

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Gustavo Duarte Bocayuva Tavares

Detecção, purificação parcial, caracterização e mutagenicidade de extrato de proteínas bioativas
de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)

Rio de Janeiro

2019

Gustavo Duarte Bocayuva Tavares

Detecção, purificação parcial, caracterização e mutagenicidade de extrato de proteínas bioativas de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia.

Orientador: Cláudia Alessandra Fortes Aiub

Coorientador: César Luis Siqueira Júnior

Rio de Janeiro

2019

B231 Bocayuva, Gustavo Duarte Tavares
Detecção, purificação parcial, caracterização e mutagenicidade de extrato de proteínas bioativas de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) / Gustavo Duarte Tavares Bocayuva. -- Rio de Janeiro, 2019.

63

Orientadora: Claudia Alessandra Fortes Aiub.
Coorientador: César Luis Siqueira Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019.

1. saboeiro. 2. proteínas bioativas. 3. mutagênese. I. Fortes Aiub, Claudia Alessandra, orient. II. Siqueira Júnior, César Luis, coorient. III. Título.

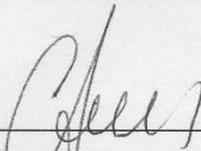
Gustavo Duarte Bocayuva Tavares

**DETECÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL, CARACTERIZAÇÃO E
MUTAGENICIDADE DE EXTRATO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS DE
SEMENTES DE *SAPINDUS SAPONARIA* L. (SAPINDACEAE)**

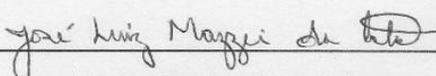
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2019.

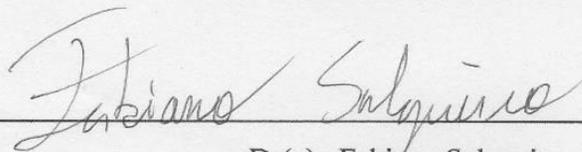
Banca Examinadora



Dr(a). Claudia Alessandra Fortes Aiub (Orientadora)
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)



Dr(a). José Luiz Mazzei da Costa
(Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)



Dr(a). Fabiano Salgueiro
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)

Nesta vida não realizamos nada sozinhos, portanto dedico esta dissertação a todas as pessoas que estiveram comigo ao longo desta jornada. Em especial para as pessoas que sei que gostariam de compartilhar este momento comigo: meus avós (*in memoriam*).

"Good Morning!" said Bilbo, and he meant it. The sun was shining, and the grass was very green. But Gandalf looked at him from under long bushy eyebrows that stuck out further than the brim of his shady hat.

"What do you mean?" he said. "Do you wish me a good morning, or mean that it is a good morning whether I want it or not; or that you feel good this morning; or that it is a morning to be good on?"

"All of them at once." said Bilbo.

The Hobbit – J.R.R. Tolkien

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Jaciara e Fernando, e irmão, Hugo, pelo apoio incondicional e amor dado ao longo de toda a minha jornada acadêmica. Não existem palavras que descrevam o sentimento que sinto e a gratidão de ter pessoas como vocês ao meu lado. Repito: não existem palavras.

Agradeço à minha melhor amiga, namorada e amor da minha vida, Ana Carolina, por igualmente me apoiar incondicionalmente e me colocar pra cima nos momentos mais difíceis dessa jornada. Nós somos um time, um time de duas pessoas, juntos nós podemos tudo.

Agradeço aos meus tios Ninil e Maria por estarem me apoiando, torcendo por mim e apostando firme no meu sucesso. Obrigado por estarem me acompanhando a cada passo que dei ao longo da minha vida acadêmica.

Agradeço aos meus orientadores: professora Dra. Claudia Aiub e professor Dr. César Luis Siqueira que acreditaram no meu potencial e apostaram em mim. Obrigado pela dedicação em minha orientação. Mesmo quando estavam atolados de assuntos para resolver me atenderam prontamente e me apoiaram nos momentos mais complicados deste processo.

Agradeço a professora Dra. Andreia da Silva, professor Dr. Carlos Fernando Oliveira e ao professor Dr. Israel Felzenszwalb pela instrução fornecida em determinados experimentos e pela recepção em seu laboratório.

Agradeço aos meus amigos “Chicleteiro”, “Lucas de Astera”, “Bemastro do Youtube”, “Duduxo”, “Zeratul”, “Salsi”, “Thiti”, “Vitin” e “Hector” por me ouvirem reclamar e ao mesmo tempo festejar nos mais diversos momentos.

Agradeço ao grupo com quem tive o prazer de trabalhar ao longo desses 4 anos (graduação e mestrado): Márcio, Renato, Camilla e Stephane.

Agradeço aos meus queridos sogros, Jorge e Adriana, por me tratarem como um filho sempre que estive com eles.

Agradeço a minha professora do ensino fundamental, Mônica, pelas conversas, pelo incentivo e pelo exemplo profissional da educação.

Agradeço a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) pela qualidade dos profissionais que nela atuam, por me preparar profissionalmente e pela infraestrutura fornecida que possibilitou a realização deste estudo. Especialmente ao Laboratório de Bioquímica e Função de Proteínas Vegetais e ao Laboratório de Genotoxicidade.

Agradeço a Pro-Reitoria de Extensão e Cultura, por ter sido contemplado em uma seleção com uma bolsa de pesquisador extensionista de pós-graduação no projeto RAPATRA.

Agradeço a CAPES e ao PPGBIO por ter sido contemplado no início de 2017 com uma bolsa de pós-graduação.

Agradeço aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Fabiano Salgueir, Prof. Dr. José Luiz Mazzei, Profa. Dra. Adriana Salgueiro e Profa. Dra. Joelma de Mesquita pela disponibilidade e pelo aceite do convite para participar de minha avaliação.

RESUMO

Sapindus saponaria L., conhecida como saboeiro, é uma planta nativa dos Neotrópicos, com ampla distribuição no Brasil, possuindo diversos usos tradicionais, mas ainda carece de estudos que comprovem o envolvimento de proteínas e seus efeitos. Nesse sentido, o presente estudo buscou detectar, purificar parcialmente, caracterizar, e avaliar a mutagênicidade do extrato bruto de proteínas presentes nas sementes de saboeiro. Através da extração em meio aquoso, precipitação por sulfato de amônio e cromatografia por gel filtração, foram purificados parcialmente, um inibidor de proteases cisteínicas e uma protease serínica. O inibidor detectado, com peso molecular entre 32 e 33kDa, apresentou significativa atividade específica de inibição contra a papaína, inibindo 75% de sua atividade. Já a protease, de aproximadamente 40kDa, apresentou maior atividade proteolítica contra substrato específico para proteases serínicas, assim como teve sua atividade inibida somente por inibidor de protease serínica. A fim de avaliar o potencial mutagênico e citotóxico do extrato bruto das sementes, quatro concentrações diferentes foram avaliadas pelo ensaio de Sobrevivência e Teste de Ames, utilizando cinco cepas diferentes de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, com a finalidade de avaliar diferentes mecanismos de mutagênese. Por sua vez, as análises de mutagenicidade e citotoxicidade indicaram que nenhuma das concentrações do extrato bruto testadas induzem respostas mutagênicas ou citotóxicas para as cepas utilizadas, na ausência de metabolização exógena. Dessa forma, as sementes de saboeiro produzem, de forma constitutiva, um inibidor de protease cisteínica e uma protease serínica, indicando que a detecção de novas moléculas bioativas é uma demonstração do potencial biotecnológico do vegetal a ser estudado.

Palavras-chave: saboeiro; proteínas bioativas; mutagênese

ABSTRACT

Sapindus saponaria L., known as soapberry, is a plant native to the Neotropics, widely distributed in Brazil possessing several traditional uses, but still lacks studies that prove the involvement of proteins and their effects. In this sense, the present study sought to detect, partially purify and characterize, as well as to evaluate the mutagenic and cytotoxic response of the crude extract of proteins in soapberry seeds. Through extraction in aqueous medium, ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography, were partially purified, an inhibitor of cysteine proteases and a serine protease. The inhibitor, with molecular weight between 32 and 33 kDa, showed a high specific activity of inhibition of the papain, inhibiting 75% of its activity. The protease, of approximately 40kDa, presented greater proteolytic activity against specific substrate of serine proteases, as well as its activity inhibited specifically by serine protease inhibitor. In order to evaluate the mutagenic and cytotoxic potential of the crude seed extract, four different concentrations were evaluated by the Ames and Survival Test, using five different strains of *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, in order to evaluate different mechanisms of mutagenesis. Further, mutagenicity and cytotoxicity analyzes indicated that the crude extract at all concentrations tested do not induce mutagenic or cytotoxic responses to the strains used, in the absence of exogenous metabolism. Thus, the seeds of soapberry constitutively produce a cysteine protease inhibitor and a serine protease, indicating that the detection of new bioactive molecules is a demonstration of the biotechnological potential of the plant to be studied.

Keywords: soapberry; bioactive protein; mutagenicity;

Lista de Ilustrações

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Registro fotográfico do fruto e da semente de <i>Sapindus saponaria</i> L. | 17 |
| Figura 2 - A: Fórmula para cálculo da Atividade Residual da Papaína. B: Fórmula para cálculo da Unidade de Inibição. | 30 |
| Figura 3 - Fórmula para Unidade de Atividade Proteolítica. | 31 |
| Figura 4 - Avaliação da atividade de inibidor de protease cisteínica do EB e frações parcialmente purificadas de sementes de saboeiro. | 35 |
| Figura 5 - SDS-Page – Análise eletroforética do perfil proteico ao longo da primeira etapa de purificação. | 36 |
| Figura 6 - Perfil cromatográfico da F30 em Biogel P-100. | 37 |
| Figura 7 - Avaliação da atividade de inibidor de protease cisteínica ao longo das etapas de purificação. | 38 |
| Figura 8 - Avaliação da atividade proteolítica da fração F60 sob efeito de diferentes inibidores. | 40 |
| Figura 9 - Avaliação da atividade proteolítica da fração F60 sobre substratos diferentes. ... | 41 |
| Figura 10 - SDS-Page – Análise eletroforética do perfil proteico da fração F60. A: Gel SDS-Page. B: Gel Zimografia. | 42 |
| Figura 11 - Perfil cromatográfico da F60 em Biogel P-100. | 43 |
| Figura 12 - Avaliação da atividade de protease serínica ao longo das etapas de purificação.. | 44 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 - Características das linhagens de Salmonella enterica sorovar Typhimurium..... | 25 |
| Tabela 2 - Avaliação do rendimento geral das etapas de enriquecimento do inibidor de proteases cisteínicas detectado. | 39 |
| Tabela 3 - Avaliação do rendimento geral das etapas de enriquecimento da proteinase serínica detectada | 45 |
| Tabela 4 - Avaliação da indução de mutagenicidade e citotoxicidade (Teste de Ames) em modelo procaríoto pelo EB | 47 |

Lista de abreviações e siglas

% Sobrev. – Percentual de sobrevivência

Abs - Absorbância

ANOVA – Análise de variância

BANA – *N*-benzoil-arginina-naftilamida

BApNA – Benzoil-arginina-*p*-nitroanilida

BSA – Bovine Sour Albumine

DN - Desnaturante

E64 – *trans*-Epoxisuccinil-L-leucil-amido(4-guanidino)-butano

EB – Extrato Bruto

EDTA – Ethilenediamine tetraacetic acid

P30 – Fração obtida entre 0 e 30% de saturação salina

P60 – Fração obtida entre 30 e 60% de saturação salina

P90 – Fração obtida entre 60 e 90% de saturação salina

P100 In – Fração contendo inibidor de protease obtida por gel filtração

P100 P – Fração contendo protease obtida por gel filtração

His- - Auxotrofia para histidina

His+ - Prototrofia para histidina

IM – Índice de Mutagenicidade

IT - Inibidor de tripsina

JB – Jardim Botânico

LB – Meio Luria Bertani

MP – Marcador de Peso

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

PVP - Polivinilpirrolidona

REFLORA - Plantas do Brasil: Resgate Histórico e Herbário Virtual para o Conhecimento e Conservação da Flora Brasileira

RJ – Rio de Janeiro

SDN - Semidesnaturante

SSTI – *Sapindus saponaria trypsin inhibitor I*

SSTI2 – *Sapindus saponaria trypsin inhibitor II*

UA - Unidade de Atividade

UI - Unidade de Inibição

Sumário

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introdução..... | 17 |
| 1.1. | <i>Sapindus saponaria</i> L. e seu uso tradicional..... | 17 |
| 1.2. | Compostos bioativos com ênfase em proteínas..... | 19 |
| 1.2.1. | Proteases e inibidores de proteases..... | 20 |
| 1.2.2. | Proteases..... | 20 |
| 1.2.3. | Inibidores de proteases..... | 20 |
| 1.2.4. | Potencial farmacológico de proteínas bioativas de origem vegetal..... | 21 |
| 1.2.5. | O potencial biotecnológico de proteínas bioativas em <i>Sapindus saponaria</i> L..... | 22 |
| 1.3. | Análises toxicológicas e sua importância para saúde, biotecnologia e farmacologia..... | 23 |
| 1.3.1. | Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico..... | 24 |
| 1.4. | Justificativa..... | 26 |
| 2. | Objetivos..... | 27 |
| 2.1. | Objetivo geral..... | 27 |
| 2.2. | Objetivos específicos..... | 27 |
| 3. | Metodologia..... | 28 |
| 3.1. | Material vegetal..... | 28 |
| 3.2. | Extração de proteínas de sementes de saboeiro..... | 28 |
| 3.3. | Purificação parcial de proteínas a partir de extrato bruto de sementes de saboeiro..... | 28 |
| 3.4. | Quantificação de proteínas..... | 29 |
| 3.5. | Detecção de inibidores de protease cisteínicas a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro..... | 29 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.6. | Detecção e caracterização de atividade de proteases a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro | 31 |
| 3.7. | Fracionamento das proteínas via SDS-PAGE | 32 |
| 3.8. | Fracionamento das proteínas via zimografia | 32 |
| 3.9. | Ensaio de mutagenicidade (Teste de Ames) e citotoxicidade | 33 |
| 4. | Resultados..... | 35 |
| 4.1. | Detecção de proteínas bioativas a partir do extrato bruto de sementes de saboeiro..... | 35 |
| 4.2. | Detecção e purificação parcial de um inibidor de protease cisteínica a partir do extrato bruto de sementes de saboeiro | 37 |
| 4.3. | Detecção e caracterização de proteases a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro | 40 |
| 4.4. | Purificação parcial de uma protease serínica a partir de extrato bruto de sementes de saboeiro..... | 43 |
| 4.5. | Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico do extrato bruto de sementes de saboeiro em modelo procarioto (Teste de Ames) | 46 |
| 5. | Discussão..... | 48 |
| 6. | Conclusão | 54 |
| 7. | Perspectivas Futuras | 55 |
| 8. | Referências | 56 |

1. Introdução

1.1. *Sapindus saponaria* L. e seu uso tradicional

A espécie *Sapindus saponaria* L., conhecida popularmente como saboeiro, sabão-de-mico, saboneteira ou sabonetinho, pertencente à família Sapindaceae Juss., é uma árvore de porte médio, com caule branco-amarelado, folhas compostas, folíolos pinados e flores branco-amareladas em cacho (ABREU MATOS, 1997; ALBIERO; BACCHI; MOURÃO, 2001; SOMNER; FERRUCCI; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2015). O fruto (**Figura 1**) é uma cápsula globosa de cor castanho-amarelada, alaranjado escuro quando seco, que abriga uma única semente de coloração negra escura e brilhante (Paoli & Santos, 1998). A espécie possui uma ampla distribuição no Brasil, sendo nativa, e com ocorrência em todas as regiões, existindo, em outros países das Américas, como México e Estados Unidos da América (NETO; SANTANA; SILVA, 2000; SOMNER; FERRUCCI; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2015).



Figura 1 - Registro fotográfico do fruto e da semente de Sapindus saponaria L. Fonte: O autor, 20019.

Diversas espécies do gênero *Sapindus* se destacam pelo seu uso tradicional, em especial terapêuticos e já são alvos de investigações bioquímicas que resultaram no isolamento de diversas substâncias (SACHIN et al., 2014). Saponinas (MIYAGAWA et al., 2009; PELEGRINI et al., 2008) foram detectadas principalmente de forma expressiva em frutos e sementes de *S. saponaria* (GUTERRES, 2005; NETO; SANTANA; SILVA, 2000). A presença de saponinas na espécie está intimamente associada ao uso das sementes e frutos como sabão, em especial por populações carentes ou sem acesso ao produto industrializado, sendo esse o seu principal e mais conhecido uso tradicional (ALBIERO; BACCHI; MOURÃO, 2001; NETO; SANTANA; SILVA, 2000). A espécie é conhecida por seus usos tradicionais terapêuticos, contra úlceras, feridas na pele e inflamações (ALBIERO; SERTIÉ; BACCHI, 2002), como diurético e tônico digestivo (DEFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004). Além disso, há registro de uso tradicional não-terapêutico da espécie, como inseticida (NETO; SANTANA; SILVA, 2000; SANTOS et al., 2008).

Dentro do gênero *Sapindus* foram registrados 55 usos tradicionais diferentes, com comprovação de 29 efeitos biológicos, sendo 32 dos usos registrados referentes à espécie *S. saponaria* (ABREU GUIRADO, 2005). No entanto, apenas 14 efeitos biológicos foram efetivamente comprovados para a espécie, demonstrando uma necessidade de investigação com relação aos efeitos dos usos tradicionais e as moléculas envolvidas com os mesmos. Dentre os estudos que comprovam os usos tradicionais registrados de extratos vegetais de partes da planta de saboeiro destacam-se os que demonstram o potencial antifúngico (DA SILVA et al., 2012), fungicida (DAMKE et al., 2011; FIORINI et al., 2016; MARINHO; KLEIN; SIQUEIRA-JUNIOR, 2018), antibacteriano e antitumoral (RASHED et al., 2013), leishmanicida e tripanomicida (CORREA et al., 2014) e larvicida (SANTOS et al., 2008). Os compostos, ou conjunto de compostos (mistura), responsáveis por esses efeitos podem ser classificados como bioativos, tendo em vista sua capacidade de exercer uma atividade específica em um determinado organismo (PLETSCHI, 1995).

1.2. Compostos bioativos com ênfase em proteínas

O conceito envolvendo o termo “bioativo” ou, ainda, “composto bioativo”, não é definido de forma padronizada e direta na literatura. Usualmente sua definição está ligada à área de pesquisa desenvolvida no estudo, permanecendo restrita aos aspectos que a permeiam. Em outras palavras, se o composto estudado, por exemplo, tem origem em um alimento e apresenta um efeito extranutricional à saúde humana, a definição do termo assume um viés médico-nutricional, como ocorre em diversos trabalhos da área (BIESALSKI et al., 2009; KRIS-ETHERTON et al., 2002; RAJARATHNAM; SHASHIREKHA; MALLIKARJUNA, 2015).

De forma geral, boa parte das pesquisas que estudam compostos bioativos busca detectar, demonstrar ou elucidar os efeitos positivos ou benéficos para a saúde humana. Este fato justifica diversos autores considerarem “bioativos” somente os compostos que exerçam tais efeitos (BIESALSKI et al., 2009; JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013; MARTIROSYAN; SINGH, 2015), excluindo da definição efeitos considerados negativos, como respostas alergênicas ou citotóxicas, por exemplo. No entanto, ao restringir este conceito somente aos compostos que apresentam efeitos benéficos à saúde humana, descartamos diversas outras atividades biológicas que poderiam potencialmente gerar algum benefício ao ser humano, mesmo que indireto, revelando um potencial biotecnológico, não necessariamente relacionado à saúde.

Tendo em vista a diversidade de formas de conceituar o termo “bioatividade” e o direcionamento da consolidação do termo a algo exclusivamente relacionado à saúde, Guaadaoui e colaboradores (2014) buscou unificar as definições, de forma preliminar e ampla, como *“composto o qual possui a capacidade de interagir com um ou mais componentes em um determinado tecido vivo, apresentando uma ampla variedade de efeitos prováveis”*. A definição obtida abrange todos os aspectos essenciais para pesquisas de compostos bioativos como: origem do material (vegetal, animal, fúngica, etc), as definições utilizadas pelas diversas áreas de pesquisa (medicina, biologia, nutrição, etc) e as questões relativas aos efeitos (disponibilidade do composto, dose, características, etc), e, portanto, será a considerada ao longo do presente trabalho.

1.2.1. Proteases e inibidores de proteases

As proteases e os inibidores de proteases desempenham funções biológicas fundamentais para os organismos, atuando desde em vias metabólicas até na defesa contra patógenos. Tais compostos podem ser encontrados nos mais diversos organismos e são largamente estudados (HABIB; FAZILI, 2007; JOANITTI; FREITAS; SILVA, 2006; MONTI et al., 2000; RYAN, 1990).

1.2.2. Proteases

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas sendo, inicialmente, classificadas como hidrolases, dentro do grupo das endopeptidases. Posteriormente, podem ser caracterizadas de acordo com a natureza do sítio ativo ou do cofator, quando presente, envolvido no mecanismo de catálise, sendo denominadas: cisteínicas, serínicas, de treonina, metaloproteases, aspárticas e glutâmicas (HOOPER, 2002; RAWLINGS et al., 2018). As proteases cisteínicas, por exemplo, apresentam, em seu sítio ativo, um grupo sulfidríla (ou mercaptano) da cadeia lateral de um resíduo de cisteína responsável pela reação, enquanto as proteases serínicas e de treonina apresentam um grupo hidroxila em resíduos de serina e treonina, respectivamente, associados a essa função. Já as metaloproteases, que apresentam um íon biovalente em seu sítio ativo, as proteases aspárticas, que apresentam um resíduo de aspartato em seu sítio ativo, e as proteases glutâmicas, que apresentam glutamato em seu sítio ativo, tem o envolvimento da água na ativação de suas reações de catálise e não por grupamentos da própria molécula, como as anteriormente citadas (HOOPER, 2002; KANOST; CLEM, 2017; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). As proteases podem, ainda, ser agrupadas em famílias e clãs de acordo com sua sequência de aminoácidos e características estruturais, como sua forma tridimensional, por exemplo, dando origem a organizações de grupos mais complexas (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

1.2.3. Inibidores de proteases

Além das proteases e seus importantes processos de clivagem de proteínas, existem as moléculas responsáveis por auxiliar no controle dessa atividade: os inibidores de proteases. No entanto, inibidores de proteases não estão restritos à somente esta função, alguns tem sido estudado e descrito por atuar na defesa contra predadores em vegetais e bioatividade anticarcinogênica para

mamíferos em determinados alimentos, por exemplo (GOMES et al., 2011; QI; SONG; CHI, 2005). Os inibidores de protease têm sido bastante estudados e o número de famílias no sistema de classificação vem aumentando, atingindo o número atual de aproximadamente 99 famílias (LASKOWSKI; QASIM, 2000; RAWLINGS et al., 2018). Por esse motivo, a caracterização destes inibidores é normalmente simplificada e feita de acordo com a sua especificidade, sendo classificados, inicialmente, como inibidores não-específicos ou classe-específicos (HIBBETTS; HINES; WILLIAMS, 1999; JOANITTI; FREITAS; SILVA, 2006). Os inibidores não-específicos são capazes de inibir membros de duas ou mais classes de proteases, enquanto os inibidores classe-específicos inibem somente proteases de uma determinada classe, sendo classificados de acordo com a mesma. Dessa forma, os inibidores específicos de proteases cisteínicas, por exemplo, são denominados inibidores de proteases cisteínicas, e assim sucessivamente para as demais classes. Essa classificação pode, ainda ser subdividida ao se levar em consideração outras características como a cinética proteica, massa molecular e até mesmo origem (animal, vegetal, etc).

1.2.4. Potencial farmacológico de proteínas bioativas de origem vegetal

Nos diversos organismos em que podem ser encontradas, as proteínas bioativas desempenham funções precisas que dependem, muitas vezes, de sua alta especificidade. As funções específicas e a alta especificidade são características que proporcionam vantagens no uso terapêutico de proteínas com relação ao uso de moléculas menores (Leader et al., 2008), como a diminuição de efeitos adversos, por exemplo. Muitas proteínas de origem vegetal apresentam atividade biológica relacionada ao uso do vegetal na medicina tradicional (AL AKEEL et al., 2014) e já tem seu potencial na indústria farmacológica estudado (EKOR, 2014; OZGUR; TUTAR, 2013).

Além da aplicabilidade na biotecnologia descrita anteriormente, estudos demonstram o potencial terapêutico de proteínas bioativas, como inibidores de proteases e proteases, por exemplo. De forma completa, Gomes e colaboradores (2011) apontam o potencial farmacológico de diversos inibidores de proteases de origem vegetal, em especial a atividade antitumoral e anti-inflamatória, corroborado por outros estudos (SRIKANTH; CHEN, 2016). De forma semelhante, Brito e colaboradores (2016) demonstraram o potencial antibacteriano de dois inibidores de proteases bioativos contidos em uma mesma fração do extrato aquoso de sementes de *Hymenaea courbaril*. O resultado obtido pela pesquisa reforça a ideia de que extratos brutos e misturas não-

puras, ou parcialmente purificadas, também podem apresentar bioatividade a partir da sinergia entre uma ou mais moléculas, no caso, inibidores de proteases.

As proteases também podem ser empregadas na farmacologia, compondo tratamentos para diversas doenças humanas. Em seu estudo, Salas e colaboradores (2008) descrevem uma associação entre proteases cisteínicas de origem vegetal e tratamentos terapêuticos para úlceras no trato digestivo, feridas na pele e como antitumoral. Por sua vez, Gomes e colaboradores (2011) descrevem, também, efeitos associados à modulação de respostas imunológicas e êxito no tratamento de úlceras e feridas, por exemplo, a partir de proteases de origem vegetal.

1.2.5. O potencial biotecnológico de proteínas bioativas em *Sapindus saponaria L*

Dentre os potenciais dos extratos de *S. saponaria* citados anteriormente, destaca-se o inseticida, único descrito sendo obtido a partir de extrato aquoso. Uma vez que a extração aquosa, geralmente, privilegia a extração de proteínas e a manutenção de sua conformação nativa, essa forma de extração permite a detecção de atividades relacionadas a essas moléculas. Dessa maneira, Santos e colaboradores (2008) demonstraram a existência de inibidores de tripsina em extrato aquoso de sementes de *S. saponaria*, pela incubação do extrato com enzimas semelhantes a tripsina presentes no intestino médio de lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* (praga de lavouras conhecida como lagarta-do-cartucho) em estágio de desenvolvimento. Buscando elucidar este efeito, Macedo e colaboradores (2011) purificaram, por cromatografia de troca iônica e de afinidade, um inibidor de tripsina das sementes de *Sapindus saponaria*, de 18kDa, denominado SSTI (*Sapindus saponaria tripsina inhibitor I*), eficaz na inibição de enzimas digestórias de diversas espécies de larvas de artrópodes, reconhecidas pragas em lavouras. Este inibidor pode estar envolvido com a atividade tóxica às larvas de *S. frugiperda* inicialmente detectada por Santos e colaboradores (2008) e representa um grande potencial para a agricultura, pois poderia ser utilizado diretamente como um extrato defensivo contra pragas e em estudos de mecanismo de defesa vegetal, por exemplo. Posteriormente, Lima (2012) purificou, utilizando cromatografia de afinidade e de fase reversa, outro inibidor de protease serínica, denominado SSTI2 (*Sapindus saponaria tripsina inhibitor II*), de 7,5kDa, também a partir de sementes de *S. saponaria*. Este não foi só eficaz na inibição de enzimas digestivas de artrópodes-praga mas também de artrópodes vetores de doenças, como a espécie *Aedes aegypti*, demonstrando um potencial biotecnológico de importância agroeconômica e epidemiológica.

Mais recentemente, Rebello e Siqueira-Júnior (2006) detectaram a produção induzida de uma proteína com atividade de inibidor de protease cisteínica em folhas de saboeiro, em resposta a ferimento e tratamento com metil-jasmonato (eliciador da resposta de defesa de plantas). Nesse trabalho, o inibidor foi detectado e caracterizado por reagir cruzadamente com anticorpos policlonais contra uma cistatina do tomate, sugerindo que a proteína detectada pode ser a primeira cistatina descrita em plantas de saboeiro. Apesar de seu potencial não ter sido avaliado, é possível inferir que a presença de inibidores de protease cisteínicas em plantas de saboeiro também representam um potencial biotecnológico, tendo em vista estudos que demonstram potencial inseticida (Koiwa, et al., 2000; Siqueira-Júnior et al., 2002) e antifúngico (Soares-Costa et al., 2002; Siqueira-Júnior et al., 2002).

1.3. Análises toxicológicas e sua importância para saúde, biotecnologia e farmacologia

O uso tradicional de extratos vegetais para fins terapêuticos é uma das formas mais antigas de prevenção e cura de doenças que continua bem difundida em certas populações de países em desenvolvimento, muito provavelmente pela carência de acesso à infraestrutura de saúde, principalmente com relação aos tratamentos alopáticos (SOUZA et al., 2013; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). Portanto, além da necessidade de comprovação dos efeitos biológicos registrados, e a detecção das moléculas envolvidas com estes efeitos, são necessários estudos para averiguar a segurança da utilização do vegetal como medicamento. Os dados obtidos, por sua vez, são utilizados para direcionar a população na melhor forma de administração do composto e, possivelmente, para o desenvolvimento de um novo produto biotecnológico através do uso racional de sua síntese, pela molécula de interesse. Dessa forma, um importante passo para a manutenção do uso do vegetal como medicamento, na produção e emprego de um novo produto (biotecnológico ou farmacológico), é a realização dos testes que avaliam riscos toxicológicos capazes de avaliar o potencial citotóxico, mutagênico e genotóxico, por exemplo. Tais testes são utilizados como padrão para avaliar danos genéticos, de um determinado composto antes de sua liberação para utilização, pela população, seguindo as recomendações da OECD (do inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development*) (OECD, 2015).

Porém, sendo a relação entre exposição e carcinogênese já bem estabelecida para muitos compostos e moléculas conhecidas (ICH, 2011), novas moléculas biologicamente ativas, candidatas ao uso farmacológico ou biotecnológico, devem ser submetidas aos testes que avaliam

seu potencial mutagênico, citotóxico e genotóxico. De acordo com a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development*) (OECD, 2015), tais testes possuem o propósito de identificar as concentrações, da substância estudada, que possam causar, a longo prazo, dano genético às células e utilizar as informações obtidas para fins regulatórios de produtos direcionados ao uso humano.

1.3.1. Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico

Devido à rapidez na obtenção de resultados, ampla aceitação (MORTELMANS; ZEIGER, 2000) e seu baixo custo, o Teste de Ames é, normalmente, o primeiro teste toxicológico utilizado para avaliar um determinado composto químico. Além disso, os resultados obtidos nesse teste apresentam uma alta correlação com modelos *in vitro* de células de mamíferos, isto é, se um dado composto apresenta resposta mutagênica neste teste, muito provavelmente apresentará a mesma resposta em mamíferos. O teste é conhecido como ensaio de mutação reversa bacteriana e faz uso de diferentes linhagens de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* com mutações induzidas em *loci* específicos, tornando-as auxotróficas para histidina (*His-*), que quando em contato com um agente mutagênico, revertem para o fenótipo selvagem, isto é, tornam-se prototróficas para histidina (*His+*). As diferentes linhagens de *S. Typhimurium*, com mutações em *loci* específico para a produção do aminoácido histidina são capazes de detectar mecanismos diferentes pelos quais a mutagenicidade ocorre (Tabela 1). A presença do plasmídeo pKM101 aumenta a sensibilidade às possíveis moléculas mutagênicas e confere resistência à ampicilina. A ausência do gene *uvrB* nas linhagens TA97, TA98, TA100 e TA104 aumenta a sensibilidade à mutágenos e as torna auxotróficas para biotina e a mutação no gene *rfa*, presente em todas as linhagens, aumenta a permeabilidade à grandes moléculas.

Tabela 1– Características das linhagens de Salmonella entérica sorovar Typhimurium.

| Linhagem | Mutação | Plasmídeo | Mutações | Tipo de Mecanismo | |
|-----------------|-----------------|------------------|------------------|--------------------------|-------------------|
| | His | | | | |
| TA97 | <i>hisD6610</i> | pKM101 | <i>rfa, uvrB</i> | Adição | G:C |
| TA98 | <i>hisD3052</i> | pKM101 | <i>rfa, uvrB</i> | Adição ou Deleção | G:C |
| TA100 | <i>hisG46</i> | pKM101 | <i>rfa, uvrB</i> | Substituição | G:C por A:T |
| TA102 | <i>hisG428</i> | pKM101, pAQ1 | <i>rfa</i> | Substituição | A:T por G:C |
| TA104 | <i>hisG428</i> | pKM101 | <i>rfa, uvrB</i> | Substituição | A:T por G:C |

Fonte: MORTELMANS; ZEIGER, 2000

1.4. Justificativa

O Abreu Guirado (2005) demonstra a necessidade de estudos a respeito dos usos tradicionais tanto do gênero *Sapindus* quanto da espécie *S. saponaria*. Portanto, o estudo de proteínas bioativas representa o primeiro passo na caracterização e comprovação de efeitos biológicos registrados e na demonstração de seu potencial biotecnológico ou farmacológico. Os estudos já realizados a respeito de proteínas bioativas detectadas representam apenas uma parcela das moléculas envolvidas com os usos tradicionais do saboeiro, sendo muitos dos usos registrados possivelmente associados à outras proteínas bioativas ainda não descritas na literatura.

Além disso, uso tradicional de vegetais para fins terapêuticos é uma das formas mais antigas de prevenção e cura de doenças. No entanto, a exposição a produtos vegetais provenientes de seu uso tradicional podem trazer riscos quando a toxicidade destes não foi completamente elucidada. Dessa forma, faz-se necessário, também, estudos para averiguar a segurança da utilização do extrato vegetal, sendo os dados obtidos utilizados para orientar a população na melhor forma de uso do composto e, possivelmente, para o desenvolvimento de um novo produto biotecnológico através do uso racional de sua síntese, pela molécula de interesse.

Porém, um importante passo para a manutenção do uso do extrato vegetal e na produção e emprego de um novo produto, é a realização dos testes que avaliam riscos toxicológicos, entre eles a mutagenicidade e citotoxicidade, seguindo as recomendações da (OECD, 2015).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Detectar, purificar parcialmente e caracterizar bioquimicamente proteínas bioativas produzidas em sementes de *Sapindus saponaria*, além de avaliar sua mutagenicidade e citotoxicidade.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar, purificar parcialmente e caracterizar proteases produzidas em sementes de *S. saponaria*;
- Detectar, purificar parcialmente e caracterizar inibidores de proteases produzidos em sementes de *S. saponaria*;
- Avaliar o potencial de indução de respostas mutagênicas e citotóxicas em modelo procarioto (Teste de Ames) pelo extrato bruto aquoso de sementes de *S. saponaria*;

3. Metodologia

3.1. Material vegetal

As sementes foram coletadas na região de São João da Barra/RJ (21°44'58" S, 41°09'60" W), norte fluminense, no período de 2012 à 2017, sendo parte depositada no herbário Prof^o Jorge Pedro Pereira Carauta – HUNI, sob o número de tombo HUNI1375, e parte armazenada em freezer. O descongelamento do material foi realizado em ambiente refrigerado, entre 17 e 18 °C. O material foi submetido à uma lavagem em solução 10% hipoclorito de sódio e três lavagens seguidas com 1L de água destilada e seco em ambiente refrigerado (entre 17 e 18 °C) por 24h. Posteriormente o material foi estocado entre 0°C e -10°C até sua utilização.

3.2. Extração de proteínas de sementes de saboeiro

As sementes higienizadas foram pesadas em porções de 60g e em seguida pulverizadas com o auxílio de um moinho de facas do tipo Willye (Fortinox) até a formação de uma farinha fina, sendo armazenada entre 0°C e -10°C para utilização em, no máximo, um mês. As proteínas, então, foram extraídas por incubação de 20g do material vegetal pulverizado em tampão Tris-HCl 50mM (pH 6,0), na proporção de 1:4 (m/v) contendo 10% (do peso seco das sementes pulverizadas) de polivinilpirrolidona (PVP), sob agitação por 30 minutos à 4°C. A mistura, então, foi filtrada em filtro de papel qualitativo (80g, 44µm), e o filtrado foi centrifugado a 15000xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi novamente filtrado em filtro de papel qualitativo (80g, 44µm) e o novo filtrado foi denominado extrato bruto (EB) e utilizado como fonte de proteínas, alcançando rendimento médio de 70mL. Posteriormente, o EB teve sua composição proteica quantificada e foi avaliado quanto à presença de atividade biológica e quanto ao seu potencial mutagênico e citotóxico.

3.3. Purificação parcial de proteínas a partir de extrato bruto de sementes de saboeiro

O EB foi submetido à precipitação por sulfato de amônio (*salting out*), utilizando os intervalos de 0-30%, 30-60% e 60-90% de saturação, dando origem a três frações denominadas F30, F60 e F90, respectivamente. As frações F30 e F60, foram submetidas à cromatografia de gel filtração utilizando resina Bio-Gel P-100 (BioRad) em coluna de vidro (47x1,4cm), utilizando Tris-HCl 20mM (pH 6,0) como eluente. Um fluxo de 4mL/h foi estabelecido com auxílio de uma bomba peristáltica. O processo originou 60 frações de 1mL cada. As 120 frações foram avaliadas por

espectrofotometria (Biospectro SP-220), em cubeta de quartzo, à 280nm, para verificação da presença de proteínas, e testadas quanto a presença de atividade de interesse. De forma complementar às análises, as frações oriundas da precipitação e do processo cromatográfico foram analisadas por eletroforese utilizando a metodologia SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e zimografia (EGITO et al., 2007).

3.4. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas do EB e das frações resultantes dos processos de purificação foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando como referência para as dosagens uma curva padrão. Para confecção da curva padrão, foi utilizado Albumina Sérica Bovina (BSA), na concentração final de 0µg/mL, 2µg/mL, 4µg/mL, 6µg/mL, 8µg/mL e 10µg/mL, em tubos de microcentrífuga contendo água deionizada (Milli-Q), totalizando 800µL, e 200µL do reagente de Bradford, para obtenção da reação, resultando no volume final de 1mL. Após 5 minutos de reação, as misturas foram analisadas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220), em cubeta de vidro, à 595nm.

3.5. Detecção de inibidores de protease cisteínicas a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro

O EB e as frações, oriundas tanto da precipitação por sulfato de amônio, quanto da cromatografia de gel filtração, foram analisadas através de ensaios de inibidores de proteases cisteínicas. Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Siqueira Júnior e Colaboradores (2002), utilizando *N*-benzoil-arginina-naftilamida (BANA) como substrato a ser clivado e 2µg de papaína (Sigma Aldrich) como protease modelo a ser inibida pelas proteínas contidas no extrato. A papaína foi incubada, individualmente, com 40µg de proteínas totais contidas nas amostras por 10 minutos à 37°C em tampão fosfato de sódio 250mM, 2,5mM EDTA, 25mM β-mercaptoetanol (pH 6,0). O ensaio foi iniciado com a adição de 35µL de BANA à 5mM e incubação por 30 minutos à 37°C. A atividade foi encerrada pela adição de 500µL de solução 2% HCl em etanol e, em seguida, corada utilizando 500µL de solução corante (0,06% *p*-dimetilaminacinaldeído em etanol). As misturas de reação foram analisadas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220), em cubeta de vidro, a 540nm, utilizando como branco tubo contendo somente tampão fosfato de sódio e BANA e controle positivo tubo contendo tampão fosfato de sódio, papaína e BANA (referência para 100% de atividade).

Os experimentos foram realizados 8 vezes de forma independente, com duplicatas, e analisados estatisticamente para determinação de diferenças estatísticas pelo teste t de Student. Para avaliação da atividade, os resultados foram expressos em atividade residual da papaína (**Figura 2A**) e para avaliação do rendimento os resultados foram expressos em unidades de inibição (UI) (**Figura 2B**).

A

$$\frac{\left(\text{Absorbância da Reação Contendo Amostra} * 100\% \right)}{\text{Absorbância da Reação do Controle Positivo}} = \text{Atividade Residual da Papaína}$$

B

$$\left(\text{Absorbância da Reação do Controle Positivo} * 100 \right) - \left(\text{Absorbância da Reação Contendo Amostra} * 100 \right) = \text{Unidade de Inibição}$$

Figura 2 - A: Fórmula para cálculo da Atividade Residual da Papaína. B: Fórmula para cálculo da Unidade de Inibição. Fonte: O autor, 2019

3.6. Detecção e caracterização de atividade de proteases a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro

Com o intuito de detectar a atividade de proteases no extrato e nas frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro, foi utilizada uma modificação da metodologia descrita por Siqueira Júnior e Colaboradores (2002). De forma semelhante, o EB e as frações foram incubadas em tampão fosfato de sódio 250mM, 2,5mM EDTA, 25mM β -mercaptoetanol (pH 6,0), utilizando BANA como substrato. As misturas de reação foram analisadas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 540nm, utilizando como branco tubo contendo somente tampão fosfato e BANA. Como variação da técnica descrita, as amostras foram avaliadas na ausência de qualquer inibidor e na presença de diferentes inibidores de proteases, a saber: 1mM E64 (*Trans*-epoxisuccinil-L-leucil-amido(4-guanidino)-butano) (CAS: 66701-25-5); 1mM inibidor de tripsina (IT) (CAS: 9035-81-8), 10mM EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético); visando a detecção de proteases cisteínicas, serínicas e metaloproteases, respectivamente.

A fim de determinar a especificidade da protease detectada com substratos, a atividade das amostras também foi aferida na presença de BApNA (Benzoil-arginina-*p*-nitroanilida), um substrato específico para proteases serínicas, em substituição ao BANA, utilizando a mesma metodologia anteriormente descrita.

Os experimentos foram realizados 8 vezes de forma independente, com duplicatas, e analisados estatisticamente para determinação de diferenças estatísticas pelo teste t de Student. Para avaliação da atividade, os resultados foram expressos em Unidades de Atividade (UA) (**Figura 3**).

$$\frac{\text{Absorbância da Reação}}{\text{Absorbância do Controle}} * 100 = \text{Unidade de Atividade}$$

Figura 3 - Fórmula para Unidade de Atividade Proteolítica.
Fonte: O autor, 2019.

3.7. Fracionamento das proteínas via SDS-PAGE

Parte do EB e das frações oriundas dos processos de purificação foram incubadas na proporção 1:3 (v/v) em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5mM; 2,5% dodecil sulfato de sódio; 0,002% azul de bromofenol; 5% β -mercaptoetanol; 10% glicerol) e, posteriormente, fervidas por 3 minutos, sendo denominadas amostras desnaturadas (DN). Por sua vez, o extrato ou fração incubados em tampão de amostra não submetido à fervura é, então, denominada amostra semi-desnaturada (SDN).

As amostras foram fracionadas pelo método SDS-PAGE, como proposto por Laemmli, (1970), utilizando gel de poliacrilamida 12,5% em sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems* (BioRad). O fracionamento foi obtido em tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, 0,1% dodecil sulfato de sódio) à 130V por 2h. Ao final deste período o gel foi incubado em solução corante comassie (40% metanol; 10% ácido acético; 0,1% *comassie brilliant blue* R250, em água destilada), por uma hora, sendo posteriormente incubado em solução descorante (5% metanol; 7% ácido acético em água destilada) até a completa descoloração do gel e visualização das bandas proteicas.

3.8. Fracionamento das proteínas via zimografia

Uma variação da técnica de SDS-PAGE, denominada zimografia, foi empregada para detectar proteases ao longo do processo de purificação, seguindo as diretrizes da metodologia proposta por Egito e colaboradores (2007), com acréscimo de 0,1% de gelatina no gel a ser utilizado. Neste método, a amostra incubada no tampão de amostra não foi submetida à fervura (SDN). O fracionamento também foi obtido em tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, 0,1% dodecil sulfato de sódio) à 130V por 2h. Ao final deste período, o gel foi incubado duas vezes em solução 2,5% triton X-100 por 30 minutos, sob agitação. Em seguida, o gel foi incubado em tampão de atividade (fosfato de sódio 250mM, 2,5mM EDTA, pH 6,0) por uma hora à 37 °C, em incubadora com agitador orbital (60rpm). O gel foi, então, corado por incubação em solução corante comassie (40% metanol; 10% ácido acético; 0,1% *comassie brilliant blue* R250) por uma hora, sendo posteriormente incubado em solução descorante (5% metanol; 7% ácido acético) até a completa descoloração do gel e visualização das áreas onde a gelatina contida no gel foi clivada pela atividade de proteases.

3.9. Ensaio de mutagenicidade (Teste de Ames) e citotoxicidade

Para avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade foi utilizado modelo procarioto composto pelo conjunto cepas proposto por Mortelmans e Zeiger (2000) contendo as linhagens TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104. Os ensaios, então, foram realizados de acordo com as Diretrizes 471 para Testes de Mutagenicidade (OECD, 1997).

As bactérias foram incubadas por 16h-18h à 37°C sob agitação (60rpm) em 10mL de meio Louria Bertani líquido (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl) com 31,5µL de ampicilina (8mg/mL) e 2,5µL de tetraciclina (8mg/mL), somente para TA102, para atingir a fase estacionária de $1-2 \times 10^9$ ufc/mL e serem utilizadas no teste. Os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo repetidos três vezes, e os resultados analisados estatisticamente por ANOVA e teste t de Student, visando à determinação estatística de diferenças.

Para o teste de Ames, 100µL da solução contendo bactérias em fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ ufc/mL) e 100µL de uma das quatro concentrações de EB (1µg/µL; 0,1µg/µL; 0,01µg/µL; 0,001µg/µL), diluídas em 0,9% NaCl, ou do controle positivo, ou do controle negativo (0,9% NaCl) foram incubados em 500µL de tampão fosfato de sódio (0,2M; pH 7,4) por 20 min à 37°C. Após esse período, 2mL de ágar de superfície (0,7% ágar bacteriológico; 0,5% de NaCl; 10% biotina/histidina), à 40°C são adicionados à mistura e esta foi vertida em placa de petri contendo meio ágar Vogel-Bonner (1% ágar bacteriológico; 2% solução de sais Vogel-Bonner; 2% glicose), levado à incubação por 72h em estufa à 37°C e as colônias revertentes contabilizadas. De acordo com as Diretrizes 471 da OECD (OECD, 1997), o EB testadas será considerado mutagênico se apresentar um índice de mutagenicidade pelo menos duas vezes maior que o observado no controle negativo.

Para indução e controle de respostas mutagênicas, foram utilizados como controle positivo 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO) à 0,01µg/µL, para as linhagens TA97, TA98 e TA100, e metilmetano sulfonato (MMS) à 0,25µg/µL para TA102, e 2,5µg/µL para TA104.

Para ensaio de sobrevivência, 100µL da solução contendo bactérias em fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ ufc/mL) foram incubados por 20 min à 37°C, em contato com as amostras, ou controle negativo ou controle positivo, nas mesmas condições descritas para o teste de Ames. Em seguida, 10µL da mistura teste são diluídos seriadamente, utilizando solução 0,9% NaCl, visando a

concentração final de $1-2 \times 10^2$ ufc/placa. Por fim, 100 μ L desta mistura são alíquotados para uma placa de petri contendo meio ágar Luria Bertani (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 1,5% ágar bacteriológico), sendo espalhados com auxílio de pérolas de vidro, e as placas são incubadas por 24h em estufa à 37°C. Após esse período, as colônias são contabilizadas e o percentual de sobrevivência é calculado em relação ao controle negativo, sendo considerada concentração tóxica a que apresentar sobrevivência inferior a 70%.

4. Resultados

4.1. Detecção de proteínas bioativas a partir do extrato bruto de sementes de saboeiro

Após o processo de extração, o EB foi submetido à precipitação por Sulfato de amônio, utilizando três intervalos de saturação (0-30%, 30-60% e 60-90%), com o objetivo de separar proteínas. Amostras das frações obtidas (F30, F60 e F90) e do EB foram submetidas ao ensaio de atividade inibitória, de acordo com a metodologia proposta por Siqueira Júnior e colaboradores (2002), a fim de detectar atividade de inibidores de protease usando a papaína como enzima modelo. A atividade residual da papaína quando incubada com amostras do EB, F30, F60 e F90 foi avaliada em comparação ao controle, e também entre as mesmas (**Figura 4**). Utilizando 40 μ g de proteínas totais, o EB apresentou atividade inibitória contra a papaína, inibindo 63% da atividade enzimática.

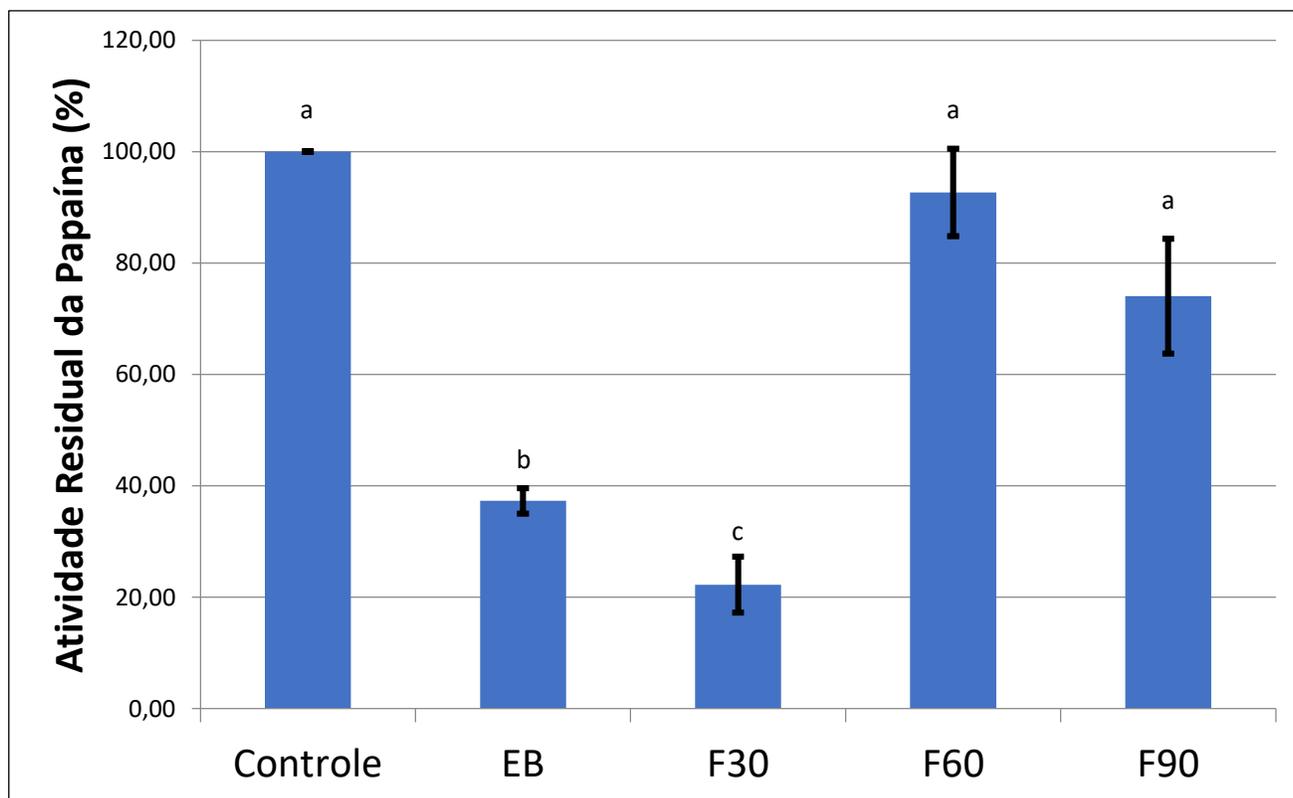


Figura 4– Avaliação da atividade de inibidor de protease cisteínica do EB e frações parcialmente purificadas de sementes de saboeiro. Controle – Tubo contendo tampão fosfato, BANA e papaína (2 μ g), ausência de extrato; EB – Tubo contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g) e amostra do EB (40 μ g); F30 - Tubo contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g) e amostra da F30 (40 μ g); F60 – Tubo contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g) e amostra da F60 (40 μ g); F90 – Tubo contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g) e amostra da F90 (40 μ g). Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre os dados pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Tal atividade pode ser detectada de forma mais expressiva na fração F30, atingindo 78% de atividade inibitória contra papaína, um aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparado à atividade observada no EB. Por sua vez, as atividades das frações F60 e F90 não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparadas ao controle. No entanto, é possível observar o evento de ligeiro aumento da atividade proteolítica na F60, isto é, quebra do substrato, e uma diminuição média de aproximadamente 20% da atividade proteolítica da papaína contra o substrato na F90.

As amostras obtidas também foram analisadas via SDS-PAGE e, ao se observar o perfil proteico das frações em comparação com o EB (**Figura 5**), é possível verificar a eficácia da precipitação por sulfato de amônio ao separar as proteínas em três frações ricas das mesmas. Na raia contendo amostra da F30 é possível notar uma banda mais evidente de aproximadamente 33kDa. A fração F60 apresenta a presença de diversas proteínas em seu perfil, indicando que boa parte das proteínas contidas em sementes de saboeiro precipita nesta faixa de saturação salina (30 a 60% de saturação). Já a fração F90 apresenta baixa diversidade de proteínas, com faixa de massas moleculares entre 16 e 65kDa, com baixa concentração das bandas proteicas.

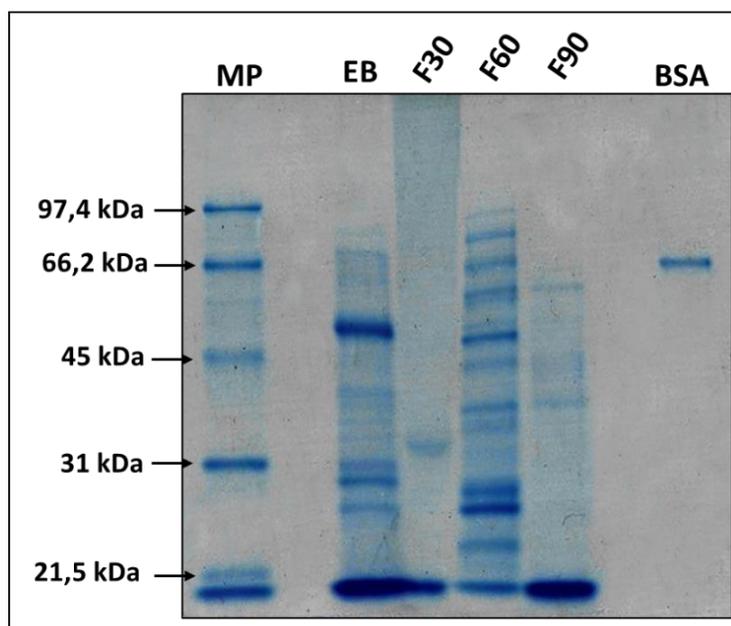


Figura 5 – SDS-Page – Análise eletroforética do perfil proteico ao longo da primeira etapa de purificação. MP – Marcador de Peso Molecular; EB – Extrato Bruto (20 µg); F30 – Amostra da F30 (20 µg); F60 – Amostra da F60 (20 µg); F90 – Amostra da F90 (20 µg).

4.2. Detecção e purificação parcial de um inibidor de protease cisteínica a partir do extrato bruto de sementes de saboeiro

Tendo em vista a detecção da mesma atividade inibitória do EB na F30, diversas frações F30, resultantes de mais de 10 extrações independentes, foram acumuladas e submetidas à cromatografia de filtração em gel. A avaliação quanto a presença de proteínas, via leitura a 280nm, e a presença de atividade inibitória, via ensaio de atividade, indicaram um espectro de atividade de interesse entre as frações 25 e 31, sendo a fração 31 a com atividade inibitória mais expressiva (**Figura 6**). Os sucessivos processamentos por cromatografia possibilitaram o acúmulo de todas as frações, especialmente da fração 31, sendo esta amostra denominada “P-100 In” e utilizada nos ensaios subseqüentes.

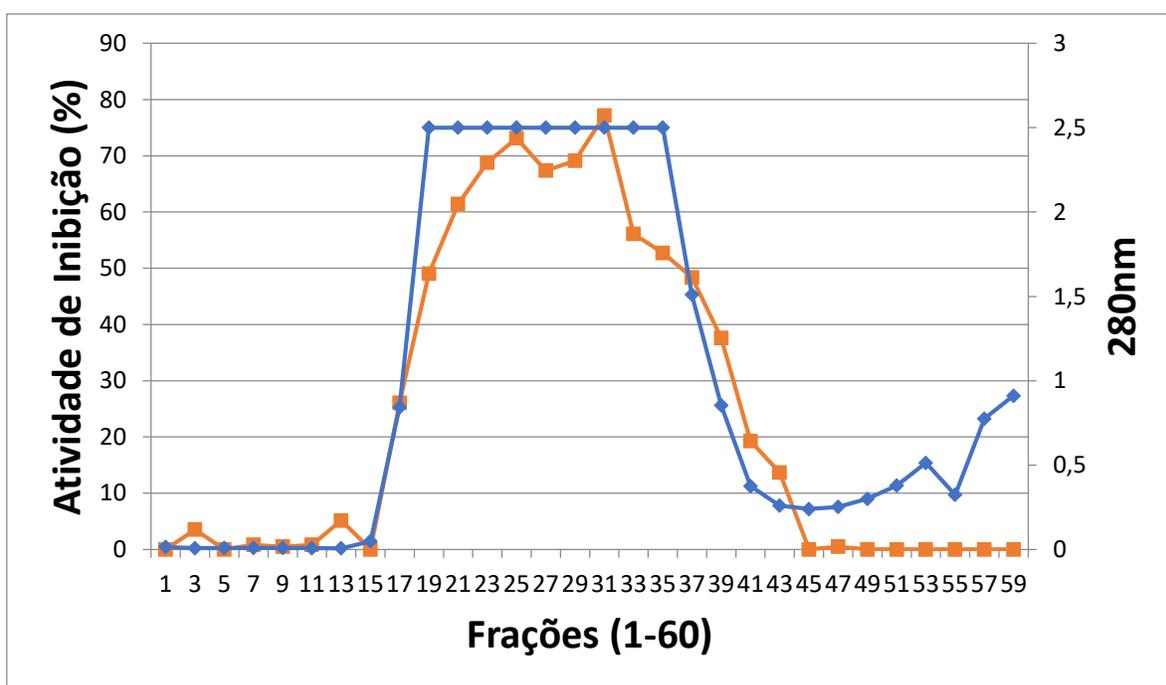


Figura 6– Perfil cromatográfico da F30 em Biogel P-100. Série azul – Absorbância à 280nm; Série laranja – Atividade de Inibição contra a papaína (2µg).

Buscando verificar a eficácia dos processos de enriquecimento, foram realizados ensaios de atividade inibitória comparando cada uma das etapas de enriquecimento utilizadas: extração (EB), precipitação por sulfato de amônio (F30) e cromatografia de gel filtração (P-100 In). De forma geral, o EB e a F30 mantiveram suas taxas de inibição na faixa de 60% e 80%, respectivamente, apresentando um aumento significativo ($p < 0,05$) de atividade de inibição entre essas duas etapas (**Figura 7**). Por sua vez, a fração P-100 In apresenta um aumento da atividade de inibição, alcançando aproximadamente 85% de inibição da papaína (**Figura 7**). No entanto, tal aumento não foi significativo em comparação com a etapa anterior. De forma semelhante, a avaliação do rendimento das etapas de fracionamento (**Tabela 2**) demonstra um aumento da atividade de inibição específica, que é corroborada pela diminuição do rendimento em massa de proteínas, acompanhado de aumento da atividade de inibição ao passar de cada etapa.

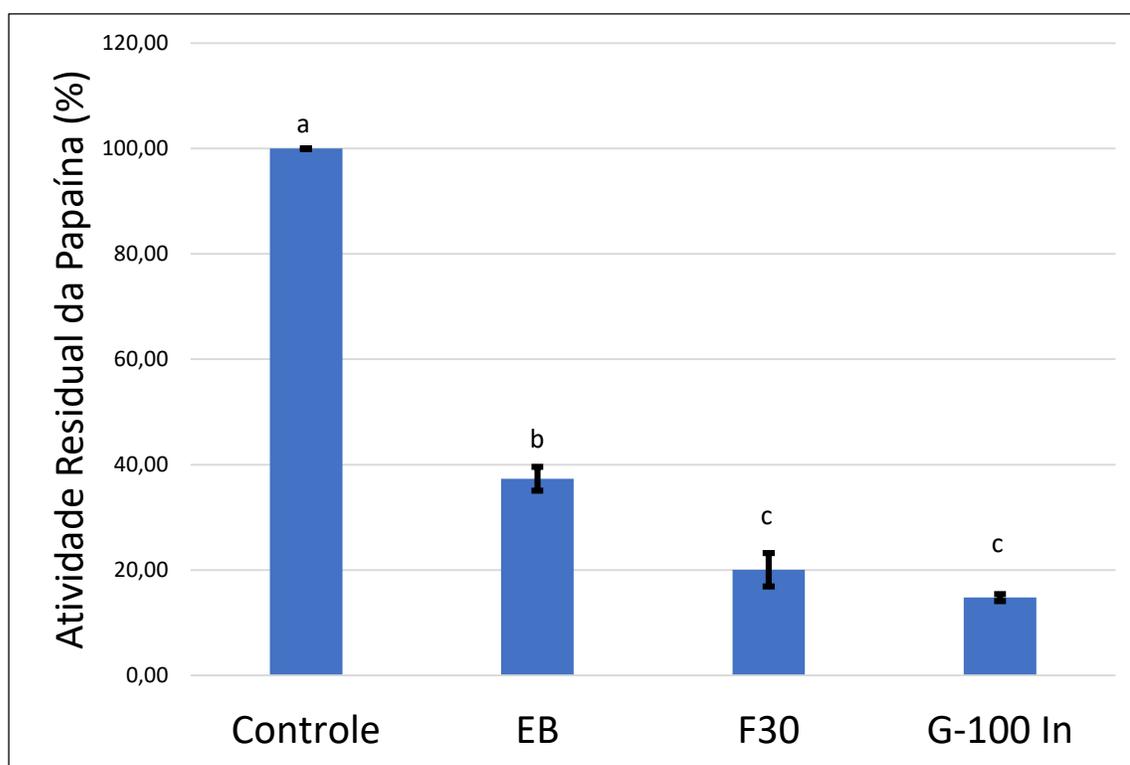


Figura 7– Avaliação da atividade de inibidor de protease cisteínica ao longo das etapas de purificação. Controle – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g), ausência de extrato; EB – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g) e amostra do EB (40 μ g); F30 - Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g) e amostra da F30 (40 μ g); P-100 In – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA, papaína (2 μ g) e amostra da fração P-100 In (40 μ g). Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre os dados pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Rendimento e atividade das etapas de fracionamento do inibidor de proteases cisteínicas detectado.

| ETAPA | Massa de Proteínas (mg) | Atividade de Inibição(Ul) | Atividade Específica(Ul/mg) | Rendimento de Massa de Proteínas (%) | Rendimento de Atividade de Inibição (%) |
|----------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---|
| EB | 40 | 36,03 | 900,78 | 100 | 100 |
| F30 | 11,5 | 49,35 | 1233,75 | 28,75 | 136,96 |
| P-100 In | 4 | 54,38 | 1359,48 | 10 | 150,92 |

Legendas: EB – Proteínas obtidas a partir do processo de extração; F30 – Proteínas obtidas a partir da precipitação por sulfato de amônio do EB no intervalo de saturação de 0% a 30%; P-100 In – Proteínas obtidas a partir da cromatografia realizada com amostra da F30. Fonte: O autor, 2019.

4.3. Detecção e caracterização de proteases a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro

A partir do aumento de atividade proteolítica pela F60 observado na **Figura 4**, a fração F60 passou a ser avaliada separadamente, utilizando uma adaptação do ensaio de atividade, na qual a enzima modelo (papaína) é retirada, sendo observada somente a atividade proteolítica da amostra em questão. Simultaneamente, na tentativa de caracterizar a proteína responsável pela atividade proteolítica observada na fração, amostras da F60 foram incubadas com inibidores específicos de proteases cisteínicas (E64), serínicas (IT) e metaloproteases (EDTA). Dos inibidores utilizados somente o inibidor de tripsina foi capaz de inibir a atividade da fração, atingindo 100% de inibição em todos os ensaios realizados (**Figura 8**). Em comparação, nenhum dos outros inibidores foi capaz de alterar significativamente a atividade da fração.

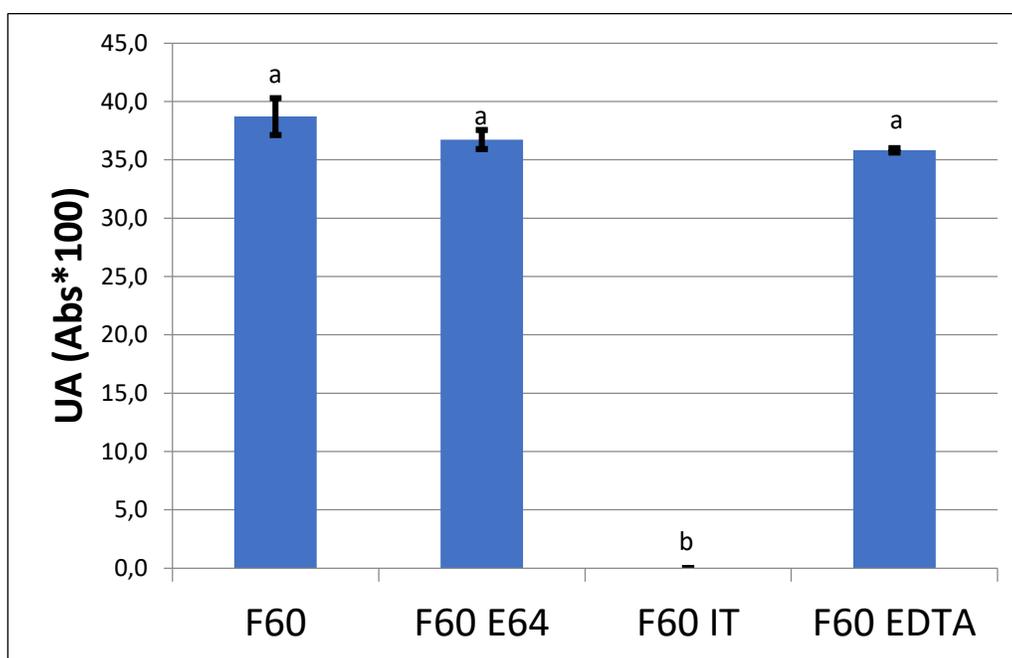


Figura 8 – Avaliação da atividade proteolítica da fração F60 sob efeito de diferentes inibidores. F60 - Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA e amostra de F60 (40µg); F60 E64 – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA, amostra da F60 (40µg) e inibidor específico para proteases cisteínicas (1mM); F60 IT – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA, amostra da F60 (40µg) e inibidor de tripsina (1mM); F60 EDTA – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA, amostra da F60 (40µg) e inibidor de metaloproteases (20mM). Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre os dados pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Com o objetivo de obter dados bioquímicos complementares sobre a protease detectada, amostras da F60 foram incubadas com dois substratos diferentes: BANA, comum tanto a proteases serínicas quanto cisteínicas, e BApNA, específico de proteases serínicas. Ao encontro dos dados obtidos nos demais ensaios, a atividade da protease detectada é significante maior contra um substrato específico para proteases serínicas, em comparação a sua atividade contra o substrato comum à proteases serínicas e cisteínicas (**Figura 9**).

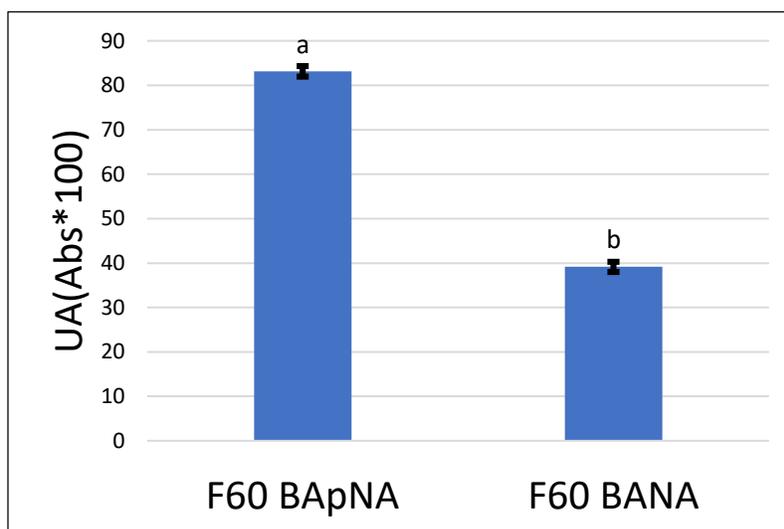


Figura 9 – Avaliação da atividade proteolítica da fração F60 sobre substratos diferentes. F60 BApNA - Tubo de reação contendo tampão fosfato, amostra de F60 (40µg) e substrato específico para proteases serínicas (5mM); F60 BANA – Tubo de reação contendo tampão fosfato, amostra da F60 (40µg) e substrato comum a proteases cisteínicas e serínicas (5mM). Barras com letras diferentes indicam diferença significante entre os dados pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Buscando verificar o perfil proteico da F60, o peso molecular e a termoestabilidade da protease contida nela, a fração foi submetida à análise eletroforética via SDS-Page e zimografia. Uma alíquota da amostra F60 foi submetida à fervura por 3 minutos (DN - desnaturada) enquanto outra não recebeu o tratamento térmico (SDN – semi-desnaturada). Na **Figura 10-A** é possível observar uma protease de aproximadamente 40kDa, que produz a clivagem da gelatina (**Figura 10-B**). A atividade da protease é eliminada quando a amostra é submetida ao tratamento térmico indicando sua desnaturação em altas temperaturas e não são verificadas outras bandas de clivagem, indicando a presença de somente uma protease na fração.

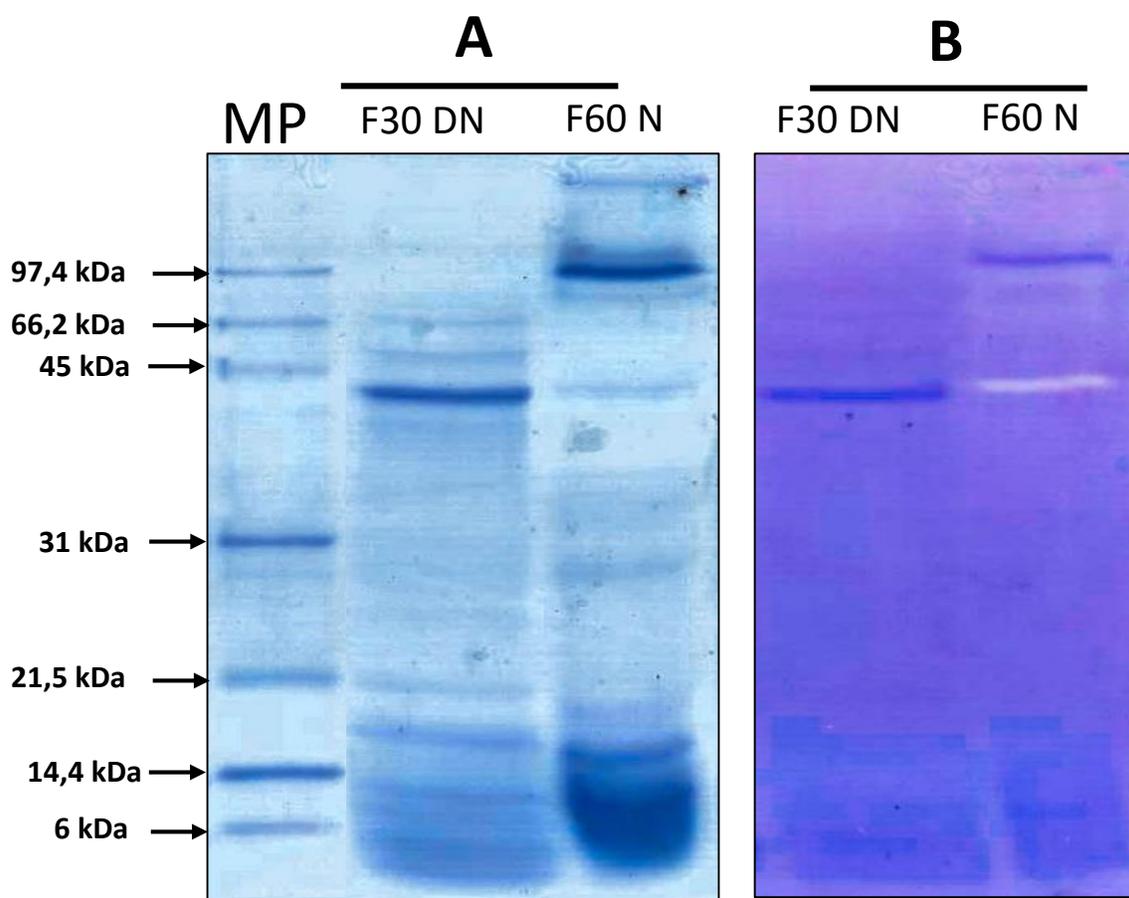


Figura 10– SDS-Page – Análise eletroforética do perfil proteico da fração F60. A: Gel SDS-Page. B: Gel Zimografia. MP – Marcador de Peso Molecular; F60 DN – Amostra da F60 (20 µg) fervidas por 3 min; F60 SDN – Amostra da F60 (20 µg) não-fervidas.

4.4. Purificação parcial de uma protease sérica a partir de extrato bruto de sementes de saboeiro

A partir da detecção da mesma atividade proteolítica do EB na F60, diversas frações F60, resultantes de mais de 12 extrações independentes, foram acumuladas e submetidas à cromatografia de gel filtração. A avaliação quanto a presença de proteínas, via leitura a 280nm, e a presença de atividade proteolítica, via ensaio de atividade, indicaram um espectro de atividade de interesse relevante entre as frações 17 e 19, sendo a fração 18 a com maior atividade (**Figura 11**). Os sucessivos processamentos por cromatografia possibilitaram o acúmulo da fração 18, sendo esta amostra denominada “P-100 P”.

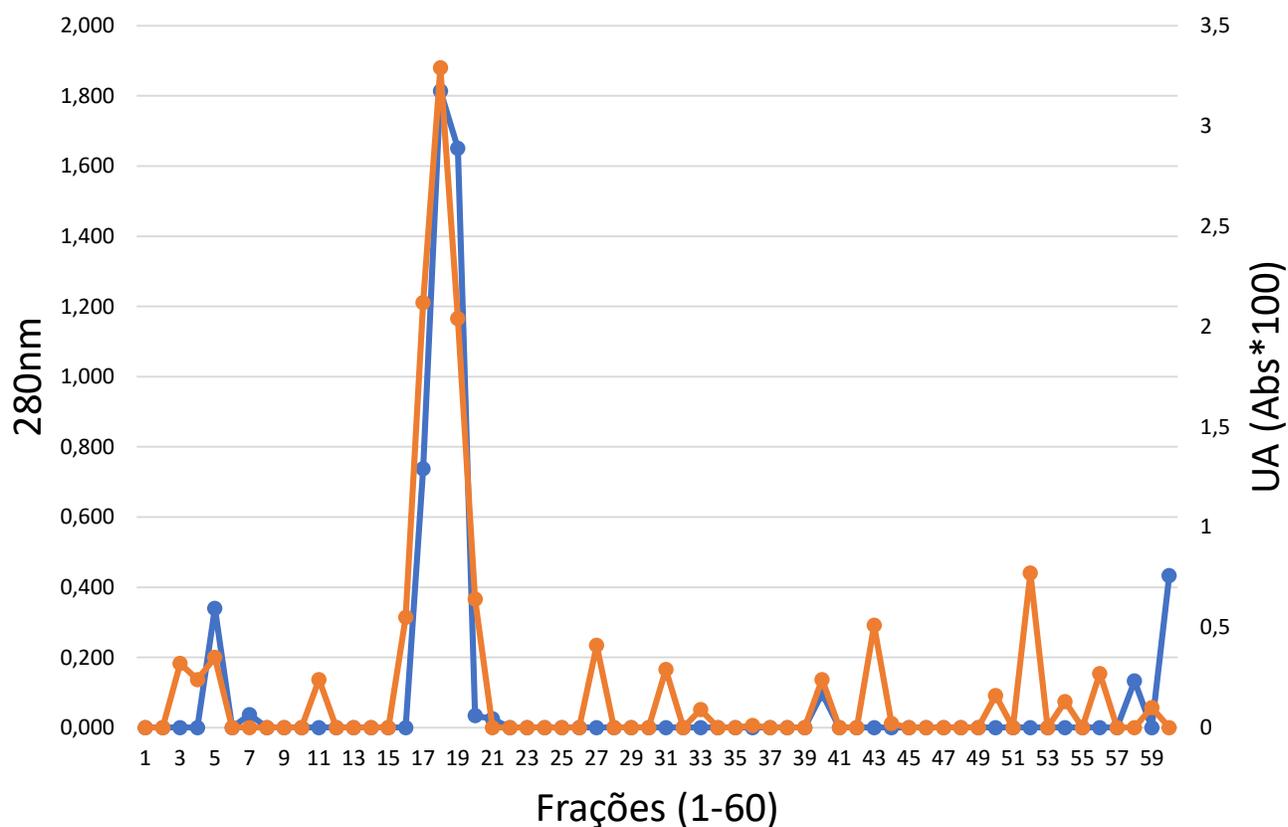


Figura 11– Perfil cromatográfico da F60 em Biogel P-100. Série azul – Absorbância à 280nm; Série laranja – Atividade proteolítica em Unidades de Atividade (Abs*100).

A fim de verificar a eficiência dos processos de enriquecimento, foram realizados ensaios de atividade inibitória comparando cada uma das etapas de enriquecimento utilizadas: extração (EB), precipitação por sulfato de amônio (F60) e cromatografia de gel filtração (P-100 P) (**Figura 12**). A princípio, o EB apresentou uma baixa atividade específica, compatível com o aumento detectado nos primeiros ensaios investigativos (**Figura 4**). A primeira etapa de fracionamento, que deu origem a fração F60, se mostrou eficaz em aumentar a concentração da protease de interesse, aumentando significativamente a atividade específica da protease, indicando maior concentração da mesma.

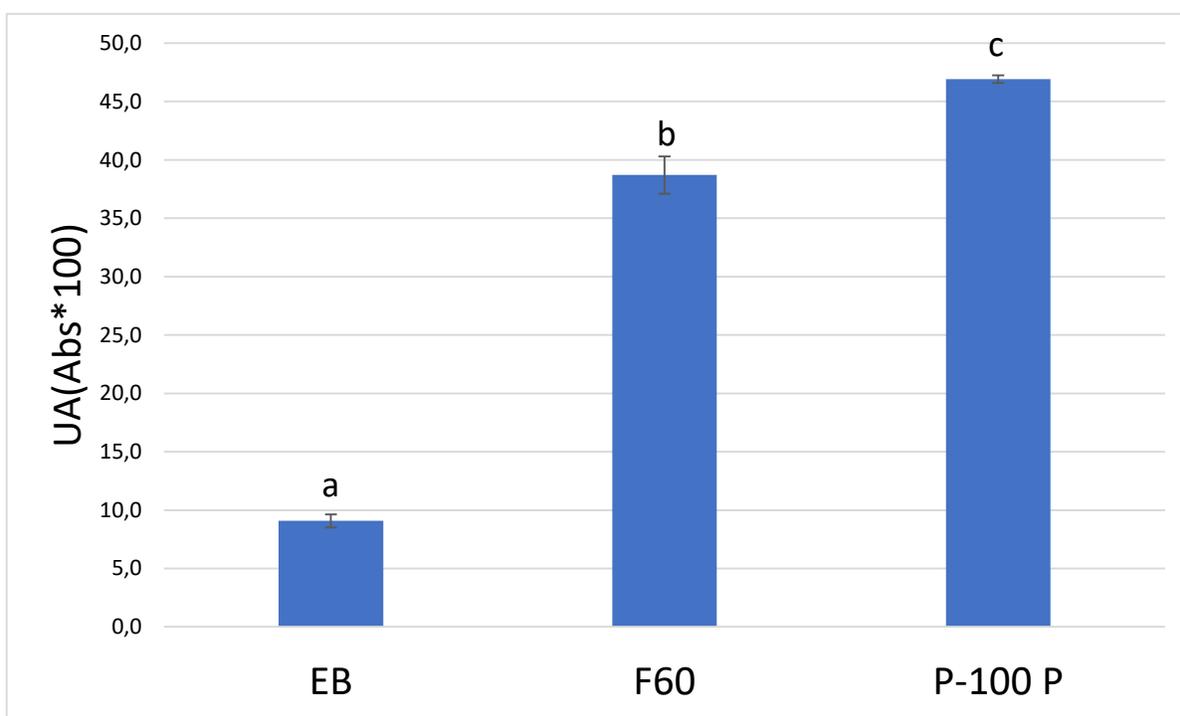


Figura 12 – Avaliação da atividade de protease sérica ao longo das etapas de purificação. EB – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA e amostra do EB (40µg); F60 - Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA e amostra da F30 (40µg); P-100 P – Tubo de reação contendo tampão fosfato, BANA e amostra da fração P-100 P (40µg). Barras com letras diferentes indicam diferença significante entre os dados pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

Posteriormente, o fracionamento via cromatografia de gel filtração, que deu origem a fração P-100 P foi capaz de aumentar, também significativamente, a atividade da protease, ainda que menor que o aumento observado entre as etapas EB e F60. De forma complementar, a avaliação do rendimento das etapas de fracionamento (**Tabela 3**) confirma o aumento expressivo de 407% da atividade específica da protease entre as etapas EB e F60. Da mesma maneira, o aumento em quase 100% da atividade da protease pode ser verificado quando se compara as atividades obtidas entre as etapas F60 e G-100 P, revelando, novamente, o enriquecimento da protease de interesse entre estas etapas.

Tabela 3 – Rendimento e atividade das etapas de fracionamento da proteinase serínica detectada

| ETAPA | Massa de Proteínas (mg) | Atividade Proteolítica (UA) | Atividade Específica(UA/mg) | Rendimento de Massa de Proteínas (%) | Rendimento de Atividade Proteolítica (%) |
|---------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| EB | 40 | 9,08 | 226,96 | 100 | 100 |
| F60 | 7,5 | 37,04 | 925,89 | 18,75 | 407,95 |
| P-100 P | 0,9 | 46,14 | 1153,48 | 2,25 | 508,22 |

Legendas: EB – Proteínas obtidas a partir do processo de extração; F60 – Proteínas obtidas a partir da precipitação por sulfato de amônio do EB no intervalo de saturação de 30% a 60%; P-100 P – Proteínas obtidas a partir da cromatografia realizada com amostra da F60.

4.5. Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico do extrato bruto de sementes de saboeiro em modelo procarioto (Teste de Ames)

Tendo em vista os usos tradicionais registrados na literatura e as moléculas bioativas detectadas pelo presente estudo, fez-se necessária a avaliação do potencial mutagênico e citotóxico do extrato bruto proteico de sementes de saboeiro. O EB diluído seriadamente, em quatro concentrações diferentes, não induziu respostas mutagênicas nem citotóxicas considerando $IM < 2,0$ e sobrevivência $> 70\%$ à nenhuma das cinco linhagens de *Salmonella* utilizadas nos testes (**Tabela 4**). No entanto, análises estatísticas indicaram diferença significativa ($p < 0,05$), para o IM nas concentrações 0,1 e $1\mu\text{g/placa}$ da linhagem TA102, e para a sobrevivência nas concentrações $100\mu\text{g/placa}$ da TA102 e $10\mu\text{g/placa}$ da TA98, em relação aos seus respectivos controles (**Tabela 4**). Adicionalmente foi observada a indução de mutagênese pelos controles positivos 4-NQO nas linhagens TA97, apresentando 521 ± 45 , TA98 apresentando 665 ± 63 , e TA100, apresentando 366 ± 46 e MMS nas linhagens TA102, apresentando 471 ± 79 , e para TA104, apresentando 987 ± 24 .

Tabela 4 – Avaliação da indução de mutagenicidade e citotoxicidade (Teste de Ames) em modelo procarioto pelo EB

| CEPA | µg/placa | IM | -S9 | | |
|-------|----------|-------------|-------|------|--------------|
| | | | His+ | DP | % Sobrev |
| TA97 | 0 | 1,0 | 166,5 | 13,4 | 100,0 |
| | 0,1 | 1,0 | 165,0 | 15,5 | 96,6 |
| | 1 | 1,0 | 169,0 | 11,3 | 92,4 |
| | 10 | 1,0 | 160,0 | 10,6 | 91,5 |
| | 100 | 1,0 | 164,0 | 9,9 | 92,4 |
| TA98 | 0 | 1,0 | 36,0 | 2,0 | 100,0 |
| | 0,1 | 0,9 | 32,0 | 2,8 | 81,6 |
| | 1 | 0,9 | 34,0 | 2,5 | 84,4 |
| | 10 | 1,0 | 37,0 | 4,2 | 80,9* |
| | 100 | 1,0 | 37,0 | 1,4 | 81,5 |
| TA100 | 0 | 1,0 | 115,0 | 4,0 | 100,0 |
| | 0,1 | 1,1 | 124,7 | 10,8 | 107,1 |
| | 1 | 1,3 | 152,7 | 11,8 | 103,9 |
| | 10 | 1,1 | 127,3 | 13,4 | 117,7 |
| | 100 | 0,9 | 103,3 | 12,6 | 99,6 |
| TA102 | 0 | 1,0 | 205,5 | 7,8 | 100,0 |
| | 0,1 | 1,7* | 341,5 | 6,4 | 79,6 |
| | 1 | 1,6* | 322,0 | 1,4 | 80,9 |
| | 10 | 1,6 | 332,7 | 19,0 | 72,9 |
| | 100 | 1,1 | 219,0 | 15,6 | 71,4* |
| TA104 | 0 | 1,0 | 479,0 | 24,0 | 100,0 |
| | 0,1 | 0,9 | 421,3 | 21,8 | 90,5 |
| | 1 | 1,0 | 469,0 | 21,9 | 87,2 |
| | 10 | 1,0 | 493,7 | 25,2 | 87,9 |
| | 100 | 1,2 | 551,3 | 21,5 | 81,2 |

Legenda: µg/placa – Quantidade total de proteínas do EB utilizadas por placa; IM – Índice de mutagenicidade; His⁺ – Número de revertentes no ensaio de mutagenicidade; DP - Desvio padrão dos revertentes no ensaio de mutagenicidade; % Sobrev. – Percentual de sobreviventes no ensaio de citotoxicidade. *Concentrações consideradas estatisticamente diferentes em relação ao controle identificadas com **.

5. Discussão

A diminuição de atividade da papaína, quando em contato com o EB (**Figura 4**) sugere a presença de inibidores de protease nas sementes de saboeiro, sendo, posteriormente, detectada a mesma atividade em duas frações distintas (F30 e F90), indicando a presença, inicialmente, de pelo menos dois inibidores de protease nas sementes de saboeiro.

O processo de purificação parcial do EB resultou na separação de uma proteína de aproximadamente 33kDa na F30, detectadas via SDS-PAGE (**Figura 5**). Aparentemente, uma destas proteínas está relacionada com a atividade inibitória contra a papaína, detectada nos ensaios de atividade biológica. Nesse caso, pelo fato da protease modelo utilizada ser da classe cisteínica, pode-se inferir que a atividade observada tanto no EB quanto na F30 está relacionada à presença de um inibidor de proteases cisteínicas presente em sementes de saboeiro.

Apesar de atividade semelhante ter sido detectada na F90, esta fração não foi investigada no presente estudo devido à detecção (dados não apresentados) de inibidores de protease serínica já descritos na literatura (LIMA, 2012; MACEDO et al., 2011). Além disso, os resultados obtidos nos ensaios realizados com esta amostra se mostraram muito discrepantes, como verificado pelo alto desvio padrão obtido (**Figura 4**), diferente das outras amostras (EB, F30 e F60) que mesmo em extrações independentes, ao longo de todo o estudo, apresentaram resultados homogêneos (**Figuras 7, 8, 9 e 12**).

A segunda etapa de purificação do inibidor de protease cisteínica, que faz uso da técnica de cromatografia de gel filtração, foi capaz de proporcionar um aumento na concentração do inibidor e da atividade específica de inibição (**Figura 7**). O perfil cromatográfico da fração contendo inibidor (**Figura 6**) é condizente com o perfil eletroforético da mesma fração (**Figura 5**). Tal fato pode ser observado pela eluição de uma grande quantidade de proteína com atividade inibitória contra a papaína no intervalo das frações 19 e 35, enquanto as proteínas de baixo peso detectadas junto ao limite do corante do gel, na faixa do marcador de 14kDa, são excluídas tardiamente a partir da fração 45. Como consequência, houve um aumento no rendimento desta atividade (**Tabela 2**), indicando que o processo foi eficaz na purificação da molécula de interesse em um grupo de frações. No entanto, tal passo de purificação não permitiu uma análise eficiente via SDS-Page, devido à baixa concentração de proteínas totais. Dessa forma, tendo em vista análises mais

importantes, optou-se pelo racionamento de amostra, sendo a análise via SDS-Page da amostra G-100 In subtraída do presente estudo.

Ao encontro dos dados obtidos, a presença de inibidores de proteases cisteínicas em sementes já é conhecida. Kouzuma e colaboradores (1996) purificaram e caracterizaram dois inibidores de proteases cisteínicas de 9,3 e 11,1 kDa em sementes de girassol (*Helianthus annuus*). Já Joshi e colaboradores (1998) purificaram e caracterizaram um inibidor de protease cisteínica de 24kDa em sementes de *Pennisetum glaucum*. Tratando-se da planta de saboeiro, anteriormente, trabalhos já descreveram a presença de inibidores de protease serínicas em suas sementes, bem como seu potencial biotecnológico para a agricultura. Macedo e colaboradores (2011) demonstrou a atividade de um inibidor de protease serínica, de 18kDa, purificado a partir de sementes de saboeiro, contra enzimas digestivas presentes no intestino médio de diversas larvas de espécies da ordem Lepidoptera, todas conhecidas como pragas de importância para agricultura. Um ano depois, Lima (2012) detectou, purificou e caracterizou outro inibidor de protease serínica, de 7,5kDa, também eficaz na inibição de enzimas digestivas de insetos-praga. Desse modo, a atividade de inibição contra a papaína (**Figura 4**) detectada na F90 pode ser justificada pela não especificidade dos inibidores produzidos em sementes de saboeiro já descritos, pois ambos os inibidores apresentaram, mesmo que não significativa, atividade inibitória contra papaína (LIMA, 2012; MACEDO et al., 2011).

Da mesma maneira que os inibidores de protease serínica, diversos estudos já estabelecem o papel de inibidores de protease cisteínica de origem vegetal na defesa contra predadores e patógenos fungos e insetos praga (JOSHI et al., 1998; OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003; PERNAS et al., 1999; SIQUEIRA-JÚNIOR et al., 2002). Dessa forma, o inibidor detectado no presente estudo apresenta um potencial biotecnológico, com aplicabilidade na agricultura, podendo vir a ser estudado e aplicado no combate à pragas de interesse econômico, por exemplo.

Além da aplicabilidade na biotecnologia voltado para a agricultura, estudos relacionam a atividade de inibidores de proteases com seu potencial terapêutico. De forma completa, Gomes e colaboradores (2011) apontam o potencial farmacológico, em especial a atividade antitumoral, de diversos inibidores de proteases de origem vegetal, incluindo inibidores de proteases cisteínicas. Srikanth e Chen (2016) apresentam um estudo que, além de reforçar a aplicabilidade destes inibidores na farmacologia, reportam alguns inibidores de proteases com ação anti-inflamatória e

anticarcinogênica, que se encontram em fase de testes clínicos. Ainda que parcialmente purificados, Brito e colaboradores (2016) demonstraram o potencial antibacteriano de inibidores de proteases serínicas e cisteínicas contidos em uma mesma fração do extrato aquoso de sementes de *Hymenaea courbaril*. Além de apresentar o potencial farmacológico de inibidores de proteases cisteínicas, tais estudos vão ao encontro dos dados obtidos no presente estudo, sendo possível gerar a hipótese da existência de uma relação entre alguns dos efeitos biológicos do uso tradicional do saboeiro (como contra inflamações, por exemplo) com a presença de inibidores de proteases cisteínicas.

Adicionalmente, a atividade inibitória contra papaína, em específico, detectada no presente estudo representa uma característica a ser estudada, e futuramente explorada, contra outras proteases similares a papaína. Diversos estudos apresentam enzimas de importância médica semelhantes à papaína como potencial alvo para fármacos por atuarem em vias essenciais de diversos organismos como: bactérias (KANTYKA; SHAW; POTEMPA, 2011; YAO et al., 2009); protozoários (CAFFREY; STEVERDING, 2009; SANTOS; SCHARFSTEIN; ANA PAULA, 2006); e vírus (NIEMEYER et al., 2018)

As análises bioquímicas realizadas também indicaram a presença de uma proteína de aproximadamente 40kDa (**Figura 10**), detectada na fração F60, com atividade proteolítica contra a gelatina contida no zimograma. Posteriormente, ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando diversos inibidores, a fim de caracterizar tal atividade. Dentre os inibidores utilizados, o inibidor de tripsina foi capaz de inibir a atividade da fração atingindo 100% de inibição em todos os ensaios realizados, sugerindo que a atividade observada pode estar relacionada com a presença de uma protease serínica (**Figura 8**). Comparativamente, dos demais inibidores, nenhum foi capaz de alterar significativamente a atividade proteolítica na fração, indicando que a atividade em questão se deve a presença de uma protease serínica na amostra. De forma complementar, a atividade contra o substrato BApNA ser significativamente maior que a atividade verificada contra o substrato BANA (**Figura 9**) indica uma especificidade da atividade proteolítica contra o substrato específico para proteases serínicas, corroborando a ideia da presença de uma protease desta classe na amostra.

Além disso, atividade proteolítica mínima detectada no EB (**Figura 12**) que, após a precipitação por sulfato de amônio, atinge um rendimento de 407% na F60 (**Tabela 3**), pode estar relacionada não só a concentração baixa da protease, mas também à interação com os inibidores de protease serínicas já descritos para a semente de saboeiro (LIMA, 2012; MACEDO et al., 2011), reforçando a ideia de que a protease detectada no presente estudo é, de fato, da classe serínica.

Outro dado importante é o fato da protease manter sua atividade proteolítica tanto no tampão de atividade utilizado nos ensaios de atividade enzimática quanto no tampão de atividade utilizado na zimografia. Apesar de ambos serem a base de fosfato de sódio, os tampões diferem pelo fato de que o utilizado na zimografia não possui β -mercaptoetanol em sua composição. O β -mercaptoetanol é um agente redutor de pontes dissulfeto, usualmente utilizado na ativação de proteases cisteínicas, como a papaína, por exemplo (AMRI; MAMBOYA, 2012). O fato da protease parcialmente purificada manter sua atividade na ausência deste agente redutor é mais um indicador de que pertence à classe de proteases serínicas.

Diversos autores já obtiveram sucesso na purificação e caracterização de proteases produzidas em sementes, como Praxedes-Garcia e colaboradores (2012) que apresentaram o primeiro registro de uma protease em sementes de pau-brasil, possuindo 61kDa e caracterizada como serínica. Anteriormente, Ahmed (2009) purificaram e caracterizaram uma protease serínica em sementes de *Solanum dubium*, de 66kDa, relacionando sua atividade com seu potencial na produção de queijos a partir de ensaio de coagulação do leite (*milk-clothing*), demonstrando uma das aplicabilidades de uma protease de origem vegetal na indústria alimentícia.

Atualmente, a produção de queijo na indústria alimentícia faz uso do complexo de enzimas Rennet, extraídas do estômago de ruminantes, majoritariamente composto pela protease aspártica quimosina, mas contendo, também, outras enzimas como proteases e lipases (FOX et al., 2017). Dessa forma, capacidade de coagulação do leite por proteases de origem vegetal se mostra como uma atividade de interesse, que já vem sendo estudada como uma alternativa a utilização de enzimas de origem animal (AHMED et al., 2009b; BEN AMIRA et al., 2017; MAHAJAN; CHAUDHARI, 2014). Nesse sentido, estudos que busquem elucidar tal efeito podem direcionar aplicação da protease detectada na indústria alimentícia.

Além de seu potencial biotecnológico, as proteases podem ser empregadas na farmacologia, compondo tratamentos para diversas doenças humanas. Em seu estudo, Salas e colaboradores (2008) descrevem uma associação entre proteases cisteínicas de origem vegetal e tratamentos terapêuticos para úlceras no trato digestivo, feridas na pele e como antitumoral. Posteriormente, Gomes e colaboradores (2011), apresentaram o potencial farmacológico de proteases de origem vegetal de diversas classes, dentre eles a modulação de respostas imunológicas, o tratamento de úlceras e na cicatrização de feridas na pele. A própria papaína, uma protease cisteínica existente no mamão (*Carica papaya*), tem seu efeito terapêutico no tratamento de feridas estudado desde o final século XIX (RANKIN, 1895), evoluindo para estudos envolvendo os mesmos efeitos, mas com aplicações mais tecnológicas na atualidade (RODRIGUES et al., 2015).

Dentre os diversos usos tradicionais do saboeiro, destacam-se os terapêuticos, em específicos os usos contra úlceras, feridas na pele e inflamações, citados anteriormente por estarem associados a proteases de origem vegetal. Assim, a presença de uma protease em sementes de saboeiro constitui um indício de que os usos tradicionais da planta possam estar associados com a presença de proteases, sendo possivelmente uma delas a protease serínica detectada no presente estudo. No entanto, a fim de confirmar tal hipótese, faz-se necessário avanços com relação à purificação e caracterização da molécula, para que ensaios relacionados à efeitos terapêuticos possam ser realizados de forma precisa.

O uso de plantas medicinais sempre foi presente e vem crescendo, juntamente com o número de relatos de reações adversas e outros problemas, principalmente devido ao seu uso indiscriminado e pela ausência de estudos que comprovem os seus efeitos biológicos, dosagem e toxicidade (EKOR, 2014; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). Assim, a escolha da maior concentração utilizada nos ensaios foi baseada na média das dosagens do EB obtidas ao longo das extrações realizadas no presente estudo. Dessa forma, seria possível aproximar a quantidade e diversidade de proteínas ao qual o indivíduo é exposto quando faz uso do extrato vegetal em questão.

As linhagens TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* foram utilizadas devido à sua alta sensibilidade na detecção de diversos mecanismos de mutação, sendo baseada em recomendações de organizações internacionais como a OECD (OECD, 1997).

Inicialmente, não foi detectada mutagenicidade e citotoxicidade dentro dos limites estabelecidos de $IM > 2,0$ e $Sobrev.\% < 70\%$, respectivamente. No entanto, tratamento estatístico determinou diferenças para as concentrações 0,1 e 1 $\mu\text{g/placa}$ da linhagem TA102. Apesar de terem atingido IM abaixo do limite considerado, a diferença estatística encontrada foi significativa, o que indica dano ao material genético. A linhagem é em questão é eficaz na detecção de mutágenos oxidantes (LEVIN et al., 1982), o que pode indicar a presença de agentes oxidantes no EB capazes de induzir mutações, como metabólitos secundários, por exemplo.

Dessa forma, o fato do EB não apresentar respostas mutagênicas ou citotóxicas acima dos limites estipulados (**Tabela 4**), na ausência de metabolização exógena (-S9 Mix), para a linhagens testadas, nas concentrações testadas, não isenta o usuário do extrato dos riscos associados ao seu uso. No entanto, tal resultado representa um importante passo na verificação da segurança na utilização do extrato em estudos que possam elucidar seus efeitos biológicos e avaliar seu potencial biotecnológico e farmacológico.

A fim de contemplar todo o espectro toxicológico do EB, faz-se necessária a implementação do teste de Ames com a utilização da fração S9, capaz de mimetizar uma metabolização que ocorre no fígado de mamíferos, bem como a utilização de um modelo *in vitro* eucarioto de células de mamíferos (OECD, 2015).

6. Conclusão

De acordo com o presente estudo, as sementes de saboeiro produzem de forma constitutiva pelo menos duas proteínas biologicamente ativas: um inibidor de protease cisteínica, de aproximadamente 33kDa, e uma protease serínica, de aproximadamente 40kDa.

O extrato bruto aquoso de proteínas extraídas a partir das sementes não induz respostas mutagênicas, nem citotóxicas, testando com 5 linhagens de *Salmonella* recomendadas para testagem, na ausência de metabolização exógena.

Tais resultados não só demonstram o potencial biotecnológico a ser estudado no vegetal, pela detecção de novas moléculas bioativas, mas também, viabiliza o prosseguimento das investigações toxicológicas do extrato vegetal, para melhorar a segurança na utilização do mesmo.

Além disso, tais moléculas detectadas em uma planta como o saboeiro, isto é, uma planta nativa do Brasil, com ampla distribuição por todo o território e não economicamente explorada, podem ser consideradas potenciais produtos biotecnológicos.

7. Perspectivas Futuras

A detecção e caracterização das novas moléculas direcione estudos posteriores para análises das mais diversas vertentes, que podem resultar em uma caracterização mais profunda das moléculas ou até mesmo elucidar/conceber efeitos biológicos envolvidos com o uso tradicional da planta. Da mesma maneira, a utilização dessas moléculas deve ser condicionada pelas mesmas análises toxicológicas e outras mais profundas e específicas, visando uma maior segurança dos produtos gerados a partir delas.

Dentre as possíveis etapas destacam-se:

- Atualmente, uma pequena quantidade da protease serínica detectada foi isolada e encaminhada para sequenciamento, o que possibilitará a realização de diversas análises de dinâmica molecular e *docking*, por exemplo, por técnicas de biologia computacional;
- Como etapa futura de trabalho, é considerada a conclusão dos ensaios de mutagenicidade do extrato bruto utilizando metabolização exógena (*S9 Mix*);
- O extrato bruto e a protease parcialmente purificada serão avaliados quanto sua atividade de coagulação do leite.
- O extrato bruto e as frações purificadas serão avaliados quanto ao seu potencial antimicrobiano;
- O extrato bruto e as frações purificadas serão avaliados quanto ao seu potencial antioxidante;
- Realização da purificação completa das moléculas detectadas.

8. Referências

- ABREU GUIRADO, O. A. Potencial medicinal del género Sapindus L. (Sapindaceae) y de la especie Sapindus saponaria L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, 2005.
- ABREU MATOS, F. J. O formulário fitoterapico do professor Dias da Rocha. Fortaleza: **Universidade Federal do Ceará**, 1997.
- AHMED, I. A. M. et al. Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of Solanum dubium Fresen. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 483–491, 2009a.
- AHMED, I. A. M. et al. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from Solanum dubium Fresen seeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 395–400, 2009b.
- AL AKEEL, R. et al. Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 147–151, 2014.
- ALBIERO, A. L. M.; BACCHI, E. M.; MOURÃO, K. S. M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de Sapindus saponaria L.(Sapindaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 549–560, 2001.
- ALBIERO, A. L. M.; SERTIÉ, J. A. A.; BACCHI, E. M. Antiulcer activity of Sapindus saponaria L. in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 41–44, 2002.
- AMRI, E.; MAMBOYA, F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 99–104, 2012.
- BEN AMIRA, A. et al. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 2, p. 1–9, 2017.
- BIESALSKI, H. K. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, p. 1202–1205, 2009.

BRITO, M. S. DE et al. Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. seeds and antibacterial effect of protein fractions. **Hoehnea**, v. 43, n. 1, p. 11–18, 2016.

CAFFREY, C. R.; STEVERDING, D. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 12–19, 2009.

CORREA, E. et al. Leishmanicidal and trypanocidal activity of *Sapindus saponaria*. **Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas**, v. 13, n. 4, p. 311–323, 2014.

DA SILVA, M. L. et al. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 366–375, 2012.

DAMKE, E. et al. In vivo activity of *Sapindus saponaria* against azole-susceptible and -resistant human vaginal *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 35, 2011.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. Medicinal plants of the Guianas. **Histoire**, p. 490, 2004.

EGITO, A. S. et al. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 816–825, 2007.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Neurology**, v. 4 JAN, n. January, p. 1–10, 2014.

FIORINI, A. et al. *Candida Albicans* protein profile changes in response to the butanolic extract of *Sapindus Saponaria* L. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. April, 2016.

FOX, P. F. et al. Fundamentals of Cheese Science: Enzymatic Coagulation of Milk Summary. **Fundamentals of Cheese Science**, p. 185–229, 2017.

GOMES, M. T. R. et al. Plant Proteinases and Inhibitors: An Overview of Biological Function and Pharmacological Activity. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 417–436, 2011.

GUAADAOU, A. et al. What is a Bioactive Compound? A Combined Definition for a Preliminary Consensus. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 3, p. 174–179, 2014.

GUTERRES, S. B. **Estudo dos extratos dos frutos de Sapindus saponaria enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar**. USP, 2005.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, n. 3, p. 68–85, 2007.

HIBBETTS, K.; HINES, B.; WILLIAMS, D. An overview of proteinase inhibitors. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 4, p. 302–308, 1999.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays In Biochemistry**, v. 38, p. 1–8, 2002.

ICH, I. C. O. H. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1). v. 4, 2011.

JOANA GIL-CHÁVEZ, G. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.

JOANITTI, G.; FREITAS, S.; SILVA, L. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition**, v. 2, n. 3, p. 199–217, 2006.

JOSHI, B. N. et al. Cysteine Protease Inhibitor from Pearl Millet: A New Class of Antifungal Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, n. 246, p. 382–387, 1998.

KANOST, M. R.; CLEM, R. J. Insect Proteases. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, p. 346–364, 2017.

KANTYKA, T.; SHAW, L. N.; POTEMPA, J. Papain-like proteases of staphylococcus aureus. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 712, p. 1–14, 2011.

KOUZUMA, Y. et al. Purification, characterization, and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, Sca and Scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 6, p. 1106–1113, 1996.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71–88, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 324–337, 2000.

LEVIN, D. E. et al. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 23, p. 7445–7449, 1982.

LIMA, G. P. G. DE. **Purificação, caracterização bioquímicas e atividade biológica in vitro contra insetos praga de um novo inibidor de tripsina isolado de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. UFC, 2012.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.

MACEDO, M. L. R. et al. A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: Purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. **Protein Journal**, v. 30, n. 1, p. 9–19, 2011.

MAHAJAN, R. T.; CHAUDHARI, G. M. Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 5, p. 1173–1181, 2014.

MARINHO, G. J. P.; KLEIN, D. E.; SIQUEIRA-JUNIOR, C. L. Evaluation of soapberry (*Sapindus saponaria* L.) leaf extract against papaya anthracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 2, p. 127–131, 2018.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209–223, 2015.

MIYAGAWA, T. et al. Cardenolide glycosides of *Thevetia peruviana* and triterpenoid saponins of *Sapindus emarginatus* as TRAIL resistance-overcoming compounds. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1507–1511, 2009.

MONTI, R. et al. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 5, p. 501–507, 2000.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay Kristien. **Acarologia**, v. 455, p. 29–60, 2000.

NETO, G. G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. DA. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta bot. bras**, v. 14, n. 3, p. 327–334, 2000.

NIEMEYER, D. et al. The papain-like protease determines a virulence trait that varies among members of the SARS-coronavirus species. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1–27, 2018.

OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. **OECD Guidekub for testing of chemicals**, 1997.

OECD. Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. **Genetic toxicology Guidance Document**, p. 1–58, 2015.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91–104, 2003.

OZGUR, A.; TUTAR, Y. Therapeutic Proteins: A to Z. **Protein & Peptide Letters**, v. 20, n. 12, p. 1365–1372, 2013.

PELEGRINI, D. D. et al. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922–927, 2008.

PERNAS, M. et al. Antifungal Activity of a Plant Cystatin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 7, p. 624–627, 1999.

PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 4, p. 12–15, 1995.

PRAXEDES-GARCIA, P. et al. Biochemical Aspects of a Serine Protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) Seeds: A Potential Tool to Access the Mobilization of Seed Storage Proteins. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

QI, R. F.; SONG, Z. W.; CHI, C. W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 5, p. 283–292, 2005.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKHA, M. N.; MALLIKARJUNA, S. E. Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1324–1339, 2015.

RANKIN, G. Chronic gastric ulcer and its treatment by papain. **The Lancet**, v. 145, n. 3728, p. 333–336, 1895.

RASHED, K. N. et al. Antimicrobial Activity, Growth Inhibition of Human Tumour Cell Lines, and Phytochemical Characterization of the Hydromethanolic Extract Obtained from *Sapindus saponaria* L. Aerial Parts. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

RAWLINGS, N. D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D624–D632, 2018.

REBELLO, A. N. DA S.; SIQUEIRA-JUNIOR, C. L. Detecção de uma proteína de defesa homóloga à cistatina do tomate em plantas de saboeiro (*Sapindus saponaria*). **Livro de Resumos: 13a Jornada de Iniciação Científica UNIRIO**, n. 2002, p. 5–6, 2006.

RODRIGUES, A. L. S. et al. Effectiveness of papain gel in venous ulcer treatment: randomized clinical trial. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 3, p. 458–465, 2015.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990.

SACHIN, G. et al. Review Article Medicinal Plants of the Genus Sapindus (Sapindaceae) - a Review of Their Botany , Phytochemistry , Biological Activity and. v. 4, n. 5, p. 7–20, 2014.

SALAS, C. E. et al. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2263–2269, 2008.

SANTOS, C. C.; SCHARFSTEIN, J.; ANA PAULA, A. P. C. Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 323–324, 2006.

SANTOS, W. L. et al. Effect of the aqueous extracts of the seeds of Talisia esculenta and Sapindus saponaria on fall armyworm. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 373–383, 2008.

SIQUEIRA-JÚNIOR, C. L. et al. 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 247–254, 2002.

SOMNER, G. V.; FERRUCCI, M. S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. **Sapindus in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20934>>. Acesso em: 9 fev. 2017.

SOUZA, C. M. P. et al. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 188–193, 2013.

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. DEC, 2016.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

YAO, Q. et al. A bacterial type III effector family uses the papain-like hydrolytic activity to arrest the host cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3716–3721, 2009.