



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA MARIA ALENCAR DE MOURA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UM INIBIDOR DE
PROTEASE CISTEÍNICA PRESENTE EM SEMENTES DE *Terminalia catappa*, COM
POTENCIAL ANTIMICROBIANO FRENTE A *Staphylococcus aureus***

FORTALEZA
2019

AMANDA MARIA ALENCAR DE MOURA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UM INIBIDOR DE
PROTEASE CISTEÍNICA PRESENTE EM SEMENTES DE *Terminalia catappa*, COM
POTENCIAL ANTIMICROBIANO FRENTE A *Staphylococcus aureus***

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Coorientador: Dr. Lucas Pinheiro Dias.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M884p Moura, Amanda Maria Alencar de.
Purificação e caracterização bioquímica de um inibidor de protease cisteínica presente em sementes de Terminalia catappa, com potencial antimicrobiano frente a Staphylococcus aureus / Amanda Maria Alencar de Moura. – 2019.
46 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Coorientação: Prof. Dr. Lucas Pinheiro Dias.

1. Terminalia catappa. 2. inibidor de protease cisteínica. 3. antibiótico. 4. Staphylococcus aureus. I. Título.
CDD 661

AMANDA MARIA ALENCAR DE MOURA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UM INIBIDOR DE
PROTEASE CISTEÍNICA PRESENTE EM SEMENTES DE *Terminalia catappa*, COM
POTENCIAL ANTIMICROBIANO FRENTE A *Staphylococcus aureus***

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha família.

Ao meu querido Alyson.

Aos meus amigos de caminhada.

Aos meus companheiros de bancada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC, sem esse auxílio seria difícil o desenvolvimento deste trabalho.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa - LPVD, sob a coordenação do Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Ao Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, por toda a motivação e os ensinamentos. A conclusão deste trabalho só é possível graças às contribuições dadas por ele e por sua paciência para ensinar.

Aos participantes da banca examinadora Prof.^a Dr.^a. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa e Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao Dr. Lucas Pinheiro Dias, por todo o auxílio, dedicação e tempo disponibilizado para este trabalho, sem seus ensinamentos eu não teria desenvolvido meus experimentos. Além disso, ele me ensinou a ser uma pessoa melhor em vários aspectos, sua competência é inigualável e seu trabalho é fundamental para o desenvolvimento da pesquisa brasileira.

Ao Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves, por contribuir com sugestões para este trabalho e por ter passado tranquilidade nos momentos mais difíceis.

À minha família, por todo apoio e dedicação concedida. Meus pais me ensinaram valores indispensáveis para minha formação como pessoa e profissional, nunca deixaram faltar nada e compreenderam minhas escolhas. Ao meu pai Wagner que auxiliou na obtenção das castanholas, a minha mãe Vera que compreendeu os momentos de cansaço e a minha irmã Alana que me deu suporte em momentos difíceis.

Ao amor da minha vida Alyson Veras, que me abraçou nos dias difíceis, me deu conselhos preciosos e é meu amigo de todas as horas. Sem ele este trabalho seria impossível, pois ele dedicou seus feriados e finais de semana para ajudar nos meus experimentos, na obtenção das castanholas e na formatação dos meus trabalhos.

Aos amigos do curso de Biotecnologia, Bruna Araújo, que esteve sempre ao meu lado e me fez sorrir mesmo em dias tristes. Cristiane Maria, por ser uma pessoa iluminada que me apoia. Felipe de Castro, um vizinho que eu só conheci na UFC, que se mostrou ser uma

peessoa prestativa e atenciosa. Larissa Belizário, uma amiga dedicada a fazer o bem. Lennon Camilo, que apesar da distância esteve apoiando minha caminhada. Lucas Lopes, que engrandeceu meus pensamentos críticos. Mateus Monteiro, por todo o afeto que me foi doado e sorrisos que me acalmaram. Milena Maciel, que se faz sempre prestativa e disposta a ajudar. Rhaynan Andrade, por escutar meus anseios e acreditar nas minhas loucuras. Essas pessoas são os pilares que eu tive dentro da Universidade, vocês são como minha família e eu sei que posso contar sempre com o amor e apoio de vocês.

Aos meus amigos de caminhada Amanda Martins, Ana Carolina, Ana Karoline, Ana Karolyna, Carlos Eduardo, Davi Nobre, Dayane Barbosa, Fran Alves, Igor Neves, Jamilly Maciel, Joaquim Júnior, Manuela Vidal, Natália Pereira, Nayara Freitas, Raissa Bret, Vitor Nairo, Wésly Lima, William e Wyara Paiva, por toda a fé depositada em mim e por todas as sábias palavras que me fizeram forte.

Aos companheiros de bancada do LPDV Érica, Letícia, Nilton, Patrícia, Pedro e Sâmia pelas contribuições dadas a este trabalho. Em especial a Queilane que me ajudou com as castanholas e levantou meu astral todos os dias.

Aos companheiros de bancada do LabTox Larissa, pelos ensinamentos durante minha iniciação científica. Nadine, por me motivar nos momentos mais delicados e por toda a ajuda durante a purificação do inibidor. Eva, por ajudar sempre na obtenção do inibidor e por toda a positividade. Helen, pelo auxílio com os dados e por todos os conselhos científicos. Xavier, pelos momentos de descontração e por toda assistência durante a graduação.

A Deus, por permitir a existência de pessoas que me fizeram ser melhor e mais consciente.

Agradeço.

*"Feminist: a person who believes in the social,
political and economic equality of the sexes."*

Chimamanda Ngozi Adichie

RESUMO

As infecções hospitalares são um problema de saúde pública, sendo causadas por diferentes microrganismos. *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias que mais provocam quadros de infecção hospitalar. Sua resistência a antibióticos impossibilita seu controle e, portanto, a busca por moléculas anti- *S. aureus* em fontes da flora e fauna terrestre é importante e necessária, tendo em vista que os antibióticos disponíveis no mercado não são efetivos. O presente estudo teve por objetivo a purificação e caracterização bioquímica de um inibidor de papaína, denominado TcPI-II, obtido da espécie vegetal *Terminalia catappa* e avaliação de sua atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*. TcPI-II foi purificado a partir da fração de proteínas F_{80 °C}, preparada após extração das proteínas de sementes maduras de *T. catappa* usando tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo 200 mM de NaCl e tratamento térmico a 80 °C durante 30 min, seguido de cromatografia das proteínas solúveis recuperadas em resina de troca iônica (DEAE-celulose). A fração proteica não-retida em DEAE-celulose se mostrou homogênea, tendo apresentando índice de purificação de 8,67 e rendimento de 2,29%. SDS-PAGE revelou que essa fração purificada (TcPI-II) possuía massa molecular de 15,9 kDa e especificidade para papaína, uma protease cisteínica. A cinética de inibição evidenciou se tratar de um inibidor do tipo competitivo (IC₅₀ 1,56×10⁻⁶ M), com K_i de 1,02 x 10⁻⁶ M. O TcPI-II preservou sua atividade inibitória quando testado em uma ampla faixa de pH (2,0-10,0) e temperatura (30-100°C), mantendo sua atividade inibitória da papaína mesmo quando aquecido a 100 °C (0-120 min). Na concentração de 3,14 x 10⁻⁸ M, o TcPI-II foi capaz de inibir em 86,40% o crescimento de *S. aureus*. Assim, pode-se sugerir que o TcPI-II tem potencial para ser usado no combate às infecções causadas por *S. aureus*, mas antes há necessidade de estudos de seu mecanismo de ação e testes de segurança de seu uso clínico.

Palavras-chave: *Terminalia catappa*, inibidor de protease cisteínica, antibiótico, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Hospital infections are a public health problem, being caused by different microorganisms. *Staphylococcus aureus* is one of the bacteria that most causes hospital infection. Its resistance to antibiotics makes it impossible to control it and, therefore, the search for anti-*S. aureus* molecules in earthly flora and fauna sources are important and necessary, considering that commercially available antibiotics are not effective. The present study destined at purification and characterization a papain inhibitor, called *TcPI-II*, obtained from the plant species *Terminalia catappa* and evaluating its antimicrobial activity against *S. aureus*. *TcPI-II* was purified from F80 ° C protein fraction prepared after protein extraction from mature *T. catappa* seeds using 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 200 mM NaCl and heat treatment at 80 ° C for 30 minutes, followed by chromatography of the soluble proteins recovered from ion exchange resin (DEAE-cellulose). The non-retained DEAE-cellulose protein fraction was homogeneous, with purification index of 8.67 and yield of 2.29%. SDS-PAGE revealed that this purified fraction (*TcPI-II*) had a molecular mass of 15.9 kDa and papain specificity, a cysteine protease. Inhibition kinetics were found to be a competitive inhibitor ($IC_{50} 1.56 \times 10^{-6}$ M), with a K_i of 1.02×10^{-6} M. *TcPI-II* preserved its inhibitory activity when tested on a wide range pH range (2.0-10.0) and temperature (30-100 °C), sustain its papain inhibitory activity even when heated to 100 °C (0-120 min). At a concentration of $3, 14 \times 10^{-8}$ M, *TcPI-II* was able to inhibit *S. aureus* growth by 86, 40%. Therefore, it can be suggested that *TcPI-II* has the potential to be used to combat infections caused by *S. aureus*, but there is a need for studies of its mechanism of action and safety tests for its clinical use.

Key words: *Terminalia catappa*, cysteine protease inhibitor, antibiotic, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1- PORCENTAGENS DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE INCIDÊNCIA DE <i>INFECÇÃO PRIMÁRIA DE CORRENTE SANGUÍNEA LABORATORIALMENTE CONFIRMADA</i> IPCSL EM PACIENTES ADULTOS HOSPITALIZADOS EM UTIS (BRASIL, 2012-2015)..... | 18 |
| FIGURA 2 - ESTÁGIOS DE FORMAÇÃO DO BIOFILME. | 19 |
| FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DOS INIBIDORES DE PROTEASES..... | 21 |
| FIGURA 4 - ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO 80 °C (F80 °C) DE SEMENTES DE T. CATAPPA..... | 31 |
| FIGURA 5 - PERFIL CROMATOGRÁFICO EM DEAE-CELULOSE DA FRAÇÃO F _{80 °C} | 33 |
| FIGURA 6 - ESPECIFICIDADE INIBITÓRIA DO TCPI-II FRENTE A PAPAÍNA E TRIPSINA..... | 34 |
| FIGURA 7 - ZIMOGRAMA CONFIRMANDO A ATIVIDADE INIBITÓRIA DE PAPAÍNA DO TCPI-II..... | 36 |
| FIGURA 8 - PERFIL DO TCPI-II APÓS ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE; 15%)..... | 36 |
| FIGURA 9 - CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA PAPAÍNA PELO TCPI-II..... | 37 |
| FIGURA 10 - ESTABILIDADE DO TCPI-II EM RELAÇÃO À SUA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE PAPAÍNA, QUANDO TRATADO TERMICAMENTE E INCUBADO A DIFERENTES PHS..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE PAPAÍNA OBTIDO DE <i>Terminalia catappa</i> (TcPI-II)..... | 33 |
| TABELA 2 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TcPI-II FRENTE A <i>S. aureus</i> | 42 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> : uma bactéria resistente à antibióticos | 17 |
| 2.2 Inibidores de proteases: Uma alternativa para aplicações na medicina e agricultura | 19 |
| 2.3 <i>Terminalia catappa</i> : Uma fonte promissora de inibidores de proteases..... | 22 |
| 3. OBJETIVOS | 23 |
| 3.1. Objetivo Geral | 23 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 23 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 4.1 Reagentes Químicos | 24 |
| 4.2. Material biológico..... | 24 |
| 4.3. Extração das proteínas | 24 |
| 4.4. Determinação do teor de proteínas | 25 |
| 4.5. Purificação | 25 |
| 4.6. Especificidade Enzimática..... | 26 |
| 4.7. Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular | 26 |
| 4.8. Zimograma..... | 27 |
| 4.9. Parâmetros Cinéticos | 28 |
| 4.10. Estabilidade térmica e pH ótimo da atividade inibitória | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1. Extração de proteínas de sementes de <i>T. catappa</i> | 30 |
| 5.2. Purificação de <i>TcPI-II</i> | 31 |
| 5.3. Especificidade enzimática | 34 |
| 5.4. Caracterização bioquímica da fitocistatina <i>TcPI-II</i> | 35 |
| 5.4.2. Massa molecular | 35 |
| 5.4.3. Parâmetros cinéticos (IC50, mecanismo de inibição e determinação de <i>Ki</i>)..... | 37 |
| 5.4.4. Estabilidade a temperatura e pH de <i>TcPI-II</i> sobre a papaína | 38 |
| 5.5 Atividade antimicrobiana de <i>TcPI-II</i> | 41 |
| 6. CONCLUSÃO | 43 |
| REFERÊNCIAS | 43 |

1.INTRODUÇÃO

Um problema seríssimo e atual de saúde pública é a resistência de bactérias aos antibióticos, levando à ineficiência desse tipo de tratamento de infecções. A resistência aos antibióticos pode acontecer naturalmente, mas ela pode advir do uso inadequado dos antibióticos, inexistência ou insuficiência de programas de prevenção e controle de infecções, baixa qualidade dos medicamentos, vigilância inadequada e falha na regulação em relação ao uso dos antibióticos (WHO, 2015). Os dados da vigilância epidemiológica de *Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde* (IRAS), fornecidos pela ANVISA, relatam que o número de *Infecções Primárias de Corrente Sanguínea* confirmadas laboratorialmente (IPCSL) apresentou redução no decorrer dos anos de 2011-2015. Porém, a persistência dos agentes etiológicos de fenótipos resistentes ainda preocupa, pois têm sido frequentemente notificados (ANVISA, 2016).

A disseminação do patógeno infeccioso *Staphylococcus aureus* é uma ameaça alarmante à saúde mundial (GATADI *et al.*, 2019). A resistência a antibióticos leva a disseminação de cepas resistentes responsáveis por causar altas taxas de mortalidade em pacientes infectados (WIDIANINGRUM; NOVIANDI; SALASIA, 2019). *S. aureus* é conhecida por ser a principal responsável por várias infecções hospitalares, dentre essas endocardite, osteomielite, bacteremia, pneumonia, infecção na pele, além de enfermidades relacionadas a dispositivos implantados. O desenvolvimento de biofilme por parte de *S. aureus* em próteses é considerado um desafio médico, visto que é difícil o tratamento desse tipo de infecção, pois essa espécie é muito resistente a antibióticos convencionais, biocidas, estresse externo e mecanismos de defesa do hospedeiro, o que leva a persistência dessa bactéria durante infecções estafilocócicas (PARAI *et al.*, 2020).

A obtenção de novos medicamentos é algo complexo e dispendioso, pois cada medicamento leva cerca de 12 anos e mais de 1 bilhão de dólares para ser comercializado. A síntese química ou extração de produtos naturais são maneiras de se obter as substâncias que compõem os medicamentos, porém, a obtenção de fitoquímicos tem se mostrado eficiente, econômico e de menor toxicidade quando comparado aos sintéticos (ESWARI; YADAV, 2019). A utilização de plantas para fins medicinais não é novidade. Seu uso é mencionado há

muitos séculos sendo difundido e usado em 80% dos países em desenvolvimento, onde a medicina natural é a principal modalidade de assistência à saúde. O efeito das plantas contra bactérias e fungos patogênicos é comprovado através do uso de técnicas de microbiologia moderna, tornando evidente a potência das plantas contra agentes infecciosos (CHEESMAN et al., 2017; DARWISH et al., 2002).

Como exemplo de compostos para o uso medicinal temos os inibidores de natureza proteica que inibem as proteases ou proteinases cisteínicas, que são enzimas proteolíticas. Agem formando um complexo reversível com a enzima, atuando como um pseudo-substrato e, assim, dificultando o acesso dessa enzima ao substrato específico, ou seja, à proteína alvo da proteólise. Esses inibidores são encontrados em plantas, animais e microrganismos e prestam papel fundamental na sobrevivência e manutenção dos mesmos. A prospecção dessas moléculas em plantas é limitada, pois apenas 1-5% das espécies vegetais, das dez principais famílias de plantas, foram estudadas com a finalidade de encontrar inibidores com potencial de uso na medicina e agricultura, ou seja, essa imensa diversidade de plantas ainda precisa ser estudada, pois o uso dessas moléculas para produção de novos medicamentos é algo promissor e necessário (BENCHABANE *et al.*, 2010; SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016; HELLINGER; GRUBER, 2019). Por exemplo, foi relatado recentemente que um inibidor de protease cisteínica proveniente do fruto do kiwi foi capaz de reduzir biofilme biológico oral na língua de idosos, o ensaio foi realizado *in vitro* (MUGITA *et al.*, 2017).

A *Terminalia catappa*, uma espécie originária da Índia e pertencente à família Combretaceae, vem sendo investigada por nosso grupo de pesquisa, motivado pelo fato da espécie ter se mostrado uma promissora fonte de inibidores de proteases. A presença de fitocistatinas (inibidores de proteases cisteínicas de plantas) e inibidores de tripsina nas sementes de *T. catappa* foi detectada em estudos preliminares (QUEIROZ, 2018). Portanto, o presente trabalho foi conduzido com o intuito de se obter a purificação e caracterização bioquímica de um inibidor de protease cisteínica presente nas sementes de *T. catappa*, além de testar sua ação antimicrobiana contra patógenos de interesse médico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

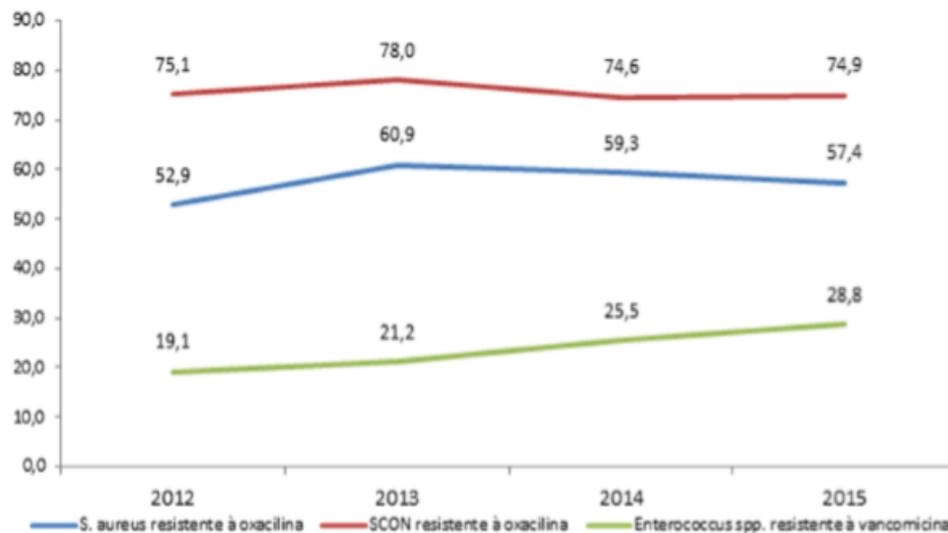
2.1 *Staphylococcus aureus*: Uma bactéria resistente a antibióticos

S. aureus é uma das bactérias mais desafiadoras quanto ao controle por antibióticos. Ela é responsável por causar graves infecções. Essa bactéria Gram-positiva comensal coloniza a mucosa nasal de forma transitória ou permanente. A resistência aos medicamentos adquirida por essa bactéria é devido ao uso, de forma inapropriada, dos antibióticos, o que dificulta o controle e resulta na formação de cepas resistentes, conhecidas como *S. aureus* “*multidrug-resistant*” (MDRSA). Como exemplo desses antimicrobianos temos a meticilina, vancomicina (glicopeptídeo), daptomicina (lipopeptídeo), linezolida (oxazolidinona), tedizolida (anoxazptinólida), antibiótico β -lactama, ceftobiprol e carbapenêmicos (ESWARI; YADAV, 2019; GATADI *et al.*, 2019).

A resistência de *S. aureus* ao amplo espectro de antibióticos é adquirida por conta do acúmulo de mutações e a aquisição de elementos genéticos. Os mecanismos de resistência envolvem inativação dos antimicrobianos, codificação de genes para proteínas não suscetíveis, modificação da proteína alvo, uso de bombas de efluxo e proteção das proteínas alvos (THALLINGER *et al.*, 2013). Para controlar a resistência aos antibióticos, foi criado o Plano de Ação Global em Resistência Microbiana, aprovado em 2015 pela Assembleia Mundial de Saúde. O objetivo do plano é assegurar o tratamento dessas doenças infecciosas, de modo que o uso dos antimicrobianos seja feito de maneira segura e proveniente de fonte confiável, responsável e com acesso para todos (WHO, FAO, OIE 2016).

A incidência dessas bactérias, *Staphylococcus* Coagulase Negativo, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp*, em infecções hospitalares é preocupante. Os dados mostram (Figura 1) um aumento no número de casos de infecção. Tal fato é justificável, já que esses agentes etiológicos contornam as formas de controle impossibilitando a queda no número de casos. As espécies mais notificadas em UTIs adulto entre os cocos Gram-positivos são: *Staphylococcus* Coagulase Negativo (74,9%), resistentes à oxacilina; *Staphylococcus aureus* (57,4%), resistentes à oxacilina; e *Enterococcus spp* (28,8%), resistentes à vancomicina (ANVISA, 2016).

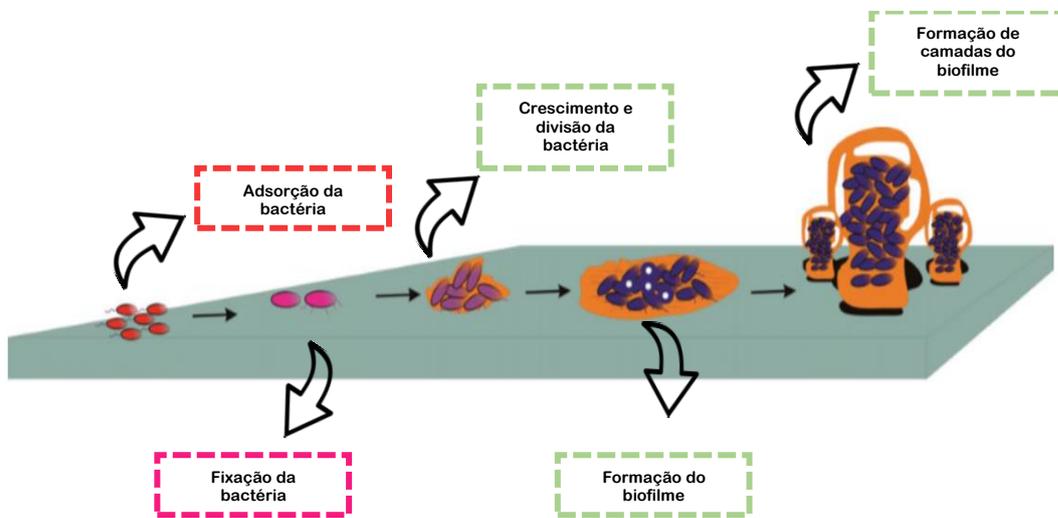
Figura 1- Porcentagens dos agentes etiológicos de incidência de *Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorialmente Confirmada-IPCSL* em pacientes adultos hospitalizados em UTIs (Brasil, 2012-2015)



Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2016

A formação de matriz (biofilme) por parte dessas espécies é outra estratégia desenvolvida e utilizada por 99% dos microrganismos que habitam a Terra. O processo de formação do biofilme se dá com a adsorção de bactérias em superfícies sólidas, seguida de fixação, crescimento e secreção de polissacarídeos extracelulares (Figura 2) (THALLINGER *et al.*, 2013). A formação desse biofilme de matriz extracelular altamente estruturada é mais um fator que contribui para a resistência de *S.aureus*, tornando sua suscetibilidade de 10-1.000 vezes menor ao variado número de antimicrobianos disponíveis no mercado (MOHAMMED *et al.*, 2018).

Figura 2 - Estágios de formação do biofilme.



Fonte: Adaptado de THALLINGER *et al.*, 2013

Diante do que foi descrito, uma solução viável para o controle dessas infecções é o uso de extratos de plantas a fim de purificar compostos que possam compor medicamentos, dado que os antibióticos existentes no mercado perderam sua eficiência contra microrganismos resistentes. No período de 2005-2015, cerca de 112 plantas foram estudadas, sendo fontes de compostos bioativos que exibiram atividade antibacteriana, antituberculósica e antimalárica (SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017).

2.2 Inibidores de proteases: Uma alternativa para aplicações na medicina e agricultura

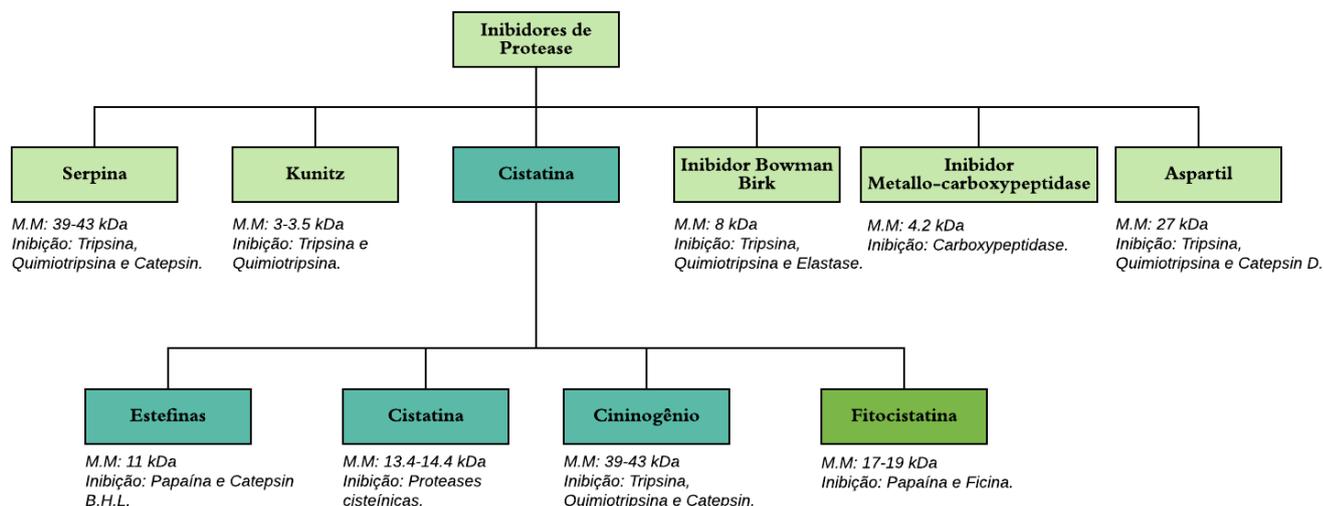
Os inibidores de proteases são uma classe de polipeptídios que agem impossibilitando a ação das enzimas proteolíticas. As enzimas proteolíticas desempenham importantes funções para a sobrevivência e manutenção dos organismos vivos. Além disso, estão relacionadas com o desencadeamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose, AIDS, doença de Alzheimer e infecções microbianas (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). Na presença dos inibidores de proteases, processos como crescimento celular, apoptose, renovação proteica e migração celular são afetados de maneira direta ou indireta (MARATHE

et al., 2019). Portanto, é de grande relevância a descoberta de novos inibidores para reverter às ocorrências citadas.

A classificação dos inibidores de proteases é baseada no modo de ação, no tipo de protease que sofre inibição e na sequência primária dos inibidores (Figura 3) (RAWLINGS; BARRETT; BATEMAN, 2012). Na figura 3, algumas famílias são apresentadas e suas funções e estruturas são descritas (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). O presente trabalho destaca a superfamília de cistatinas, que contém a família do inibidor em estudo. As cistatinas são um grupo que compreende quatro famílias: (I) estefinas, (II) cistatinas, (III) cininogênios e (IV) fitocistatinas, que são classificadas de acordo com a massa molecular e sua distribuição na natureza. (SHAMSI, 2016)

As estefinas (família I) são polipeptídeos de cadeia única, com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, desprovidas de ligações dissulfeto e carboidratos. Esses inibidores atuam de maneira reversível com uma inibição do tipo competitiva. Elas podem ser encontradas no citosol de diferentes células e em fluídos corporais. Os representantes das estefinas são as cistatinas A e B. Diferente das estefinas, as cistatinas (família II) possuem duas ligações dissulfeto no terminal carboxil e alguns membros são glicosilados. Apresentam 120-122 resíduos de aminoácidos e sua síntese ocorre como proproteína contendo um peptídeo sinal, esse fato sugere a existência de atividade extracelular. A família II tem como integrantes as cistatinas C, D, S, SA e SN. Já os cininogênios (família III) possuem alta massa molecular, oito pontes de dissulfeto e são glicosilados, no entanto estes carboidratos não estão ligados nos domínios da cistatina. São representantes dos cininogênios: cininogênio humano de alta massa molecular (120 kDa), cininogênio humano de baixa massa molecular (68kDa) e cininogênio T (SHAMSI; BANO, 2017; OCHIENG; CHAUDHURI, 2010).

Figura 3 - Classificação dos inibidores de proteases



Fonte: Adaptado de SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016.

As fitocistatinas (família IV) são inibidores de baixa massa molecular que agem de maneira reversível no sítio ativo de proteases alvos (SIDDIQUI *et al.*, 2016). A família IV das cistatinas é amplamente encontrada em plantas. O banco de dados PlantPI registra cerca de 495 inibidores provenientes de 129 famílias de plantas. Esses tipos de inibidores estão ligados diretamente com o sistema de defesa das plantas, através da atividade proteolítica contra proteases ditas essenciais. As fitocistatinas impedem o desenvolvimento de insetos e doenças que possam acometer diferentes espécies vegetais (MARATHE *et al.*, 2019). Além de proteção contra patógenos e doenças, essas moléculas desempenham papel importante durante o processo de germinação e maturação de espécies vegetais, pois elas regulam as proteases envolvidas durante essas fases. A expressão desses inibidores é mais evidente quando existem condições de estresse biótico ou abiótico (SIDDIQUI *et al.*, 2016).

As fitocistatinas possuem inúmeras aplicações na área médica, como exemplo temos a fitocistatina de arroz, *Oryza sativa*, que atua inibindo uma protease envolvida com câncer, artrite e doença de *Alzheimer* (VALADARES *et al.*, 2010). Essas moléculas obtidas de plantas também possuem importância na agricultura, como, por exemplo, o inibidor obtido de feijão-de-corda ou feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) que foi capaz de impedir o crescimento de larvas de *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*, importantes pragas agrícolas (AGUIAR *et al.*, 2006).

Diante do exposto, percebe-se que os inibidores de proteases são moléculas promissoras com diversas aplicações. Portanto, a descoberta de novos inibidores é essencial, visto toda a versatilidade funcional dessas moléculas.

2.3 *Terminalia catappa*: Uma fonte promissora de inibidores de proteases

Terminalia catappa L. é uma espécie pertencente à família Combretaceae, conhecida popularmente como castanheira, castanhola, castanholeira, chapéu-de-sol e setecopas (OLIVEIRA; PEREIRA, 1984). Essa espécie é originária da Índia podendo ser encontrada, também, em outros países como Malásia, Austrália, Sri Lanka, Paquistão e muitos outros países do sul da Ásia (SHARMA; RANA, 2017). Na América do Sul, a introdução dessa espécie teve a finalidade de reflorestamento e uso ornamental (KATIKI *et al.*, 2017).

O fruto da *T. catappa* L. é composto por 1/3 de polpa e 2/3 de semente. As sementes podem ser consumidas pelos seres humanos, sendo esse hábito comum em países em desenvolvimento (EZEOKONKWO; DODSON, 2004). As sementes são constituídas por proteína (23,8%), carboidratos (16%), lipídeos (51,8%), além de minerais como K (9,3%), Ca (8,3%) e Mg (8) (MATOS *et al.*, 2009). A espécie é amplamente estudada para aplicação medicinal, pois as folhas possuem atividade antioxidante (KINOSHITA *et al.*, 2007), anti-inflamatório (FAN *et al.*, 2004) e anticâncer (CHEN *et al.*, 2000) e os frutos têm propriedades antidiabéticas (NAGAPPA *et al.*, 2003). Além da finalidade medicinal, a espécie é usada também na produção de biocombustíveis, o que amplia a aplicação da *T. catappa* (IHA *et al.*, 2014).

A *T. catappa* é uma fonte promissora de inibidores de protease, visto que estudos realizados por nosso grupo de pesquisa levaram à purificação de uma fitocistatina de sementes que inibiu o crescimento de *Candida tropicalis* (QUEIROZ, 2018). As aplicações da espécie

vegetal são inúmeras, assim, a *T. catappa* se mostra uma fonte de moléculas promissoras para o desenvolvimento de pesquisas, seja na área medicinal ou ambiental. Portanto, o presente trabalho se justifica pelo potencial apresentado pelas sementes da espécie como fonte de moléculas promissoras na área medicinal.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Purificação de um inibidor de protease proveniente das sementes de *Terminalia catappa*, determinação de suas características bioquímicas e avaliação de seus efeitos antimicrobianos.

3.2. Objetivos Específicos

- Estabelecimento de um protocolo de purificação de um dos inibidores de proteases cisteínicas encontrados nas sementes maduras de *T. catappa*;
- Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular aparente do inibidor;
- Determinação da cinética de inibição;
- Determinação da temperatura ótima de atividade inibitória do inibidor purificado sobre a papaína;
- Determinação da estabilidade térmica do inibidor purificado;
- Determinação da estabilidade do inibidor purificado a diferentes condições de pH;
- Determinação dos efeitos do inibidor purificado sobre *E. coli*, *S. aureus* e leveduras do gênero *Candida*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes Químicos

Acrilamida, N,N'-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue G250, N- α -benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BApNA), N- α -benzoyl-DL-arginina-p-naftilamida (BANA), 7-dimetilaminocumarina-4-ácido acético (DMACA), tripsina tipo II (EC 3.4.21.4), papaína (3.4.22.2), trizma-base, ditioneitol (DTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Os marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare Life Science (NY, USA). Os demais produtos químicos e meios de cultura caldo Mueller Hinton adquirido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA) e da Himedia® Laboratories Pvt. Ltd. (Mumbai, Índia).

4.2. Material biológico

Os frutos foram coletados no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará-UFC. A polpa foi descartada e o fruto seco em liofilizador durante 48 h. Após secagem, as amêndoas foram retiradas e trituradas em moinho elétrico, até obtenção de uma fina farinha, que foi, posteriormente, delipidada com hexano (C₆H₁₄) na proporção de 1:5 (m/v). A farinha passou por cinco trocas de hexano. Após delipidação, a farinha foi seca em temperatura ambiente (24 °C) durante 48 h, sendo, em seguida, armazenada sob refrigeração até o momento da extração do inibidor.

As bactérias Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923) e a Gram-negativa *E. coli* (ATCC 8739) foram obtidas do Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Já as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258) e um isolado clínico de *Candida tropicalis* foram adquiridos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC (Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes).

4.3. Extração das proteínas

A extração das proteínas foi realizada conforme protocolo baseado em QUEIROZ *et al.*, 2018. As proteínas totais foram extraídas em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo 0,2 M de NaCl, na proporção de 1:10 (m/v), durante 180 min, sob agitação, a 4 °C. Após

extração, a suspensão foi filtrada em tecido de nylon e, em seguida, centrifugada a 12.000xg, por 20 min, a 4 °C (centrífuga Himachi II, Hitachi, Tóquio, Japão). O sobrenadante obtido foi incubado em banho-maria a 80 °C durante 30 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000xg, por 20 min, a 4°C (centrífuga Himachi II, Hitachi, Tóquio, Japão) e o sobrenadante recolhido, dialisado contra água destilada e liofilizado, denominado de Fração 80 °C (F_{80 °C}).

4.4. Determinação do teor de proteínas

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada seguindo a metodologia proposta por Bradford, (1976). A concentração proteica foi estimada em relação a uma curva padrão obtida utilizando diferentes concentrações de albumina sérica bovina. Alíquotas de 0,1 mL da amostra, não diluída ou diluída em até 10 vezes, foram adicionadas em um tubo de ensaio com 2,5 mL da solução de Bradford. Após 15 min em temperatura ambiente (23 ± 2 °C), leituras de absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV, Thermo Fischer, Waltham, Estados Unidos) foram anotadas. O cálculo para obter a concentração de proteínas (Cp) das amostras foi feito com base no fator de calibração (Fc) gerado a partir da curva padrão obtida usando albumina sérica bovina como proteína padrão. A equação abaixo foi, então, empregada para o cálculo da concentração de proteína expressa em mg por mL da amostra:

$$C_p = \frac{\text{média das absorvancias} * F_c * \text{diluição da amostra}}{100} = \text{mg/ml}$$

4.5. Purificação

O extrato proteico e a fração F_{80 °C} apresentaram elevada atividade inibitória contra papaína. Portanto, esta fração foi utilizada para dar continuidade ao estudo, objetivando a purificação de um inibidor de papaína. A fração F_{80 °C} (15 mg) foi, inicialmente, solubilizada em 10 mL de tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e submetida a cromatografia de troca-iônica em matriz de DEAE-celulose, previamente equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas não-retidas foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio e as proteínas retidas foram eluídas, sequencialmente, com tampão de equilíbrio acrescido de 0,2 e 1 M de NaCl . A cromatografia foi realizada em fluxo constante de 60 mL/h, sendo frações de 4 mL coletadas. As frações obtidas foram analisadas quanto à presença de atividade inibitória de proteases. A fração não-retida apresentou a melhor atividade inibitória frente à papaína, sendo então

dialisada contra água destilada e liofilizada. Posteriormente, foi verificado que essa fração continha uma única proteína, com atividade inibitória de papaína. Essa proteína foi então denominada de *TcPI-II* (*T. catappa papain inhibitor II*).

4.6. Especificidade Enzimática

O ensaio de atividade inibitória de tripsina foi realizado de acordo com Erlanger; Kokowsky; Cohen (1961), avaliando a atividade hidrolítica residual da tripsina bovina após incubação com as amostras testes, usando BApNA (N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato. O *TcPI-II* obtido de sementes de *T. catappa* na concentração de $2,98 \times 10^{-4}$ M foi solubilizado em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e incubado com 20 μ L de tripsina (0,3 mg mL⁻¹ em 1 mM HCl), a 37 °C, por 10 min. A esta mistura, 0,5 mL de de BApNA 1,25 mM foram adicionado e após 15 min a reação foi interrompida por adição de 250 μ L de ácido acético glacial a 30% (v/v). A hidrólise de BApNA foi monitorizada a 410 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV, Thermo Fischer, Waltham, Estados Unidos) .

O ensaio de atividade inibitória de papaína foi conduzido segundo ABE *et al.*, (1992), usando BANA (N- α -benzoil-DL-arginina-pnaftilamida) como substrato. Alíquotas de 200 μ L de *TcPI-II* ($2,98 \times 10^{-4}$ M) foram incubadas com 30 μ L de solução de papaína (1 mg de papaína) dissolvida em água ultrapura grau Milli-Q e diluída 20 vezes em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0, 40 μ L da solução ativadora (tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0, EDTA 2 mM, DTT 3 mM) e 230 μ L de tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0. A mistura foi incubada a 37 °C por 10 min. Após a incubação, 200 μ L de BANA na concentração de 1 mM foram adicionados. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de HCl a 2% (v/v) preparado em etanol a 95% (v/v). Em seguida, 500 μ L de DMACA [(4-[dimetilamino] cinnamaldeído) a 0,06% (p/v) dissolvidos em etanol a 95% (v/v) foram adicionados para desenvolvimento da cor, sendo as leituras de absorbância feitas a 540 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV, Thermo Fischer, Waltham, Estados Unidos).

4.7. Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular

O perfil eletroforético de *TcPI-II* foi obtido após eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970) adaptada ao uso de placas. Para montagem das placas, gel de aplicação, encerrando 3,5% de

acrilamida e 1% de SDS preparados em tampão tris-HCl 50 mM, pH 6,8, e gel de separação contendo 15% de acrilamida e 1% de SDS em tampão tris-HCl 3,0 M, pH 8,8 foram usados. As amostras foram primeiramente dissolvidas em tampão de amostra (tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 1% de SDS e 20% de glicerol). Em seguida, as mesmas foram aquecidas a 100 °C durante 5 min e centrifugadas (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Alemanha) a 12.000 x g, por 5 min, à temperatura ambiente (24 °C). Azul de bromofenol (4 vezes concentrado) foi adicionado aos sobrenadantes para acompanhar a corrida eletroforética. Em seguida, foram aplicadas alíquotas (10µL) das amostras em poços do gel de aplicação e a corrida foi conduzida a uma corrente constante de 20 mA, por, aproximadamente, 1 h. Após corrida eletroforética, as proteínas do gel foram fixadas com solução aquosa de etanol a 30% (v/v) e ácido fosfórico 2% (v/v) e, então, reveladas com Coomassie G-250 (Blue silver) (CANDIANO *et al.*, 2004). Já o descoramento do gel foi feito com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0, v/v/v). As seguintes proteínas foram usadas como padrões de massa molecular: fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e 2-lactoalbumina (14,4 kDa). A massa molecular aparente das amostras foi estimada a partir de uma curva padrão construída com os Rfs dos marcadores de massa molecular utilizados.

4.8. Zimograma

A visualização do perfil de inibição em gel de TcPI-II foi realizada de acordo com Shaw & Prasad (1970). As amostras foram primeiramente dissolvidas em tampão de amostra (tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 1% de SDS e 20% de glicerol). Em seguida, as mesmas foram aquecidas a 100 °C durante 5 min e centrifugadas (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Alemanha) a 12.000 x g, por 5 min, à temperatura ambiente (24 °C). Alíquotas de TcPI-II (10µg) foram aplicadas em poços no gel de aplicação (3%) e a corrida eletroforética desenvolvida em gel de poliacrilamida a 15% (m/v) contendo gelatina 0,5% (m/v). Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em Triton X-100 a 2,5% (v/v) por 20 min a 37 °C, lavado com água destilada e incubado com solução de papaína (0,1 mg/mL) durante 120 min a 37 °C. As proteínas do gel foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 preparado em metanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v). O excesso de corante foi removido do gel usando a solução de metanol, ácido acético e água (4: 1: 5,v/v/v).

4.9. Parâmetros Cinéticos

O TcPI-II foi colocado em diferentes concentrações ($0,94 \times 10^{-5}$ M, $1,57 \times 10^{-5}$ M, $1,89 \times 10^{-5}$ M e $3,14 \times 10^{-5}$ M) e em seguida estas foram utilizadas em ensaio de inibição contra papaína para avaliar a concentração do inibidor capaz de inibir 50% da atividade da enzima (IC_{50}). Para determinar a constante de inibição (K_i), o inibidor TcPI-II foi preparado em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0 em diferentes concentrações ($1,36 \times 10^{-6}$ e $2,05 \times 10^{-6}$ M) e incubado com solução de papaína, nas condições descritas no item 4.6. A reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de BANA em diferentes concentrações ($0,5 \times 10^{-3}$ M e $2,0 \times 10^{-3}$ M) e foi interrompida após 20 min pela adição de 500 μ L de HCl 2% (v / v) em etanol 95% (v / v). O gráfico de *Lineweaver-Burk* foi obtido pelo valor recíproco da taxa da reação enzimática ($1/v$) versus o valor recíproco da concentração do substrato ($1/[S]$) na ausência e presença de TcPI-II. O K_i foi obtido pela interseção das duas linhas no eixo x, correspondendo às concentrações do substrato (*Dixon*).

4.10. Temperatura e pH ótimos da atividade inibitória

Para avaliar a estabilidade térmica de TcPI-II, o inibidor ($2,7 \times 10^{-6}$ M) foi incubado em banho-maria em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) durante 20 min. As amostras foram resfriadas em geladeira (10 ± 2 °C) e em seguida estas foram utilizadas em ensaio de inibição contra papaína. A atividade inibitória residual foi quantificada a partir de leituras a 540 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV, Thermo Fischer, Waltham, Estados Unidos). Além disso, um outro ensaio de inibição de papaína foi realizado, onde TcPI-II ($2,7 \times 10^{-6}$ M) sofreu aquecimento em banho-maria a 100 ± 2 °C em diferentes tempos (0, 45, 60 75, 90 e 120 min), as amostras foram resfriadas em geladeira (10 ± 2 °C) e posteriormente o ensaio foi conduzido. A atividade residual foi quantificada do mesmo modo que o experimento de estabilidade anterior.

O TcPI-II ($2,7 \times 10^{-6}$ M) foi diluído em diferentes tampões com concentração de 50 mM com valores de pH variando de 2 a 10, a saber: glicina-HCl (pH 2); acetato de sódio (pH 5,2); fosfato de sódio (7); tris-HCl (pH 8); e glicina-NaOH (pH 10). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente (23 ± 2 °C) por um período de 30 min, em seguida, a atividade inibitória contra papaína foi avaliada, como descrito anteriormente.

4.11. Ensaio antimicrobiano *in vitro* contra bactérias

TcPI-II foi testado contra *E. coli* e *S. aureus* em placas de poliestireno para microtitulação com 96 poços, de acordo com Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, <https://clsi.org/>). Para o ensaio uma alíquota de 100µL do meio de cultura de caldo Mueller Hinton com células bacterianas (5×10^5 CFU / mL) foi incubada por 480 min a 37 °C, no escuro, com o *TcPI-II* dissolvidos e diluídos em série ($3,14 \times 10^{-8}$, $1,57 \times 10^{-8}$, $7,86 \times 10^{-9}$, $3,93 \times 10^{-9}$ e $1,96 \times 10^{-9}$) em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. Após 24 horas em temperatura ambiente (23 ± 2 °C), leituras de absorvância a 600 nm foram realizadas em leitor de absorvância automatizado para microplacas de absorvância (Epoch, BioTek Instruments, Inc., EUA). Os controles negativos e positivos foram fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e ciprofloxacina ($1,50 \times 10^{-6}$ M), respectivamente. O meio de cultura de caldo Mueller Hinton contendo apenas as células bacterianas foi utilizado como referência para 100% de crescimento.

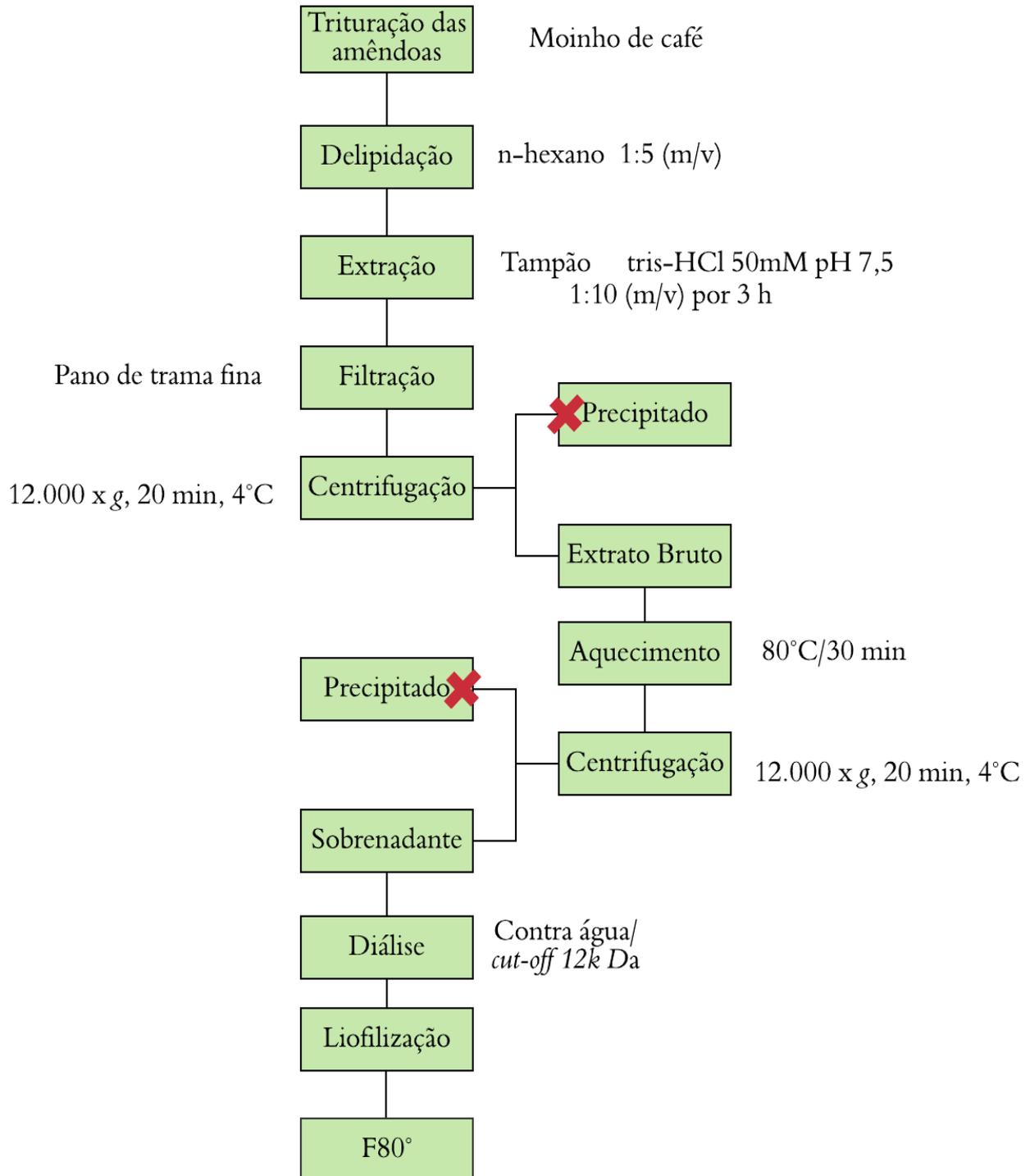
O ensaio antifúngico foi realizado em caldo Mueller Hinton em placas de poliestireno para microtitulação com 96 poços. Alíquotas (100 µL) contendo suspensão celular de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* ($0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC / mL) em caldo Mueller Hinton foram incubadas com 100 µL de *TcPI-II* dissolvido e diluído em série ($15,7 \times 10^{-6}$, $7,8 \times 10^{-6}$, $3,9 \times 10^{-6}$ e $1,95 \times 10^{-6}$ M) em NaCl 0,15 M. A incubação das placas ocorreu a 37 °C, 24 h, no escuro. O crescimento da levedura foi avaliado por leituras de absorvância a 600 nm em um leitor de microplacas de absorvância automatizado (Epoch, BioTek Instruments Inc., EUA). Para os controles foram usados Nistatina 122,7 µM (controle positivo) e NaCl 0,15 M (controle negativo).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração de proteínas de sementes de *T. catappa*

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que as sementes de *T. catappa* constituem uma importante fonte de inibidores de proteases. Dessa forma, este estudo padronizou um protocolo para extração e purificação (Figura 4) de um inibidor de papaína presente nas sementes dessa espécie, objetivando sua aplicação como inibidor antimicrobiano. O aquecimento do extrato a 80 °C por 30 min resultou na eliminação de vários contaminantes, resultando em um material mais limpo, quando comparado ao extrato obtido por precipitação com ácido tricloroacético (TCA), usada como uma etapa de purificação de um outro inibidor de papaína de sementes de *T. catappa* (QUEIROZ , 2018). As coletas das sementes ocorreram de um único exemplar da espécie vegetal. No ano de 2018 o exemplar estudado teve sua copa cortada, este fato pode ter influenciado na expressão do inibidor, pois os padrões de inibição não foram mais os mesmos, a produção dos frutos também sofreu com essa condição. Dessa forma, é interessante a condução de estudos para a analisar a expressão do inibidor em diferentes condições, como clima e estresse mecânico.

Figura 4 - Esquema para obtenção da fração 80 °C (F80 °C) de sementes de *T. catappa*



5.2. Purificação do *TcPI-II*

O extrato proteico obtido das sementes de *T. catappa* exibiu atividade inibitória específica de papaína de 16,4 UAI mg⁻¹ de proteína (Tabela 1). A purificação do inibidor compreendeu precipitação de proteínas indesejáveis por aquecimento em banho-maria do extrato proteico de *T. catappa*, a 80 °C, gerando a F_{80 °C}. Esta fração apresentou aumento da atividade inibitória específica de papaína (29,5 UAI mg⁻¹ de proteína), em relação ao extrato bruto, com rendimento e índice de purificação de 80% e 1,8x, respectivamente. Após aplicação da F_{80 °C} em coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5, duas frações proteicas com atividade inibitória de papaína foram obtidas (Fig. 5). A primeira fração foi eluída com o próprio tampão de equilíbrio e encerrava o inibidor de papaína purificado (*TcPI-II*), como mostrado apresentando uma única banda proteica após SDS-PAGE (Fig. 8). O *TcPI-II* apresentou atividade específica de 142,3 UAI mg⁻¹, rendimento de 2,3% e índice de purificação de 8,7x. O rendimento de *TcPI-II* foi semelhante ao encontrado para um inibidor de protease purificado de *Triticum dicoccoides* que apresentou rendimento de 2,25% (RUAN *et al.*, 2017). Já o baixo índice de purificação em relação ao extrato bruto denota que este encerrava poucas proteínas contaminantes, que foram removidas pelo tratamento térmico a 80 °C seguido da cromatografia. Por isso, a necessidade de poucos etapas de purificação para obtenção do *TcPI-II*.

Tabela 1 - Etapas de purificação do inibidor de papaína obtido de *Terminalia catappa* (TcPI-II).

| Etapas de Purificação | Proteína total (mg) | Atividade total (UAI) ^a | Atividade específica (UAI mg ⁻¹) ^b | Rendimento (%) ^c | Índice de purificação (x) ^d |
|-------------------------|---------------------|------------------------------------|---|-----------------------------|--|
| Extrato Bruto | 762,0 | 12501,0 | 16,4 | 100,0 | 1,0 |
| F _{80 °C} | 610,2 | 18032,0 | 29,5 | 80,1 | 1,8 |
| TcPI-II (DEAE-Celulose) | 17,5 | 2487,0 | 142,3 | 2,3 | 8,7 |

Fonte: Própria autora.

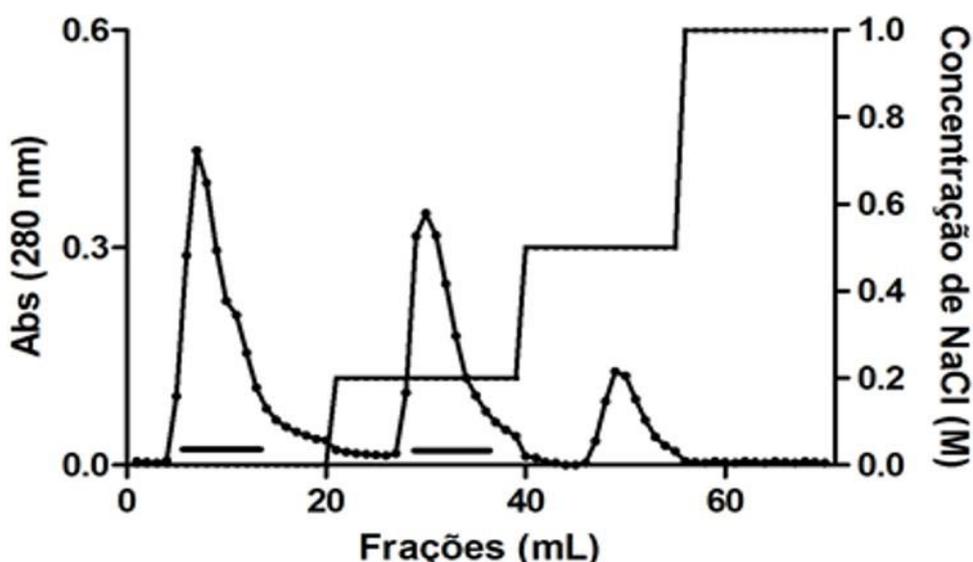
a) Quantidade total de proteína recuperada a partir de 20 g de farinha delipidada de sementes de *T. Catapa*.

b) 1 UAI (unidade de atividade inibidora da papaína) foi definida como a diminuição de 0,01 unidade de absorvância na presença do inibidor em relação àquela na sua ausência, lida a 540 nm;

c) A atividade específica obtida em cada etapa foi calculada como sendo a razão entre a sua atividade total e a concentração total de proteína;

d) O índice de purificação foi calculado como a razão entre a atividade específica obtida em cada etapa de purificação e aquela do extrato bruto tomada como 1.

Figura 5 - Perfil cromatográfico em DEAE-celulose da fração F_{80 °C}



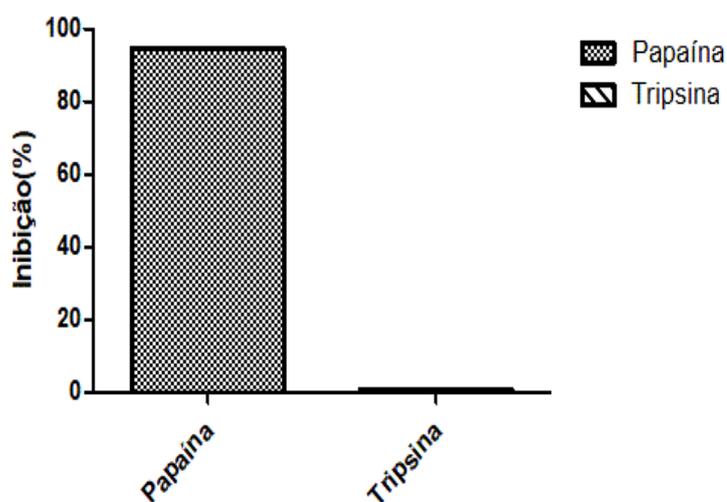
Fonte: Própria autora

A coluna foi equilibrada com tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e 15 mg de F₈₀ °C dissolvido nesse tampão foi aplicado. A fração não-retida na matriz foi eluída com o tampão de equilíbrio e as demais com um gradiente de NaCl de 0-1 M, preparado no tampão tris. Frações de 4,0 mL foram coletadas a uma vazão de 60 mL/h. Barras horizontais no interior dos picos indicam frações que exibem atividade inibitória de papaína.

5.3. Especificidade enzimática

O TcPI-II inibiu a atividade da papaína que é uma protease cisteínica, em até 95%. Já contra tripsina, uma serino protease, o TcPI-II não apresentou atividade inibitória (Figura 6). Resultado semelhante foi observado para um inibidor de protease purificada de *Cicer arietinum* (AB *et al.*, 2016), que inativou de forma eficiente a papaína, mas não a tripsina. A especificidade de inibidores de proteases cisteínicas em relação às proteases inibidas é devida a um resíduo de Gly conservado, encontrado na região N-terminal desse tipo de inibidor, que desempenha papel fundamental para propiciar uma forte atividade inibitória. Essa região do inibidor não mantém contato direto com o sítio ativo de proteases, mas contribui para o processo de ligação, ou seja, da formação do complexo Enzima-Inibidor (EI) (BENCHABANE *et al.*, 2010).

Figura 6 - Especificidade inibitória do TcPI-II frente a papaína e tripsina



Fonte: Própria autora

O TcPI-II ($2,98 \times 10^{-4}$ M) foi incubado em meio de reação contendo papaína e tripsina. A atividade inibitória foi realizada de acordo com Erlanger; Kokowsky; Cohen (1961) e avaliada por espectrofotometria. Os valores correspondem à média de três repetições ($n = 3$).

5.4. Caracterização bioquímica da fitocistatina TcPI-II

5.4.1. Confirmação da atividade inibitória do TcPI-II por zimografia

O zimograma (Figura 7) mostra que o TcPI-II apresentou atividade inibitória de papaína na região onde o inibidor foi aplicado confirmando, assim, a inibição dessa cisteíno protease. Esse resultado já era esperado, visto que a especificidade de impedir a atividade de papaína havia sido confirmada por ensaio de inibição avaliado por diminuição da absorbância da reação inibida em relação à não-inibida (Tabela 1).

5.4.2. Massa molecular do TcPI-II

O TcPI-II se apresentou como uma única banda proteica após SDS-PAGE, com massa molecular aparente de 15,9 kDa (Figura 8). Essa massa molecular foi similar àquelas encontradas para os inibidores purificado de *Allium sativum* (12,5 kDa) (SIDDIQUI; AHMED; BANO, 2017) e cisteína de *Helianthus annuus* (15,0 kDa) (ASHOURI *et al.*, 2017). A maioria das cistatinas são definidas como moléculas pequenas que possuem massa molecular entre 11-16 kDa (MARATHE *et al.*, 2019).

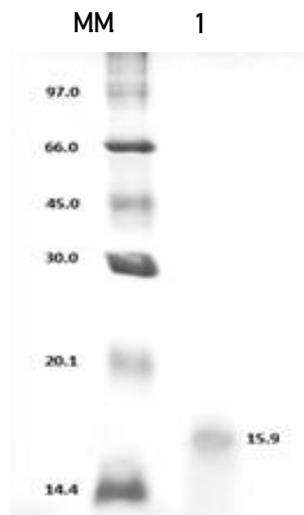
Figura 7 - Zimograma confirmando a atividade inibitória de papaína do *TcPI-II*.



Fonte: Própria autora

O gel foi realizado segundo a metodologia descrita por Shaw & Prasad (1970). A quantidade de proteína aplicada por raia foi de 10 µg.

Figura 8 - Perfil do *TcPI-II* após eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; 15%)



Fonte: Própria autora

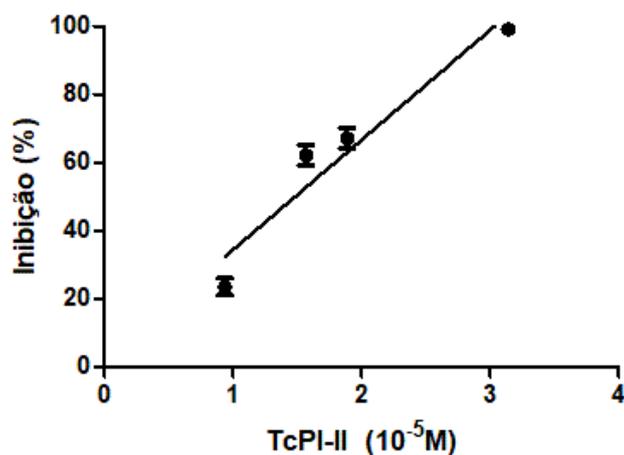
O gel foi corado segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Na raia MM encontram-se os marcadores de massa molecular. Na raia 1, encontra-se o *TcPI-II*. O gel foi corado de acordo com a metodologia descrita por NEUHOFF *et al.* (1988). A quantidade de proteína aplicada por raia foi de 10 µg.

5.4.3. Parâmetros cinéticos (IC₅₀, mecanismo de inibição e determinação de *K_i*)

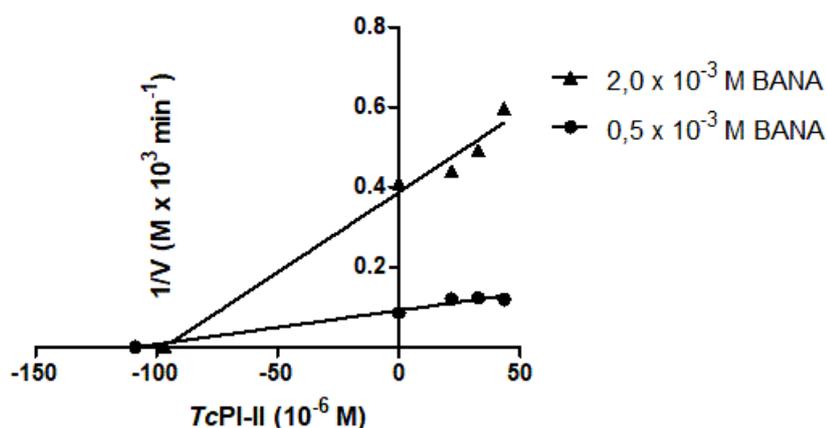
Em relação à atividade inibitória, o TcPI-II na concentração de $1,56 \times 10^{-5}$ M foi capaz de reduzir em 50% a atividade da papaína (Figura 9). O IC₅₀ do TcPI-II apresentou concentração de $1,56 \times 10^{-5}$ M, para um outro inibidor de protease cisteínica de *Terminalia catappa* foi observada a concentração de $5,25 \times 10^{-6}$ M (QUEIROZ, 2018). Os gráficos de Lineweaver-Burk e Dixon revelaram que o TcPI-II é um inibidor competitivo, com um *K_i* de $1,02 \times 10^{-6}$ M. A fitocistatina purificada de *Colocasia esculenta*, assim como TcPI-II, foi relatado como inibidor competitivo contra a papaína, com valor de *K_i* de $5,8 \times 10^{-8}$ M (WANG *et al.*, 2008). A literatura afirma que as cistatinas, em grande maioria, são inibidores competitivos (BENCHABANE *et al.*, 2010).

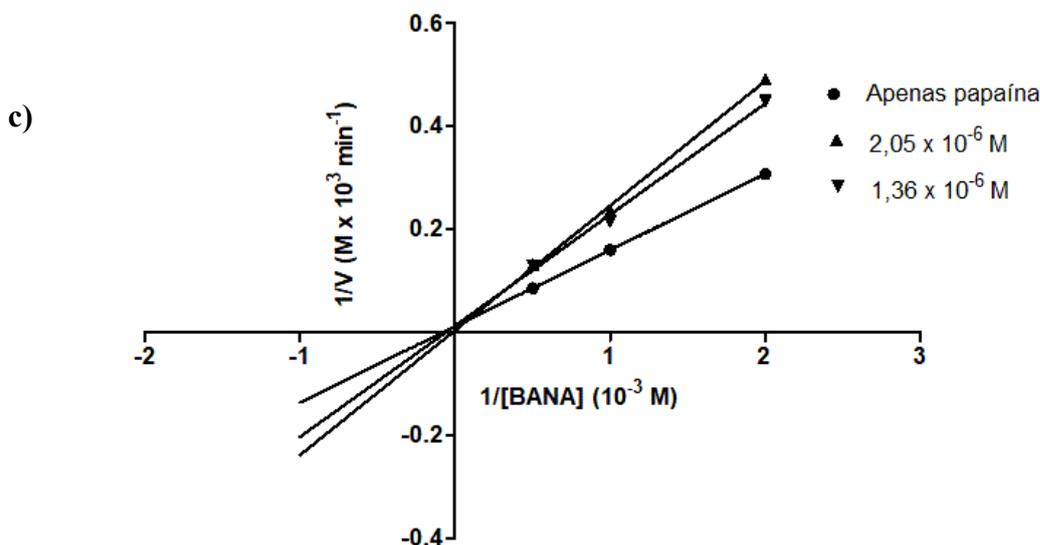
Figura 9 - Cinética de inibição da papaína pelo TcPI-II

a)



b)





Fonte: Própria autora

- Efeito do *TcPI-II* contra a papaína. O IC_{50} de *TcPI-II* na papaína foi de $1,56 \times 10^{-6} M$;
- Gráfico de Dixon para determinação da constante de dissociação (K_i). O BANA foi utilizado em concentrações finais de $0,5 \times 10^{-3}$, $1,00 \times 10^{-3}$ e $2,00 \times 10^{-3} M$ com aumento da concentração do inibidor ($1,36 \times 10^{-6}$ e $2,05 \times 10^{-6}$). O valor de K_i para *TcPI-II* foi de $1,02 \times 10^{-6} M$;
- Gráfico de atividade inibidora de Lineweaver-Burk contra a papaína por *TcPI-II*. A atividade enzimática foi determinada usando BANA como substrato. Os dados mostram que a cistatina purificada é um inibidor competitivo da papaína.

5.4.4. Estabilidade a temperatura e pH de *TcPI-II* sobre a papaína

O *TcPI-II* apresentou atividade máxima em $50^\circ C$, mas, também, mostrou atividade considerável nas demais temperaturas testadas (Figura 10A). Ao ser aquecido a $100^\circ C$ durante 45, 60, 75, 90 e 120 min, a atividade inibitória do *TcPI-II* permaneceu estável (Figura 10B). Os dados apresentados por QUEIROZ *et al.*, 2018 também evidenciaram a estabilidade térmica de um outro inibidor de protease cisteínica (*TcPI-I*) purificado de sementes de *T. catappa*, que manteve sua atividade inibitória constante quando incubada por 20 min com temperaturas variando de 37 a $100^\circ C$. Um inibidor purificado de *Vigna radiata* (KLOMKLAO *et al.*, 2011) demonstrou semelhança com o *TcPI-II*, pois a atividade de inibição permaneceu a mesma quando o inibidor foi aquecido a $90^\circ C$ em diferentes tempos, ocorrendo decréscimo na atividade só após 60 min de aquecimento. A resistência ao calor é uma das características apresentadas por fitocistatinas, em função da presença de pontes de

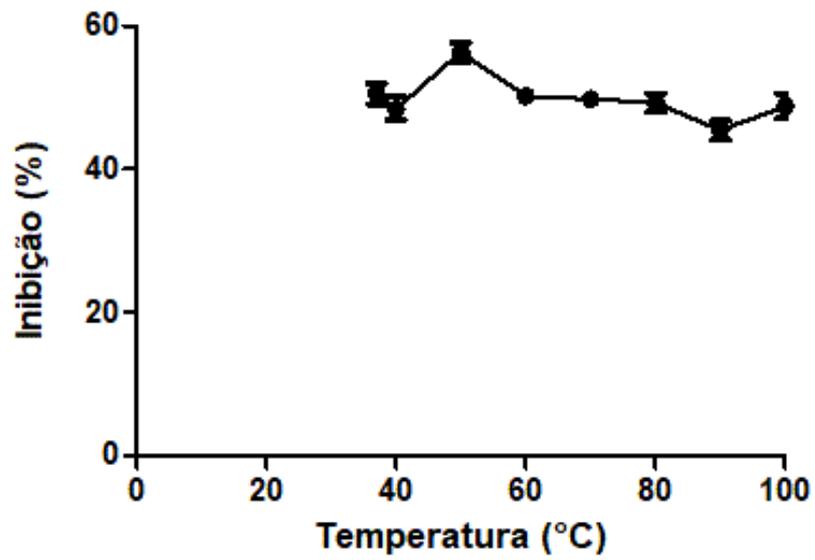
dissulfeto (BANGRAK; CHOTIGEAT, 2011).

Por outro lado, as fitocistatinas purificadas de amêndoa de noz (SIDDIQUI *et al.*, 2016) e sementes de *Cicer arietinum* (AB *et al.*, 2016) não apresentaram a mesma termoestabilidade dos inibidores referidos acima, pois ao serem expostos a temperaturas acima de 50 e 80 °C eles perderam o potencial de inibição. A fitocistatina purificada de *Brassica alba* (AHMED; SHAMSI; BANO, 2016) também não demonstra a mesma estabilidade térmica do TcPI-II, visto que no primeiro minuto de incubação a 70 °C o inibidor perdeu totalmente sua atividade

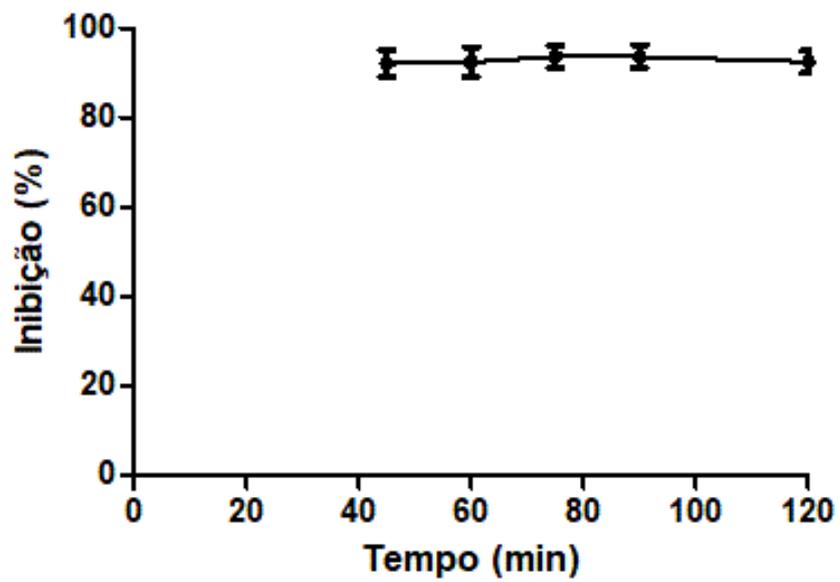
A atividade inibitória de TcPI-II sobre a papaína manteve-se também constante quando o inibidor foi incubado em diferentes valores de pH (Figura 10C). Da mesma forma, as cistatinas purificadas de *Brassica nigra* (FEROZ *et al.*, 2019) e amendoeira (SIDDIQUI *et al.*, 2016) obtiveram atividade inibitória contra papaína na faixa de pH 5-9 e 3-12, estas apresentaram pequenas perdas de atividade se mantendo estável nos diferentes pH de incubação. Diferente dos inibidores de proteases apresentados, o obtido de *Solanum aculeatissimum* Jacq não apresentou estabilidade nos extremos de pH ácido (2-3) e básico (11-12). No entanto, mostrou atividade inibitória máxima em pH 8,0 e pequenas perdas de inibição no pH de 4-10. A estabilidade do inibidor ao pH está relacionada a suas peculiaridades estruturais, como a presença de anéis aromáticos geralmente envolvidos na transferência de energia (MEENU KRISHNAN; MURUGAN, 2015).

Figura 10 - Estabilidade do *TcPI-II* em relação à sua atividade inibitória sobre papaína, quando tratado termicamente e incubado a diferentes pHs

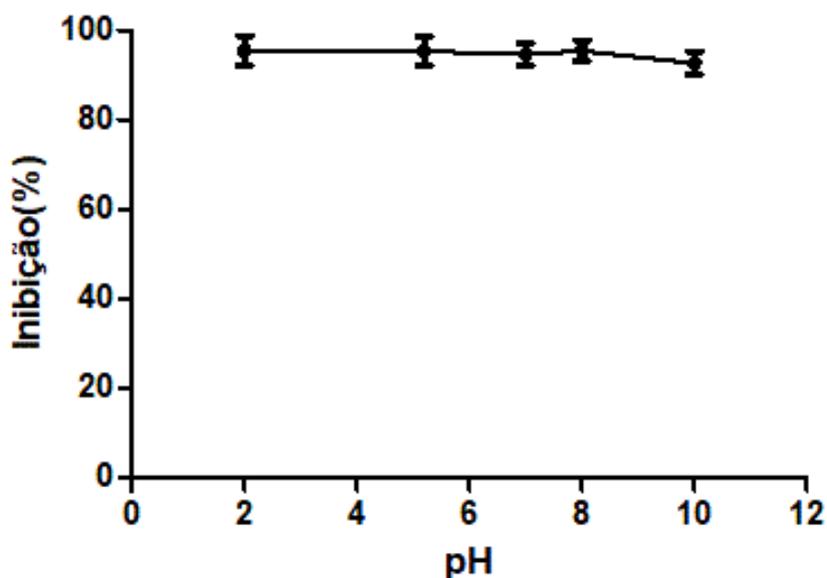
a)



b)



c)



Fonte: Própria autora

- a) Estabilidade térmica do *TcPI-II* após 20 min de incubação a diferentes temperaturas;
- b) Estabilidade do *TcPI-II* após diferentes tempos de incubação a 100 °C;
- c) Estabilidade do *TcPI-II* após incubação em diferentes pHs por 30 min a 37 °C.

5.5 Atividade antimicrobiana de *TcPI-II*

A atividade antimicrobiana *in vitro* de *TcPI-II* contra *S. aureus* resultou em diferentes taxas de inibição para o patógeno (Tabela 2). Já contra o crescimento de *E. coli* e leveduras (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) *TcPI-II* não foi efetivo, diferente de *TcPI-I* (QUEIROZ, 2018), que apresentou inibição do crescimento de *C. tropicalis*. A concentração de *TcPI-II* para inibir 86,40% do crescimento *S. aureus* foi de $3,14 \times 10^{-8}$ M. Para um inibidor de tripsina purificado de sementes de *Jatropha curcas* (*JcTI-I*) (COSTA *et al.*, 2014) foi necessário uma concentração de $4,87 \times 10^{-7}$ M para inibir 84,60% do crescimento do mesmo patógeno, desse modo, quando comparamos os resultados percebemos que o *TcPI-II* foi eficiente no combate de *S. aureus* em uma concentração menor que o inibidor encontrado na literatura.

Os inibidores provenientes de plantas possuem alta atividade inibitória contra proteases cisteínicas, estas possuem atuação como moléculas antibacterianas e antivirais (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). A problemática da resistência à medicamentos cria a necessidade de novas alternativas para o combate desses microrganismos, logo as cistatinas são potentes na ação contra patógenos (WESIERSKA *et al.*, 2005). O fato dos inibidores de proteases combaterem a invasão de patógenos em plantas pode justificar sua ação antimicrobiana contra microrganismos que acometem os seres humanos (ESWARI; YADAV, 2019).

Com base no exposto, os resultados alcançados no presente trabalho possibilitam o uso da espécie *T. catappa* como fonte de moléculas de interesse médico para impedir o crescimento de *S. aureus*. Em especial, a fitocistatina (*TcPI-II*) purificada da espécie vegetal *T. catappa* foi capaz de controlar uma espécie patogênica responsável por inúmeras infecções.

Tabela 2- Atividade antimicrobiana de *TcPI-II* frente a *S. aureus*

| Amostras | Inibição (%) |
|--|---------------------|
| Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 | - |
| <i>TcPI -II</i> ($3,14 \times 10^{-8}$ M) | 86,40 |
| <i>TcPI -II</i> ($1,57 \times 10^{-8}$ M) | 50,90 |
| <i>TcPI -II</i> ($7,86 \times 10^{-9}$ M) | 32,13 |
| <i>TcPI -II</i> ($3,93 \times 10^{-9}$ M) | 35,60 |
| <i>TcPI -II</i> ($1,96 \times 10^{-9}$ M) | 38,66 |
| Ciprofloxacina ($1,50 \times 10^{-6}$ M) | 100 |

Fonte: Própria autora

A tabela foi construída com base nos percentuais de inibição de *TcPI-II* em diferentes concentrações.

6. CONCLUSÃO

O TcPI-II, uma fitocistatina purificada de sementes de *T. catappa*, foi caracterizada e avaliada quanto ao seu potencial de atividade antimicrobiano. A resistência do inibidor à diferentes temperaturas, tempos de aquecimento e pH, bem como sua atividade inibitória do crescimento de *S. aureaus*, uma bactéria resistente e de difícil controle, torna essa molécula promissora para uso médico. Entretanto, há necessidade de estudos de seu mecanismo de ação e testes de segurança de seu uso clínico. Além disso, sua sequência pode ser analisada a fim de se obter um peptídeo inspirado no inibidor.

REFERÊNCIAS

AB, S. et al. Purification and Biochemical Characterization of a Cystatin-Like Thiol Proteinase Inhibitor from *Cicer arietinum* (Chickpea). **Journal of Chromatography & Separation Techniques**, v. 08, n. 06, 2016.

ABE, M. et al. Corn Kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, 1992.

AGUIAR, J. M. et al. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 2006.

AHMED, A.; SHAMSI, A.; BANO, B. Purification and biochemical characterization of phytocystatin from *Brassica alba*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, n. 5, p. 223–231, 2016.

ASHOURI, S. et al. Extraction and purification of protease inhibitor(s) from seeds of *Helianthus annuus* with effects on *Leptinotarsa decemlineata* digestive cysteine protease. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. December 2016, p. 113–119, 2017.

BANGRAK, P.; CHOTIGEAT, W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea rubber latex*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 244–250, 2011.

BENCHABANE, M. et al. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657–1666, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, 2004.

CHEN, P. S. et al. Folk medicine Terminalia catappa and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Letters**, v. 152, n. 2, p. 115–122, 2000.

COSTA, H. P. S. et al. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from Jatropha curcas seed cake with potential for bacterial infection treatment. **Frontiers in Microbiology**, 2014.

DARWISH, R. M. et al. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of Staphylococcus aureus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 359–364, 2002.

DIAS, L. P. et al. RcAlb-PepII, a synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of Ricinus communis, is a potent antimicrobial agent against Klebsiella pneumoniae and Candida parapsilosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, p. 183092, 2019.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1961.

ESWARI, J. S.; YADAV, M. New perspective of drug discovery from herbal medicinal plants: Andrographis paniculata and Bacopa monnieri (terpenoids) and novel target identification against Staphylococcus aureus. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 188–198, 2019.

EZEOKONKWO, C. A.; DODSON, W. L. Almond) Seed As a Source of Dietary Protein. **Journal of Food Quality**, v. 27, n. 2004, p. 207–219, 2002.

FAN, Y. M. et al. Phytochemical and antiinflammatory studies on Terminalia catappa. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3–4, p. 253–260, 2004.

FEROZ, A. et al. Purification and characterization of a cystatin like thiol protease inhibitor from *Brassica nigra*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 1128–1139, 2019.

GATADI, S. et al. Promising antibacterial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic Chemistry**, v. 92, n. September, p. 103252, 2019.

HELLINGER, R.; GRUBER, C. W. Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, 2019.

IHA, O. K. et al. Potential application of *Terminalia catappa* L. and *Carapa guianensis* oils for biofuel production: Physical-chemical properties of neat vegetable oils, their methyl-esters and bio-oils (hydrocarbons). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 95–98, 2014.

KATI KI, L. M. et al. *Terminalia catappa*: Chemical composition, in vitro and in vivo effects on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 246, n. January, p. 118–123, 2017.

KINOSHITA, S. et al. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. **Phytomedicine**, v. 14, n. 11, p. 755–762, 2007.

KLOMKLAO, S. et al. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1348–1354, 2011.

LAEMMLI, U. K. 227680a0. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

MARATHE, K. R. et al. **Protease Inhibitors and Their Applications: An Overview**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. v. 62

MATOS, L. et al. Composition and nutritional properties of seeds and oil from *Terminalia catappa* L. **Advance Journal of Food Science and Technology**, 2009.

MEENU KRISHNAN, V. G.; MURUGAN, K. Purification, characterization and kinetics of protease inhibitor from fruits of *Solanum aculeatissimum* Jacq. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 3, p. 97–107, 2015.

MOHAMMED, Y. H. E. et al. Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 339–347, 2018.

MUGITA, N. et al. Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 82, p. 233–240, 2017.

NAGAPPA, A. N. et al. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 45–50, 2003.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255–262, 1988.

OCHIENG, J.; CHAUDHURI, G. Cystatin superfamily. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 21, n. 1 SUPPL. 1, p. 51–70, 2010.

PARAI, D. et al. Reserpine attenuates biofilm formation and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, p. 103790, 2020.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 343–350, 2012.

RUAN, J. et al. Purification and properties of the chymotrypsin inhibitor from wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) of Israel and its toxic effect on beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 141–147, 2017.

SHAMSI, A.; BANO, B. Journey of cystatins from being mere thiol protease inhibitors to at heart of many pathological conditions. **International Journal of Biological**

Macromolecules, v. 102, p. 674–693, 2017.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016.

SHARMA, R.; RANA, V. Effect of carboxymethylation on rheological and drug release characteristics of Terminalia catappa gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 728–738, 2017.

SHAW, C. R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes-A compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, 1970.

SIDDIQUI, A. A. et al. Isolation and purification of phytocystatin from almond: Biochemical, biophysical, and immunological characterization. **Cogent Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2016.

SIDDIQUI, M. F.; AHMED, A.; BANO, B. Insight into the biochemical, kinetic and spectroscopic characterization of garlic (*Allium sativum*) phytocystatin: Implication for cardiovascular disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 734–742, 2017.

SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 1–15, 2017.

THALLINGER, B. et al. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 1, p. 97–109, 2013.

VALADARES, N. F. et al. Molecular determinants of improved cathepsin B inhibition by new cystatins obtained by DNA shuffling. **BMC Structural Biology**, v. 10, p. 1–10, 2010.

WANG, K. M. et al. Characterization of inhibitory mechanism and antifungal activity between group-1 and group-2 phytocystatins from taro (*Colocasia esculenta*). **FEBS Journal**, v. 275, n. 20, p. 4980–4989, 2008.

WESIERSKA, E. et al. Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 59–64, 2005.

WIDIANINGRUM, D. C.; NOVIANDI, C. T.; SALASIA, S. I. O. Antibacterial and immunomodulator activities of virgin coconut oil (VCO) against *Staphylococcus aureus*. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. e02612, 2019.

World Health Organization. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. Geneva: **WHO**, 2015.

WHO, World Health Organization; FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations; OIE, World Organization For Animal Health. Antimicrobial Resistance - **A manual for developing national action plans**. Versão 1. 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204470/1/9789241549530_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 11 nov. 2019.