicionado 100  $\mu$ L de solução reveladora (2  $\mu$ L de BApNA 50 mM + 98  $\mu$ L de tampão de extração). Para a reação enzimática foi utilizado 5  $\mu$ L de cada amostra, 395  $\mu$ L de tampão de extração (Tris-HCl pH 8,1, 50mM) e 100  $\mu$ L de solução reveladora. O controle positivo foi constituído de tripsina bovina, tampão de extração e solução reveladora (BApNA) e o negativo foi constituído da mistura que continha amostra e tampão de extração. A reação foi processada durante 60 min, a temperatura de 37°C, em um Banho Maria (KaCIL BM- 02). Finalizado o tempo de reação, a mesma foi bloqueada adicionando 500  $\mu$ L de ácido cítrico 20 % (m/v), e a atividade foi aferida em absorbância a 410 nm no espectrofotômetro.

#### 4.4 Curva de tempo do extrato bruto das sementes

Para confirmar a presença da tripsina-símile nas amostras foi realizada uma curva de tempo, utilizando a mesma metodologia aplicada para os ensaios enzimáticos, descrito no item 4.4, variando o tempo. Para tanto foi utilizado um intervalo de tempo de 1h a 4hs.

#### 4.5 Precipitação salina

Foi realizado um fracionamento salino, utilizando sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , em cinco faixas, 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%, sob agitação constante, em temperatura de 4 °C, adaptado de Santos et., 2016. Ao fim da adição do sal, a solução foi incubada a 4°C, durante 01 hora. Decorrido o tempo, foi realizado processo de centrifugação a 15.000 g, a 4 °C, durante 15 min, usando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K), o precipitado foi ressuspendido em tampão Tris- HCl pH 8.1, 50 mM, e armazenados em eppendorfs, numa temperatura de 4 °C. Ao término desta etapa foi realizado o ensaio enzimático, em triplicata, como descrito anteriormente.

#### 4.6 Precipitação Trifásica

Para a precipitação trifásica foi realizada a precipitação com sulfato de amônio, nas mesmas condições do procedimento descrito anteriormente no item 4.5, até a fração 40-60%, que foi acondicionada na geladeira durante 1h, em seguida a fração foi transferida para um tubo falcon e adicionado álcool terc-butanol na proporção de 1:2. Lentamente o falcon foi agitado durante 5 minutos. Decorrido este tempo a fração foi mantida em repouso durante 1h, em temperatura ambiente, e logo após a fração foi centrifugada a 5.000g e 4 °C, durante 15 min. Ao término desta etapa foi realizado o ensaio enzimático, em triplicata, das três fases formadas, como descrito no item 4.3.

#### 4.7 Cromatografia líquida por exclusão molecular

A fração com maior atividade para a tripsina foi submetida à cromatografia líquida com coluna de exclusão molecular, composta de fase estacionária formada por resina Sephacryl S-100, equilibrada com tampão Tris- HCl pH 8,1, 50mM com 0,5 M de NaCl como fase móvel. O fluxo foi ajustado para 0,1 mL/min, volume total da coluna foi de 50 mL, conectada a um sistema FPLC AKTA *pure* M1 (GE). Foi aplicado um volume de 300 µL da fração mencionada acima e coletados 2 mL por fração.

Para o monitoramento da atividade enzimática das 60 frações coletadas foi usado 25  $\mu$ L de cada fração e 375  $\mu$ L de tampão de extração e 100  $\mu$ L solução reveladora (2  $\mu$ L de BApNA 50 mM + 98  $\mu$ L de tampão de extração). A reação durou 30 min, a uma temperatura de 37 °C. Decorrido o tempo à reação foi bloqueada usando 500  $\mu$ L de ácido cítrico 20 % (m/v), e aferiu-se a absorbância a 410 nm no espectrofotômetro, também foi avaliada a presença de proteína pela absorbância da amostra no comprimento de onda de 280 nm.

#### **4.8 Cromatografia de troca iônica**

Após a cromatografia de exclusão molecular com sal, as amostras, que compunham o pico proteico ativo, foram dialisadas, em membranas de 12 -14 kDa, duas vezes contra água e uma terceira contra tampão Tris-HCl pH 8,1, 50 mM, e posteriormente aplicadas (5 mL por corrida) na coluna de troca iônica. A cromatografia de troca iônica foi realizada em coluna DEAE Sepharose (30 cm), aniônica, acoplada ao sistema de FPLC AKTA *pure* M1 (GE), equilibrada com Tris-HCl pH 8,1, 50 mM, 0,5 M de NaCl e eluída com um gradiente de salino. Um fluxo de 0,5 mL/min foi usado e frações de 10 mL foram coletadas. A atividade enzimática de cada fração foi monitorada usando-se o substrato BApNA, e aferido a atividade em um comprimento de onda de 410 nm. Também foi avaliada a presença de proteínas, através da leitura no comprimento de onda de 280 nm.

#### **4.9 Eletroforese (SDS-PAGE)**

A eletroforese foi realizada pelo método descrito por Laemmli (1970), em voltagem constante de 90 mV, utilizando gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), usando 5% e 12% (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente. O tampão das amostras continha 0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5%  $\beta$ -Mercaptoetanol; 0,001% de azul de Bromofenol. As amostras foram aquecidas por 5 min a 100°C. As proteínas presentes no gel foram reveladas usando uma solução de comassie blue G-250 4% em *overnight*, seguida de imersão em solução descorante composta por 10% de ácido acético, 40% Metanol e 50% de água. Bem como

pela utilização da coloração com nitrato de prata, onde 0,4 g de Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foram diluídos em 2,0 mL de água, em seguida adicionado a uma solução formada por 126  $\mu\text{L}$  de NaOH (10M) e 48 mL de Água Deionizada, sendo mantido em repouso por 15 min. Posteriormente, os géis foram lavados com água e adicionados a solução composta por 25  $\mu\text{L}$  de ácido cítrico; 25  $\mu\text{L}$  de formaldeído e 50 mL de água, até as bandas serem visualizadas.

#### **4.10 Zimografia**

Géis de poliacrilamida produzidos de acordo com a metodologia proposta por Laemmli 1970, com modificações, a saber: substituindo a água por uma solução de caseína a 0,4 %. Para tanto, inicialmente foi realizado duas soluções, uma contendo 10  $\mu\text{L}$  de tripsina bovina (1mg/mL), 10  $\mu\text{L}$  de extrato bruto da amostra e 10  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra; e na outra solução, o extrato bruto da amostra foi substituído pelo SBTI. As soluções foram mantidas em repouso durante 15 minutos, em temperatura ambiente e em seguida foram aplicadas no gel.

A corrida foi realizada em voltagem constante de 90 mV e após o fim da eletroforese, os géis foram imersos em solução de comassie blue G-250 4% por 12 horas, sendo o gel descorado em solução composta por 10% de ácido acético, 40% Metanol e 50% de  $\text{H}_2\text{O}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

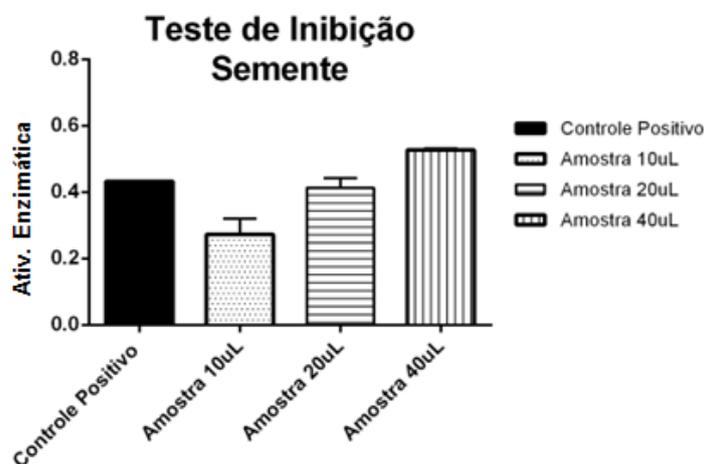
Vale ressaltar que este trabalho é baseado em pré- testes realizados pelo grupo de pesquisa, onde se buscava determinar a presença de possíveis inibidores de tripsina presentes nas sementes da espécie estudada, uma vez que espécies de leguminosas apresentam uma alta concentração de compostos proteicos (CRUZ, 2008), dentre os quais se encontram os inibidores de protease, incluindo os inibidores de tripsina (BRAGANÇA, 2011; CHEVREUIL et al., 2014, SOUZA, 2015, ).

Devido à alta escassez de trabalhos sobre tripsinas vegetais, neste trabalho também serão confrontados com resultados de outras fontes de tripsina.

### 5.1 Ensaio inibitório

Ao realizar o ensaio de inibição com o extrato das sementes secas da *Chamaecrista nictitans*, observou-se que em baixas concentrações, o extrato bruto mostrou inibição para tripsina bovina, conseguindo inibir em torno de 60% da atividade da enzima (figura 7). No entanto, ao aumentar a concentração do extrato foi observado que essa inibição diminuiu, como pode ser visto na coluna 4, correspondente a 40  $\mu$ L da amostra (figura 7), sugerindo uma possível atividade enzimática.

**Figura 7: Ensaio de inibição enzimática com extrato da semente da espécie *C. nictitans*:** A reação se processou por 60 min sendo interrompida pelo acréscimo de 500  $\mu$ L ácido cítrico. A atividade contida no controle foi atribuída como 100%.

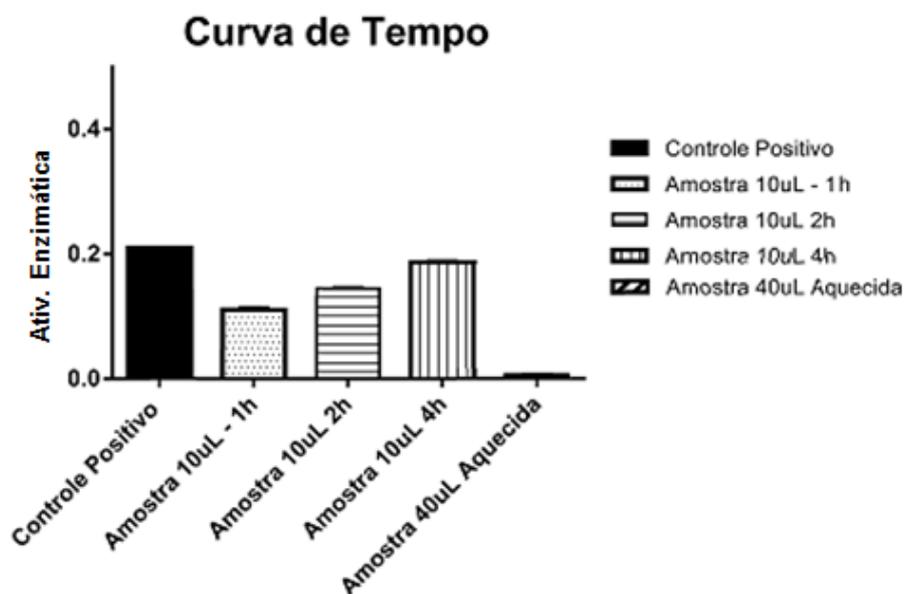


Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Sabendo que espécies vegetais apresentam muitos metabólitos secundários em sua constituição, como relatados nos estudos de HERRERO URIBE; CHAVES OLARTE (2004) e Mateos-Martín et al. (2014), que reconheceram a presença de compostos fenólicos na espécie *C. Nictitans*.

Sabendo que a presença de tais compostos pode resultar em um dado irreal para o teste, foi realizada uma curva de tempo, visando eliminar essa hipótese e confirmar a presença de uma possível enzima semelhante à tripsina no extrato. Para tanto foi realizada uma curva de tempo com a amostra que apresentou inibição (10µL) e aquecida, à 100 °C, a amostra que apresentou maior atividade enzimática (figura 8). Uma vez que é sabido que a temperatura atua como um fator desnaturante para as enzimas, fazendo com que ocorram modificações na sua estrutura terciária e conseqüentemente resulte na diminuição ou perda total da sua atividade (NELSON; COX, 2014).

**Figura 8: Curva de tempo para extrato das sementes de *C. nictitans*:** A atividade contida no controle foi atribuída como 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

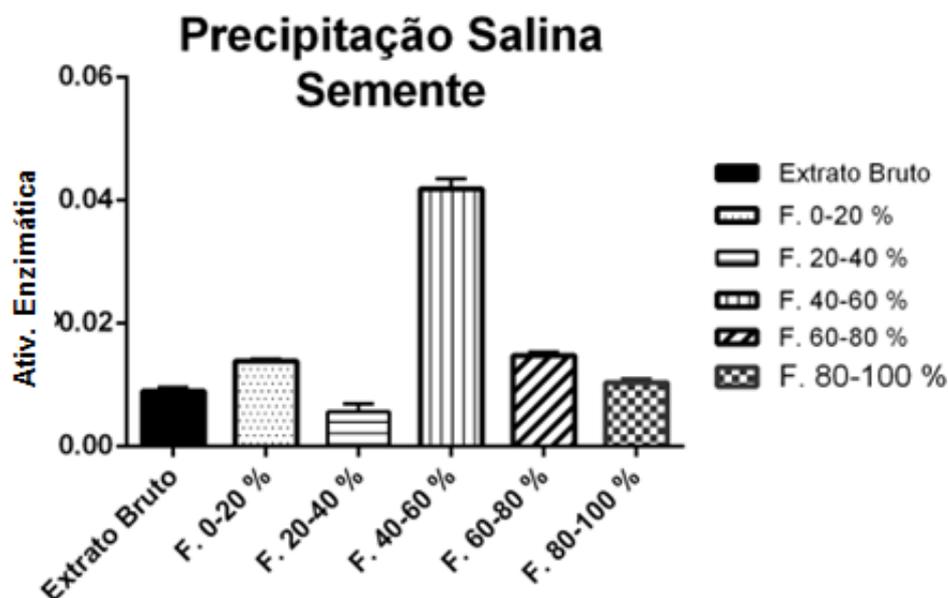
Decorrido o tempo do experimento e aferido as leituras no espectrofotômetro, foi possível confirmar a presença de uma enzima semelhante à tripsina, uma vez que, foi observado que à medida que aumentava o tempo de reação a atividade inibitória diminuía, enquanto a amostra que foi aquecida (com atividade enzimática) perdeu 98,73% da atividade (figura 8).

Desta forma foi percebido que, além da presença de um inibidor, o extrato também contava com enzimas na sua constituição, e que se tratava de uma *tripsina-like*. Por ser uma descoberta extremamente rara, foi decidido investigar as características dessa possível serinoprotease, para tanto se viu a necessidade de realizar o seu isolamento, para posteriores caracterizações bioquímicas.

## 5.2 Fracionamento Salino (*Salting out*)

Os resultados correspondentes à precipitação salina, utilizando sulfato de amônio, do extrato bruto das sementes da espécie *C. nictitans*, são relatados na figura 9, onde, através da análise do ensaio enzimático, por meio da hidrólise do substrato cromogênico BApNA, foi constatado a inibição e atividade enzimática, concentradas em frações distintas.

**Figura 9: Atividade enzimática das frações da precipitação salina das sementes da espécie vegetal *C. nictitans*:** A atividade contida no controle foi atribuída como 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

O fracionamento salino é caracterizado como uma etapa fundamental, antes da amostra ser submetida a processos cromatográficos, uma vez que, este tende a concentrar a amostra em um número mínimo de frações, sendo ideal que se concentre em apenas uma fração, além de eliminar boa parte dos

contaminantes presentes na amostra. Fatores como temperatura e agitação devem ser observados para a obtenção de melhores resultados na recuperação do método (FRANÇA, 2013; WARNER, 2017).

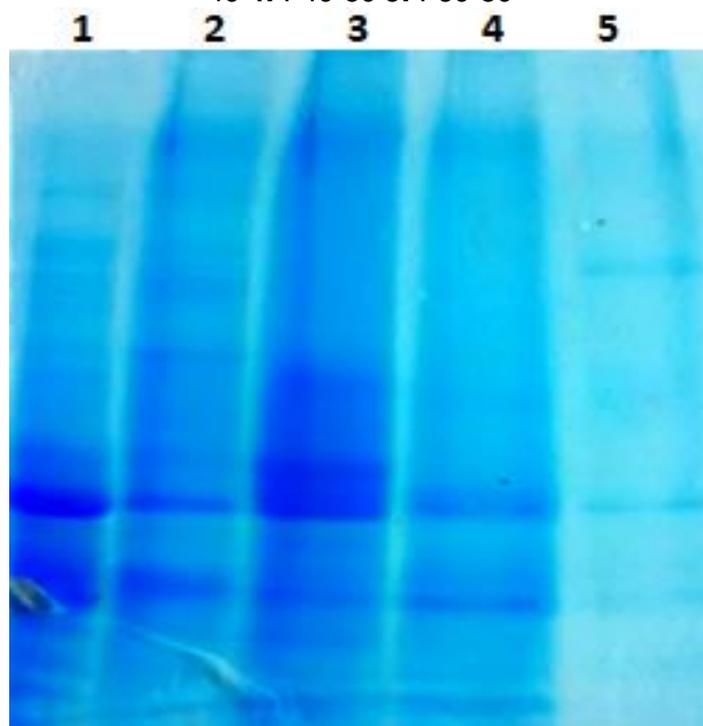
Ao observar a figura 9 pode-se perceber eficácia no método de fracionamento salino das sementes da *C. nictitans*, uma vez que a atividade enzimática se concentrou praticamente em uma única fração (40-60%).

Este resultado corrobora com muitos resultados de trabalhos contidos na literatura, como pode ser vista nos trabalhos realizados por Santos (2018), Souza (2018) e Santos (2016) com os peixes, *Coryphaena hippurus* (dourado do mar), *Scomberomorus brasiliensis* (Serra) *Lophiosilurus alexandri* (Pacamã), respectivamente, que também conseguiram concentrar a atividade da enzima na fração 40-60%. Khangembam e Chakrabarti (2015), ao purificar a tripsina da espécie *carp Cirrhinus mrigala* obtiveram resultados semelhantes, visto que a atividade ficou retida na fração 30- 50%, Sharifloo (2018) também utilizou o método no processo de purificação de tripsina digestiva do intestino médio de grandes borboletas brancas de couve, *Pieris brassicae L.*, obtendo maior atividade tripsínica nas frações 30% e 70%.

Também foi observado que através do fracionamento salino foi possível separar o inibidor e a enzima, pois como mostrado na figura 9, o inibidor ficou retido na fração 20-40%, fração anterior a que concentrou a tripsina-like.

Para avaliar o perfil de bandas protéicas, do extrato bruto e das frações do fracionamento salino, foi realizada uma eletroforese com gel de poliacrilamida (12%), em condições redutoras, usando tampão de amostra contendo  $\beta$ - 2-Mercaptoetanol (Figura 10).

**Figura 10: Gel de poliacrilamida em SDS-PAGE: 1: Extrato Bruto; 2: F0-20; 3: F20-40 4: F40-60 5: F60-80**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Através da análise do gel de eletroforese foi possível perceber que o extrato bruto das sementes da *C. nictitans* trata-se de um extrato complexo, pois foi observado um perfil protéico bem concentrado de inúmeras bandas.

O gel apresentado acima demonstra que houve alta eficiência no processo de pré- purificação, precipitação com sulfato de amônio, tendo em vista que ao longo da precipitação foi possível concentrar majoritariamente a enzima de interesse em uma única fração (canaleta 4), sendo esta detentora de alta atividade enzimática. Também foi demonstrado que houve uma diminuição dos contaminantes durante o processo.

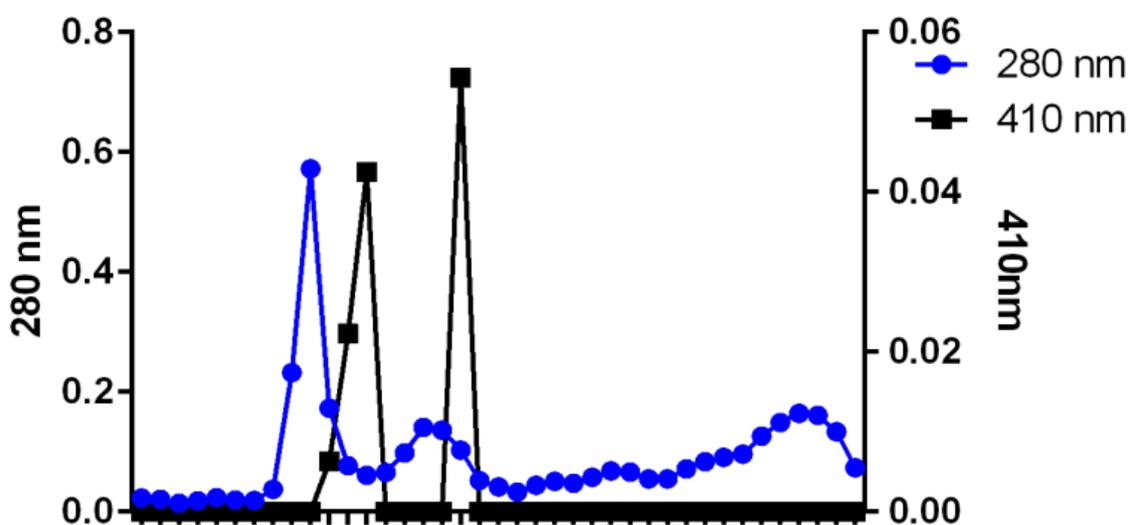
### **5.3 Cromatografia de exclusão molecular com NaCl**

Mediante a análise do ensaio enzimático e do perfil protéico das frações do fracionamento salino das sementes da *C. nictitans* mostrado no gel de eletroforese foi optado pelo processo cromatográfico de exclusão molecular, visto que a amostra da fração 40-60% mostrou ser composta por proteínas com massa molecular distinta, observada a partir da separação das bandas no gel,

característica necessária para a utilização do método (NELSON; COX, 2014; NGOC et al., 2015).

A fração com maior atividade enzimática, 40-60%, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, Sephacryl S100 (50 mL), (equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,1, com 0,5 M de NaCl, em um fluxo de 0,1 mL por minuto. Durante a cromatografia foram coletadas frações de 2 mL). Na figura 11 é mostrado o cromatograma referente ao método. Para isso foi utilizado o software Graph Pad. Prism. v6. 01. Retail.

**Figura 11: Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S100:** (50mL):Linha azul: leitura  $A_{280\text{nm}}$  (Presença de proteínas) e linha preta: leitura  $A_{410\text{nm}}$  (Atividade enzimática).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

A figura 11 mostra o perfil da cromatografia, onde em azul é retratado a leitura  $A_{280\text{ nm}}$ , indicando a presença de proteínas, sendo este o comprimento de onda capaz de detectar aminoácidos aromáticos, e em preto é mostrada a absorção em um comprimento de onda de 410 nm, retratando a atividade enzimática da tripsina-like, através da hidrólise do BApNA. Observou-se a presença de dois picos proteicos referentes à atividade tripsínica. Através do ensaio enzimático foi percebido que os tubos 12, 13 e 18 hidrolisaram o BApNA.

A cromatografia mostrou ótima resolução, visto que apresentou um pico bem resolvido. O método mostrou uma recuperação de aproximadamente 194%, dos quais 108% foram correspondentes às frações 12 e 13. A

recuperação acima de 100% é justificável pela ausência do inibidor na fração aplicada e que estava presente no extrato. Recuperações como as demonstradas na cromatografia acima são pouco comum de ser encontradas nos trabalhos sobre purificação de proteínas.

Para validar esse resultado e confirmar a presença de tripsina símile foi realizada uma curva de tempo, na qual mostrou a presença de enzima nas frações 12 e 13, uma vez que a atividade tripsínica aumentou mediante ao acréscimo do tempo, todavia a fração 18 apresentou um comportamento diferente, ou seja, a atividade enzimática diminuiu ao longo do tempo, sugerindo que este pode se tratar de um contaminante, tais como metabolitos secundários, presente na amostra.

Os métodos cromatográficos podem apresentar perfis de recuperação muito diferenciados, podendo apresentar resultados muito representativo, como o demonstrado neste trabalho, mas também podem apresentar resultados de recuperação muito baixa.

Shamsi (2017) e Nishikata (1984) conseguiram purificar serinoproteases, do tipo tripsina-like, oriundas de sementes verdes de grão-de-bico (*Cicer Arientum*) e de soja, respectivamente, utilizando cromatografias de troca-iônica.

Vargas (2011), utilizando cromatografia de afinidade, com resina p-nitroamidina, obteve uma recuperação de 124%, ao realizar a purificação parcial de tripsina-like presente no intestino de *Anticarsia gemmatalis*. Xavier (2006) mostrou uma recuperação de 64,5% na purificação parcial da tripsina-like do intestino médio da lagarta de soja *Anticarsia gemmatalis*; Sharifloo (2018) utilizou dois processos cromatográficos uma cromatografia de gel filtração e uma troca-iônica para a purificação de tripsina digestiva do intestino médio de grandes borboletas brancas de couve, *Pieris brassicae L.*, e obteve recuperações de 44,5% e 22,8%, respectivamente. Já Mendes (2016) conseguiu um rendimento de 6,1%, com a utilização de uma cromatografia de afinidade usada para purificar tripsina do peixe-zebra (*Danio rerio*), a recuperação de cromatografias de exclusão molecular, realizada por Souza (2018), para isolar a tripsina do peixe serra *Scomberomorus brasiliensis*, mostrou uma atividade equivalente a 5,55%.

#### 5.4 Eletroforese SDS- PAGE

As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram submetidas ao método de eletroforese SDS-PAGE, em condições redutoras, utilizando gel de acrilamida a 12%, para analisar o grau de pureza da enzima, bem como seu peso molecular aparente. Para corar os géis foi utilizada uma solução de 8% de Comassie Blue. Após o intervalo de tempo proposto o mesmo foi descorado com a solução descorante (40% metanol, 10% ácido acético e 50% de água), resultando no perfil protéico mostrado na figura 12.

**Figura 12: Eletroforese SDS-PAGE a 12%: 1: F12; 2: 13; 3: 18**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Ao observar o perfil de bandas de proteína mostrado no gel foi possível constatar a presença de duas bandas muito próximas, sugerindo ser proteínas, com massa molecular semelhante, o que sugere uma purificação parcial da enzima. Dados como esses são característicos do processo cromatográfico de exclusão molecular. Também é observado que a fração 18 (canaleta 3), mostrou um perfil diferente das outras duas, mostrando três bandas, o que pode ser características de algum contaminantes.

Visando obter a purificação total da tripsina símile foi realizada uma cromatografia de troca-iônica, utilizando uma coluna de DEAE- Sepharose.

A purificação de enzimas é um trabalho que na maioria das vezes exige a utilização de mais de uma técnica cromatográfica. É notório dizer que quanto mais complexo a amostra em estudo, maiores serão os obstáculos para isolar a enzima alvo (SILA et al., 2012; SOUZA, 2018).

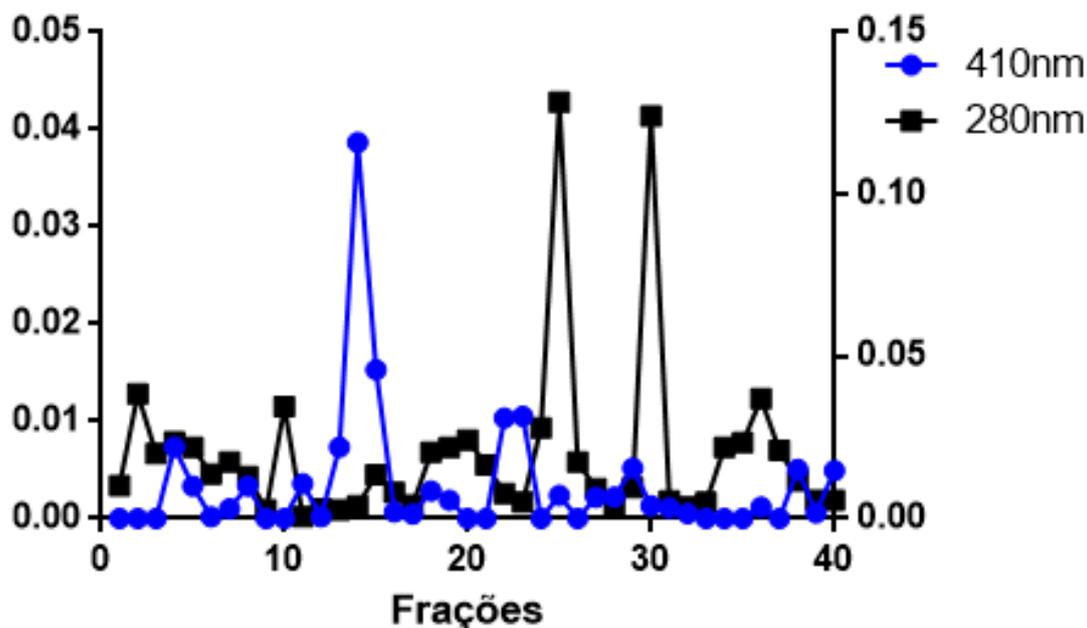
Na literatura são descritos vários trabalhos referente ao tema, mostrando a necessidade de utilizar dois ou mais métodos cromatográficos. Xavier (2006) descreve o uso de três processos cromatográficos, uma gel filtração, uma troca iônica (DEAE) e uma de afinidade para purificar tripsinas contidas no intestino médio da lagarta da soja. Alves (2017), utilizou duas cromatografia de troca iônica, uma aniônica, DEAE-Sephadex A-50 e outra catiônica (CM Sephadex C-50) para isolar proteases de *Aspergillus tamarii* URM4634. Sharifloo (2017), utilizou dois processos cromatográficos, uma coluna de gel filtração e uma troca-iônica para a purificação de tripsina digestiva do intestino médio de grandes borboletas brancas de couve, *Pieris brassicae* L.

Vale salientar que antes de serem submetidas à cromatografia iônica, as frações 12 e 13, foram dialisadas para retirar o sal contido na amostra. Estas passaram por três trocas, sendo as duas primeiras contra água e a terceira contra o tampão de extração.

## 5.5 Cromatografia de troca-iônica

As frações 12 e 13, que mostraram um dubleto de bandas e maior atividade enzimática, foram submetidas à cromatografia de troca-iônica, utilizando gradiente salino e matriz aniônica. O cromatograma abaixo (figura 13) mostra a presença de várias proteínas, representadas pelos picos na curva em preto (A280 nm), além de vários picos representativos de atividade enzimática, perfil representado pela curva em azul (A410 nm).

**Figura 13: Cromatograma da cromatografia de troca-iônica DEAE- Sephadex:** Linha preta: leitura A280 nm e linha azul: leitura A410 nm



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Após coletada as frações advindas da coluna DEAE, foi realizado o ensaio enzimático, entretanto foi observado que a amostra reduziu significativamente a sua atividade. É necessário ressaltar que após a amostra ter vindo da coluna de gel filtração e diálise para retirada do sal, a amostra exibiu uma redução considerável da atividade tripsínica na amostra, sendo perdida completamente após o novo processo cromatográfico na coluna de troca iônica.

### 5.6 Atividade enzimática e de inibição do novo extrato e das frações do fracionamento salino.

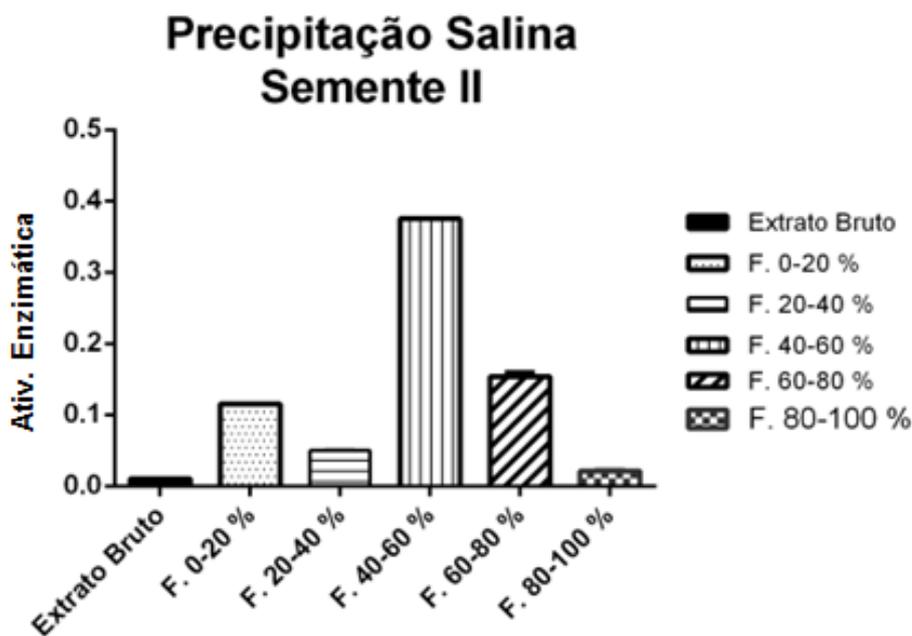
Para reaver o problema, acima citado, foi feito um novo extrato nas mesmas condições de extração e em seguida foi realizado o ensaio enzimático do mesmo para constatar a presença da tripsina- like, onde foi observada ausência de atividade enzimática, uma vez que não ocorreu a hidrólise do BApNA.

Por esse motivo foi realizado o ensaio de inibição, onde foi constatada a alta atuação do inibidor no extrato, nas duas concentrações testadas (20µL e

40  $\mu\text{L}$ ) inibindo aproximadamente 99% o controle (enzima bovina), mostrando que os dados foram bem reproduzidos.

Em seguida foi realizado o processo de fracionamento salino, nas mesmas condições anteriores (cinco frações: 0-100), utilizando sulfato de amônio. Os resultados do fracionamento são mostrados na figura 14.

**Figura 14: Precipitação Salina do extrato bruto das sementes da espécie vegetal *C. nictitans*:** A reação se processou por 60 min sendo interrompida pelo acréscimo de 500  $\mu\text{L}$  ácido cítrico. A atividade contida no controle foi atribuída como 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

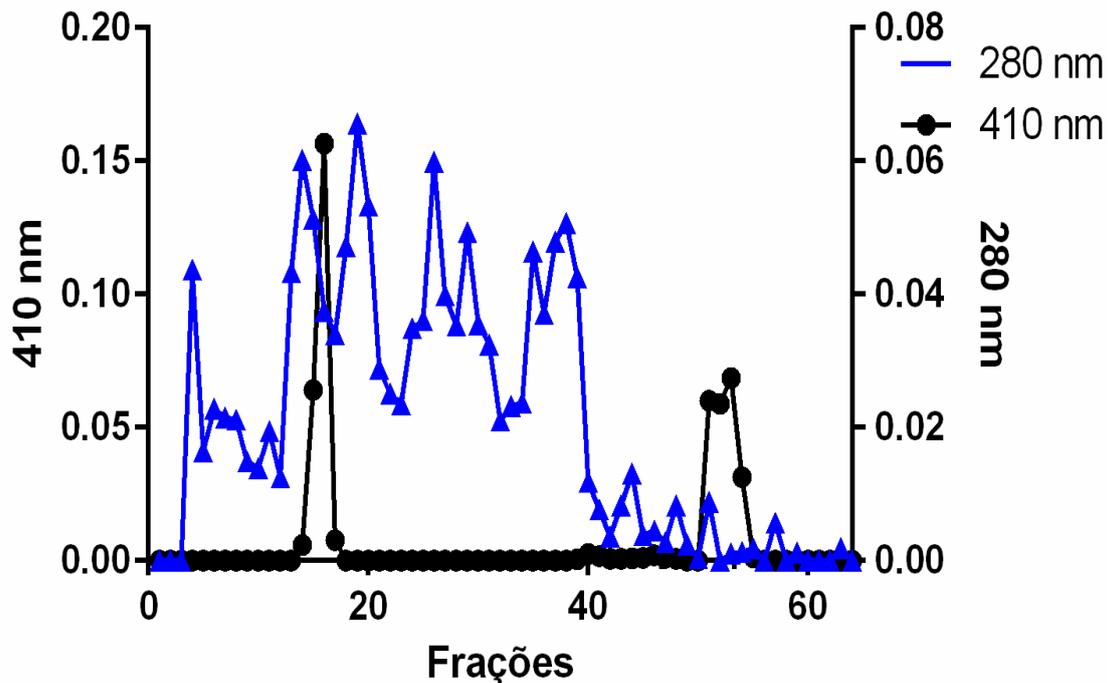
Observando os dados da figura 14 foi verificada uma prevalência na atuação da enzima, sendo o inibidor e a tripsina-like retidos nas mesmas frações da precipitação salina realizada com o primeiro extrato bruto, o que demonstra a reprodutibilidade do método. Este, por sua vez, apresentou uma recuperação de 82%.

## 5.7 Cromatografia de exclusão molecular

Devido à perda de atividade enzimática, após o processo de diálise, optou-se por realizar a cromatografia de exclusão molecular sem utilizar sal, para que as frações pudessem ser submetidas logo em seguida a cromatografia de troca-iônica.

A fração com maior atividade enzimática, 40-60%, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, Sephacryl S100 (50 mL), nas mesmas condições de processamento utilizado anteriormente.

**Figura 15: Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular:** Linha preta: leitura A280 nm e linha azul: leitura A410 nm



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O cromatograma representado na figura 15 mostra o perfil da cromatografia, onde em azul é retratado a leitura A280 nm, indicando a presença de proteínas, e em preto é mostrado a absorvância em um comprimento de onde de 410 nm, retratando a atividade enzimática da tripsina-like, através da hidrólise do BApNA. Observou-se a dois picos proteicos com atividade tripsínica, correspondendo os tubos 12, 13 e 14 e 48, 49, 50 e 51, respectivamente, referente à atividade tripsínica.

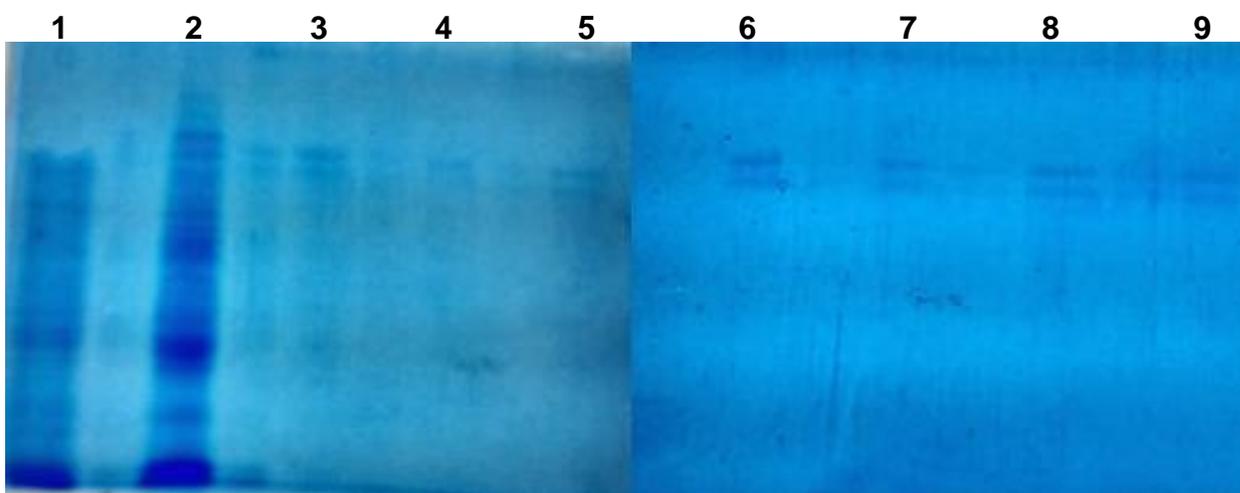
A cromatografia mostrou ótima resolução, pois é analisada a presença de dois picos bem resolvido, referentes à atividade tripsínica, sugerindo que estes possam ser isoformas de tripsinas presentes na fração aplicada na coluna. A diferença no perfil proteico e nos picos que demonstraram atividade enzimática podem está interligado a ausência do cloreto de sódio (NaCl) do

método, levando a interações eletrostática entre as proteínas e a matriz, retardando suas eluições.

Pode-se dizer que o método mostrou uma recuperação de aproximadamente 170%, dos quais 57% foram correspondentes a fração 13. Os dados mostrados durante o processo foram semelhantes ao mostrado na cromatografia anterior, mostrando que o método foi bem reproduzido.

Para analisar o perfil protéico, oriundo dos picos com maior atividade, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE, em condições redutoras, como mostradas na figura 16.

**Figura 16: Eletroforese SDS-PAGE: 1: E.B.; 2: F3 (40-60); 3: F12; 4: F13; 5: F15; 6: F48; 7: F49; 8: F50; 9: F 51**



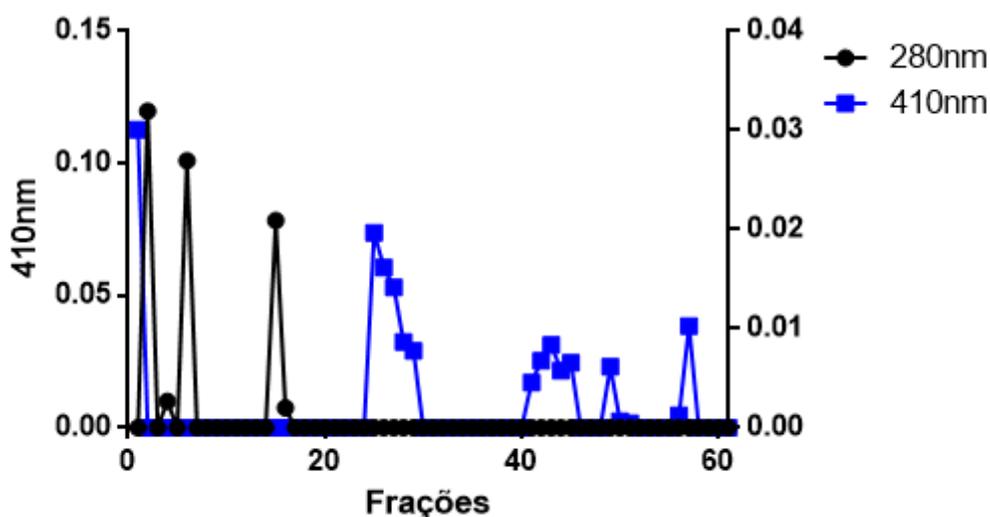
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Mediante a observação do gel foi verificado que as frações reproduziram os resultados da eletroforese anterior, sendo verificado o dubleto de bandas. Após o ensaio enzimático, foi determinado que a fração 13 fosse submetida ao próximo passo cromatográfico.

## 5.8 Cromatografia de troca-iônica

A fração 13, que apresentou maior recuperação e atividade enzimática foi submetida à cromatografia de troca-iônica, utilizando gradiente salino e matriz aniônica (Figura 17).

**Figura 17: Cromatografia de troca-iônica DEAE- Sephadex: Linha preta: leitura A280nm e linha azul: leitura A410nm**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A cromatografia não mostrou eficiência, visto que, ao realizar o ensaio enzimático, foi observado que não ocorreu a hidrólise do BApNA, sugerindo que a amostra possa não ter eluído, pois, como mostrado no cromatograma (Figura 17), foi observado a ausência de proteínas, através das medidas a A280nm.

Outra característica foi observada referente à estabilidade da tripsina-like. Foi detectada uma alta instabilidade, visto que a atividade demonstrada no extrato bruto, na fração 40-60%, do fracionamento salino e as frações oriundas da cromatografia de exclusão molecular, são inativadas após três meses, dois meses e vinte dias, respectivamente. A maior durabilidade no extrato possivelmente deve-se a presença do inibidor.

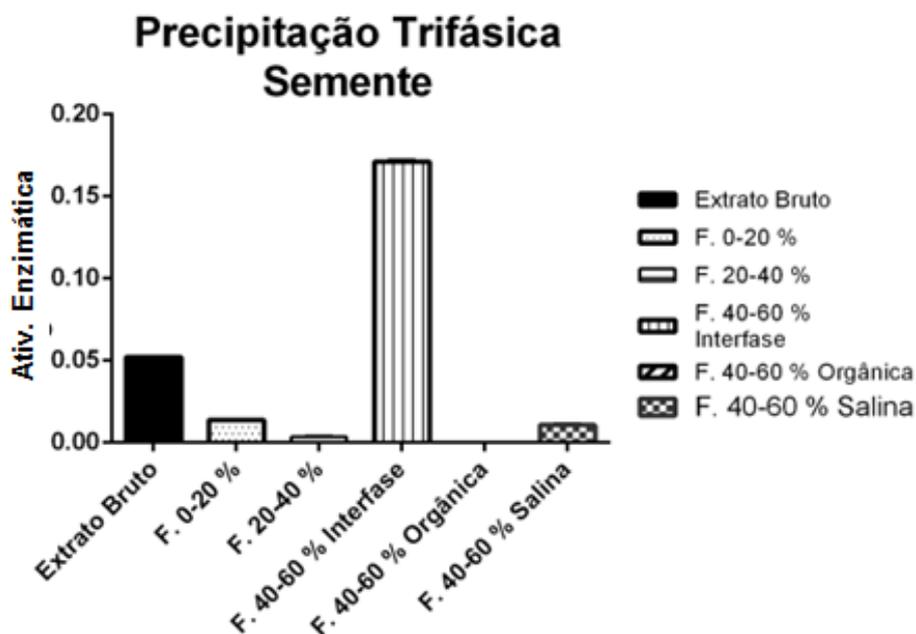
## 5.9 Precipitação Trifásica

Tentando remover a maior parcela de moléculas indesejáveis a serem levadas para a etapa de purificação, o extrato bruto foi submetido a um processo de precipitação trifásica que, por meio da utilização de um sal e um álcool, é possível obter maior grau de separação dos constituintes da amostra. Normalmente, esta precipitação possibilita a formação de três fases, uma orgânica, uma salina e uma interfase.

Ao realizar a reação enzimática das frações oriundas da precipitação trifásica, foram observadas semelhanças significativas com a precipitação

salina, sendo visto que o inibidor se manteve na fração 20-40%, anterior à fração que retem a enzima. A partir da adição do álcool t- butanol ao processo foi percebido que a interfase da fração 40-60% reteve a maior concentração de tripsina, pois esta apresentou maior atividade frente ao substrato BApNA (figura 18 ), e obteve uma recuperação de 80%.

**Figura 18: Precipitação trifásica do extrato bruto das sementes da espécie vegetal *C. nictitans*:** A reação se processou por 60 min sendo interrompida pelo acréscimo de 500  $\mu$ L ácido cítrico. A atividade contida no controle foi atribuída como 100%.

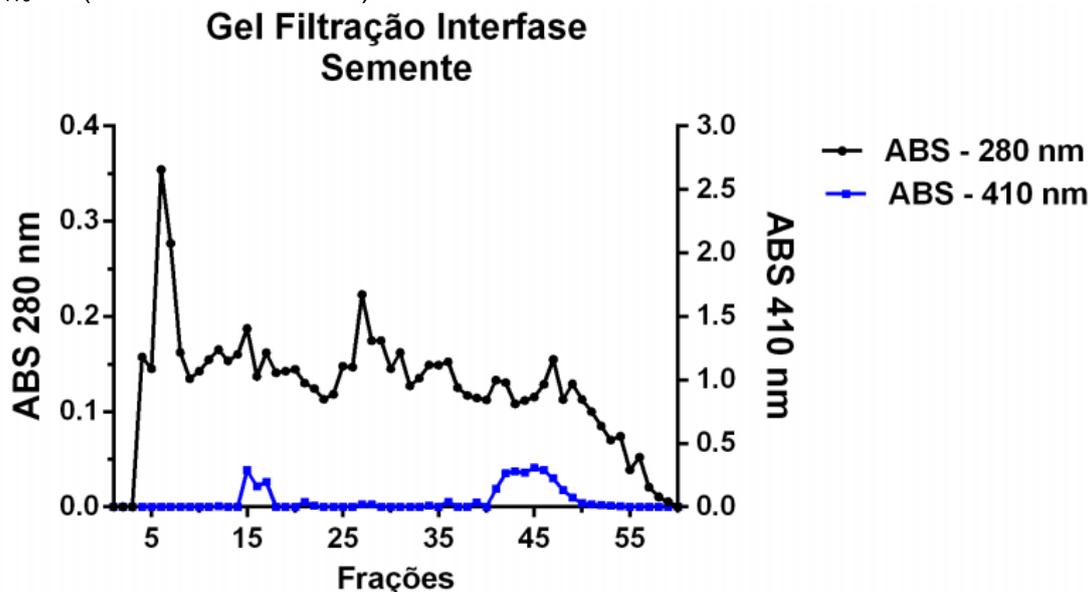


Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

### 5.10 Cromatografia de exclusão molecular

A fração com maior atividade enzimática, Interfase da fração 40-60%, foi submetida ao processo de cromatografia de exclusão molecular, Sephracryl S100 (50 mL), (equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,1, com 0,5 M de NaCl, em um fluxo de 0,1 mL por minuto. Durante a cromatografia foram coletadas frações de 2 mL). Na figura 19 é mostrado o cromatograma referente ao método. Para isso foi utilizado o software Graph Pad.Prism. v6. 01. Retail.

**Figura 19: Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S100 (50mL):** Linha preta: leitura  $A_{280\text{nm}}$  (Presença de proteínas) e linha azul: leitura  $A_{410\text{nm}}$  (Atividade enzimática).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O perfil da cromatografia é mostrado na figura 19, onde em preto é visualizado a leitura  $A_{280\text{ nm}}$ , comprimento de onda indicativo da presença de proteínas, uma vez que é capaz de detectar aminoácidos aromáticos, e em azul é mostrado a absorbância em um 410 nm, retratando a atividade enzimática da tripsina símile, através da hidrólise substrato BApNA. Observou-se a presença de dois picos proteicos referentes à atividade tripsínica. Através do ensaio enzimático foi percebido que os tubos 15, 16 e 17 (pico proteico 1) e 42 ao 46 (pico proteico 2) hidrolisaram o BApNA, com recuperações de 37% e 93%, respectivamente.

Os resultados da cromatografia sugerem que, mesmo se tratando de uma coluna utilizada como exclusão molecular, a mesma se comportou, para esta amostra, como uma coluna de afinidade. Tendo em vista que a amostra adsorveu na coluna, pois sabendo que esta apresenta um volume de 50 mL, o segundo pico proteico, com maior atividade enzimática, necessitou do dobro da capacidade da coluna.

Muitas serinoproteases, de diferentes fontes, foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade. Alici e Arabaci (2018) purificaram uma serinoprotease do morango usando cromatografia por afinidade de ácido Sepharose-4B-L-tirosina-p-aminobenzóico, Vargas (2011), utilizando

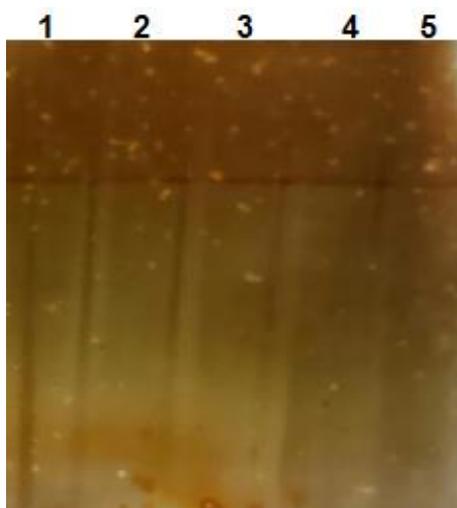
cromatografia de afinidade, com resina p-nitroamidina, realizou uma purificação parcial de tripsina-like presente no intestino de *Anticarsia gemmatalis* e Mendes (2016) com a utilização de uma cromatografia de afinidade purificou a tripsina do peixe-zebra (*Danio rerio*).

### 5.11 Eletroforese SDS- PAGE

As frações que formaram o segundo pico proteico (frações 42 a 46) foram submetidas ao método de eletroforese SDS-PAGE, em condições redutoras, utilizando gel de acrilamida a 12%, para analisar o grau de pureza da enzima, bem como seu peso molecular aproximado. Os resultados mostrados na figura 20 mostram uma única banda proteica, mostradas através da coloração do gel através da utilização da metodologia de coloração com Nitrato de Prata. Este resultado confirma a homogeneidade da amostra nas frações avaliadas.

A metodologia adotada (Nitrato de Prata) é bem mais sensível, quando comparada com a metodologia que utiliza Comassie Blue, onde, através das interações eletrostáticas, com os grupos amino dos polipeptídeos, é possível detectar tais moléculas que variem de 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  e 0,5-5 ng, respectivamente (SYROVY e HODNY, 1991).

**Figura 20: Eletroforese SDS- PAGE a 12%:** As linhas 1-5 correspondem as frações 42-46. A eletroforese foi processada a voltagem constante (90 mV), e as bandas coradas com nitrato de prata.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

### 5.12 Zimografia de inibição do extrato

A fim de avaliar se o inibidor, contido no extrato, era de origem protéica ou um metabolito secundário foi realizado uma zimografia de inibição, tendo como controle o inibidor de tripsina de soja (SBTI). Para tanto o extrato foi colocado com tripsina bovina, no gel (Figura 21), para verificar a inibição da enzima, sendo também comparado com a atuação do SBTI sobre a enzima.

**Figura 21: Zimografia de inibição com o extrato: 1 e 2: Enzima+ E.B., 3 e 4: Enzima+ SBTI**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Através da análise do gel foi possível observar que o inibidor não conseguiu inativar a ação da tripsina bovina, pois a mesma conseguiu digerir a caseína presente na composição do gel, o que é constatado através da diminuição da intensidade da coloração do azul de comassie, nas canaletas 1 e 2, sugerindo que o mesmo não apresenta características protéicas, mas que se trata de um possível metabolito secundário, quando comparado com a atuação do SBTI frente à enzima, que inibiu satisfatoriamente a atividade enzimática.

## 6 CONCLUSÕES

Mediante o desenvolvimento deste trabalho foi possível observar um extrato rico em metabólitos primários, apresentando alta concentração de proteínas. Também se observou a presença de inibidores de proteases, com características não proteicas, nesta espécie vegetal. Por meio da utilização de métodos de precipitação e cromatografia de exclusão molecular, foi possível realizar a purificação de uma enzima semelhante à tripsina. É sabido que o isolamento da tripsina símile pode contribuir para os estudos que buscam entender sua atuação metabólica nos organismos vegetais e possíveis utilizações em setores biotecnológicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, F., et al. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, 2011. v. 46, p. 2301-2310.

ALICI, Esmá Hande; ARABACI, Gulnur. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.

ALVES, Raniele Oliveira et al. PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Aspergillus tamarii* URM4634 POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 329-334, 2017.

AOKI, Hironori et al. Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor in rice, against herpes simplex virus type 1 in vitro and in vivo. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 846-849, 1995.

APG, I. V. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV Botanical Journal of the Linnean Society 181: 1-20. DOI: [http://dx. doi. org/10.1111/boj](http://dx.doi.org/10.1111/boj), v. 12385, 2016.

ARZU, U. Production of  $\alpha$ -amylase from some thermophilic *Aspergillus* species and optimization of its culture medium and enzyme activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 47, p. 3179–3183, 2015.

AZARKAN, Mohamed et al. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable  $\beta$ -sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 6, p. 1063-1072, 2006.

AZEVEDO, T. O. M. et al. **Produção e caracterização de proteases de fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Am. 2018.

BALAMI, Joyce S. et al. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 12, n. 2, p. 145-154, 2013.

- BAJAJ, Priyanka et al. Expression and purification of biologically active recombinant human paraoxonase 1 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 115, p. 95-101, 2015.
- BANIK, Rathindra Mohan; PRAKASH, Monika. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiological research**, v. 159, n. 2, p. 135-140, 2004.
- BARANGER, Kévin et al. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. **The FEBS journal**, v. 275, n. 9, 2008.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G. et al. Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- $\beta$  anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 26, 2015.
- BIBO-VERDUGO, Betsaida et al. A chymotrypsin from the digestive tract of California spiny lobster, *Panulirus interruptus*: purification and biochemical characterization. **Marine biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 416-427, 2015.
- BIRK, Y. The Bowman-Birk Inhibitor. Trypsin- and Chymotrypsin-Inhibitor from Soybeans. *Int. J. Pept. Protein Res.* v. 25, issue 2, p. 113-131, 1985.
- BONTURI, Camila Ramalho. Ação dos inibidores de proteases, ecti e cratabl, em linhagens de câncer cerebral (glioblastoma multiforme). 2015.
- BORGES-VELOSO, André et al. In-depth characterization of trypsin-like serine peptidases in the midgut of the sugar fed *Culex quinquefasciatus*. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 373, 2015.
- BÖSTERLING, Bernhard; QUAST, Ulrich. Soybean trypsin inhibitor (Kunitz) is doubleheaded: kinetics of the interaction of  $\alpha$ -chymotrypsin with each side. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 657, n. 1, p. 58-72, 1981.
- BOUACEM, Khelifa et al. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 299-307, 2015.

- BOUGATEF, Ali. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications—comprehensive review. **Journal of cleaner production**, v. 57, p. 257-265, 2013.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRZIN, Jože; KIDRIČ, Marjetka. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 421-468, 1996.
- CAPRARA, Carolina da Silva Canielles. Processo de obtenção e caracterização de proteases extracelulares expressas por *Penicillium restrictum*, 2015.
- CARR, Andrew et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. **Aids**, v. 12, n. 7, p. F51-F58, 1998.
- CARVALHO, Osorio et al. Effect of chronic treatment of rats with *Chamaecrista nictans* Irwin & Barneby on elimination of renal calculi. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 32, n. 1, p. 33-36, 1996.
- CARVALHO, L. C. T. **Produção de lipases e biossurfactantes por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual**. Dissertação (Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2012.
- CHAUDHARY, Navneet S. et al. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2120-2126, 2008.
- CHEVREUIL, L. R. et al. Partial purification of trypsin inhibitors from *Parkia* seeds (Fabaceae). **Hoehnea**, v. 41, n. 2, p. 181-186, 2014.
- CHRISTENHUSZ, Maarten JM; BYNG, James W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

CORREIA, Cláudia Letícia de Souza Barros; CONCEIÇÃO, Adilva de Souza. The genus *Chamaecrista* Moench in a fragment of the Ecological Station Raso da Catarina, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 2, 2017.

COLARES, Lara Franca et al. Detection of protease inhibitors in seeds of *Punica granatum*. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 270-274, 2017.

COSTA, Ricardo Bezerra et al. **Purificação, caracterização e avaliação de atividade antifúngica e citotóxica da lectina de casca de Genipa americana (Jenipapo)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) Universidade Federal de Alagoas. Maceió. AL 2018.

CRAIK, Charles S.; PAGE, Michael J.; MADISON, Edwin L. Proteases as therapeutics. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 1-16, 2011.

CRUZ, A. C. B. **Purificação, caracterização e análise bioinseticida, de um inibidor de tripsina em sementes de catanduva (*Piptadenia moniliformis*)**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

DA MATA ATAÍDE, Glauciana et al. Alterações nas reservas de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 372-379, 2017.

DA SILVA ESPÓSITO, Talita. Resíduos do processamento de peixes comerciais como fonte de proteases alcalinas e seu potencial uso biotecnológico. 2010.

DADSHAHI, Zahra et al. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Penaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food chemistry**, v. 202, p. 110-115, 2016.

DE CASTRO, R. J. S. et al. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 199–207, 2015.

DE SOUZA, D. D. et al. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds. **South African Journal of Botany**, v. 104, p. 30-34, 2016.

DE VASCONCELOS, Mayron Alves et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.

DEVOOGDT, Nick et al. Secretory leukocyte protease inhibitor in cancer development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1028, n. 1, p. 380-389, 2004.

DOKKA, Muni Kumar; SEVA, Lavanya; DAVULURI, Siva Prasad. Isolation and Purification of Trypsin Inhibitors from the Seeds of *Abelmoschus moschatus* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3750-3762, 2015.

DOS SANTOS SOARES, Alexandra Martins; MACHADO, Olga Lima Tavares. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

DOUMAS, Stergios; KOLOKOTRONIS, Alexandros; STEFANOPOULOS, Panagiotis. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. **Infection and immunity**, v. 73, n. 3, p. 1271-1274, 2005.

ESTEVE, Clara et al. Mass spectrometry imaging shows major derangements in neurogranin and in purine metabolism in the triple-knockout 3x Tg Alzheimer mouse model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 7, p. 747-754, 2017.

FEDATTO, Luciana Maria. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.

FRANÇA, Renata Cristina da Penha. **Caracterização bioquímica e molecular da tripsina dos cecos pilóricos do Bijupirá (*Rachycentron canadum*) e a sua compatibilidade com formulações de detergentes**. 2013.

GESSESSE, Amare et al. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 519-524, 2003.

GONÇALVES, José Francisco de C. et al. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 139-142, 2002.

GUDMUNDSDÓTTIR, Ágústa; HILMARSSON, Hilmar; STEFANSSON, Bjarki. Potential use of atlantic cod trypsin in biomedicine. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

GUPTA, Rajesh; BEG, Q.; LORENZ, Patrick. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

HABIB, Huma; FAZILI, Khalid Majid. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 68-85, 2007.

HEDSTROM, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.

HERBOTS, Ivan et al. Enzymes, 4. Non-food Application. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2000.

HERENDEEN, P. S.; WING, S. Papilionoid legume fruits and leaves from the Paleocene of northwestern Wyoming. **Proceedings of Botany**, p. 12-16, 2001.

HERRERO URIBE, Libia; CHAVES OLARTE, Esteban; TAMAYO CASTILLO, Giselle. In vitro antiviral activity of *Chamaecrista nictitans* (Fabaceae) against herpes simplex virus: biological characterization of mechanisms of action. **Revista de biología tropical**, v. 52, n. 3, p. 807-816, 2004.

HOU, Enling et al. Purification and characterization of an alkaline protease from *Micrococcus* sp. isolated from the South China Sea. **Journal of Ocean University of China**, v. 16, n. 2, p. 319-325, 2017.

IRWIN, Howard S.; BARNEBY, Rupert C. **The American cassiinae synoptical revision of leguminosae tribe cassieae subtribe cassiinae in the New World**. 1982.

ITKONEN, Outi et al. Serum samples from pancreatectomized patients contain trypsinogen immunoreactivity. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 128, n. 1, p. 98-102, 1996.

JISHA, Velloorvalappil N. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in enzyme research**, v. 1, n. 03, p. 39, 2013.

JOSHI, Bimba N. et al. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 246, n. 2, p. 382-387, 1998.

JUDD, Walter S. et al. **Sistemática Vegetal:- Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora, 2009.

KAPLAN, Andrew H. et al. Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. **Journal of virology**, v. 67, n. 7, p. 4050-4055, 1993.

KHANGEMBAM, Bronson Kumar; CHAKRABARTI, Rina. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: Purification, characterization and its potential application. **Food chemistry**, v. 175, p. 386-394, 2015.

KIM, Jin-Young et al. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 6, p. 2860-2872, 2009.

KIM, Nan-Sun et al. High-level production of recombinant trypsin in transgenic rice cell culture through utilization of an alternative carbon source and recycling system. **Enzyme and microbial technology**, v. 63, p. 21-27, 2014.

KOSHIKAWA, Naohiko et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. **The American journal of pathology**, v. 153, n. 3, p. 937-944, 1998.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. general properties. *Journal of Genetic and Physiology*, v. 30, p. 291-310, 1947.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LEE, Thomas D. Patterns of fruit and seed production in a Vermont population of *Cassia nictitans* L.(Caesalpinaceae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, p. 15-21, 1989.

LEWIS, G. P. Tribe Cassieae. **Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew**, p. 111-125, 2005.

LI, Qing et al. Commercial proteases: present and future. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1155-1163, 2013.

LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. **Food chemistry**, v. 159, p. 55-63, 2014.

MAGALLON, Susana; SANDERSON, Michael J. Absolute diversification rates in angiosperm clades. **Evolution**, v. 55, n. 9, p. 1762-1780, 2001.

MAGNI, Chiara et al. Identification in lupin seed of a serine-endopeptidase activity cleaving between twin arginine pairs and causing limited proteolysis of seed storage proteins. **Molecular plant**, v. 5, n. 5, p. 1011-1019, 2012.

MARINHO, Luciana Cardoso et al. A ANGIOGÊNESE NAS LEUCEMIAS: UMA REVISÃO. 2016.

MATEOS-MARTÍN, María Luisa et al. Identification of polyphenols from antiviral *Chamaecrista nictitans* extract using high-resolution LC–ESI–MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 22, p. 5501-5506, 2014.

MAURER, Karl-Heinz. Detergent proteases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330-334, 2004.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; YADA, R. Y. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-17, 2017.

McKEE, H. S. Nitrogen metabolism in plants, 329. Oxford: Clarendon, 1962. 728 p

MENDES, Cayro de Macedo. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA TRIPSINA DO PEIXE-ZEBRA (Danio rerio)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia). Universidade Federal da Paraíba, PR. 2016.

MILLER, James Howard; MILLER, Karl V. **Forest plants of the southeast and their wildlife uses**. University of Georgia Press, 2005.

MONTEIRO, N. V.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI**, Goiânia, v.3, n.5, ano 3, jan/jun 2009.

MOREIRA, HJC da; BRAGANÇA, H. B. N. Manual de identificação de plantas infestantes–Hortifruti. **São Paulo: FMC Agric** MOREIRA, HJC da; BRAGANÇA, H. B. N. Manual de identificação de plantas infestantes–Hortifruti. **São Paulo: FMC Agricultural Products**, p. 788-789, 2011.

MUHLIA-ALMAZÁN, Adriana; SÁNCHEZ-PAZ, Arturo; GARCÍA-CARREÑO, Fernando L. Invertebrate trypsins: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 178, n. 6, p. 655-672, 2008.

NGOC, Duan Pham et al. Characterization of immunogenic Clonorchis sinensis protein fractions by gel filtration chromatography. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 284-288, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principios de Bioquímica de Lehninger. **Artmed, Porto Alegre**, 2014.

NISHIKATA, Makoto. Trypsin-like protease from soybean seeds. Purification and some properties. **The Journal of Biochemistry**, v. 95, n. 4, p. 1169-1177, 1984.

NIYONZIMA, Francois Niyongabo; MORE, Sunil. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 233-258, 2015.

NORIOKA, Naoko et al. Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. **Agricultural and biological chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1245-1252, 1988.

OLIVEIRA, Vagne de Melo. Obtenção de proteases a partir do trato digestivo de peixes neotropicais para aplicação na produção de peptídeos de colágeno. 2015.

OLSON, Oakley C.; JOYCE, Johanna A. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 12, p. 712, 2015.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.  
PAGE, Michael J.; DI CERA, Enrico. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7-8, p. 1220-1236, 2008.

PATERSON, David L. et al. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. **Annals of internal medicine**, v. 133, n. 1, p. 21-30, 2000.

PATON, Nicholas I. et al. Protease inhibitor monotherapy for long-term management of HIV infection: a randomised, controlled, open-label, non-inferiority trial. **The lancet HIV**, v. 2, n. 10, p. e417-e426, 2015.

PATRIOTA, Leydianne LS et al. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 611, 2016.

PESQUET, Edouard. Plant proteases—from detection to function. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 1-4, 2012.

PEREIRA, H. J. V. **Síntese e Aplicação de Inibidores de Proteases Análogos ao Inibidor de Tripsina do Girassol SFTI-1**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. SP. 2007.

PIER, 2013. Pacific Islands Ecosystems at Risk. Honolulu, Hawaii, USA: HEAR, University of Hawaii. <http://www.hear.org/pier/index.html>

QUEIROZ, Rubens Teixeira de; LOIOLA, Maria Iracema Bezerra. The genus *Chamaecrista* Moench (Caesalpinioideae) in areas adjoining Parque Estadual

das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 725-736, 2009.

RABÊLO, Luciana Maria Araújo. Efeitos de um inibidor do tipo Kunitz de sementes de *Mimosa regnellii* Benth sobre eventos celulares da linhagem tumoral B16-F10. 2016.

RANASINGHE, Shiwanthi Lakmali et al. Kunitz type protease inhibitor EgKI-1 from the canine tapeworm *Echinococcus granulosus* as a promising anti-cancer therapeutic. **bioRxiv**, p. 357590, 2018.

RANJBAR, Mina; ZIBAE, Arash; SENDI, Jalal Jalali. A trypsin-like proteinase in the midgut of *Ectomyelois ceratoniae* zeller (Lepidoptera: Pyralidae): purification, characterization, and host plant inhibitors. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 85, n. 1, p. 1-12, 2014.

RAO, Mala B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N.D.; BARRET, A.J. Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol.* v.244, p. 19-61, 1994.

RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRETT, A.J. An introduction to peptidases and the Merops database. Chapter 10, p. 161-179 In: Polaina, J. and MacCabe, A.P (editores). *Industrial enzymes: Structure, Function and application*. **Springer**. 1ª edição. 2007.

RAY, Abhijit. Protease enzyme-potential industrial scope. **Int J Tech**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2012.

REIS, Denise Torres Cruz. **Purificação e caracterização de proteases digestivas Tripsinalike do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto**. Tese (Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

RIBEIRO, Jannison Karlly Cavalcante. **Novas propriedades do SKTI (Inibidor de tripsina de soja): inibição para elastase neutrofílica humana e efeitos no processo de injúria pulmonar aguda**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2010.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: DEY, P. M.; J. B. HARBORNE (Ed.). *Methods in plant biochemistry*. New York: Academic Press, 1991. v. 5, p. 259-306.

SAHIN-TÓTH, Miklós. Biochemical models of hereditary pancreatitis. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 35, n. 2, p. 303-312, 2006.

SANTOS, C.W.V. **Purificação e caracterização de tripsina a partir do ceco pilórico do Pacamã (*L. alexandri*)**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas. Maceió. AL. 2016.

SANTOS, D. M. R. C. dos et al. **Purificação e caracterização da tripsina isolada do *Coryphaena hippurus* (dourado do mar)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) Universidade Federal de Alagoas. Maceió. AL. 2018.

SANTOS, A. F. dos et al., **APLICAÇÕES, PROTEÍNAS E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA**. 2018

SATHEESH, L. Shilpa; MURUGAN, K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. 2011.

SAVITHA, S. et al. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 2, p. 298-304, 2011.

SCARAFONI, A. et al. Identification and Characterization of a Bowman-Birk Inhibitor Active Towards Trypsin but not Chymotrypsin in *Lupinus Albus* Seeds. *Phytochemistry*, v. 69, Issue 9, p. 1820-1825, 2008.

SHAMSI, Tooba Naz et al. Purification and characterization of a novel trypsin-like protease from green-seeded chickpea (*Cicer arietinum*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 513-519, 2017.

SHARIFLOO, A. et al. Biochemical characterization a digestive trypsin in the midgut of large cabbage white butterfly, *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). **Bulletin of entomological research**, v. 108, n. 4, p. 501-509, 2018.

SILA, Assaâd et al. Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. **Food chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1287-1295, 2012.

SILVA, Elisangela Teixeira da et al. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais) Universidade Católica de Pernambuco. Recife. 2013.

SILVA-LOPEZ, Raquel Elisa da. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 4, n. 01, p. 108-119, 2013.

SONG, Xiao-yu et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 4, p. 535-542, 1999.

SOUZA et al., A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz J Microbiol**, 2015. Jun; 46 (2): 337–346.

SOUZA, V.C., BORTOLUZZI, R.L.C. 2015. Chamaecrista in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22877>>. Acessado em 15 de julho de 2018.

SOUZA, C. B. de et al. **Isolamento e caracterização da tripsina do ceco pilórico da espécie *Scomberomorus brasiliensis* (Serra)**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas. Maceió. AL. 2018.

SOUZA, D. D. de. **Purificação e caracterização parcial de inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina* L.** Dissertação. Mestrado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. PE. 2015.

SOUZA, F. da R. de. Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e coenzimáticos. 2010.

STRYER. L.; TYMOCZKO, J.L.; BERG, J.M. **Bioquímica**. Editora Guanabara. Koogan LTDA. 6ª Ed. Rio de Janeiro, 2006.

SYROVY, L.; HODNY, Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamid gel eletrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 569, p. 175-169, 1991.

TERRAS, Franky RG et al. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1311-1319, 1993.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

UPADHYAY et al., Purification of recombinant ovalbumin from inclusion bodies of Escherichia coli, **Protein Expression and Purification**, v.117, p. 52–58. 2015.

VAGADIA, Brinda Harish; VANGA, Sai Kranthi; RAGHAVAN, Vijaya. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor—A review. **Trends in food science & technology**, v. 64, p. 115-125, 2017.

VAN BOEKEL, Martinus et al. A review on the beneficial aspects of food processing. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 9, p. 1215-1247, 2010.

VARGAS, Adriana Maria Patarroyo. **Purificação parcial e caracterização cinética da inibição de proteases intestinais tripsina-like de Anticarsia gemmatalis**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2006

VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. In: Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 11, p. 273-287, 2008.

VIEIRA, Fernanda Silva. **Avaliação da atividade antiangiogênica do peptídeo sintético análogo a lunasina e do inibidor bowman-birk em membrana coriolantóica de gallus domesticus**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais. 2014.

VOJCIC, Ljubica et al. Advances in protease engineering for laundry detergents. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629-634, 2015.

WARD, O.P, RAO, M. B, KULKARNI, A. Proteases, Production. In: Applied Microbiology: Industrial. New York: Springer; 2009. p. 495-511.

WARNER, Alden H. Proteases and protease inhibitors in Artemia and their role in the developmental process. In: **Biochemistry and Cell Biology of Artemia**. CRC Press, 2017. p. 113-132.

WIEGAND, Ulrich et al. Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. **Gene**, v. 136, n. 1, p. 167-175, 1993.

YANG, Yong et al. Serine proteases of parasitic helminths. **The Korean journal of parasitology**, v. 53, n. 1, p. 1, 2015.

XAVIER, Luciana Pereira. **Purificação parcial, propriedades e caracterização cinética de protease tripsina-like do intestino médio da largata de soja, Anticarsia gemmatalis**. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2006.

YAVELLOW, J. et al. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. **Cancer research**, v. 43, n. 5 Suppl, p. 2454s-2459s, 1983.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus Myceliophthora sp. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2137-2143, 2011.

ZAPPI, Daniela C. et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 233-252, 2015.