



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ADSON ÁVILA DE SOUZA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E POTENCIAL
ANTIBACTERIANO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE CHIA
(*Salvia hispanica* L.)**

FORTALEZA

2021

ADSON ÁVILA DE SOUZA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E POTENCIAL
ANTIBACTERIANO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE CHIA
(*Salvia hispanica* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

FORTALEZA

2021

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)

- S713p Souza, Adson Ávila de.
Purificação, caracterização bioquímica e potencial antibacteriano de um inibidor de tripsina de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) / Adson Ávila de Souza. – 2021.
101 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. Proteína bioativa de planta. 2. Inibidor de protease. 3. MRSA. 4. Sinergismo. I. Título.

CDD 572

ADSON ÁVILA DE SOUZA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E POTENCIAL
ANTIBACTERIANO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE CHIA
(*Salvia hispanica* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 29/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof.^a Dra. Ana Heloneida de Araújo Morais
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Dra. Raquel de Oliveira Rocha
University of Georgia

Prof.^a Dra. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico a Deus e a minha família,
meus alicerces.

AGRADECIMENTOS

Gratidão, palavra de origem latina *gratus* que pode ser traduzida como estar agradecido ou ser grato. Costumo dizer que este é um sentimento nobre que faço questão de sentir e, sobretudo, demonstrar. Ao longo de minha jornada, diversos foram os desafios que enfrentei, maior ainda foi o apoio que recebi. Deixo registrado meu reconhecimento a todos os envolvidos que direta ou indiretamente me permitiram construir essa história até aqui.

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** pela vida. Por ser luz e proteção em meus caminhos. Sem a sua permissão, nenhuma graça que alcancei seria possível.

Aos meus pais, **José e Alândia**, que pelo fruto do seu amor e a permissão divina me trouxeram ao mundo. Sou grato por nunca terem poupado esforços para que não me faltasse nada. Obrigado pelo afeto, por cada conselho e ensinamento, e até mesmo pelos “puxões” de orelha que foram cruciais para que eu me tornasse o homem que hoje sou. Agradeço ainda a meus irmãos, **Alinson e Anderson**, por juntos formarem minha base familiar, e serem sempre a minha fortaleza, onde posso habitar em paz.

Também agradeço a todos da minha **família**, em especial a minhas avós **Nely e Guiomar**, pelos almoços de domingo, com a casa sempre cheia. Sou uma pessoa verdadeiramente amada e feliz por terem vocês em minha vida.

Aos amigos de escola, em especial ao **Alan, Filipe (*in memoriam*) e Mário Jr.**, por cada palavra de incentivo, e pelos momentos de descontração que me renderam (e rendem) grandes lembranças em minha vida. Agradeço ainda aos meus **professores do período escolar** por compartilharem comigo seus conhecimentos, e em especial aos **professores de Biologia**, que despertaram em mim a paixão por essa disciplina.

Ao meu amor, **Andreza**, por diariamente alegrar a minha vida. Por sempre me encorajar a seguir em frente diante de cada novo desafio. Obrigado por toda sua paciência e companheirismo ao longo dessa jornada, e por todo o amor que dedica a mim.

Agradeço à **Universidade Estadual do Ceará (UECE)**, onde iniciei minha jornada acadêmica no campo da Biologia. Aos amigos de graduação, em particular a **Cíntia, Fátima, Ingrid, Jordana e Mayara**, pelo companheirismo e entusiasmo compartilhado ao longo desses anos. Sou grato também aos meus **professores de**

Graduação, que foram fundamentais para a minha formação profissional, em especial a **prof.^a Maria Dra. Erivalda Farias de Aragão**, ao **prof. Dr. Luis Flávio Mendes Saraiva** e a **prof.^a Dra. Maria de Lourdes Oliveira Otoch**, que me encorajaram a trilhar os caminhos no incrível campo da Bioquímica.

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, por me acolher como estudante de Mestrado e Doutorado, e mais recentemente, como servidor técnico. Sou grato a todos do **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**, pelo comprometimento na formação de recursos humanos, e ao **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos** por viabilizar a infraestrutura necessária para a condução dos experimentos desta tese.

Nessa trajetória como pós-graduando construí grandes amigos e parcerias aos quais sou profundamente grato. Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Química Medicinal, em especial a **Adriane, Andréa, Cristiane, Rodolpho e Vilmara**, pelo auxílio em meus experimentos, pelos cafezinhos das tardes e pelas conversas descontraídas que sempre revigoravam as energias nos dias de desânimos.

Agradeço aos **membros do Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA)** e **Laboratório de Manejo de Ácaros e Insetos (LAMAI)**, em especial aos respectivos coordenadores, **prof. Dr. Patrik Luiz Pastori** e **prof. Dr. José Wagner da Silva Melo**, por toda a compreensão e paciência durante essa minha jornada dupla como estudante de Doutorado e servidor técnico.

Ao **prof. Dr. Celso Shiniti Nagano** do Departamento de Engenharia de Pesca (UFC) pela parceria nas análises por Espectrometria de Massas.

Agradeço ao **prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior**, à **prof.^a Dra. Cecília Rocha da Silva**, e aos demais membros do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), em especial à **Dra. Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá**, pela parceria nos ensaios de atividade antimicrobiana com bactérias.

À **prof.^a Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa**, e aos membros do Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX), particularmente ao **Lucas, Nadine e Larissa**, pela assistência no estudo do modo de ação da atividade antibacteriana conduzida neste estudo.

Agradeço ainda aos membros da minha banca examinadora, **prof.^a Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira**, **prof.^a Dra. Ana Heloneida de Araújo Morais**, **prof.^a Dra. Raquel de Oliveira Rocha** e **prof.^a Dra. Denise Cavalcante**

Hissa, por dedicarem o seu tempo a leitura deste trabalho, e pelas valiosas contribuições que agregaram ainda mais qualidade a presente tese.

Finalmente, sou extremamente grato ao **meu orientador prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira**, em primeiro lugar, por prontamente me acolher em seu laboratório lá atrás em 2013, como estudante de Mestrado. Por diariamente contribuir para a minha formação, não só como profissional, mas também como ser humano. De fato, você foi e sempre será meu “pai científico”. Muito obrigado por todo o seu profissionalismo, seu comprometimento com a pesquisa e seu rigor científico, e por todas as lições pedagógicas que me ensinou. Saiba que o senhor é um exímio professor, e um ser humano incrível, ao qual eu serei eternamente grato.

Os trabalhos experimentais que compõem esta tese foram realizados ainda com o apoio dos seguintes Programas/Instituições aos quais também sou grato: **Universidade Federal do Ceará (UFC)** por meio das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas no Laboratório de Química Medicinal, sob a coordenação do prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira; em parceria com o Departamento de Engenharia de Pesca, junto ao prof. Dr. Celso Shiniti Nagano; ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), sob coordenação prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior e a prof.^a Dra. Cecília Rocha da Silva; e ao Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX), sob a coordenação da prof.^a Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa. **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** por meio de concessão da bolsa de doutorado e de fomento à pesquisa. **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)** por meio do apoio financeiro necessários na melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC. O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** – código de financiamento 001.

RESUMO

A crise de resistência aos antibióticos provocada pelo surgimento crescente de bactérias multirresistentes tem gerado profundos impactos globais. A presença de cepas resistentes em ambiente hospitalar tem aumentado os custos com assistência médica, bem como as chances de falhas no tratamento, levando a complicações clínicas ou mortalidade. Assim, é imperativa a busca por terapias alternativas aos antibióticos que estão se tornando ineficazes. Os inibidores de protease de plantas (IPPs) aparecem como moléculas promissoras com atividade antimicrobiana, que têm sido considerados excelentes candidatos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Este trabalho teve como objetivo purificar, investigar aspectos bioquímicos e avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de um inibidor de tripsina de sementes de chia (*ShTI*, do inglês *Salvia hispanica* L. Trypsin Inhibitor). *ShTI* foi purificado a partir de sementes de chia por meio de tratamento térmico do extrato bruto, seguido de cromatografia de afinidade e fase reversa. Análise eletroforética em condições não redutoras (Tricina-SDS-PAGE 15%) de *ShTI* revelou uma única banda glicoproteica de massa aparente de ~11 kDa, que foi confirmada em análise por espectrometria de massa (11,558 kDa). *ShTI* foi notavelmente estável sob temperaturas extremas (100 °C; 120 min.), mantendo 100% de sua atividade inibitória de tripsina. Além disso, o inibidor purificado foi estável em uma ampla faixa de pH (2-10), retendo 80-100% da atividade inibitória em pH ácidos e básicos. Após exposição ao agente redutor DTT (0,1 M; 120 min.), a atividade antitriptica de *ShTI* foi parcialmente perdida (~38%), indicando a participação de pontes dissulfeto em sua estrutura nativa. Estudos cinéticos mostraram que *ShTI* é um inibidor competitivo ($K_i = 1,79 \times 10^{-8}$ M; $CI_{50} = 1,74 \times 10^{-8}$ M) com razão estequiométrica 1:1 para o complexo *ShTI*:tripsina. Ensaio de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* demonstraram que *ShTI* exibiu atividade antibacteriana contra todas as três cepas de *Staphylococcus aureus* testadas (*S. aureus* ATCC® 6538P, *S. aureus* resistente à meticilina ATCC® 4996 e um isolado clínico - MRSA), apresentando concentrações inibitórias mínimas (CIMs) variando de 15,83 a 19,03 µM. Nenhum efeito significativo foi observado contra as bactérias Gram-negativas testadas (*Escherichia coli* ATCC® 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027). *ShTI* também exibiu efeito sinérgico no cotratamento com oxacilina com Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) variando de 0,20 a 0,33 contra as cepas de *S. aureus* ATCC® 6538P e *S. aureus* resistente à meticilina

ATCC® 4996. Análises por microscopia de fluorescência e eletrônica de varredura revelaram que *ShTI* ocasionou aumento da permeabilidade celular, com a formação de poros na membrana plasmática, e indução de superprodução de espécies reativas de oxigênio em *S. aureus*. Portanto, *ShTI* representa um novo candidato a ser explorado como agente terapêutico para o manejo bacteriano de infecções por *S. aureus*.

Palavras-chave: proteína bioativa de planta; inibidor de protease; MRSA; sinergismo.

ABSTRACT

The burgeoning emergence of multiresistant bacteria has generated the so-called antibiotic resistance crisis with profound global impacts. The presence of resistant strains in the hospital environment has raised healthcare costs and the chances of treatment failures, leading to clinical complications or mortality. Thus, it is imperative to search for alternative therapies to antibiotics that are becoming obsolete. Plant protease inhibitors (PPIs) appear as promising molecules with antimicrobial activity, considered excellent candidates for novel therapeutic agents' development. This work aimed to purify, biochemically characterize and evaluate the antibacterial activity *in vitro* of a trypsin inhibitor from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. The trypsin inhibitor, named *ShTI*, was purified from chia seeds through crude extract heat treatment, affinity and reversed-phase chromatographies. Tricine-SDS-PAGE analysis of *ShTI* revealed a single glycoprotein band of ~11 kDa under non-reducing conditions, confirmed by mass spectrometry analysis (11.558 kDa). *ShTI* was remarkably stable under high-temperature incubation (100 °C; 120 min.), maintaining 100% of its trypsin inhibitory activity. Moreover, the purified trypsin inhibitor was stable at a broad pH range (2 -10), retaining 80 – 100% of inhibitory activity in acidic and basic pHs. Upon exposure to DTT (0.1 M; 120 min.), *ShTI* antitrypsin activity was partially lost (~38%), indicating the participation of disulfide bridges in the protein native structure. Kinetic studies showed that *ShTI* is a competitive inhibitor ($K_i = 1.79 \times 10^{-8}$ M; $IC_{50} = 1.74 \times 10^{-8}$ M) that forms a 1:1 stoichiometry ratio for the *ShTI*:trypsin complex. *In vitro* antimicrobial susceptibility, assays demonstrated *ShTI* antibacterial activity against all three *Staphylococcus aureus* strains tested (*S. aureus* ATCC® 6538P, Methicillin-resistant *S. aureus* ATCC® 4996, and a clinical strain of MRSA), showing MIC ranging from 15.83 to 19.03 µM. No significant effect was observed toward the Gram-negative bacteria tested (*Escherichia coli* ATCC® 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027). *ShTI* also displayed antibacterial activity in drug combination therapy with oxacillin Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) ranges from 0.20 to 0.33 showing synergistic effects against *S. aureus* ATCC® 6538P and MRSA ATCC® 4996. Fluorescence and scanning electron microscopy analysis revealed that *ShTI* increased cell permeability, leading to plasma membrane pore formation and inducing overproduction of reactive oxygen species in *S. aureus*. Therefore, *ShTI* represents a

novel candidate to be used as a therapeutic agent for bacterial management of *S. aureus* infections.

Keywords: plant bioactive protein; protease inhibitor; MRSA; synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo resumando a introdução das classes de antibióticos para o uso clínico, e os eventos de resistência antimicrobiana.....	21
Figura 2 – Representação esquemática enfatizando os principais efeitos farmacológicos dos inibidores de protease de plantas (IPPs).....	32
Figura 3 – Aspectos botânicos de <i>Salvia hispanica</i> L.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de inibidores de proteases de plantas.....	34
Tabela 2 – Estudos clínicos do valor terapêutico das sementes de chia.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AMP	Peptídeos antimicrobianos (do inglês, Antimicrobial Peptides)
AMR	Resistência Antimicrobiana (do inglês, Antimicrobial Resistance)
ATCC	American Type Culture Collection
BApNA	N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida
BHI	Infusão de Cérebro e Coração (do inglês, Brain Heart Infusion)
BSA	Albumina Sérica Bovina (do inglês, Bovine Serum Albumin)
CFU	Unidades Formadoras de Colônia (do inglês, Colony Forming Units)
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DCFH-DA	2,7-diacetato de diclorofluoresceína (do inglês, 2'-7'dichlorofluorescein diacetate)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (do inglês, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” (do inglês, Electrospray Ionization-Mass Spectrometry)
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada (do inglês, Fractional Inhibitory Concentration Index)
IC50	Concentração inibitória de 50% (do inglês, Inhibitory Concentration 50%)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (do inglês, Meticillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
MTCC	Microbial Type Culture Collection
OD	Densidade Óptica (do inglês, Optical Density)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês, Polyacrylamide gel electrophoresis)
PAS	Ácido periódico de Schiff (do inglês, periodic acid-Schiff)
PPIs	Inibidores de Protease de Plantas (do inglês, Plant Protease Inhibitors)
ROS	Espécies reativas do oxigênio (do inglês, Reactive Oxygen Species)

RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa (do inglês, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura (do inglês, Scanning Electron Microscopy)
ShTI	Inibidor de tripsina de <i>Salvia hispanica</i> L. (do inglês, <i>Salvia hispanica</i> L. trypsin inhibitor)
TEMED	N, N, N',N' - Tetrametiletilenodiamina
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, Tumor Necrosis Factor)
VRE	Enterococcus resistente à vancomicina (do inglês, Vancomycin Resistant Enterococci)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina (do inglês, Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês, World Health Organization)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Antibióticos e a resistência bacteriana	18
2.2	A busca por novos antibióticos: peptídeos/proteínas vegetais como fontes alternativas	24
2.3	Características bioquímicas e aplicações biotecnológicas dos inibidores de proteases de plantas	27
2.4	<i>Salvia hispanica</i> L: descrição de características botânicas, e potencial nutracêutico e farmacológico na saúde humana	36
3	HIPÓTESE	45
4	OBJETIVOS	46
4.1	Objetivo Geral	46
4.2	Objetivos Específicos	46
5	ARTIGO DA TESE	47
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A – FIGURAS PRESENTES NO ARTIGO DA TESE	100
	APÊNDICE B – TABELAS PRESENTES NO ARTIGO DA TESE	101

1 INTRODUÇÃO

Desde a metade do século passado, os antimicrobianos têm contribuído substancialmente para o sucesso da terapia dos cuidados com a saúde humana, representando um dos pilares da medicina moderna (DADGOSTAR, 2019). De fato, a maioria das classes de antibióticos utilizadas até hoje é proveniente das décadas de 1940 – 1960. Devido a velocidade na descoberta dos antibióticos nesse período, acreditava-se que brevemente as doenças infecciosas se tornariam um problema de saúde pública controlado (CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019). No entanto, o cenário que se tem observado é bastante diferente.

O uso de maneira incorreta de antibióticos ao longo do tempo tem culminado com o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (BOTTERY; PITCHFORD; FRIMAN, 2021). Essa situação está atrelada ao surgimento de cepas de microrganismos modificadas resistentes a antibióticos, reduzindo a eficácia da terapia aplicada aos pacientes. Como resultado, uma maior morbidade e mortalidade, ou complicações clínicas são observadas em setores de assistência médica. Essa ameaça tem atingido níveis críticos no século XXI, com profundos impactos globais. Atualmente, cerca de 700.000 pacientes morrem anualmente em todo mundo, vítimas da resistência antimicrobiana. Estimativas para 2050 apontam cerca de 10 milhões de mortes, caso nenhuma intervenção efetiva contra a resistência antimicrobiana seja adotada. Segundo projeções, essa problemática poderá implicar em \$300 bilhões a mais de \$1 trilhão em gastos por ano até 2050 em todo o mundo (ABUSHAHEEN et. al., 2020; DADGOSTAR, 2019). Assim, é imperativa a luta contra a resistência antimicrobiana, e a descoberta de novos antibióticos cada vez mais crítica.

No início de 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma lista de prioridade global de patógenos que incluía bactérias resistentes a antibióticos. Doze patógenos foram ranqueados em 3 categorias: crítico, alto e médio. *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (crítico), Enterobacteriaceae resistente aos carbapenêmicos e a cefalosporina de 3ª geração (crítico) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (alto) foram alguns dos patógenos incluídos na lista. Esse documento tinha como objetivo guiar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

Diante desse cenário desafiador, uma gama de estudos destinados à obtenção de novos compostos antibacterianos tem sido contínua, sendo desenvolvidas em ambientes acadêmicos e principalmente em empresas de biotecnologia. Nesse contexto, inúmeras abordagens têm sido empregadas, desde métodos clássicos que envolvem a prospecção de agentes antimicrobianos produzidos por microrganismos e modificação química de drogas já conhecidas, mas também de moléculas potencializadoras de antibióticos da prática clínica, e àquelas capazes de inibir a virulência bacteriana (MOELLERING, 2011). Estas abordagens incluem também investigações de compostos com atividade antimicrobiana em fontes alternativas: secreções animais, tais como venenos de aranhas, escorpiões, sapos e cobras; bem como de fontes vegetais (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ et al., 2021; CHANDRA et al., 2017; YACOUB et al., 2020).

Nos últimos anos, o rastreo e isolamento de peptídeos/proteínas de plantas com atividade antimicrobiana tem sido explorado como ferramenta biotecnológica na procura de novos antibióticos. Essas moléculas têm sido obtidas a partir dos diversos tecidos vegetais, como raízes, caules, bulbos, folhas, frutos, flores e sementes. Destas, as sementes têm recebido destaque devido ao seu maior teor de proteínas quando comparada às outras partes da planta (ALMEIDA et al., 2014). Inibidores de proteases de plantas (IPPs) representam 1-10% do conteúdo total de proteínas solúveis presentes nas sementes, cujo potencial antimicrobiano tem sido amplamente descrito (CLEMENTE et al., 2019; HELLINGER; GRUBER, 2019).

Sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) têm se mostrado uma promissora fonte de inibidores de proteases, cuja atividade antitriptica foi detectada em diferentes frações proteicas obtidas por precipitação com sulfato de amônio, sendo inclusive reportado o isolamento de um inibidor de tripsina por Souza et al. (2017). No entanto, até o momento, parâmetros bioquímicos e propriedades bioativas dos inibidores detectados nas sementes de chia não foram bem investigados. Portanto, este trabalho reporta a purificação e caracterização bioquímica de um inibidor de tripsina a partir das sementes de chia, bem como apresenta seu potencial antibacteriano *in vitro* sobre bactérias de interesse clínico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Antibióticos e a resistência bacteriana

É inegável os benefícios dos antibióticos na saúde humana ao longo da história das civilizações. Inclusive, historicamente o uso de microrganismos produtores de antibióticos são datados mesmo antes do advento da medicina moderna. A exemplo, o uso de fungos filamentosos crescidos em pães no tratamento de feridas e queimaduras tem sido descrito a mais de 2000 anos nas sociedades da Sérvia, China, Grécia e Egito (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). O uso de pão mofado e de solo medicinal é apontado ainda como medicamentos no papiro de Éber (1.500 a.C.), um dos mais antigos documentos médicos preservados que se tem registro (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Mesmo antibióticos modernos remontam os tempos antigos, como é o caso da tetraciclina, cujos traços já foram encontrados em restos de esqueletos humanos que datam de 350-550 d.C. na antiga Núbia Sudanesa (AMINOV, 2010; BARREIRO, BARREDO, 2021).

Séculos mais tarde, com o advento do microscópio por Antonie van Leeuwenhoek (1632–1723) em 1676, foi possível estudos iniciais da bacteriologia e o reconhecimento de pequenas criaturas ou “animalículos”. Do final do século XVIII, a associação de bactérias como agentes causais de doenças foi estabelecida por Robert Koch (1843–1910) e Louis Pasteur (1822–1895) (GOULD, 2016). Além disso, Louis Pasteur observou que alguns microrganismos eram capazes de matar outros por meio de secreções. Ele propôs isso, após notar a inibição do crescimento da bactéria *Bacillus anthracis* de amostras de urina, quando co-cultivada com outras bactérias aeróbias “comuns” (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019). Em 1889, o termo “antibiose” foi designado pela primeira vez como antônimo de simbiose por Jean Paul Vuillemin, para abordar a relação biológica na qual “um organismo vivo mata outro para garantir sua própria existência”. A origem do termo antibiótico advém desse período. Apesar das descobertas das interações antagônicas entre os microrganismos, a purificação de uma molécula dotada de atividade antimicrobiana não havia sido elucidada (NICOLAOU; RIGOL, 2018; STACHELEK et al., 2021).

Esse cenário mudou na primeira metade do século XX, com os estudos de Paul Ehrlich e Alexander Fleming, cujos nomes são usualmente associados com o início da “era dos antibióticos” modernos (AMINOV, 2010). Em 1906, Ehrlich e seu grupo de pesquisa sintetizaram e testaram, de forma sistemática, uma miríade de compostos, incluindo centenas de derivados do ácido arsênico. Essa triagem levou a descoberta do composto 606, diamino diidroxí arsenobenzol (asfenamina), que se mostrou eficaz no tratamento de *Treponema pallidum*, agente causal da sífilis. Em 1910, essa droga foi aprovada e comercializada com o nome de Salvarsan®. Posteriormente, novas versões (Neosalvarsan® e Solu-Salvarsan®) mais solúveis e menos tóxicas foram introduzidas no mercado. Juntas, Salvarsan® e seus derivados foram as drogas mais prescritas durante um longo período, sendo substituídas após a introdução da penicilina na década de 1940 (AMINOV, 2010; DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; NICOLAOU; RIGOL, 2018).

A descoberta da penicilina teve origem com o esquecimento acidental de colônias de *Staphylococcus aureus* por Alexander Fleming, em 1928. Ao retornar de viagem, Fleming observou a inibição do crescimento de estafilococos em torno de colônias de mofo em placas de Petri (posteriormente identificado como *Penicillium notatum*). Fleming obteve um extrato a partir de culturas puras do fungo, capaz de inibir várias bactérias patogênicas, principalmente Gram-positivas. Em março de 1929, Fleming nomeou a substância como penicilina. Apesar da descoberta promissora, dificuldades na purificação e no escalonamento em larga escala da substância, fez com que Fleming abandonasse o projeto. Apenas em 1940, Howard Florey e Ernst Chain realizaram melhorias no ramo de bioprocessos permitindo a produção em escala industrial da penicilina. Primariamente, essa droga foi utilizada por forças militares durante a II Guerra Mundial, tornando-se de uso público em 1945, salvando milhões de vidas em todo o mundo (AMINOV, 2010; BARREIRO; BARREDO, 2021; DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019; NICOLAOU; RIGOL, 2018; CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019).

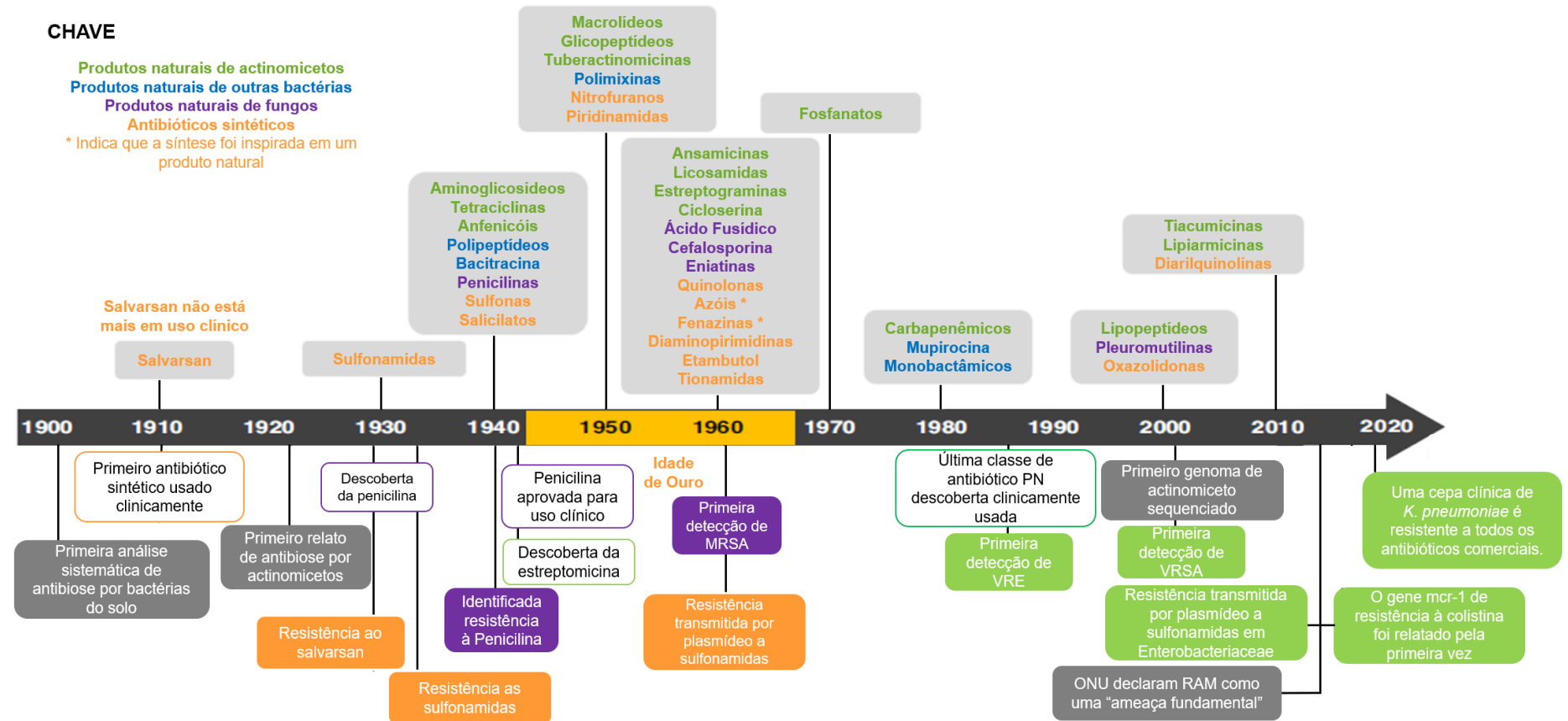
O interesse em estudo de compostos antimicrobianos produzidos por microrganismos, levou Selman Waksman ainda no final da década de 1930, a realizar uma pesquisa sistemática com bactérias do solo, principalmente do gênero *Streptomyces*. Os estudos de Waksman conduziram à obtenção de uma miríade de antibióticos e antifúngicos, tais como: actinomicina, estreptomicina, neomicina,

fumigacina e clavacina (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). A indústria farmacêutica, encorajada pelos trabalhos de Waksman, descobriu uma série de compostos de fontes naturais e derivados sintéticos de várias classes de antibióticos, entre as décadas de 1940 e 1960, período este conhecido como a “Era de Ouro dos Antibióticos” (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019). Entre essas classes, podemos citar: aminoglicosídeos, anfenicóis, ansamicinas, beta-lactâmicos, lipopeptídeos, diaminopirimidinas, fosfomicinas, imidazóis, macrolídeos, oxazolidinonas, estreptograminas, polimixinas, sulfonamidas, glicopeptídeos, quinolonas e tetraciclina (CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019).

Nos anos seguintes a esse promissor período até os dias de hoje, o que se tem observado é um declínio na introdução de novos antibióticos no mercado. Dificuldades em descobrir novos antibióticos com diferentes mecanismos de ação àqueles já existentes, menor retorno financeiro quando comparado ao tratamento de outras doenças crônicas e requerimentos regulatórios mais rígidos estão entre os principais fatores responsáveis por este declínio. Das 20 empresas farmacêuticas que investiram na descoberta de antibióticos na década de 1980, restavam apenas cinco até 2015. Nas últimas décadas, apenas drogas como linezolida (2000) e daptomicina (2003) foram introduzidas no mercado, embora já tivessem sido descobertas em 1955 e 1986, respectivamente. A figura 1 apresenta uma linha do tempo resumindo a introdução das classes de antibióticos para o uso clínico (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019; FAIR; TOR, 2014; FERNANDES, 2015; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

As diferentes classes de antibióticos podem ser categorizadas, quanto ao seu mecanismo de ação, de acordo com a função bacteriana a qual são capazes de atuar: A) inibidores da síntese de parede celular; B) inibidores da função ribossomal (síntese proteica); C) inibidores da síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA); D) inibidores do metabolismo do ácido fólico; E) inibidores da integridade da membrana celular. Uma visão mais detalhada de cada um dos mecanismos de ação pode ser encontrada na literatura (ADEFEGHA, 2019; KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010; STACHELEK et al., 2021).

Figura 1 - Linha do tempo resumando a introdução das classes de antibióticos para o uso clínico, e os eventos de resistência antimicrobiana.



Fonte: Adaptado de HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; BROWNE et al., 2020.

Os antibióticos são coloridos de acordo com sua origem: verde = actinomicetos, azul = outras bactérias, roxo = fungo e laranja = sintético. Na parte inferior da linha do tempo estão as datas principais relacionadas à descoberta de antibióticos e à resistência antimicrobiana, incluindo os primeiros relatos de cepas resistentes como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), enterococos resistentes à vancomicina (VRE), *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) e resistência à colistina transmitida por plasmídeo em Enterobacteriaceae. PN (produto natural), ONU (Organização das Nações Unidas) e RAM (resistência antimicrobiana).

Como pode ser observado (figura 1), a história do surgimento dos primeiros casos de resistência microbiana é paralela ao desenvolvimento dos primeiros antibióticos. Essa ameaça se estende até os dias de hoje. Entende-se por resistência microbiana a habilidade por parte de uma cepa em sobreviver e se manter viável diante dos efeitos antagônicos de um agente antimicrobiano, sendo capaz de se adaptar e crescer na presença de medicamentos, mesmo em elevadas doses (ABUSHAHEEN et. al., 2020; CESUR; DEMIRÖZ, 2013; DADGOSTAR, 2019). Entre as principais causas envolvidas na resistência microbiana estão a prescrição excessiva de antibióticos, o uso inadequado por parte de pacientes, aumento de viagens internacionais, comercialização não autorizada de antibióticos, má higiene/saneamento, limitações de diagnóstico, e o uso excessivo de antibióticos em animais (ASLAM et al, 2018; AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017; MATAMOROS-RECIO et al., 2021).

A resistência a antibióticos pode ser categorizada principalmente em resistência natural (ou intrínseca), resistência adquirida (ou extrínseca), resistência cruzada, e a resistência a múltiplas drogas. A resistência natural está associada às características biológicas inatas do microrganismo, que não tem relação direta de seu desenvolvimento associada ao uso de um antibiótico, mas que inviabilizam a ação do agente antimicrobiano. A exemplo, podemos apontar microrganismos que não possuem uma estrutura alvo de um antibiótico, ou o mesmo não alcança o seu alvo (bactérias Gram-negativas são naturalmente resistentes à vancomicina, pois a membrana externa impede sua entrada na célula). A resistência adquirida está atrelada a modificações em características genéticas do microrganismo e que confere insensibilidade a um antibiótico ao qual antes era responsivo. Envolve principalmente mutações no DNA cromossômico ou a aquisição de DNA extra cromossômico (plasmídeos, transposon). A resistência cruzada resulta da adaptação de um microrganismo a um antibiótico, que pode levar a diminuição de sua sensibilidade a outro antibiótico. Se uma cepa bacteriana desenvolve mecanismos que permite sua resistência a três ou mais classes de antibióticos, é considerada resistência a múltiplas drogas (CESUR; DEMIRÖZ, 2013; MANAGE; LIYANAGE, 2019).

Os principais mecanismos relacionados à resistência bacteriana envolvem: o emprego de enzimas que degradam ou inativam antibióticos (ex.: clivagem de penicilina e cefalosporina por β -lactamases e a fosforilação que ocorrem em macrolídeos, respectivamente); a modificação de alvos à agentes antibacterianos (ex.:

mutações em região determinante de resistência à quinolona na DNA girase de bactérias Gram-positivas e negativas que conferem resistência a fluoroquinolona); a redução do acúmulo intracelular de antibióticos, por meio de ativação de bombas de efluxo (existem 5 famílias principais de bombas de efluxo; AcrAB-TolC em Enterobacteriaceae e MexAB-OprM em *P. aeruginosa* - ambas pertencentes à família de resistência-nodulação-divisão celular (RND) - são capazes de extrudir tetraciclinas) e diminuição da permeabilidade (ex.: mutação no gene oprD em *P. aeruginosa* produz poros modificados reduzindo o influxo de imipenem); o uso de vias metabólicas alternativas (bactérias podem adquirir ácido fólico já pronto do ambiente circundante em vez de sintetizá-lo, conferindo resistência a sulfonamidas e trimetoprima) (ABUSHAHEEN et al., 2020; CESUR; DEMIRÖZ, 2013; GAJDÁCS et al., 2021; MATAMOROS-RECIO et al., 2021; MUNITA, ARIAS, 2016).

Em adição, bactérias podem se organizar em comunidades microbianas capazes de ampliar a resistência desses microrganismos quando comparados às suas formas planctônicas. Biofilmes, como são denominadas, compreendem populações bacterianas aglomeradas (2-5% células microbianas) que secretam uma matriz circundante constituída de polímeros de exopolissacarídeos (1-2%), DNA e RNA extracelular (< 1-2%), proteínas, incluindo enzimas (< 1-2%) e água (até 97%). Esses biofilmes conferem proteção em ambientes hostis (de alterados pH e osmolaridade, nutrientes escassos, sob forças mecânicas e de cisalhamento), bem como à antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro (por dificultar o acesso as células bacterianas) (BANERJEE et. al., 2019; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019).

No ambiente clínico, biofilmes têm sido encontrado em superfícies de dispositivos médicos e em tecidos de pacientes, sendo responsável por infecções persistentes. Com relação a infecções em utensílios médicos, estimativas apontam sua presença em 2% de próteses articulares, 2% em implantes mamários, 4% em válvulas cardíacas mecânicas, 10% em dispositivos de derivação ventricular, 4% em marcapassos e desfibriladores, e cerca de 40% em dispositivos de assistência ventricular (JAMAL et. al., 2018). Ademais, bactérias formadoras de biofilme têm sido associadas a infecções e doenças potencialmente fatais em humanos, como fibrose cística, otite média, periodontite, endocardite infecciosa, feridas crônicas e osteomielite (MUHAMMAD et. al., 2020). Estima-se que os biofilmes estejam envolvidos em cerca de 80% de todas as infecções microbianas que acometem o ser humano (VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019).

Biofilmes bacterianos conferem maior resistência aos antibióticos, sendo capazes de suportar concentrações 10-1000 vezes mais elevadas se comparadas às células planctônicas (VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019). Essa propriedade tem refletido no aumento dos custos e na dificuldade do tratamento, conduzindo a uma maior incidência de morbidade e mortalidade entre os pacientes. Anualmente, os custos relacionados ao tratamento de infecções envolvendo biofilmes correspondem a 1 bilhão de dólares (SATPATHY *et al.*, 2016).

Diante desse cenário desafiador, os antimicrobianos à base de plantas têm emergido como fonte potencial para combater bactérias, fungos, protozoários e doenças virais, bem como suplantar os eventos de resistência microbiana. Esses compostos compreendem moléculas do metabolismo primário e secundário que incluem: quininas, alcalóides, flavonas, flavonóides, flavonóis, cumarina, terpenóides, óleos essenciais e taninos (metabolismo secundário) e peptídeos/proteínas (metabolismo primário) (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; CHANDRA *et al.*, 2017). O presente trabalho enfoca em peptídeos/proteínas vegetais como estratégia alternativa na busca por novos antibióticos.

2.2 A busca por novos antibióticos: peptídeos/proteínas vegetais como fontes alternativas

Conforme descrito anteriormente, nos últimos anos houve uma limitada inserção de novos antibióticos no mercado. Destes casos, telitromicina (derivado da classe dos macrolídeos), temafloxacina e trovofloxacina (derivados das quinolonas) aprovadas no final dos anos 1990 e no início dos anos 2000, demonstraram eventos adversos graves culminando com a descontinuação da comercialização dos produtos (FERNANDES; MARTENS, 2017). De fato, muitos antibióticos convencionais têm sido associados a efeitos adversos, como por exemplo, casos de nefrotoxicidade decorrentes de administração de gentamicina e hepatotoxicidade em pacientes tratados com oxacilina (NIZAR *et al.*, 2002; WARGO; EDWARDS, 2014). Tal agravante tem direcionado a estratégias alternativas no tratamento de doenças bacterianas (ex.: cotratamento com drogas na busca por efeitos sinérgicos), bem como reiterado a busca por novas moléculas com potencial antibacteriano e reduzidos efeitos adversos.

Estimativas da Organização Mundial de Saúde apontam que cerca de 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional, baseada no uso de plantas e seus subprodutos, no tratamento de cuidados primários de saúde, incluindo as doenças infecciosas (SIDDIQUI *et al.*, 2014). Não há dúvidas de que a utilização de produtos naturais fornece um banco amplo de moléculas bioativas na busca por novos fármacos, com grande variedade de moléculas provenientes do metabolismo primário e secundário. Diante deste fato, pesquisadores em todo mundo têm direcionado a atenção na busca por compostos derivados de plantas com propriedades antimicrobianas (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; CHANDRA *et al.*, 2017). Esses estudos tem reportado amplamente o isolamento e caracterização de diversas classes de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês “Antimicrobial Peptides”), bem como de proteínas de reserva vegetal, apontando-os como novas estratégias biotecnológicas na busca por antibióticos (ALMEIDA *et al.*, 2014; CÂNDIDO *et al.*, 2011; NAWROT *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2021).

Os AMPs são moléculas de baixo peso molecular (15 a 100 resíduos de aminoácidos), que comumente possuem natureza catiônica e estrutura compacta, estabilizada por pontes dissulfeto (alto conteúdo de cisteínas). Essa estrutura compacta e rígida confere estabilidade térmica, química e à proteólise, permitindo a manutenção de sua atividade biológica mesmo em ambientes adversos, como pela passagem no trato gastrointestinal. De acordo com sua homologia na estrutura primária, o padrão das pontes dissulfetos e no arcabouço da estrutura tridimensional, os AMPs são categorizados em nove classes: tioninas, defensinas, seferdinas, ciclotídeos, esnaquinas, heveinas, knotinas, lb-AMPs e proteínas transferidoras de lipídeos (CAMPOS *et al.*, 2018; CÂNDIDO *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2021).

Do ponto de vista da atividade antimicrobiana, embora a maioria dos relatos demonstrem os efeitos dos AMPs sobre espécies de interesse agrônômico, investigações direcionadas ao potencial sobre bactérias Gram-positivas e negativas de importância clínica também têm sido descritas (NAWROT *et al.*, 2014). A exemplo, *McLTP₁*, uma proteína transferidora de lipídeos de sementes de *Morinda citrifolia* L., foi capaz de inibir o crescimento de formas planctônicas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, bem como de interferir na formação de biofilme de ambas as espécies estudadas. *McLTP₁* não apresentou efeito sobre as bactérias Gram-negativas testadas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*). Contrariamente, J1-1, uma defensina isolada do pimentão (*Capsicum annuum*), exibiu

atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* (CIM de 250 µg/mL), mas não apresentou efeito antibacteriano contra *S. aureus*. (GUILLÉN-CHABLE et al., 2017; SOUZA et al., 2018)

Essa propriedade antimicrobiana é comumente atribuída ao caráter catiônico da maioria dos AMPs (devido ao elevado teor de resíduos de aminoácidos carregados positivamente – arginina e lisina) que permitem a interação com a parede celular e membranas negativas dos microrganismos. Como resultado dessa interação, é observado o aumento da permeabilidade nas bactérias, extravasamento do conteúdo celular, seguido de morte celular (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010; CHANDRA et al., 2017). Ademais, alvos intracelulares também têm sido atribuídos aos AMPs, como síntese de DNA/RNA e proteínas, enovelamento de proteínas, atividade enzimática e/ou síntese da parede celular. Há relatos na literatura de forma mais detalhada do mecanismo de ação dos AMPs (MAHLAPUU et al., 2016; SAMRITI, BISWAS, BISWAS, 2018; SHWAIKI; LYNCH; ARENDT, 2021).

Os AMPs têm despertado o interesse principalmente devido ao amplo espectro de ação e potência, seletividade eficaz, ampla gama de alvos, toxicidade potencialmente baixa, baixo acúmulo nos tecidos, fácil absorção e possibilidade de administração por rotas diversas (AFROZ et al., 2020; YILI et al., 2014). Além disso, os AMPs têm demonstrado não somente um efeito antimicrobiano direto, como também têm apresentado atividade imunomodulatória. Outro fator de destaque, é que geralmente atribuem-se aos AMPs menores chances de desenvolvimento de resistência bacteriana se comparados aos antibióticos convencionais, uma vez que eles apresentam múltiplos alvos o que dificulta a defesa bacteriana mediante um único mecanismo de resistência. No caso particular da membrana bacteriana, alvo principal dos AMPs, seria difícil evitar sua ação disruptiva formadora de poros, e ao mesmo tempo preservar suas propriedades estruturais e funcionais. Portanto, esses aspectos reforçam o potencial dos AMPs como candidatos a drogas (LEI et al., 2019; MAHLAPUU et al., 2016).

No contexto das proteínas de armazenamento de plantas; sementes, nozes, cereais, grãos, leguminosas, parênquima de haste das árvores, e algumas raízes e tubérculos configuram-se como ricas fontes de diversas classes de proteínas com atividades antimicrobianas. Por exemplo, essa propriedade foi relatada para representantes das classes de inibidores de proteases, albuminas 2S, lectinas, vicilinas e proteínas ricas em glicina (CÂNDIDO *et al.*, 2011). Essas propriedades

antimicrobianas têm sido exploradas sobre bactérias Gram-negativas de interesse clínico, como demonstrado pelo efeito bacteriostático de um inibidor do tipo Kunitz de sementes de *Inga vera* sobre *E. coli* (BEZERRA *et al.*, 2016). ApulSL, uma lectina purificada a partir das sementes de *Apuleia leiocarpa*, exibiu efeito bacteriostático sobre espécies de bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), como também sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*) (CARVALHO, *et al.*, 2015).

A diversidade de peptídeos/proteínas bioativas de plantas contra microrganismos tem levado a um cenário de prospecção dessas moléculas em fontes alternativas, tais como em estruturas de armazenamento de proteínas vegetais. Entre essas moléculas, inibidores de proteases tem recebido destaque pela sua ampla gama de aplicações biotecnológicas, incluindo seu potencial antimicrobiano.

2.3 Características bioquímicas e aplicações biotecnológicas dos inibidores de proteases de plantas

Proteases, também denominadas “peptidases” ou “proteinases”, são enzimas envolvidas na hidrólise da ligação peptídica. Encontram-se amplamente distribuídas em todos os Reinos, estando presente em animais, plantas e microrganismos. Processos proteolíticos são extremamente importantes para manutenção da homeostase celular e sobrevivência dos organismos. Por meio da degradação e reciclagem de proteínas é possível assegurar o controle das funções e a correta localização temporal e espacial das proteínas (CLEMENTE *et al.*, 2019; SANTAMARÍA *et al.*, 2014). Em animais, uma ampla gama de eventos celulares envolve a participação de enzimas proteolíticas, tais como: resposta inflamatória, apoptose celular, coagulação sanguínea e vias de processamento hormonal (CLEMENTE *et al.*, 2019). Em plantas, as proteases realizam a degradação de proteínas de reserva durante a germinação da semente, na produção de esporos, embriogênese, participam do amadurecimento dos frutos, na senescência, entre outros processos fisiológicos (GOMES *et al.*, 2011; RUSTGI *et al.*, 2018). Diante do papel crucial que as proteases desempenham nas funções vitais dos organismos, o controle refinado dessas enzimas é de extrema importância. Eventuais descontroles da atividade proteolítica podem resultar em danos ao organismo. Diversos

mecanismos atuam nesse controle acurado das proteases, entre eles estão os inibidores de proteases (IPs) (RAWLINGS, 2010).

Inibidores de protease de natureza proteica são usualmente moléculas pequenas (4 – 24 kDa), dotados de uma elevada quantidade de resíduos de cisteína (MARATHE et al., 2019). Esses resíduos de cisteína formam pontes dissulfeto que asseguram resistência ao calor, extremos de pH ou força iônica, e à proteólise (COTABARREN et al., 2020). Os IPs podem apresentar um único domínio de inibição (inibidores simples) ou múltiplos domínios (inibidores complexos), que permitem inibir proteases que possuem especificidades diferentes ou mesmo hidrolases diferentes (ex.: α -amilase) – sendo denominados inibidores bifuncionais (GROSSE-HOLZ; VAN DER HOORN, 2016).

Em 1980, Laskowski e Kato propuseram um sistema de classificação em famílias baseado em sequências presentes no sítio reativo dos IPs. Quatro famílias principais foram descritas com base nesse sistema: (1) inibidores de protease cisteínica, (2) inibidores de metaloprotease, (3) inibidores de protease aspártica e (4) inibidores de protease serínica. Evidentemente, limitações de informações de sequências dos IPs daquele período, limitaram o desenvolvimento de um sistema mais robusto que refletisse melhor as relações evolutivas baseada em homologias. (LASKOWSKI JR; KATO, 1980; RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004)

Posteriormente em 2004, essa classificação foi revisitada por Rawlings e colaboradores, que introduziram um sistema baseado em unidades inibitórias, famílias e clãs. Unidades inibitórias correspondem aos domínios presentes nos IPs responsáveis pela interação com as proteases alvos que desencadeiam sua atividade inibitória. Como mencionado anteriormente, os IPs podem apresentar um único domínio ou múltiplos domínios, tornando a classificação ainda mais complexa. A classificação em famílias baseia-se na homologia das sequências presentes nas unidades inibitórias. Os clãs levam em consideração similaridade na estrutura tridimensional dos domínios inibitórios. Identificadores são usados para descrever as famílias (formado pela letra maiúscula I, e um número serial – ex.: I1, I2.), e os clãs (formado pelas letras maiúsculas I ou J, e letras maiúsculas seriais, ex.: IA, IB.). Inicialmente, essa classificação nesse sistema distinguiu 53 famílias e 27 clãs. Atualmente, os IPs estão agrupados em 85 diferentes famílias e 38 clãs. Essas informações estão disponíveis no banco de dados do MEROPS, na URL do website

(<https://www.ebi.ac.uk/merops/inhibitors/>) (CLEMENTE et al., 2019, RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004; RAWLINGS, 2010; RAWLINGS et al., 2018).

Em plantas, os IPs compreendem um grupo heterogêneo com um número superior a 6700 inibidores proteicos descritos, classificados em pelo menos 12 famílias. Já foram reportados serpinas, fitocistatinas, inibidores de tripsina de soja Kunitz, inibidores de serina protease Bowman-Birk, inibidores de tripsina/ α -amilase de cereais, inibidores de metalocarboxipeptidase, inibidores de tripsina de mostarda, inibidores de batata tipo I, inibidores de batata tipo II, inibidores de abóbora, ciclotídeos e “ α -Hairpinins”. Em 104 diferentes famílias de plantas já foram identificadas a presença de IPs, com diferenças na diversidade de inibidores expressos. Dentre as famílias de inibidores, particularmente aqueles de proteases serínicas estão entre os mais estudados os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk (CLEMENTE et al., 2019; HELLINGER; GRUBER, 2019; RUSTGI et al., 2018).

Inibidores do tipo Kunitz comumente apresentam massa molecular em torno de 18 – 24 kDa, no entanto relatos de representantes com aproximadamente 8 kDa já foram descritos em plantas e animais. A maioria desses inibidores apresentam uma ou duas cadeias polipeptídicas, com quatro resíduos de cisteína distribuídos, constituindo duas pontes dissulfetos intra ou intermolecular. Eles possuem um único sítio reativo de ligação (sendo designado como inibidor de “única cabeça”), com um motivo característico em β -trevo formado por 12 fitas β antiparalelas. O inibidor do tipo Kunitz foi originalmente descrito em 1945, o qual foi purificado por M. Kunitz a partir de sementes de soja, sendo capaz de inibir a atividade proteolítica de tripsina. Progressivamente, outros inibidores com propriedades similares têm sido relatados em outras fontes vegetais, bem como em animais. A habilidade em interagir com proteases cisteínicas e aspárticas também foi reportada. Em plantas, sua função está ligada a homeostase de processos fisiológicos, bem como são atribuídas a atuação sobre proteases de patógenos (BENDRE; RAMASAMY; SURESH, 2018; COTABARREN et al., 2020; HELLINGER; GRUBER, 2019; RUSTGI et al., 2018).

O primeiro membro da família dos inibidores do tipo Bowman-Birk foi primeiramente purificado e caracterizado a partir de sementes de soja, sendo atribuído a D.E. Bowman and Y. Birk (BOWMAN, 1946; BIRK; GERTLER; KHALEF, 1963). Os inibidores dessa família são geralmente moléculas pequenas com massa molecular variando de 4 – 15 kDa, e dois domínios de interação com dois loops reativos independentes (sendo designado inibidor de “duas cabeças”). Esses “loops” de

inibição estão localizados em lados opostos da molécula do inibidor, e possuem especificidades diferentes, permitindo a formação de um complexo estequiométrico de 1:1:1 com duas moléculas de proteases distintas. Comumente, o domínio N terminal apresenta resíduos de arginina ou lisina na posição P1, sendo a tripsina seu alvo principal. Por outro lado, o domínio C terminal possui um resíduo de aminoácido hidrofóbico na posição P1, sendo a quimiotripsina seu alvo principal. Em geral, a estrutura tridimensional é estabilizada pela presença de uma elevada quantidade de resíduos de cisteína (10 – 14 resíduos) que constituem de cinco a sete pontes dissulfetos também intra ou intercadeia. Em plantas, inibidores do tipo Bowman-Birk também são associados a resistência contra insetos e patógenos, como evidenciado pelo aumento da expressão de genes frente ao ataque desses organismos (BATEMAN; JAMES, 2011; COTABARREN et al., 2020; GOMES et al., 2011; HELLINGER; GRUBER, 2019; SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016).

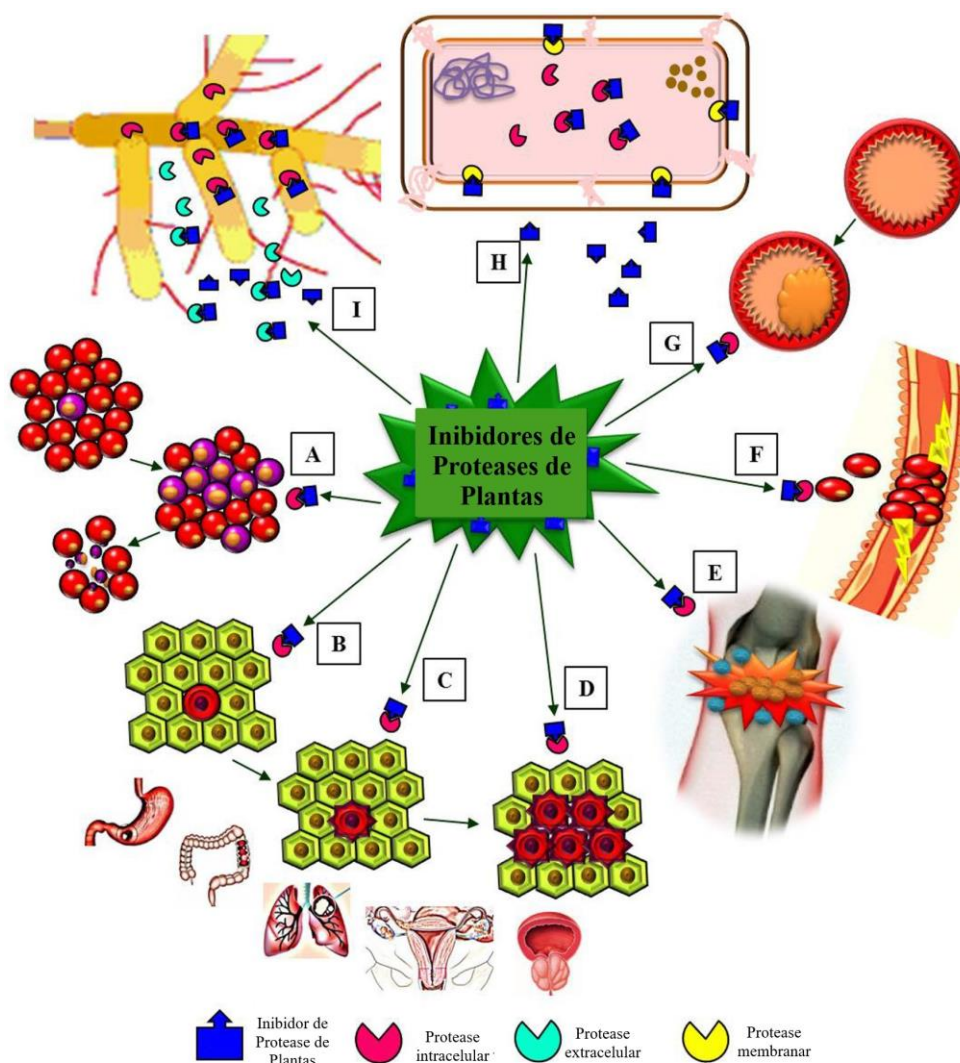
Do ponto de vista cinético, inibidores enzimáticos podem atuar mediante ação irreversível ou reversível. Inibidores irreversíveis usualmente modificam covalentemente a enzima alvo, ou podem interagir de forma não covalente estável. Inibidores reversíveis são categorizados em três tipos: competitivos, incompetitivos e não competitivos (esse último são ainda subdivididos em puros e mistos) (NELSON; COX, 2018; ZHAO; EE, 2019). Na inibição competitiva, substrato (S) e inibidor (I) competem pelo sítio ativo da enzima (E), de modo que a reação catalítica só é observada quando o complexo ES é formado. Diante da disputa pelo mesmo sítio ativo, o aumento da concentração do substrato pode resultar na completa depleção do complexo EI em favor da formação de ES. Diferentemente, na inibição incompetitiva, o inibidor só é capaz de se ligar ao complexo ES, formando ESI. Essa interação não ocorre no sítio ativo enzimático, mas em uma região alternativa exposta após a interação do substrato com a enzima. Na inibição não competitiva, o inibidor também interage em uma região distinta ao sítio ativo, no entanto, é capaz de se ligar tanto a enzima livre quanto a enzima ligada ao substrato. Inibidores não competitivos puros apresentam afinidades similares por E e o complexo ES, enquanto os mistos possuem afinidades distintas (NELSON; COX, 2018).

Devido a capacidade de atuar sobre a atividade de proteases endógenas e exógenas, os IPs de plantas têm sido explorado em uma ampla gama de aplicações, principalmente destinadas ao agronegócio e à saúde humana. Como mencionado anteriormente, uma das funções atribuídas aos IPs em plantas é na defesa vegetal.

De fato, essa foi uma de suas primeiras funções benéficas reconhecidas. Em 1947, Mickel e Standish notaram que certas larvas de insetos não se desenvolviam normalmente em produtos de soja. Posteriormente, em 1972, Green e Ryan demonstraram a rápida acumulação de IPs em folhas de batata e tomate após o ataque do besouro da batata do Colorado (localmente e sistemicamente) (SINGH et al., 2020). Além disso, a participação dos IPs na proteção da planta frente a infecção por patógenos também tem sido descrita. O desenvolvimento da infecção depende do envolvimento de proteases secretadas para a invasão do microrganismo na célula vegetal, e na assimilação de nutrientes. O aumento da expressão de IPs na planta é uma estratégia utilizada para mitigar o desenvolvimento do microrganismo fitopatogênico e prevenir o estabelecimento da infecção (CLEMENTE et al., 2019; ZHAO; EE, 2019). Baseado nisso, o potencial biotecnológico dos IPs tem sido implementado como ferramenta para o desenvolvimento de plantas transgênicas mais resistentes ao ataque de pragas e patógenos (CLEMENTE et al., 2019).

A proposição de IPs de plantas como agente terapêutico também tem sido uma área de intensa pesquisa na comunidade científica, exibindo um notável espectro de efeitos farmacológicos (Figura 2). Esse fato advém de as proteases serem apontadas como importantes alvos farmacológicos em várias doenças humanas. São exemplos de proteases como alvos de drogas: renina e enzima conversora de angiotensina (hipertensão), proteases da cascata de coagulação sanguínea, γ - e β -secretases (doença de Alzheimer), dipeptidil peptidase-IV (hiperglicemia, na diabetes mellitus tipo 2, e distúrbios cardiovasculares), aspartil protease de HIV (HIV), catepsina K (osteoporose) e metaloproteases de matriz (câncer) (COTABARREN et al., 2020; HELLINGER; GRUBER, 2019).

Figura 2 - Representação esquemática enfatizando os principais efeitos farmacológicos dos inibidores de protease de plantas (IPPs).



Fonte: Adaptado de SRIKANTH; CHEN, 2016.

(A) IPPs induzem apoptose em células de leucemia (glóbulos vermelhos saudáveis e células sanguíneas leucêmicas). (B – D) IPPs mostraram efeitos anticancerígenos in vitro nos estágios de iniciação (B), proliferação (C) e progressão (D) de diferentes tipos de câncer (gástrico, cólon, pulmão, ovário e câncer de próstata). (E) IPPs como agentes antiinflamatórios. (F) O papel dos IPPs como anticoagulantes. (G) IPPs ativos contra doenças cardiovasculares (formação de placas em um vaso sanguíneo). (H) Atividade antibacteriana de IPPs. (I) Atividade antifúngica de IPPs.

Como reportado anteriormente, a resistência bacteriana representa uma séria ameaça e um dos grandes desafios no campo biomédico. Diante da redução da eficácia dos atuais antibióticos, alternativas terapêuticas naturais têm sido propostas como substituição a esses antibióticos que estão se tornando obsoletos. Diante da habilidade em inibir proteases microbianas (bactérias e fungos), e de certos vírus, IPs

de plantas também têm sido reconhecidos como candidatos no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (COTABARREN et al., 2020; GAMAGE; KUMARI, 2018).

Das sementes de *Albizia amara* Boiv., foi purificado um inibidor de tripsina termoestável (49 kDa) ativo contra bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7926 – CIM $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Bacillus subtilis* MTCC 1789 - CIM $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e fungos (*Alternaria alternata* MTCC 7202 - CIM $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, *Alternaria tenuissima* MTCC 2802 - CIM $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Candida albicans* MTCC 3958 - CIM $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (DABHADE; MOKASHE; PATIL, 2016). Um inibidor do tipo Bowman-Birk, purificado a partir das sementes de *Luetzelburgia auriculata*, inibiu o crescimento de *S. aureus* mediante indução de estresse oxidativo e danos na membrana plasmática, conduzindo a lise celular (MARTINS et al., 2018). Um inibidor de tripsina das sementes de *Jatropha curcas* (nomeado JcTI-I) exibiu atividade antibacteriana sobre as espécies patogênicas *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Choleraesuis e *S. aureus*. JcTI-I exibiu valor de CIM de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo capaz de inibir proteases endógenas e secretadas de ambas as espécies bacterianas do estudo (COSTA et al., 2014). Há diversos outros IPs de plantas com potencial antimicrobiano (tabela 1).

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de inibidores de proteases de plantas.

Nome do inibidor	Descrição	Referência
Inibidor de Tripsina de <i>Ricinus communis</i> (RcTI)	Inibiu a germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	SILVA et al., 2015
Inibidor de Tripsina de <i>Inga edulis</i> (IETI)	Atividade antifúngica contra <i>Candida</i> spp., incluindo <i>Candida buinensis</i> e <i>Candida tropicalis</i> .	DIB et al., 2018
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium timbouva</i> (EfTI)	EfTI foi candidicida contra <i>Candida albicans</i> , <i>Candida buinensis</i> e <i>Candida tropicalis</i> .	OLIVEIRA et al., 2018
Inibidor de protease de <i>Rhamnus frangula</i> (RfP1)	Atividade inibitória contra proteases do tipo tripsina comerciais de <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus</i> sp. e <i>Bacillus licheniformis</i> . Efeito antibacteriano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	BACHA et al., 2017
Inibidor de protease das folhas de <i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt. (PI)	PI inibiu cepas microbianas patogênicas, incluindo <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e fungos patogênicos <i>Candida albicans</i> , <i>Mucor indicus</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> .	SATHEESH; MURUGAN, 2011

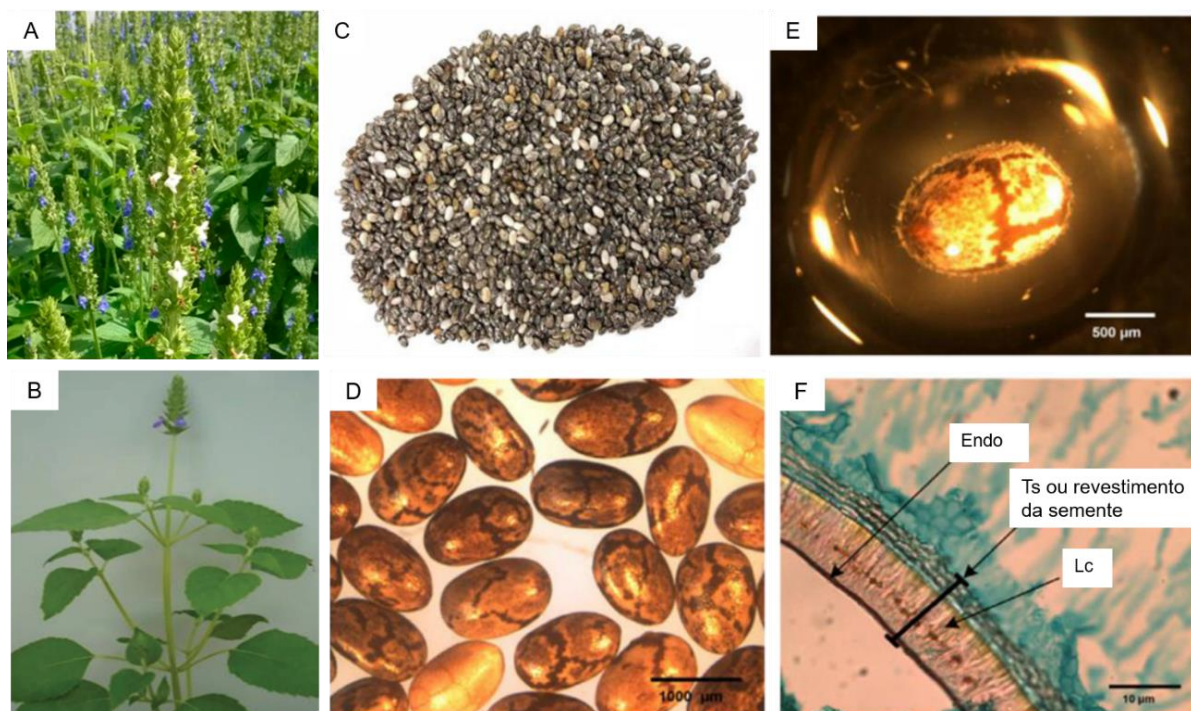
Inibidor de tripsina de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. andigenum var. overa (oPTI)	O oPTI recombinante mostrou um efeito inibitório contra <i>Salmonella braenderup</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> S-1, <i>Acinetobacter baumannii</i> R, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> R, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> e <i>Bacillus stearothermophilus</i> com uma zona de inibição maior que 5 mm.	CISNEROS et al., 2020
Inibidor de protease de <i>Macrotyloma uniflorum</i> (MUPI)	MUPI inibiu <i>Phytophthora capsici</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> MUPI inibiu <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MOHAN; KUMARI; ELYAS, 2018
Inibidor de tripsina de <i>Inga vera</i> (IVTI)	IVTI foi fungicida para <i>Candida buinensis</i> e um agente bacteriostático para <i>Escherichia coli</i> .	BEZERRA et al., 2016
Inibidor de tripsina das sementes de <i>Acacia nilotica</i> L. (AnTI)	AnTI (20 µg) produziu inibição contra diferentes bactérias patogênicas humanas (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Xanthomonas oryzae</i>). Atividade antifúngica (50 µg) também foi observada (<i>Aspergillus niger</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>).	MEHMOOD et al., 2020

Anteriormente, a presença de atividade inibitória de tripsina foi detectada na semente e farinha comerciais de chia (SOUZA et al., 2017). Finalmente, Souza et al. (2017) isolaram um inibidor de tripsina (massa aparente de 14 kDa por meio do uso de cromatografia de afinidade. Esse protocolo levou a um baixo rendimento do inibidor, cujo teor de proteínas solúveis foi detectado em quantidade discreta (0,001 mg/mL) pelo método de Bradford, não sendo possível calcular sua atividade específica. Até o momento, informações acerca do potencial de aplicação biotecnológico dos IPs detectados na chia não foram extensivamente explorados, incluindo seu uso como antimicrobiano. Além disso, dados da caracterização bioquímica do inibidor de tripsina purificado da chia permanecem desconhecidos.

2.4 *Salvia hispanica* L: descrição de características botânicas, e potencial nutracêutico e farmacológico na saúde humana.

Salvia hispanica L. é uma espécie vegetal de clima temperado e subtropical montanhoso, pertencente à família Lamiaceae, popularmente conhecida como chia. Trata-se de uma planta herbácea anual, capaz de atingir uma altura média de 1 m. Ela possui folhas simples, opostas com formato oval-elíptico, pubescente e ápice agudo, com dimensões variando de 4 – 8 cm de comprimento e 3 – 5 cm de largura. Suas flores são pequenas (3 – 4 mm) com coloração roxa ou branca, e hermafroditas com alta taxa de autofecundação. Após a fecundação, as flores originam um fruto aquênio indeiscente, dotada de uma única semente. As sementes de chia possuem aspecto ovalado com 1 – 2 mm de comprimento, 0,8 - 1,4 mm de largura e 0,8 - 1,3 de diâmetro. Elas são dotadas de uma casca lisa e brilhante, que podem apresentar colorações variadas em preta, marrom, cinza, manchada de preto ou branca. No interior de suas células epidérmicas está presente uma mucilagem, que quando posta em contato com água, origina um líquido gelatinoso característico da chia. A figura 3 apresenta as diferentes partes da planta com destaque para as sementes de chia (GRANCIERI; MARTINO; MEJIA, 2019a; SILVA et al., 2021).

Figura 3 – Aspectos botânicos de *Salvia hispanica* L.



Fonte: adaptado de DI SAPIO et al., 2012; GRANCIERI; MARTINO; MEJIA, 2019; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2020.

(A): Cultivo de chia em campo; (B) Aspecto geral de um indivíduo adulto; (C) Sementes de chia em tamanho real; (D) sementes de chia secas e inteira (imagem aproximada); (E) semente inteira hidratada com cápsula mucilaginosa ao redor; (F) dentro da semente: observam-se três camadas de células retangulares que formam a casca da semente; endo: camada de endocarpo; lc: camada de esclereides; Ts: testa da semente (tegumento externo da semente).

A chia é originária da região que se estende do centro-oeste do México até o norte da Guatemala. Atualmente, cultivos comerciais de chia se destacam em países como Austrália, Bolívia, Colômbia, Peru, Argentina, além de Guatemala e México (este último é o maior produtor em todo mundo) (GRANCIERI; MARTINO; MEJIA, 2019a; SILVA et al., 2021). No Brasil, o cultivo da chia ainda é recente, ocorrendo primariamente nas regiões do oeste Paranaense e noroeste do Rio Grande do Sul (MIGLIAVACCA et al., 2014).

Essa cultura tem feito parte do consumo humano há mais de 4500 anos, sendo as sementes tradicionalmente utilizadas no período Pré-Colombiano pelas sociedades da Mesoamérica como alimento e em preparações na medicina popular (SOSA-BALDIVIA et al., 2018). Relatos do tratamento de doenças respiratórias, problemas renais e infecções compreendem algumas das propriedades terapêuticas

descritas envolvendo a aplicação das sementes de chia (GAZEM; CHANDRASHEKARIAH, 2016).

O grande destaque dessa cultura está diretamente associado ao seu potencial nutracêutico decorrente de seu elevado valor nutricional agregado. As sementes de chia são compostas de proteínas (15-25%), lipídeos (30-33%), carboidratos (26-41%), fibra dietética (18-30%) e minerais (5%). Também contém uma grande quantidade de antioxidantes, especialmente compostos fenólicos (ácidos clorogênicos, ácidos caféicos e quercetina), e vitaminas (A, E, C, B1, B2 e B3) (KATUNZI-KILEWELA et al., 2021; KNEZ HRNČIČ et al., 2020; KULCZYŃSKI et al., 2019; MUÑOZ *et al.*, 2013). A chia possui todos os aminoácidos essenciais à incorporação na alimentação humana (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina). Suas proteínas apresentam uma boa digestibilidade (78,9%), a qual é superior aos valores encontrados para proteínas do milho (66,6%), arroz (59,4%) e trigo (52,7%); similar as proteínas do feijão (77,5%) e à caseína (88,6%); e inferior àquelas encontrada no amaranto (90%) (GRANCIERI; MARTINO; MEJIA, 2019a). As sementes de chia são ainda livres de glúten, permitindo o seu consumo por pacientes celíacos (KNEZ HRNČIČ et al., 2020). Em geral, elas são consumidas inteiras ou na forma de farinha, sozinha (*in natura*) ou incorporada em outros alimentos, tais como: iogurtes, saladas e frutas. Sua adição como ingrediente em pães, bolos, bebidas, entre outros, também tem sido proposta como forma de melhorar as características físico-químicas e sensoriais dos alimentos, particularmente suas propriedades nutricionais (GRANCIERI; MARTINO; MEJIA, 2019a).

Além da qualidade nutricional, as sementes de chia têm sido amplamente consumidas devido aos seus benefícios a saúde humana. Seu potencial antioxidante, anticolesterolêmico, anti-hipertensivo, cardioprotetor, hipoglicêmico, entre outros, tem sido descrito. Esses efeitos têm sido reportados em estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, inclusive envolvendo estudos em humanos (GRANCIERI; MARTINO; MEJIA, 2019a; KNEZ HRNČIČ et al., 2020). As sementes de chia têm revelado em estudos clínicos seu valor terapêutico (tabela 2).

Tabela 2 - Estudos clínicos do valor terapêutico das sementes de chia.

Objetivo do Estudo	Descrição do estudo	Resultado	Referência
Avaliação do efeito da chia no peso corporal, visceral, obesidade e fatores de risco relacionados à obesidade em adultos com sobrepeso e obesos com diabetes tipo 2.	<ul style="list-style-type: none"> - Dois grupos paralelos com 77 pacientes com sobrepeso ou obesos com diabetes tipo 2 foram avaliados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Perda de peso significativa, - Redução na circunferência da cintura e proteína C reativa - Aumento da adiponectina plasmática. 	Vuksan et al., 2017a
Comparação do efeito de duas sementes (linho (<i>Linum usitatissimum</i>) e chia (<i>Salvia hispanica L.</i>)) na glicemia pós-prandial e escores de saciedade.	<ul style="list-style-type: none"> - Quinze participantes saudáveis - Randomizados para receber um teste de glicose de 50 g, sozinho ou suplementado com 25 g de chia moída ou 31,5 g de linho. 	<ul style="list-style-type: none"> - Chia parece ter a capacidade de converter glicose em um carboidrato de liberação lenta; - E afetam mais à saciedade do que o linho (devido à maior viscosidade da fibra). 	Vuksan et al., 2017b
Influência da ingestão de óleo de semente de chia no desempenho de corrida humana.	<ul style="list-style-type: none"> - Depois de fornecer uma amostra de sangue às 8h, os indivíduos ingeriram 0,5 L de água aromatizada sozinha ou 0,5 L de água com 7 kcal.kg⁻¹ de óleo de semente de chia (ordem aleatória), forneceram outra amostra de sangue às 8h30 e, em seguida, começaram a correr até a exaustão. - Amostras de sangue adicionais foram coletadas imediatamente após e 1 hora após o exercício. 	<ul style="list-style-type: none"> - A ingestão de óleo de semente de chia 30 min antes da corrida causou um aumento nos níveis plasmáticos de ALA, - Nenhum benefício perceptível para os atletas neste estudo. 	Nieman et al., 2017
Efeito da suplementação de chia (<i>Salvia hispanica L.</i>) na pressão arterial (PA) e seus fatores cardiometabólicos associados.	<ul style="list-style-type: none"> - Avaliação nutricional, medição clínica da PA, - Monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA), - Coleta de amostras de sangue. 	<ul style="list-style-type: none"> - O consumo de chia ou placebo não causou distúrbios gastrointestinais, hepáticos ou renais, - Diminuição da PA em hipertensos. 	Toscano et al., 2014

<p>Eficácia da semente de chia moída e inteira na alteração dos fatores de risco de doenças em mulheres pós-menopáusicas com sobrepeso.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Os indivíduos ingeriram 25 g de sementes de chia ou suplementos de placebo por dia durante 10 semanas, - Massa e composição corporal, pressão arterial e índice de aumento, perfil lipídico sérico, marcadores de inflamação de amostras de sangue em jejum, ácidos graxos plasmáticos e perfil metabólico. 	<p>A ingestão de 25 g/dia de semente de chia moída em comparação com a semente de chia inteira ou placebo por 10 semanas por mulheres com excesso de peso aumentou o ALA e o EPA no plasma, mas não teve influência na inflamação ou nos fatores de risco de doenças usando medidas tradicionais e baseadas em metabolômica.</p>	<p>Nieman et al., 2012</p>
<p>Avaliação dos efeitos de um padrão de dieta (PD; proteína de soja, nopal, semente de chia e aveia) nas variáveis bioquímicas de MetS, AUC para glicose e insulina, intolerância à glicose (IG), a relação da presença de certos polimorfismos relacionados à MetS, e a resposta ao PD.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Na primeira fase, os participantes foram instruídos a consumir uma dieta com baixo teor de energia e uma dieta com baixo teor de gordura saturada e colesterol por 2 semanas. - Durante o segundo estágio do estudo, os participantes foram designados aleatoriamente para consumir o padrão de dieta (PD) ou o placebo (P), além de uma dieta com energia reduzida por 2 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> - BW, BMI e WC diminuíram, - Nenhuma mudança nas porcentagens de massa magra ou gorda em nenhum dos grupos após o tratamento dietético. 	<p>Guevara-Cruz et al., 2011</p>

Fonte: adaptado de KNEZ HRNČIČ et al., 2020

EPA: do inglês, ácido eicosapentanoico (ácido graxo omega-3 (ω -3)); ALA: do inglês, ácido α -linolênico; MetS: do inglês, Síndrome Metabólica; AUC: do inglês, área sob a curva; BW: do inglês, peso corporal; BMI: do inglês, índice de massa corporal; WC: do inglês, circunferência da cintura.

Diante desse cenário, as sementes de chia vem sendo amplamente investigada na prospecção de compostos bioativos para o desenvolvimento de alimentos funcionais (ULLAH *et al.*, 2016). De fato, a demanda por sementes de chia no mercado de alimentos funcionais tem aumentado bastante nos últimos anos. Estima-se uma produção total anual de aproximadamente 30 mil toneladas para atender essa demanda. A extração de óleo é o principal foco no uso das sementes de chia com essa finalidade (TIMILSENA *et al.*, 2016). Do total de óleo presente nas sementes (30 – 33%), aproximadamente 58,7% corresponde ao ácido graxo insaturado ômega-3 (ácido α -linolênico), importante para a saúde humana, considerado essencial, já que o corpo não é capaz de sintetizá-lo (MIGLIAVACCA *et al.*, 2014; OYALO; MBURU, 2021). Durante o processo industrial de obtenção desse óleo a partir das sementes da chia, uma quantidade substancial de farinha das sementes é descartada, sendo considerada um subproduto do processo, a despeito do seu potencial como fonte de outras biomoléculas, como proteínas (15-25%) (TIMILSENA *et al.*, 2016).

A caracterização de proteínas provenientes das sementes de chia tem sido explorada nos últimos anos, conforme investigação conduzida por Sandoval-Oliveros e Paredes-López (2013). Nesse estudo, foi encontrado um elevado teor de proteínas ($22,7 \pm 0,7$ gP/100 g sementes secas), com predomínio de frações de globulinas ($52,0 \pm 1,0$ g/100 g proteína), seguidas de albuminas ($17,3 \pm 0,8$ g/100 g proteína), glutelinas ($14,5 \pm 0,2$ g/100 g proteína), prolaminas ($12,7 \pm 0,2$ g/100 g proteína) e proteínas insolúveis ($3,4 \pm 0,6$ g/100 g proteína). Essas proteínas de reserva compreendem principalmente globulinas 11S (α -conglutina, legumina e glicinina), globulinas 7S (β -conglutina, vicilina, convicilina e vicilina-like), globulina 7S básica (γ -conglutina) e albumina 2S (δ -conglutina). O perfil eletroforético das proteínas das sementes de chia demonstrou uma grande variedade de bandas com massas moleculares em torno de 10 kDa até 250 kDa (SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013).

Grancieri, Martino e Mejia (2019a) revisaram o potencial benéfico de proteínas/peptídeos das sementes de chia na saúde humana. Com base em buscas no banco de dados do UNIPROT foram identificadas um total de 20 proteínas. 12 proteínas foram associadas com diversos processos metabólicos na fisiologia de plantas (divisão celular, fotossíntese, glicólise entre outros). As demais 8 proteínas estavam envolvidas na biossíntese e armazenamento de lipídeos. Ademais as sequências de aminoácidos das proteínas em estudo foram analisadas no banco de

dados BIOPEP, que investiga potenciais peptídeos bioativos. As análises *in silico* demonstraram a presença de peptídeos com atividade antioxidante, inibitória de enzima conversora de angiotensina (ECA) e da dipeptidil peptidase-IV, entre outras. Desse modo, os autores correlacionam os resultados encontrados aos efeitos terapêuticos descritos para o consumo das sementes de chia anteriormente mencionados.

De fato, uma série de estudos *in vitro* envolvendo a obtenção de peptídeos bioativos a partir de hidrolisados proteicos das sementes de chia vem destacando os benefícios da chia na saúde humana. Pablo-Osorio, Mojica e Urías-Silvas (2019) reportaram a inibição da enzima conversora de angiotensina por hidrolisado proteico obtido com pepsina ($CI_{50} = 0,128$ mg/mL). Análises por docking molecular com um dos peptídeos obtidos (sequencia aminoacídica: LIVSPLAGRL) demonstrou sua capacidade de interação com o sítio ativo da ECA. A energia de ligação prevista dessa interação (-9,5 kcal/mol) foi inclusive menor quando comparada aos controles positivos utilizados, captopril (-5.7 kcal/mol) e lisinopril (-8.0 kcal/mol) (PABLO-OSORIO; MOJICA; URÍAS-SILVAS, 2019). A atividade antioxidante de peptídeos bioativos gerados a partir do hidrolisado proteico da chia com pepsina também foi demonstrada (COTABARREN et. al., 2019). Nesse estudo, duas frações de extratos brutos não hidrolisados (CE-3: 15 – 3 kDa e CE-4: < 3 kDa) e seus hidrolisados correspondentes (H₁₂₀₋₃ e H₁₂₀₋₄), obtidos por gel filtração, foram testados nos métodos de eliminação de radicais 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS). Valores de CI_{50} para CE-3 foram de $44,7 \pm 7,2$ µg/mL e $562,3 \pm 45,1$ µg/mL para os métodos de ABTS e DPPH, respectivamente, enquanto H₁₂₀₋₃ exibiu IC_{50} em concentrações de $25,1 \pm 5,6$ µg/mL (ABTS) e $398,1 \pm 27,8$ µg/mL (DPPH). CE-4 demonstrou CI_{50} de $125,9 \pm 16,3$ µg/mL (ABTS) e $1000 \pm 132,3$ µg/mL (DPPH), ao passo que H₁₂₀₋₄ apresentou CI_{50} em $31,6 \pm 6,8$ µg/mL (ABTS) e $316,2 \pm 31,2$ µg/mL (DPPH) (COTABARREN et. al., 2019).

Em uma outra abordagem, utilizando a proteólise sequencial com alcalase seguida de flavourzyme, foi obtida uma fração peptídica < 3 kDa a partir da chia capaz de inibir enzimas associadas ao envelhecimento da pele. Os peptídeos bioativos < 3 kDa (1 mg/mL) demonstraram atividades inibidoras de elastase (65,32%, $CI_{50} = 0,43$ mg/mL), tirosinase (58,74%, $CI_{50} = 0,66$ mg/mL), hialuronidase (26,96%, $CI_{50} = 1,28$ mg/mL) e collagenase (28,90%, $CI_{50} = 1,41$ mg/mL). Diante dos resultados, os

peptídeos bioativos foram propostos como potenciais ingredientes em formulação cosmética em produtos para a pele (AGUILAR-TOALÁ; LICEAGA, 2020).

Em estudo conduzido por Grancieri, Martino e Mejia (2019b), proteínas totais e frações proteicas (albumina, globulina, glutelina e prolamina) da chia foram submetidas à digestão gastrointestinal simulada, sendo os produtos digeridos avaliados em modelos de inflamação e aterosclerose em macrófagos *in vitro*. Principalmente, peptídeos bioativos gerados na digestão da proteína total e fração glutelínica das sementes de chia reduziram a expressão e secreção de marcadores envolvidos na inflamação e no processo de aterosclerose em macrófagos.

A atividade antimicrobiana também foi demonstrada em investigação envolvendo peptídeos bioativos obtidos a partir de hidrolisados proteicos da chia (COELHO et. al., 2018). O emprego das enzimas alcalase e flavourzyme (isoladamente e sequencialmente) produziram hidrolisados com atividade antibacteriana sobre *S. aureus*. Valores de CIM variaram de $4,40 \pm 0,198$ a $0,58 \pm 0,157$ mg/mL, sendo determinada uma concentração bactericida mínima de 5 mg/mL para algumas das frações hidrolisadas obtidas. Os diferentes hidrolisados não apresentaram efeito sobre a espécie de bactéria Gram-negativa testada, *E coli*. Nesse estudo, frações de peptídeos < 3 kDa também foram capazes de inibir a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) em até 80,7%. Esse foi o primeiro relato da obtenção de peptídeos bioativos da chia atuantes como inibidores da homeostase do colesterol *in vitro*. Diante dos resultados, os autores destacam os hidrolisados proteicos de subprodutos da chia como potenciais ingredientes em alimentos funcionais e em aplicações nutracêuticas com propriedades antibacterianas e hipocolesterolêmica (COELHO et. al., 2018).

Ademais, hidrolisados proteicos da chia obtidos por meio de proteólise sequencial com Pepsina e Pancreatina apresentaram atividade antitumoral, de acordo com Quintal-Bojórquez et al. (2021). Fração menor que 1 kDa (1 mg/mL) obtida por ultrafiltração apresentou o efeito citotóxico mais significativo contra todas as linhagens de células tumorais testadas (mama - MCF-7, cólon - Caco2, próstata - PC-3 e fígado – Hep-G2). Não houve citotoxicidade contra linhagens de células normais de fibroblastos humanos. Os autores destacam, portanto, a necessidade de estudos mais aprofundados que explorem o potencial de aplicação de frações proteicas da chia, como alimentos funcionais e/ou ingredientes nutracêuticos, particularmente como

tratamentos complementares para terapia de câncer (QUINTAL-BOJÓRQUEZ et al., 2021).

No tocante a estudos *in vivo*, foi avaliado o efeito de extratos contendo inibidores de protease do tipo serina (STPIs, do inglês serine-type protease inhibitors), a partir de diferentes sementes vegetais, incluindo de *Salvia hispanica* L., em modelo de hepatocarcinoma em camundongos. STPIs da chia afetaram a imunidade inata no microambiente tumoral para controlar o hepatocarcinoma, sendo capaz de normalizar a expressão (mRNA) de CD36 e o receptor 'Toll-like' imune inato (TLR)-4. Ambos TLR-4 e o transportador de ácido graxo CD36 têm sido associados à progressão do câncer e metástase, respectivamente. Além disso, STPIs da chia não afetou a produção de mediadores inflamatórios (fator estimulador de colônia de granulócitos-monócitos, fator de células-tronco e TNF- α), contribuindo para a manutenção da polarização do fenótipo antitumoral de macrófago M1. Desse modo, *S. hispanica* foi proposta como alternativa para o controle da agressividade de hepatocarcinoma (LAPARRA; HAROS, 2019).

Assim, considerando o potencial das sementes de chia como fonte de compostos bioativos, seu elevado teor de proteínas de reserva, e particularmente a presença de IPs (grupo com amplo histórico do potencial antimicrobianos), foram formuladas as seguintes perguntas de partida que nortearam o presente estudo:

- *É possível estabelecer um protocolo alternativo de purificação de um inibidor de tripsina das sementes de chia com maior rendimento proteico, comparando-se ao estudo anteriormente reportado?*
- *Que características bioquímicas o inibidor de tripsina da chia compartilha em relação a outros inibidores de proteases já descritos na literatura?*
- *Qual o potencial de utilização do inibidor de tripsina purificado a partir das sementes de chia como antibiótico frente a bactérias de interesse na saúde humana?*

3 HIPÓTESE

“Sementes de chia possuem um inibidor de tripsina com propriedades bioquímicas e farmacológicas semelhantes a outros representantes desse grupo, apresentando potencial de aplicação biotecnológico como agente antimicrobiano contra espécies bacterianas de interesse clínico para o homem.”

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Purificar e determinar parâmetros bioquímicos de um inibidor de tripsina a partir das sementes de chia (*Salvia hispanica* L.), e avaliar seu potencial antibacteriano sobre cepas de interesse clínico a saúde humana.

4.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de purificação de um inibidor de tripsina a partir das sementes de chia;
- Caracterizar o inibidor de tripsina quanto a massa molecular, presença de carboidrato, propriedades cinéticas e de estabilidade frente a condições adversas com agentes físicos e químicos;
- Investigar o efeito do inibidor de tripsina purificado sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico a saúde humana;
- Avaliar o potencial antibacteriano do inibidor de tripsina em cotratamento com um antibiótico convencional;
- Investigar o modo de ação da atividade antibacteriana do inibidor de tripsina purificado.

5 ARTIGO DA TESE

Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds contain a highly stable trypsin inhibitor with potential for bacterial management alone or in drug combination therapy with oxacillin

Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds contain a highly stable trypsin inhibitor with potential for bacterial management alone or in drug combination therapy with oxacillin

Adson Ávila de Souza^a, Adrianne Maia Lima^a, Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa^a, Francisca Cristiane Nogueira^a, José Carlos do Sacramento Neto^a, Lucas Pinheiro Dias^a, Nadine Monteiro Salgueiro Araújo^a, Celso Shiniti Nagano^b, Hélio Vitoriano Nobre Júnior^c, Cecília Rocha da Silva^c, Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá^c, João Batista de Andrade Neto^c, Fátima Daiana Dias Barroso^c, Maria Elisabete Amaral de Moraes^c, Hermógenes David de Oliveira^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Science Center, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Fisher Engineering, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60455-970, Fortaleza, CE, Brazil

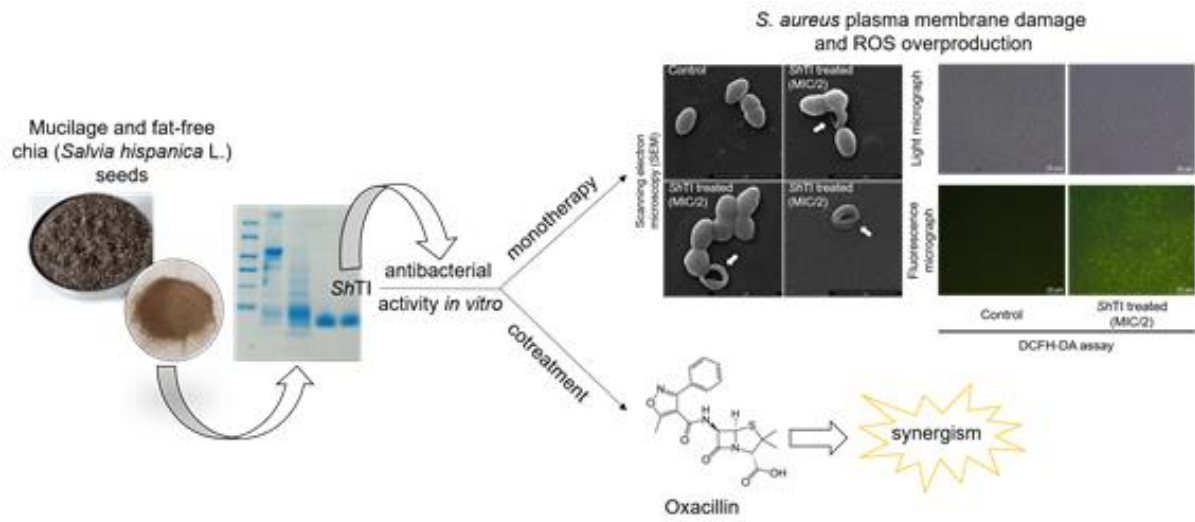
^c Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará, Campus do Porangabussu, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil

* Corresponding author: hermogenes@ufc.br (Hermógenes D. Oliveira). Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: + 55 85 3366 9826; Fax: + 55 85 3366 9789.

Highlights

- Trypsin inhibitor was purified from *Salvia hispanica* L. seeds (*ShTI*);
- *ShTI* proved to be highly stable to temperature and pH;
- *ShTI* showed antibacterial activity *in vitro* against *Staphylococcus aureus* strains;
- It acted synergistically with oxacillin against *S. aureus*, including an MRSA strain;
- It displayed overproduction of ROS and plasma membrane pore formation in *S. aureus*.

Graphical abstract



Abstract

The emergence of antibiotic resistance poses a serious and challenging threat to healthcare systems, making it imperative to discover novel therapeutic options. This work reports the isolation and characterization of a thermostable trypsin inhibitor from the chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* sensitive and resistant to methicillin. The trypsin inhibitor, *ShTI*, was purified from chia seeds through crude extract heat treatment, followed by affinity and reversed-phase chromatography. Tricine-SDS-PAGE revealed a single glycoprotein band of ~11 kDa under non-reducing conditions, confirmed by mass spectrometry analysis (11.558 kDa). *ShTI* was remarkably stable under high-temperature incubation (100 °C; 120 min.) and a broad pH range (2 – 10; 30 min.). Upon exposure to DTT (0.1 M; 120 min.), *ShTI* antitrypsin activity was partially lost (~ 38%), indicating the participation of disulfide bridges in its structure. *ShTI* is a competitive inhibitor ($K_i = 1.79 \times 10^{-8}$ M; $IC_{50} = 1.74 \times 10^{-8}$ M) that forms a 1:1 stoichiometry ratio for the *ShTI*:trypsin complex. *ShTI* displayed antibacterial activity alone (MICs range from 15.83 to 19.03 μ M) and in drug combination with oxacillin (FICI range from 0.20 to 0.33) against strains of *S. aureus*, including Methicillin-resistant ones. Overproduction of reactive oxygen species and plasma membrane pore formation is involved in the antibacterial action mode of *ShTI*. Overall, *ShTI* represents a novel candidate to be used as a therapeutic agent for bacterial management of *S. aureus* infections.

Keywords: Plant bioactive protein; Protease inhibitor; MRSA; Synergism.

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has become one of the most severe public health problems with critical global impacts. Overuse, misuse, and inadequate prescription of antibiotics, among other causes, have been attributed to the burgeoning emergence of multiresistant bacteria, generating the so-called antibiotic resistance crisis [1,2]. Resistant strains limit the efficacy of antibiotics, being responsible for an increase in infection severity and extended therapy duration compared to susceptible strains. Consequently, these pathogens raise healthcare costs and increase the chances of treatment failures, leading to clinical complications or mortality [3,4]. Along with this critical situation, the scenario has been accompanied by a low rate in the availability of novel antibiotics [5]. Only seven new antibacterials and two new β -lactamase inhibitor/ β -lactam combinations have been approved worldwide since 2016 [6]. Economic and regulatory obstacles are among the main factors in the slow antibiotic development pipeline [2]. Alternative therapies are being investigated as a strategy to overcome AMR and replace antibiotics that are becoming obsolete. Other approaches involving bacteriophages, synthetic antimicrobial peptides, antibodies, and probiotics have been adopted [7]. In addition, molecules from plant sources have also received considerable attention [8].

Plant protease inhibitors (PPIs) appear as promising molecules with antimicrobial activity [9]. PPIs are present in different tissues such as leaves, flowers, fruits, and storage tissues like seeds and tubers, representing around 1 – 10 % of the total soluble protein content [10,11]. Besides their potent antimicrobial activity, the remarkable physicochemical stability (commonly associated with PPIs) has attracted the scientific community's attention to those molecules [12]. These features have

practical relevance to the pharmaceutical industry. Thus, PPIs have been considered excellent candidates for novel therapeutic agents with antimicrobial activity [12].

Salvia hispanica L., popularly known as chia, is an herbaceous annual plant belonging to the Lamiaceae family. Lately, chia seeds consumption has increased and gained popularity due to their functional and nutraceutical properties, which greatly benefit human health [13,14]. The high lipid content (especially alpha-linolenic (ω -3) and alpha-linoleic acids (ω -6)) is the main responsible for the increasing demand for chia seeds in the functional food market [15]. Chia seeds also have high protein content and are considered a promising source of bioactive proteins and peptides with health benefits [13, 16, 17, 18, 19]. Importantly, different protein fractions obtained by ammonium sulfate precipitation from chia seeds showed anti-tryptic activity and the isolation of a trypsin inhibitor (estimated molecular mass of ~14.4 kDa) has been described. However, despite the potential attributed to PPIs, the biochemical features and bioactive properties of protease inhibitors in chia seeds were not thoroughly investigated [20].

This study reports the purification and characterization of a trypsin inhibitor from the mucilage and fat-free seeds of *S. hispanica* L., *ShTI*, with antibacterial activity. The outcomes will demonstrate a novel candidate with potential application in the bacterial management against *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-resistant strains.

2. Materials and methods

2.1. Chia seeds and reagents

Salvia hispanica L. seeds were obtained from the local market in Fortaleza, Ce, Brazil, and stored at -20 C until protein extraction and purification of the trypsin inhibitor.

Firstly, chia seeds mucilage and fat removal were performed as follows. Chia seeds were soaked in water (1:40 (m/v)) for 2 h at 4 °C under stirring. Afterward, the mucilage was removed with the aid of a sieve followed by cheesecloth filtration. The seed trace of remaining mucilage was extracted by contact with ethanol 95% (1:5 (m/v)) for 15 min at the same conditions. Finally, the dry mucilage was removed from the chia seeds surface by mechanical attrition on filter paper. Mucilage-free seeds were ground into flour using a coffee grinder. Then, the resulting flour was defatted with hexane (1:5 (m/v)) at room temperature, with three solvent changes, and stored at -20 °C. This study was registered in the Sistema de Gestão Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN: National Management System of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge) under the number A879F9E. Bovine pancreatic trypsin (EC 3.4.21.4), bovine serum albumin (BSA), N α -benzoyl-D,L-arginine4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA), sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide, bis-acrylamide, tricine, dithiothreitol (DTT), 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and propidium iodide were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standard molecular weight markers (14.4 – 97.4 kDa) and CNBr-activated Sepharose 4B chromatographic matrix were from GE Healthcare. Trypsin immobilization was carried out according to the manufacturer's instructions. The symmetry C18 column (0.46 × 25 cm, 5 μ m particle size, 300 Å pore size) was obtained from Waters Corp (Milford, MA, USA) for reversed-phase analysis. All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. *Sh*TI purification

A crude extract (CE) was obtained by stirring the mucilage and fat-free chia seed flour (5 g) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.5 M NaCl (1:10; m/v) for 4 h at 4

°C. Next, the suspension was filtered through a cheesecloth, and the filtrate was centrifuged at $10,000 \times g$, 4 °C for 30 min. The resulting supernatant was considered CE and subjected to heating at 100 °C for 30 min. After heat treatment, the sample was cooled under ice water and centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4°C. The clear supernatant, now named heat-treated crude extract (HCE; 25 mg), was applied onto a trypsin-Sepharose 4B column (1.7 × 5.5 cm) equilibrated with the extraction buffer. The adsorbed proteins were eluted with 0.05 M glycine–HCl, pH 2.2, containing 0.5 M NaCl at a $60 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ flow rate (fractions of 3 mL). The retained peak was pooled, dialyzed against Milli-Q grade water, and freeze-dried. The lyophilized sample was dissolved in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in 2% (v/v) acetonitrile and Milli-Q grade H₂O (eluent A), filtered through a 0.45 µm membrane and then subjected (100 µL) to reversed-phase high-performance liquid chromatography using a C18 column. The proteins were eluted using a linear gradient (0 – 100% (v/v)) with the eluent B (0.1% (v/v) TFA in 80% (v/v) acetonitrile and Milli-Q grade H₂O), at $60 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ flow rate. *ShTI* was collected, freeze-dried, and stored at –20 °C for further analysis. Fractions from affinity and reversed-phase chromatography were monitored at 280 nm. Protein concentrations were determined by the dye-binding method described by Bradford [21], with bovine serum albumin (BSA) as the standard. *ShTI* purification protocol was guided by trypsin inhibitory activity assay, which was used to assess the yield after each purification step.

2.3. Trypsin inhibitory activity assay

Trypsin inhibitory activity was assayed as described by Erlanger *et al.* [22] against bovine trypsin (EC 3.4.21.4) using BApNA as the substrate. Aliquots of the trypsin (10 µL; 0.3 mg/mL prepared in 0.001 M HCl) in 690 µL of assay buffer (0.05 M Tris-HCl,

pH 8.0, containing 0.02 M CaCl₂) were incubated with 100 µL of the sample to be tested at 37 °C for 10 min. CE (0.4 mg/mL), HCE (0.2 mg/mL), retained Trypsin-Sepharose 4B (0.00625 mg/mL) and *ShTI* (0.00625 mg/mL) were used in triplicates. The reaction was initiated by adding 500 µL of the synthetic chromogenic substrate BApNA (1.25 × 10⁻³ M prepared in 1 % (v/v) DMSO) and incubation at 37 °C for 15 min. The enzyme reaction was stopped by adding 120 µL of 30 % (v/v) acetic acid. The release of *p*-nitroanilide from substrate hydrolysis was monitored at 410 nm. One Trypsin Inhibitory Activity unit (TIU) was defined as the decrease in 0.01 U of absorbance per 15 min assay at 37 °C, based on enzyme activity in the absence of the inhibitor (control sample).

2.4. Biochemical characterization of *ShTI*

2.4.1. Purity and molecular mass determination

The purity from samples of each purification step was checked by tricine-SDS-PAGE as described by Schagger and Von Jagow [23]. Low range molecular weight standards (14.4 – 97.4 kDa) were used for apparent molecular mass estimation of *ShTI* (GelAnalyzer 2010a software) under non reducing conditions. Protein bands were revealed by staining the gel with 0.1% (m/v) of Coomassie Brilliant Blue R-250 and destaining with distilled water, methanol, and acetic acid (5:4:1– v/v/v).

The average molecular mass of *ShTI* was determined using Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS). Pure samples of *ShTI* (60 µg·µL⁻¹; prepared in 50% (v/v) acetonitrile containing 0.2% formic acid (v/v)) were applied into a nanoelectrospray source coupled to a Synapt HDMS ESI-Q-ToF mass spectrometer (Waters Corp., Milford, MA, USA), using a Hamilton syringe. The instrument was

calibrated with phosphoric acid and operated in positive-ion mode, under 3.5 kV capillary voltage at 363 K source temperature. Mass spectra were acquired by scanning at m/z from 1000 to 2100 and at 1 scan·s⁻¹. Mass Lynx 4.1 software (Waters) was used to deconvolute the mass spectrum.

2.4.2. Assessment of *Sh*TI glycoprotein nature

Detection of the glycoprotein nature of *Sh*TI was evidenced by the periodic acid-Schiff (PAS) technique, as reported by Zacharius *et al.* [24]. Glycoprotein bands were revealed by washing the gel with 0.5% (m/v) potassium metabisulfite in 0.05 M HCl. Fetuin (7 µg) was used as positive control.

2.4.3. Thermal, pH, and DTT stability of *Sh*TI

*Sh*TI thermal stability was assessed after incubation at 100 °C for 30, 60, 90, and 120 min in a water bath. After heat treatment, *Sh*TI was cooled to room temperature. The effect of pH was studied by exposing aliquots of *Sh*TI to the following buffers (0.05 M) for 30 min at 25 °C: glycine-HCl, pH 2 and 3; sodium phosphate, pH 6; Tris-HCl, pH 8; and glycine-NaOH pH 9 and 10. The effect of DTT on *Sh*TI activity was studied by pre-incubating samples with the reducing agent (0.1 M) for 30, 60, 90, and 120 min at 37 °C. After treatment, iodoacetamide (0.2 M) was immediately added to prevent the formation of disulfide bonds. In all experiments, purified *Sh*TI (0.00312 mg/mL) was assayed in triplicates for trypsin inhibitory activity as described in section 2.3. Trypsin inhibitory residual activity was determined (mean ± standard deviation) based on each appropriate control not exposed to the respective treatment.

2.4.4. Kinetic analyses

IC₅₀ value and the inhibition stoichiometry (ratio *Sh*TI : trypsin) were estimated through the method described in section 2.3 using purified *Sh*TI in the final concentration range of 1.03×10^{-8} M to 2.07×10^{-8} M [25].

The pattern of enzyme inhibition and the inhibition constant (K_i) was analyzed by the Lineweaver–Burk double-reciprocal [26] and the Dixon [27] plots, respectively. Trypsin inhibitory activity was performed as previously described in section 2.3 by using different concentrations of *Sh*TI (0.77×10^{-8} M to 8.31×10^{-8} M) and BApNA (0.50×10^{-3} M to 1.60×10^{-3} M) in the presence of fixed trypsin concentration (0.3 mg/mL). The Lineweaver–Burk plot was drawn by the reciprocal of the reaction rate ($1/v$; OD_{410nm}.h⁻¹.mL⁻¹ of the reaction medium) against the inverse of the substrate concentration ($1/[S]$; 1/M), in the absence and presence of *Sh*TI. Dixon graph was plotted by the inverse of the reaction rate versus *Sh*TI concentration, and K_i was determined by the intersection of the three lines plotted for different BApNA concentrations (0.50, 1.25, and 1.60×10^{-3} M).

2.5. Antibacterial activity of *Sh*TI and mode of action study

2.5.1. Bacteria strains

Antibacterial susceptibility assays were carried out with Gram-negative bacteria strains (*Escherichia coli* ATCC[®] 8739 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 9027) and Gram-positive strains (*Staphylococcus aureus* ATCC[®] 6538P, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 4996, and a clinical strain of MRSA). All strains belong to the bacteria collection of the Laboratory of Bioprospecting of Antimicrobial Molecules (LABIMAN), affiliated with the Drug Research and Development Center and the School of Pharmacy at the Federal University of Ceará. Firstly, all strains were grown in

Mueller-Hinton agar medium at 35 °C for 24 h. After that, each bacterial inoculum was prepared in a sterile saline solution based on 0.5 McFarland standard. Then, the suspension was diluted in Mueller-Hinton broth to obtain 1×10^7 Colony Forming Units (CFU)/mL.

2.5.2. MIC determination

MIC determination was performed by the microdilution broth method as previously published in the M7-A10 document [28]. The bacterial inoculum was seeded into polystyrene flat-bottom 96-well microtiter plates in the presence of *ShTI* solubilized in distilled water and filtered using 0.22 µm membranes, in the concentration range of 0.03 – 19.03 µM. Sodium oxacillin (Blau Farmacêutica S/A - Cotia, SP, Brazil) was used as positive control and was prepared following CLSI guidelines. A control group in the absence of *ShTI* was also included. Plates were incubated at 36 °C for 20 h. MIC values were expressed in micromolar, being considered the lowest concentration with no visible turbidity. Experiments were carried out in triplicate.

2.5.3. Checkerboard assay

Checkerboard titration was employed to calculate the fractional inhibitory concentration index (FICI) and determine the type of interaction between *ShTI* and oxacillin, as reported by Liu *et al.* [29]. Sub-MIC concentrations of *ShTI* (MIC/32 – MIC/4) and oxacillin (MIC/32 – MIC/4) were tested against the three Gram-positive bacteria strains. Samples preparation, inoculum size, and culture conditions were similar to those described in section 2.5.1. MIC of each agent alone and in combination was determined as aforementioned (section 2.5.2) and applied in the following formula:
$$FICI = \frac{\text{MIC oxacillin combination}}{\text{MIC oxacillin isolated}} + \frac{\text{MIC } ShTI \text{ combination}}{\text{MIC}}$$

ShTI isolated. Drug interaction was interpreted as follows: $FICI \leq 0.5$, synergy (SYN); $0.5 < FICI < 4.0$, indifference (IND); and $FICI \geq 4.0$, antagonism (ANT) [30].

2.5.4. Cell membrane permeabilization assay

The propidium iodide staining method was utilized for cell membrane permeabilization assay according to Martins *et al.* [31]. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC® 4996 cells were treated with distilled water (control) or MIC/2 *ShTI* (7.91 μM) at 36 °C for 20 h, washed three times with 0.15 M NaCl, followed by centrifugation at low-speed (2000 x *g*, 5 min, 25 °C). Subsequently, treated bacterial cells were recovered and incubated with propidium iodide (0.4 μL ; 0.001 M) for 1 h at 37 °C under constant agitation in the dark. Plasma membrane permeabilization was observed with the aid of a fluorescence microscope (Olympus BX 41; excitation wavelength, 545 nm; emission wavelength, 580 - 590 nm). Images were captured at 40X magnification.

2.5.5. Reactive oxygen species (ROS) detection

Intracellular ROS generation was assessed by the DCFH-DA staining method described by Martins *et al.* [31]. MRSA ATCC® 4996 inoculum was treated with distilled water (control) or MIC/2 *ShTI* (7.91 μM) and recovered as previously reported in section 2.5.4. Afterward, the cells were incubated with 10 μM DCFH-DA at 37 °C for 30 min. The presence of ROS was visualized under a fluorescence microscope (Olympus BX 41; excitation wavelength, 490 nm; emission wavelength, 510 - 530 nm). All images were obtained with 40X magnification.

2.5.6. Scanning electron microscopy (SEM) analysis

MRSA ATCC® 4996 samples were recovered after treatment with distilled water (control) or MIC/2 *ShTI* (7.91 µM) at the same conditions described in section 2.5.4. After, bacterial cell fixation, dehydration, and assembly onto an SEM sample stub were processed according to Martins *et al.* [31]. SEM analysis was conducted in an Inspect™ 50 FEI scanning electronic microscope (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA).

2.6. Statistical analysis

Experimental data were carried out in triplicates and expressed as means ± standard deviations. A one-way analysis of variance (ANOVA) evaluated significant differences, followed by Tukey's post hoc test using GraphPad Prism® software (GraphPad Prism, Inc., San Diego, CA, USA). In all comparisons, significant differences were considered at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. *ShTI* purification

The trypsin inhibitor from *S. hispanica* L. seeds (*ShTI*) was purified using heat treatment followed by two chromatographic steps (Trypsin-Sepharose 4B affinity column and Reverse Phase C18 column). Firstly, the crude extract of chia seeds (5 g), containing 606.86 mg of total soluble proteins, was heated at 100 °C for 30 min. Such procedure rendered a thermostable soluble protein fraction, designated heat-treated crude extract (HCE). HCE showed a lower total protein content (206.28 mg) than the crude extract, but a higher specific trypsin inhibitory activity, which increased 2.14-fold after heating the crude extract.

As depicted in Fig. 1A, two protein fractions were obtained when HCE was loaded on Trypsin-Sepharose 4B. The non-retained fraction did not show trypsin inhibitory activity and was therefore discarded. However, the adsorbed fraction eluted with 0.05 M glycine-HCl, pH 2.2, 0.5 M NaCl displayed trypsin inhibitory activity and was recovered and lyophilized.

The RP-HPLC chromatogram of the retained trypsin-Sepharose 4B peak showed a prominent single peak with maximum trypsin inhibitory activity when acetonitrile gradient reached a composition of 57% to 63% eluent B at 44 – 48 min retention time (Fig. 1B). Purification levels and yield of each purification step are summarized in Table 1. As it can be seen, the purification protocol achieved 83.29 purification fold with 16.47 % yield based on the total inhibitory activity recovered at the last step of the trypsin inhibitor purification protocol, here named *ShTI*.

Tricine-SDS-PAGE analysis of *ShTI* revealed a single protein band with an apparent molecular mass of 11 kDa under non-reducing conditions (Fig. 1B - Insert). Furthermore, *ShTI* was stained with Schiff reagent dyes, indicating a carbohydrate moiety covalently bound in its structure, confirming the purified inhibitor is a glycoprotein (Fig. 1B - Insert). Regarding native molecular mass, *ShTI* exhibited a major ion of 11,558 Da in the deconvoluted ESI-MS spectrum.

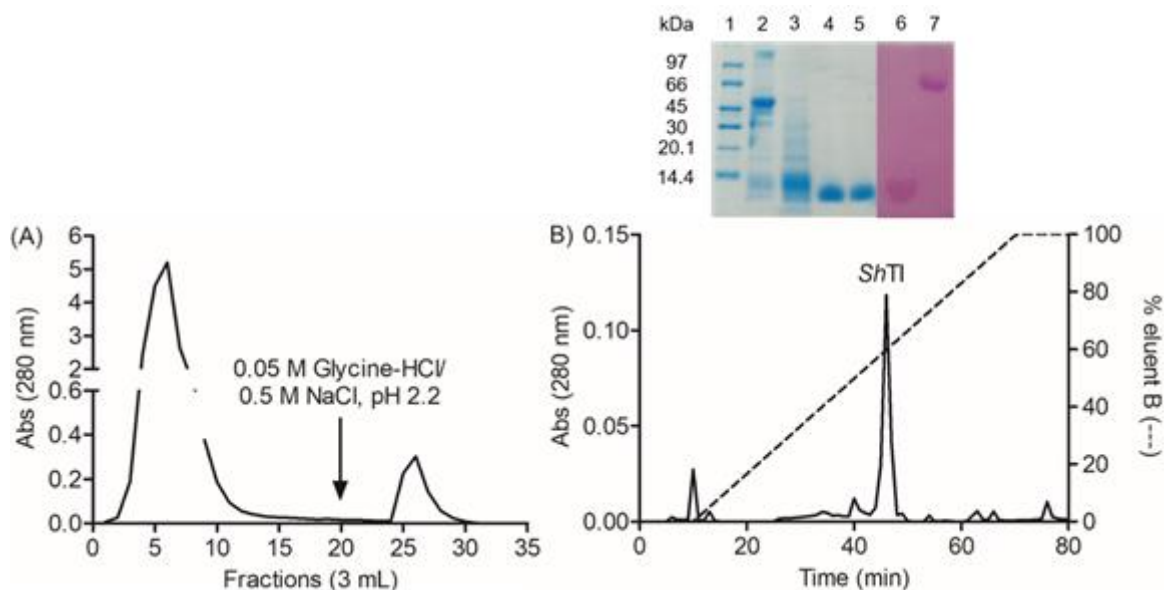


Fig. 1. Chromatogram profiles and polyacrylamide gel electrophoresis of *ShTI* purification. (A) Heat-treated extract from *S. hispanica* seeds was applied on Trypsin-Sepharose column. Fractions (n° 24 – 29) eluted with 0.05 M glycine–HCl, pH 2.2, containing 0.5 M NaCl were pooled with trypsin inhibitory activity. (B) Reverse-phase chromatography of the retained Trypsin-Sepharose fraction eluted with a linear gradient from 100% eluent A (0.1% (v/v) TFA in 2% (v/v) acetonitrile) to 100% eluent B (0.1% (v/v) TFA in 80% (v/v) acetonitrile). Insert: Tricine-SDS-PAGE (16.5%) of *ShTI*: (1) molar mass markers (MM - kDa); (2) Crude extract (CE); (3) Heat-treated crude extract (HCE); (4) Retained Trypsin-Sepharose 4B; (5) purified *Salvia hispanica* trypsin inhibitor (*ShTI*); (6) and (7) are *ShTI* and fetuin (positive control) stained with the Schiff's reagent for carbohydrate detection, respectively.

Table 1. *ShTI* purification steps from *Salvia hispanica* seeds.

Purification steps	Total protein (mg) ^a	Total inhibitory activity (TIU) ^b	Specific inhibitory activity (TIU.mg ⁻¹)	Purification (fold) ^c	Yield (%) ^d
Crude Extract (CE)	606.86 ± 19.47	270,052.70 ± 8,681.78	445 ± 15.05	1	100
Heat-treated crude extract (HCE)	206.28 ± 4.19	196,997.40 ± 4,024.43	955 ± 20.41	2.14	72.94
Retained Trypsin-Sephrose 4B	1.60 ± 0.06	56,490.67 ± 2,170.43	35,306.67 ± 75.42	79.34	20.91
Reversed Phase (<i>ShTI</i>)	1.20 ± 0.08	44,480 ± 3,074.08	37,066.67 ± 301.69	83.29	16.47

^a Total protein recovered from defatted chia seeds flour (5 g).

^b One TIU (trypsin inhibitory activity unit) was defined as the decrease in 0.01 unit of absorbance at 410 nm per 15 min assay, at 37 °C.

^c Purification index was calculated as the ratio between the specific activity obtained at each purification step and the CE taken as 1.0.

^d Yield was calculated based on the total inhibitory activity recovered (CE, 100%).

3.2. *Sh*TI stability

*Sh*TI proved to be highly thermostable, maintaining 100% of its trypsin inhibitory activity even when incubated at 100 °C for up to 2h (Fig. 2A). Moreover, the purified trypsin inhibitor was stable at a broad pH range (2 -10). *Sh*TI retained 80 – 100% of inhibitory activity in acidic and basic pHs (Fig. 2B). Differently, *Sh*TI trypsin inhibitory activity was affected by DTT (reducing agent). The inhibitory activity of *Sh*TI significantly declined to ~77% after 30 min of treatment with DTT (0.1 M). A longer time of exposure to DTT reduced its activity to 62 % (Fig. 2C).

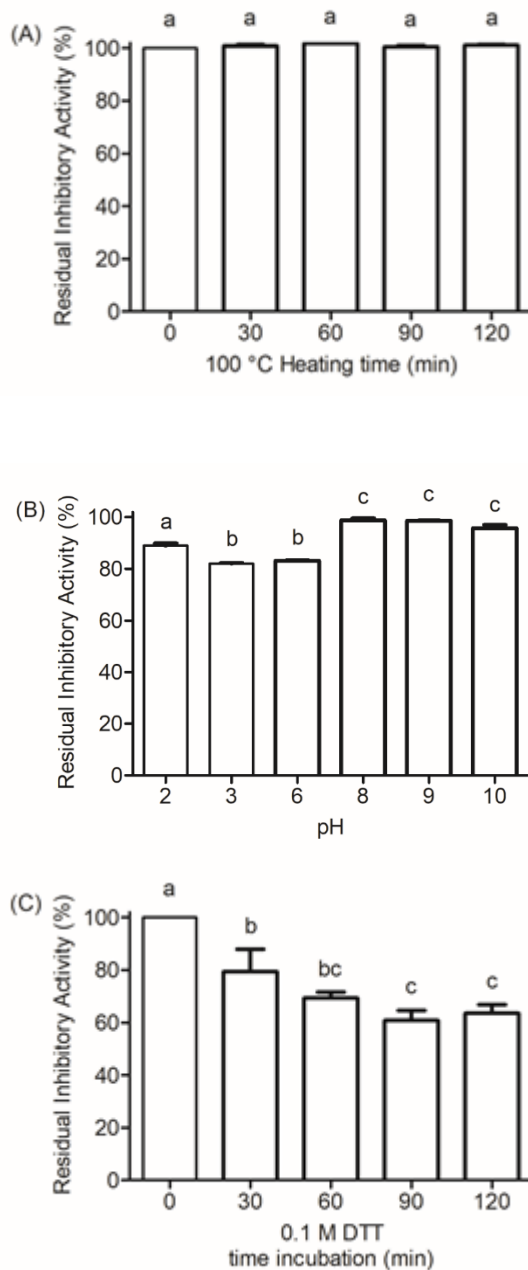


Fig. 2. Stability analysis of *ShTI*. (A) *ShTI* was exposed for different incubation periods (30 – 120 min.) at 100 °C. (B) *ShTI* was incubated at different pHs for 30 min. (C) *ShTI* was incubated with DTT (0.1 M) for different incubation periods (30 – 120 min.) at 37 °C. Residual trypsin inhibition activity of *ShTI* was determined based on each appropriate control. The values represent the means of three independent experiments (mean \pm standard deviation). Different letters indicate significant differences amongst the groups ($p < 0.05$).

3.3. IC₅₀ and kinetic study

According to the linear regression shown in figure 3A (equation: $y = 28.64x$; $R^2: 0.99$), the IC₅₀ of *Sh*TI toward trypsin was 1.74×10^{-8} M. Based on the titration curve (Fig. 3B), *Sh*TI inhibits trypsin in a molar ratio of 1:1. Lineweaver-Burk and Dixon plots were analyzed to determine the inhibition mechanism by which *Sh*TI inhibits the trypsin and the dissociation constant (K_i). In the double-reciprocal plot (Fig. 4A), increasing concentrations of *Sh*TI led to an increase in K_m with no effect in V_{max} , indicating a competitive mode of inhibition. In the Dixon plot (Fig. 4B), intersecting lines that converge above the x-axis were used to calculate K_i . The K_i value obtained for *Sh*TI was 1.79×10^{-8} M.

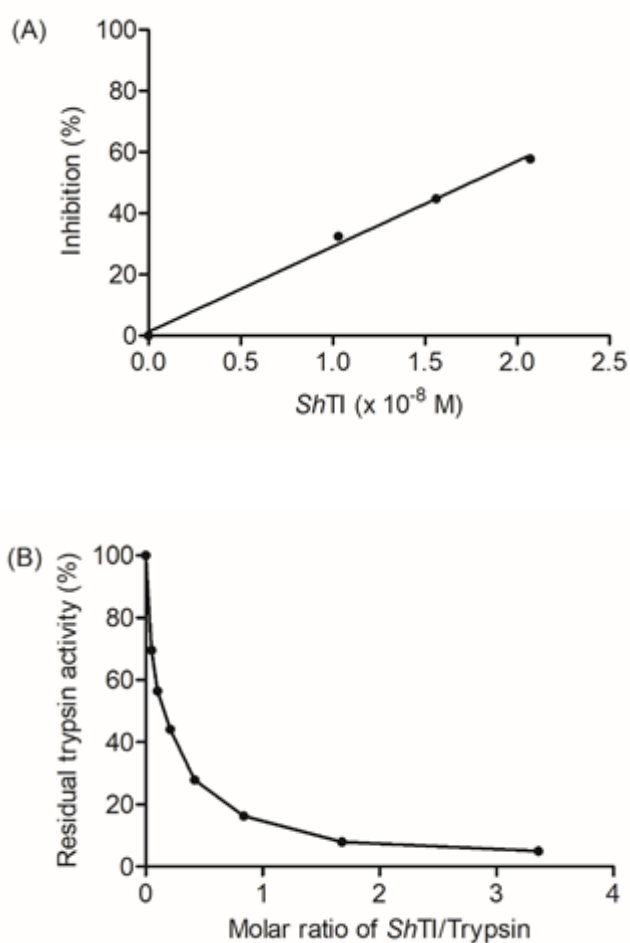


Fig. 3 Inhibitory activity of *ShTI* against bovine trypsin. (A) A trypsin inhibition curve was built by increasing amounts of *ShTI* at a fixed BApNA concentration (1.25×10^{-3} M). The IC_{50} of *ShTI* on trypsin was 1.74×10^{-8} M. (B). The titration curve reveals a 1:1 stoichiometric ratio of *ShTI*-trypsin complex formation.

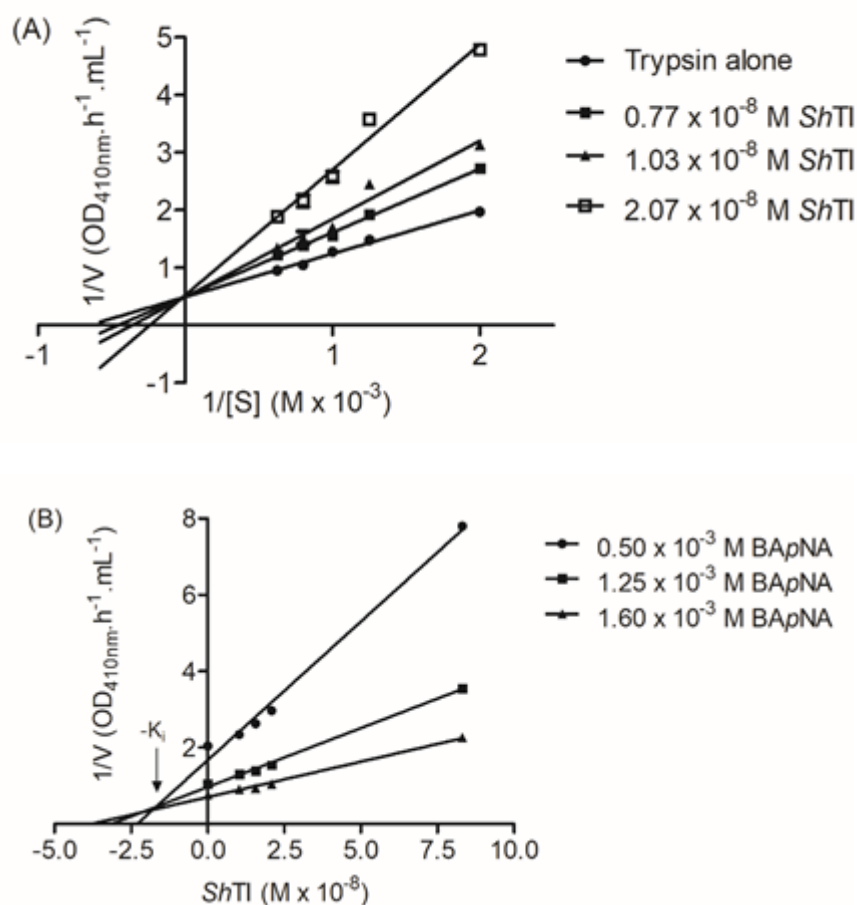


Fig. 4 Inhibition kinetics of *ShTI* toward bovine trypsin. (A) Lineweaver–Burk plot describes a competitive mechanism of inhibition by *ShTI* at various concentrations of BA_pNA (0.50 , 0.80 , 1.00 , 1.25 , and 1.60×10^{-3} M). (B) Dixon plot was employed to assess the dissociation constant (K_i) of *ShTI* (1.79×10^{-8} M).

3.4. Antibacterial activity of *ShTI*

ShTI exhibited antibacterial activity against all the three *S. aureus* strains showing MIC ranging from 15.83 to $19.03 \mu M$ (Table 2), being the lowest MIC value found to MRSA ATCC® 4996. In contrast, no significant effect was observed toward the Gram-negative bacteria tested. Moreover, *ShTI* also presented a synergic effect when combined with oxacillin, as depicted in Table 3. FICI values ranging from 0.20 to 0.33 were found.

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of *ShTI* against the standard and clinical bacterial strains.

Bacterial strains	MIC (μM)^b
<i>S. aureus</i> ATCC [®] 6538P	19.03
MRSA ATCC [®] 4996	15.83
Clinical <i>MRSA</i> ^a	19.03
<i>E. coli</i> ATCC [®] 8739	> 19.03
<i>P. aeruginosa</i> ATCC [®] 9027	> 19.03

^a Bacterial strain isolated from a biological sample.

^b The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) value was defined as the lowest concentration that produced no visible growth of bacterial cells in the plate well after 20 h of incubation.

Table 3. Synergistic activity between *ShTI* and oxacillin against *S. aureus*.

Bacterial strains	MIC (μM)				FICI ^a	Interpretation ^b
	Isolated		Combined			
	<i>ShTI</i>	Oxacillin	<i>ShTI</i>	Oxacillin		
<i>S. aureus</i> ATCC [®] 6538P	19.03	1.24	3.37	0.19	0.33	SYN
MRSA ATCC [®] 4996	15.83	39.85	1.66	4.18	0.20	SYN
Clinical MRSA	19.03	159.43	> 10.38	79.71	1.04	IND

^a: FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) was obtained using the following formula:

$$\text{FICI} = \frac{\text{MIC oxacillin combination}}{\text{MIC oxacillin isolated}} + \frac{\text{MIC } ShTI \text{ combination}}{\text{MIC } ShTI \text{ isolated}}$$

^b: Interpretation was carried out based on FICI values as follow:

FICI \leq 0.5: synergism (SYN); 0.5 < FICI \leq 4.0: indifferent (IND); FICI > 4.0: antagonistic (ANT).

Clinical *S. aureus* strain was not susceptible to the cotreatment with *ShTI* and oxacillin. Given MRSA ATCC® 4996 was the most sensitive strain to *ShTI*, this strain was selected to assess the antibacterial mode of action of *ShTI*. Fluorescence microscopy analysis was employed to observe membrane permeabilization and induction of ROS generation (Fig. 5). As expected, no fluorescence signal was observed for the control group (Fig. 5E and G). In contrast, *ShTI*-treated cells (MIC/2: 7.91 μ M) exhibited red fluorescence caused by the presence of propidium iodide, indicating cell membrane damage (Fig. 5F). Also, *ShTI* triggered ROS formation, as evidenced by bright green fluorescence detection (Fig. 5H).

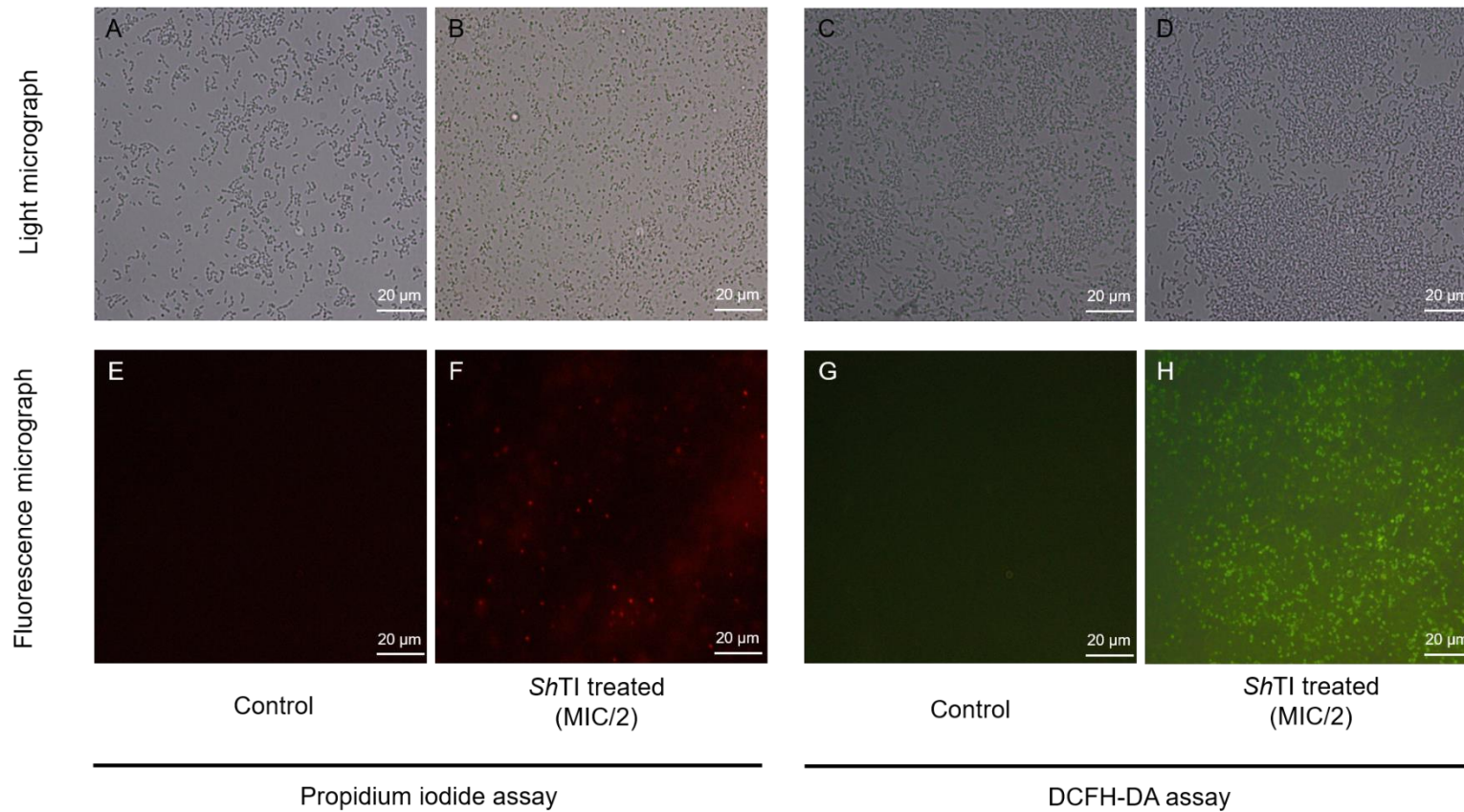


Fig. 5 Fluorescence microscopy of *S. aureus* cells after distilled water (control) or MIC/2 *ShTI* (7.91 μM) incubation. Propidium iodide uptake evidenced by red fluorescence indicates cell membrane permeabilization. Reactive oxygen species (ROS) generation was observed in *ShTI* treated cells as indicated by high green fluorescence. A, B, C e D images were recorded in the light field, while E, F, G e H images represent fluorescence micrographs. Bars = 20 μm.

To visualize ultrastructural changes in *S. aureus* cells, scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the effects of *ShTI* treatment (Fig 6). The untreated MRSA ATCC® 4996 cells did not exhibit cell morphology alteration, presenting smooth surface with an intact plasma membrane (Fig. 6A). However, after exposure to MIC/2 *ShTI* (7.91 μM), *S. aureus* cells presented surface ruptures with remarkable membrane pore formation, as observed for three different zones imaged (Fig. 6B – D).

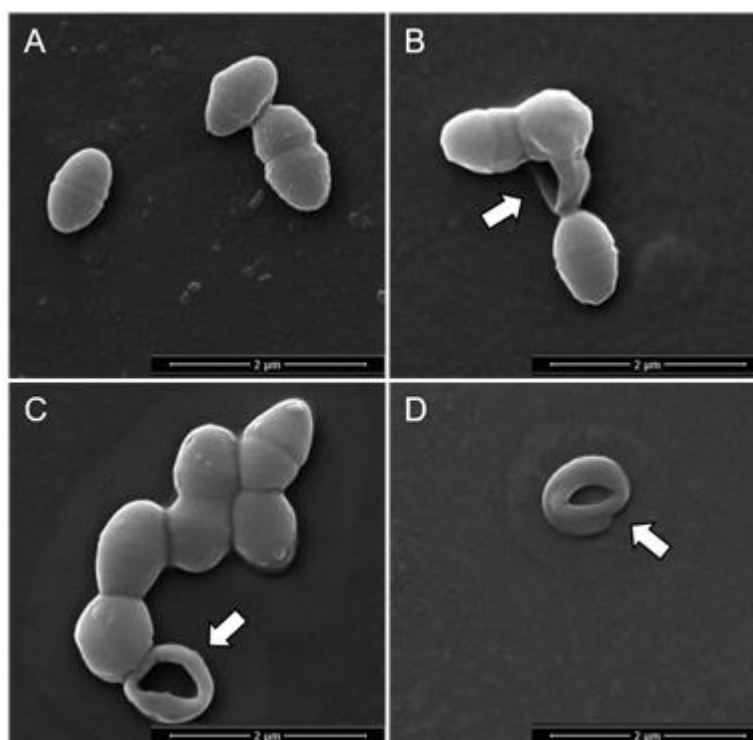


Fig. 6 Scanning electron microscopy (SEM) analysis of *S. aureus* cells exposed to distilled water (A, control) or MIC/2 *ShTI* (B – D, 7.91 μM). The untreated cells showed an intact cell morphology with well-defined and organized structures. *S. aureus* treated cells exhibited deleterious structural changes as evidenced by the presence of pores on the surface. Bars = 2 μm .

4. Discussion

Salvia hispanica L. seeds are a well-consumed food in different countries worldwide due to their numerous benefits to human health [32]. Its seeds are rich in nutraceutical compounds, resulting in high nutritional and health/medical values [13,32]. Today, their incorporation - whole or flour - into yogurt, salads, bread, cakes, and others is the main form of consumption. Overall, chia seeds provide a new opportunity for its consumption as a functional food and a source of safe bioactive compounds with benefits to human health [13]. In fact, *in vitro* biological activities of its digested protein fractions have been reported [16-19]. However, studies with isolated proteins from chia seeds are still scarce, despite their biotechnological applications. Among these compounds, protease inhibitors represent a large group of molecules in plant seeds with high agronomical, biotechnological, and biomedical added value [10-12], which has already been found in chia seeds, but remain unexplored [20].

Many biological activities have been reported for PPIs, such as antitumoral, antioxidant, anticoagulant, and insecticidal [12]. They have also been tested against osteoporosis, cardiovascular and inflammatory diseases, neurological disorders, and antimicrobial agents [33]. Therefore, PPIs offer a remarkable opportunity in drug discovery and development. In this sense - considering their diversity already identified (> 6700 plant-derived proteinaceous PIs) and those still unexplored – determining the potential effects of each novel PPI on human health is of great interest [11,33].

Initial *ShTI* purification steps involved heat treatment and affinity chromatography. These combined methods have been successfully employed for PPIs purification [31,34,35]. In fact, due to the high physicochemical stability commonly associated with PPIs, heat treatment is carried out at the initial purification steps with minimal loss of inhibitory activity. Such step allows eliminating thermolabile proteins while

concentrating the thermostable one of interest [31,34,35]. Affinity chromatography was also an efficient and convenient step for *ShTI* purification that allowed to remove the most contaminants present in HCE as observed in the tricine-SDS-PAGE profile. Still, a reverse phase C18 column was used in the purification process as a final step to obtain *ShTI*, showing a homogeneous single protein band after tricine-SDS-PAGE.

Previously, Souza et al. [20] isolated a trypsin inhibitor from commercial chia seed and flour in a protocol involving protein extraction, ammonium sulfate fractionation, and affinity chromatography. This protocol led to a low yield, whose soluble protein content of retained peak from trypsin Sepharose CNBr 4B was detected in a discrete amount (0.001 mg/mL) by the Bradford method. Because of this, it was not possible to determine the specific activity. Differently, the purification process applied in this work proved to be more efficient, achieving 0.19 % of *ShTI* protein yield based on the protein content present in the crude extract. This value is similar to those found in *RcTI* from *Ricinus communis* L. cake (0.1 %) [34] and *LzaBBI*, a Bowman-Birk protease inhibitor from *Luetzelburgia auriculata* seeds (0.2 %) [31].

After purification of *ShTI*, its physicochemical characterization was performed. *ShTI* showed an apparent molecular mass of approximately 11 kDa as evidenced by tricine-SDS-PAGE under non-reducing conditions, confirmed by mass spectrometry analysis (11.558 kDa). This molecular mass is close to those reported to other trypsin inhibitors, such as *JcTI* from *Jatropha curcas* seed cake (10.252 kDa) [25] and *RcTI* (14 kDa) [34]. Although *ShTI* was characterized as a glycoprotein, the presence of carbohydrate moieties covalently bound to trypsin inhibitor structures is not a consensus. While *JcTI* [25] and *AvTI* from *Acacia victoriae* seeds [36] were also classified as glycosylated proteins, *RcTI* [34] and *CITI* from *Cassia leiandra* seeds [37] did not show covalently linked carbohydrates.

PPIs are remarkably stable to temperature, shifts in pH, chemical agents (detergents, reductants, and oxidants), ionic strength, and proteolysis. Such characteristics are attributed to their compact tridimensional structure linked by disulfide bonds. Non-covalent interactions (e.g., hydrogen bonds and electrostatic interactions) also contribute to protein folding and overall stability [12,38]. Considering the importance of PPIs physical and chemical stability for biotechnological applications, *ShTI* stability was studied under prolonged time exposure to extremes of temperature (100 °C; 120 min), a wide range of pH, and in the presence of reducing agent (DTT).

ShTI proved to be thermostable and resistant to a wide range of pH. Due to the rigidity of the trypsin inhibitor scaffold, in the face of high-temperature treatment and an extensive range of pH, small changes in the tridimensional structure can be observed [12,38]. Molecules with physicochemical stability are of great interest to agricultural, industrial, or pharmaceutical applications. These compounds do not demand special storage conditions (e.g., cold or warm temperatures), formulations with stabilizers, preservation in buffers, and/or a non-oxidative environment. Furthermore, they can resist the gastrointestinal tract's adverse conditions, which is essential for the development of orally administered drugs [12]. When exposed to 0.1 M DTT treatments (30 – 120 min.), *ShTI* trypsin inhibitory activity was partially reduced (23 – 38% loss), reinforcing the involvement and importance of disulfide bridges in its native structure. Regarding the inhibition mechanism to targeted proteases, PPIs can act reversible or irreversible [11]. Also, distinct inhibition profiles and affinities can be found towards diverse peptidases. Stoichiometric studies with *ShTI* and trypsin indicated an inhibitor: enzyme molar ratio of 1:1, showing an IC_{50} of 1.74×10^{-8} M. The result suggests that *ShTI* presents a single reactive site trypsin complex formation as also observed for *IvTI* (*Inga vera* trypsin inhibitor) [39] and *EaTI* (*Entada acaciifolia* trypsin inhibitor) [40].

Kinetic studies of trypsin by *ShTI* described a competitive inhibition mode of action with a low K_i value of 1.79×10^{-8} M, indicating high affinity towards trypsin. Different degrees of interaction have been determined for the trypsin and PPIs relationship. For instance, a similar affinity toward trypsin has been described for *RcTI* (1.90×10^{-8} M) [34], while *EaTI* (1.75×10^{-9} M) showed a more potent degree of interaction [40]. Notably, the low K_i value found in PPIs has prompted their use in pre-clinical studies, highlighting their potential as therapeutic agents in drug development [33]. In this sense, *ShTI* may also be included as a promising candidate to be exploited.

In the biomedical field, extensive studies have revealed the antibacterial activity of PPIs alone [25,31,39,41]. However, strategies involving their effects in drug combination therapies have not been explored. Therefore, we investigated *ShTI* antibacterial properties independently and in the simultaneous treatment with oxacillin, a conventional antibiotic in clinical practice.

This study found that *ShTI* showed selective activity against *S. aureus*, including MRSA strains (MICs range from 15.83 to 19.03 μ M). Unlike, no significant inhibitory effect was observed against Gram-negative bacteria. Generally, the antibacterial properties of PPIs are attributed to their ability to inhibit the activity of the proteases from the microorganisms, resulting in antinutritional outcomes [25,41]. In addition, perturbations of the membrane permeability of the pathogens have also been reported [31,41].

Staphylococcus aureus represents an important Gram-positive human pathogen, being involved in most nosocomial and community-acquired infections worldwide. In the past, β -lactam antibiotics have been the first line for *S. aureus* infection treatment, including oxacillin, a second-generation penicillin. However, the emergence of MRSA made early generation β -lactam antibiotics no longer be used clinically [4,42]. In this

context, the World Health Organization (WHO) has issued a global priority pathogens list, including MRSA as a high priority group for research and development of new therapeutics [43]. Here, *ShTI* interacted synergistically with oxacillin against sensitive and MRSA strains. Several advantages have been attributed to combination therapies over monotherapy, such as: broaden the microorganisms' spectrum susceptible to available drugs, decrease the risk of resistance development, reduce therapeutic doses and treatment durations, as well as minimize adverse effects [42].

To evaluate the antibacterial mode of action of *ShTI*, MRSA-treated cells were analyzed under fluorescence and scanning electron microscopy. Its ability to disrupt cell membranes was demonstrated as indicated by intracellular propidium iodide detection. Propidium iodide interacts with DNA in a complex that emits red fluorescence. However, as a membrane-impermeable fluorescent dye, it only can internalize cells with compromised plasma membranes. Disbalance into membrane permeabilization can lead to cytoplasmic content loss, resulting in cell death [31]. Indeed, *ShTI* pore-forming capacity was confirmed by SEM.

Martins *et al.* [31] estimated a protein size of 3.62 nm in diameter of *LzaBBI* (17.3 kDa) by using a theoretical tool (http://www.calctool.org/CALC/prof/bio/protein_size). At the same platform, *ShTI* showed a theoretical diameter of 3.15 nm. Thus, considering the porous structure of Gram-positive bacteria cell wall dimensions of 40 – 80 nm, it is reasonable to assume that *ShTI* can reach and interact with *S. aureus* plasma membrane disturbing its surface, as also suggested by Martins *et al.* [31]. Notably, the cell wall of Gram-negative bacteria possesses an outer membrane that prevents the passage of some antibacterial compounds, which are not present in Gram-positive microorganisms [1]. This intrinsic resistance attributed to the cell wall structure might explain the particular activity found to *ShTI* against those pathogens.

ShTI was also able to induce the production of reactive oxygen species (ROS) in *S. aureus*. Overproduction of ROS can lead to a toxic environment for microorganisms, in which damage to proteins, DNA, and lipids may occur, finally resulting in cell death. Although other PPIs have also been involved in inducing ROS accumulation in bacterial and fungi cells [9,31], their mechanisms are not well understood. In yeast cells, it has been proposed that ROS overproduction results from the activation of mitochondria to assure the increased energetic metabolism necessary to repair and maintain membrane cell physiological function, which was previously damaged [9]. Taken together, considering the mode of action of oxacillin (cell wall biosynthesis inhibition) and *ShTI*, it is reasonable to assume that oxacillin may perturb cell wall structure, which in turn improves the entry and interactions between *ShTI* and the plasma membrane, thereby generating the synergistic effects observed. Thus, considering the potential therapeutic application of *ShTI* in treating infections caused by *S. aureus* alone or in drug combination therapy, its toxicological assessment and *in vivo* responses deserve further studies.

5. Conclusion

Herein a trypsin inhibitor from *S. hispanica* L. seeds was purified and characterized. *ShTI* shares remarkable stability to high temperature and a broad pH range usually found in PPIs, which seems to be involved with the presence of disulfide bridges. *ShTI* displayed antibacterial activity towards sensitive and resistant strains of *S. aureus* via oxidative stress by ROS overproduction and membrane permeabilization disbalance by membrane cell pore formation. Furthermore, *ShTI* improved the therapeutic potency of oxacillin against *S. aureus*, including an MRSA strain. To the best of our knowledge, this is the first attempt to exploit a synergistic activity of a PPI in a cotreatment with a

conventional antibiotic (oxacillin). Thus, *ShTI* represents a novel candidate to be used as a therapeutic agent for bacterial management of *S. aureus* infections.

CRedit authorship contribution statement

Adson Ávila de Souza: conceptualization, methodology design, validation, investigation, data curation, formal analysis, writing - original draft and writing - review & editing. **Adrienne Maia Lima:** investigation. **Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa:** funding acquisition, writing - original draft and writing - review & editing. **Francisca Cristiane Nogueira:** investigation. **José Carlos do Sacramento Neto:** investigation. **Lucas Pinheiro Dias:** research and formal analysis. **Nadine Monteiro Salgueiro Araújo:** investigation and formal analysis. **Celso Shiniti Nagano:** investigation, proper analysis, funding acquisition, writing - original draft and writing - review & editing. **Hélio Vitoriano Nobre Júnior:** funding acquisition, writing - original draft and writing - review & editing. **Cecília Rocha da Silva:** funding acquisition, writing - original draft and writing - review & editing. **Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá:** investigation and formal analysis. **João Batista de Andrade Neto:** writing - original draft and writing - review & editing. **Fátima Daiana Dias Barroso:** investigation and formal analysis. **Maria Elisabete Amaral de Moraes:** funding acquisition, writing - original draft and writing - review & editing. **Hermógenes David de Oliveira:** conceptualization, formal analysis, data curation, supervision, funding acquisition, writing - original draft and writing - review & editing.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian institutions CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), CAPES (Coordination of Improvement of Higher

Education, FUNCAP (Ceará Research Foundation), and UFC (Federal University of Ceará), for physical installation and financial support of this research. We also gratefully acknowledge the Center of Advanced Microscopy and Microanalysis (Central Analytical Facility) at the Federal University of Ceará, Brazil, for the Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] W. Wang, M.I. Arshad, M. Khurshid, M.H. Rasool, M.A. Nisar, M.A. Aslam, *et al.*, **Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis**, *Infect. Drug Resist.* 11 (2018) 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
- [2] C. L. Ventola, **The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats**. *Pharm. Ther.* 40 (2015) 277-283.
- [3] M. A. Abushaheen, Muzaheed, A. J. Fatani, M. Alosaimi, W. Mansy, M. George, *et al.*, **Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance**. *Disease-a-Month*, 66 (2020) 100971. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>.
- [4] M. Vestergaard, D. Frees, H. Ingmer, **Antibiotic Resistance and the MRSA Problem**, *Microbiol. Spectr.* 7 (2019) 747-765. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018>.
- [5] B.R. da Cunha, L.P. Fonseca, C.R.C. Calado, **Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go?**, *Antibiotics.* 8 (2019) 45-66. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045>.
- [6] M.S. Butler, D.L. Paterson, **Antibiotics in the clinical pipeline in October 2019**, *J. Antibiot. (Tokyo).* 73 (2020) 329–364. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0291-8>.
- [7] C. Ghosh, P. Sarkar, R. Issa, J. Haldar, **Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance**, *Trends Microbiol.* 27 (2019) 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>.

- [8] H. Chandra, P. Bishnoi, A. Yadav, B. Patni, A.P. Mishra, A.R. Nautiyal, **Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials - A review**, *Plants*. 6 (2017) 457–462.
<https://doi.org/10.3390/plants6020016>.
- [9] C.F.R. de Oliveira, C.T. Oliveira, G.B. Taveira, E. de Oliveira Mello, V.M. Gomes, M.L.R. Macedo, **Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium timbouva* with activity against *Candida* species**, *Int. J. Biol. Macromol.* 119 (2018) 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.034>.
- [10] M. Clemente, M.G. Corigliano, S.A. Pariani, E.F. Sánchez-López, V.A. Sander, V.A. Ramos-Duarte, **Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming**, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1345–1366.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061345>.
- [11] R. Hellinger, C.W. Gruber, **Peptide-based protease inhibitors from plants**, *Drug Discov. Today*. 24 (2019) 1877–1889.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.026>.
- [12] J. Cotabarren, D. Lufrano, M.G. Parisi, W.D. Obregón, **Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review**, *Plant Sci.* 292 (2020) 110398.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398>.
- [13] M. Grancieri, H.S.D. Martino, E. Gonzalez de Mejia, **Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review**, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18 (2019) 480–499.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12423>.

- [14] M.R. Sandoval-Oliveros, O. Paredes-López, **Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.)**, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 193–201. <https://doi.org/10.1021/jf3034978>.
- [15] Y.P. Timilsena, R. Adhikari, C.J. Barrow, B. Adhikari, **Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds**, *Food Chem.* 212 (2016) 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.017>.
- [16] J.E. Aguilar-Toalá, A.J. Deering, A.M. Liceaga, **New Insights into the Antimicrobial Properties of Hydrolysates and Peptide Fractions Derived from Chia Seed (*Salvia hispanica* L.)**, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 12 (2020) 1571–1581. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09653-8>.
- [17] M. Grancieri, H.S.D. Martino, E. Gonzalez de Mejia, **Digested total protein and protein fractions from chia seed (*Salvia hispanica* L.) had high scavenging capacity and inhibited 5-LOX, COX-1-2, and iNOS enzymes**, *Food Chem.* 289 (2019) 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.036>.
- [18] J. Cotabarren, A.M. Rosso, M. Tellechea, J. García-Pardo, J.L. Rivera, W.D. Obregón, *et al.*, **Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain**, *Food Chem.* 274 (2019) 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061>.
- [19] M.R. Segura-Campos, I.M. Salazar-Vega, L.A. Chel-Guerrero, D.A. Betancur-Ancona, **Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods**, *LWT - Food Sci. Technol.* 50 (2013) 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.017>.

- [20] A.P.A. de Souza, L.M.A.M. Nascimento, V.C.O. de Lima, F.M.C. de Carvalho, E.A. dos Santos, A.H. de A. Morais, **Atividade Antitriptica Em Semente E Produto Alimentício De Chia (*Salvia hispanica* L.)**, DEMETRA Aliment. Nutr. Saúde. 12 (2017) 319–332. <https://doi.org/10.12957/demetra.2017.25636>.
- [21] M. M. Bradford, **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- [22] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, **The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin**, Arch. Biochem. Biophys. 95 (1961) 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X).
- [23] H. Schägger, G. von Jagow, **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa**, Anal. Biochem. 166 (1987) 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
- [24] R.M. Zacharius, T.E. Zell, J.H. Morrison, J.J. Woodlock, **Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels**. Anal. Biochem. 30 (1969), 148–152. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90383-2).
- [25] H.P.S. COSTA, J.T.A. Oliveira, D.O.B. Sousa, J.K.S. Morais, F.B. Moreno, A.C.O. Monteiro-Moreira, *et al.*, **JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment**. Front. Microbiol. 5 (2014) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00005>.

- [26] H. Lineweaver, D. Burk, **The Determination of Enzyme Dissociation Constants**. J. Am. Chem. Soc. 56 (1934) 658–666.
<https://doi.org/10.1021/ja01318a036>.
- [27] M. DIXON, **The determination of enzyme inhibitor constants**. Biochem. J. 55 (1953) 170–171. <https://doi.org/10.1042/bj0550170>.
- [28] Clinical and Laboratory Standards Institute, **Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard M07-A10, 10th ed., Wayne, PA. 2015.
- [29] B. Liu, H. Huang, Z. Yang, B. Liu, S. Gou, C. Zhong, *et al.*, **Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo* by intermolecular triazole bridge strategy**, Peptides. 88 (2017) 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.12.016>.
- [30] F.C. Odds, **Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them**, J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003) 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>.
- [31] T.F. Martins, I.M. Vasconcelos, R.G.G. Silva, F.D.A. Silva, P.F.N. Souza, A.L.N. Varela, *et al.*, **A Bowman-Birk Inhibitor from the Seeds of *Luetzelburgia auriculata* Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth by Promoting Severe Cell Membrane Damage**, J. Nat. Prod. 81 (2018) 1497–1507.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00545>.
- [32] L.A. Muñoz, A. Cobos, O. Diaz, J.M. Aguilera, **Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food**, Food Rev. Int. 29 (2013) 394–408.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2013.818014>.

- [33] S. Srikanth, Z. Chen, **Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy**, *Front. Pharmacol.* 7 (2016).
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00470>.
- [34] R.G.G. Silva, I.M. Vasconcelos, A.J.U.B. Filho, A.F.U. Carvalho, T.M. Souza, D.M.F. Gondim, *et al.*, **Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae**, *Ind. Crops Prod.* 70 (2015) 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.058>.
- [35] J. Cotabarren, D.J. Broitman, E. Quiroga, W.D. Obregón, **GdTI, the first thermostable trypsin inhibitor from *Geoffroea decorticans* seeds. A novel natural drug with potential application in biomedicine**, *Int. J. Biol. Macromol.* 148 (2020) 869–879. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.214>.
- [36] K.Y. Ee, J. Zhao, A. Rehman, S. Agboola, **Glycosylation, amino acid analysis and kinetic properties of a major Kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Bentham seeds**, *Food Chem.* 129 (2011) 1224–1227.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.026>.
- [37] L.P. Dias, J.T.A. Oliveira, L.C.B. Rocha-Bezerra, D.O.B. Sousa, H.P.S. Costa, N.M.S. Araujo, *et al.*, **A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *Aedes aegypti***, *Process Biochem.* 57 (2017) 228–238.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.015>.
- [38] R.S. Joshi, M. Mishra, C.G. Suresh, V.S. Gupta, A.P. Giri, **Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine**

proteinase inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 5087–5094.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.019>.

[39] C. Da Silva Bezerra, C.F.R. De Oliveira, O.L.T. Machado, G.S.V. De Mello, M.G. Da Rocha Pitta, M.J.B. De Melo Rêgo, *et al.*, **Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor**,

Process Biochem. 51 (2016) 792–803. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.008>.

[40] C.F.R. De Oliveira, I.M. Vasconcelos, R. Aparicio, M.D.G.M.H. Freire, P.A.

Baldasso, S. Marangoni, *et al.*, **Purification and biochemical properties of a**

Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds, *Process*

Biochem. 47 (2012) 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.022>.

[41] A. Ben Bacha, I. Jemel, N.M.S. Moubayed, I. Ben Abdelmalek, **Purification and characterization of a newly serine protease inhibitor from *Rhamnus frangula***

with potential for use as therapeutic drug, *3 Biotech.* 7 (2017) 1–13.

<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0764-z>.

[42] B.W. Miller, J.P. Torres, J.O. Tun, M.S. Flores, I. Forteza, G. Rosenberg, *et al.*, **Synergistic anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity**

and absolute stereochemistry of 7,8-dideoxygriseorhodin C, *J. Antibiot. (Tokyo)*.

73 (2020) 290–298. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0275-8>.

[43] World Health Organization. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.** 1–7 (2017).

REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 1-21, 2020.
- ADEFEGHA, S.A. Antibiotics and Drug Pharmacology. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, Telangana, v. 3, n. 11, p. 43–49, 2019.
- AFROZ, M. *et al.* Ethnobotany and Antimicrobial Peptides From Plants of the Solanaceae Family: An Update and Future Prospects. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 11, p. 565-580, 2020.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E.; LICEAGA, A. M. Identification of chia seed (*Salvia hispanica* L.) peptides with enzyme inhibition activity towards skin-aging enzymes. **Amino Acids**, Viena, v. 52, n. 8, p. 1149–1159, 2020.
- ALMEIDA, R. G. *et al.* Screening and isolation of antibacterial proteinaceous compounds from flower tissues: Alternatives for treatment of healthcare-associated infections. **Tang [Humanitas Medicine]**, Seul, v. 4, n. 1, p. 51-58, 2014.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J. *et al.* Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: an updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, Munique, v. 90, p. 1-16, 2021.
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 1, n. dec, p. 1–7, 2010.
- ASLAM, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, Londres, v. 11, p. 1645-1658, 2018.
- AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, Londres, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2017.
- BACHA, A. B. *et al.* Purification and characterization of a newly serine protease inhibitor from *Rhamnus frangula* with potential for use as therapeutic drug. **3 Biotech**, Berlin, v. 7, n. 2, p. 1–13, 2017.
- BANERJEE, D. *et al.* A Review on Basic Biology of Bacterial Biofilm Infections and Their Treatments by Nanotechnology-Based Approaches. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 243–259, 2019.
- BARREIRO, C.; BARREDO, J. L. Worldwide Clinical Demand for Antibiotics: Is It a Real Countdown? **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 2296, p. 3–15, 2021.
- BATEMAN, K. S.; JAMES, M.N.G. Plant Protein Proteinase Inhibitors: Structure and Mechanism of Inhibition. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 341–347, 2011.

BENDRE, A. D.; RAMASAMY, S.; SURESH, C. G. Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v. 113, n. 2017, p. 933–943, 2018.

BENKO-ISEPPON, A. M. *et al.* Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 181–188, 2010.

BEZERRA, C. DA S. *et al.* Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochemistry**, Londres, v. 51, n. 6, p. 792–803, 2016.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soybean. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 87, p. 281–284, 1963.

BOTTERY, M. J.; PITCHFORD, J. W.; FRIMAN, V. P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. **ISME Journal**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 939–948, 2021.

BOWMAN, D.E. Differentiation of soybean antitryptic factor, **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 63, p. 547–550, 1946.

BROWNE, K. *et al.* A new era of antibiotics: the clinical potential of antimicrobial peptides. **International Journal of Molecular Science**, Basileia, v. 21, p. 7047–7070, 2020.

CÂNDIDO, E.S. *et al.* Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, Rockville, v. 25, n. 10, p. 3290–3305, 2011.

CÂNDIDO, E.S. *et al.* The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. **Peptides**, Nova Iorque, v. 55, p. 65–78, 2014.

CAMPOS, M. L. *et al.* A structural perspective of plant antimicrobial peptides. **Biochemical Journal**, Londres, v. 475, n. 21, p. 3359–3375, 2018.

CARVALHO, A. DE S. *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v. 75, p. 402–408, 2015.

CESUR, S.; DEMIRÖZ, A. P. Antibiotics and the Mechanisms of Resistance to Antibiotics. **Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 138–142, 2013.

CHANDRA, H. *et al.* Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials - A review. **Plants**, Basileia, v. 6, n. 2, p. 457–462, 2017.

CISNEROS, J. S. *et al.* Purification and characterization of a novel trypsin inhibitor from *Solanum tuberosum* subsp. andigenum var. overa: Study of the expression

levels and preliminary evaluation of its antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v. 158, p. 1279–1287, 2020.

CLEMENTE, M. *et al.* Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming. **International Journal of Molecular Sciences**, Basileia, v. 20, n. 6, p. 1345–1366, 2019.

COELHO, M. S. *et al.* Peptides from Chia Present Antibacterial Activity and Inhibit Cholesterol Synthesis. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 73, n. 2, p. 101–107, 2018.

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**, Lausanne, v. 5, p. 1–12, 2014.

COTABARREN, J. *et al.* Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. **Food Chemistry**, Barking, v. 274, p. 848–856, 2019.

COTABARREN, J. *et al.* Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, Limerick, v. 292, p. 1-24, 2020.

CUNHA, B. R.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? **Antibiotics**, Basileia, v. 8, n. 2, p. 1–21, 2019.

DABHADE, A. R.; MOKASHE, N. U.; PATIL, U. K. Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv. **Process Biochemistry**, Londres, v. 51, n. 5, p. 659–674, 2016.

DADGOSTAR, P. Antimicrobial resistance: implications and costs. **Infection and Drug Resistance**, Auckland, v. 12, p. 3903–3910, 2019.

DIB, H. X. *et al.* Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 201, n. 2, p. 223–233, 2018.

DI SAPIO, O. *et al.* Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L.(Lamiaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Lampa, v. 11, n. 3, p. 249-268, 2012.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdã, v. 53, n. 4, p. 371–382, 2019.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, Auckland, v. 6, p. 25–64, 2014.

FERNANDES, P. The global challenge of new classes of antibacterial agents: an industry perspective. **Current opinion in pharmacology**, Oxford, v. 24, p. 7-11, 2015.

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 133, p. 152–163, 2017.

GAJDÁCS, M. *et al.* Antimicrobial resistance in the context of the sustainable development goals: A brief review. **European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 71–82, 2021.

GAMAGE, R. N. N.; KUMARI, K. D. K. P. A Review on Therapeutic Potential of Protease Inhibitors from Medicinal Plants. **Asian Journal of Research in Biochemistry**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 1–11, 2019.

GAZEM, R. A. A.; CHANDRASHEKARIAH, S. A. Pharmacological Properties of *Salvia hispanica* (Chia) Seeds : a Review. **Journal of Critical Reviews**, Kuala Lumpur, v. 3, n. 3, p. 63–67, 2016.

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

GOULD, K. Antibiotics: From prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 71, n. 3, p. 572–575, 2016.

GRANCIERI, M.; MARTINO, H. S. D.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 18, n. 2, p. 480–499, 2019a.

GRANCIERI, M.; MARTINO, H. S. D.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Total Protein and Protein Fractions Digests Reduce Biomarkers of Inflammation and Atherosclerosis in Macrophages In Vitro. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 63, n. 19, p. 1–15, 2019b.

GROSSE-HOLZ, F. M.; VAN DER HOORN, R. A. L. Juggling jobs: Roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 210, n. 3, p. 794–807, 2016.

GUEVARA-CRUZ, M. *et al.* A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. **Journal of Nutrition**, Oxford, v. 142, n. 1, p. 64–69, 2012.

GUILLÉN-CHABLE, F. *et al.* Antibacterial activity and phospholipid recognition of the recombinant defensin J1-1 from *Capsicum* genus. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 136, p. 45–51, 2017.

HELLINGER, R.; GRUBER, C. W. Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 1877–1889, 2019.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. *et al.* Chia (*Salvia hispanica*): Nutraceutical Properties and Therapeutic Applications. **Proceedings**, Basileia, v. 53, n. 1, p. 17–22, 2020.

KNEZ HRNČIČ, M. K. *et al.* Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.): An overview-phytochemical profile, isolation methods, and application. **Molecules**, Basileia, v. 25, n. 1, p. 11–30, 2020.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, Nova Iorque, v. 51, p. 72–80, 2019.

JAMAL, M. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, Taipei, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.

KATUNZI-KILEWELA, A. *et al.* Nutritional, health benefits and usage of chia seeds (*Salvia hispanica*): A review. **African Journal of Food Science**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 48–59, 2021.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 8, n. 6, p. 423–435, 2010.

KULCZYŃSKI, B. *et al.* The chemical composition and nutritional value of chia seeds—Current state of knowledge. **Nutrients**, Basileia, v. 11, n. 6, p. 1242-1258, 2019.

LAPARRA, J. M.; HAROS, C. M. Plant seed protease inhibitors differentially affect innate immunity in a tumor microenvironment to control hepatocarcinoma. **Food & Function**, Cambridge, v. 10, n. 7, p. 4210–4219, 2019.

LASKOWSKI, J.R.; KATO, M.I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 49, n. 1, p. 593-626, 1980.

LEI, J. *et al.* The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 2019.

MAHLAPUU, M. *et al.* Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1–12, 2016.

MANAGE, P. M.; LIYANAGE, G. Y. **Antibiotics induced antibacterial resistance**. [s. l.]: Elsevier Inc., 2019.

MARAQA, N. F. *et al.* Higher occurrence of hepatotoxicity and rash in patients treated with oxacillin, compared with those treated with nafcillin and other commonly used antimicrobials. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n. 1, p. 50–54, 2002.

MARATHE, K. R. *et al.* **Protease Inhibitors and Their Applications: An Overview**.

1. ed. [s. l.]: Elsevier B.V., 2019.

MARTINS, T. F. *et al.* A Bowman-Birk Inhibitor from the Seeds of *Luetzelburgia auriculata* Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth by Promoting Severe Cell Membrane Damage. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 81, n. 7, p. 1497–1507, 2018.

MATAMOROS-RECIO, A. *et al.* Understanding the Antibacterial Resistance: Computational Explorations in Bacterial Membranes. **ACS Omega**, Washington, v. 6, n. 9, p. 6041–6054, 2021.

MEHMOOD, S. *et al.* Model prediction of a kunitz-type trypsin inhibitor protein from seeds of *Acacia nilotica* L. With strong antimicrobial and insecticidal activity. **Turkish Journal of Biology**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 188–200, 2020.

MIGLIAVACCA, R. A. *et al.* O cultivo da chia no Brasil: futuro e perspectivas. **Journal of Agronomic Sciences**, Maringá, v. 3, n. especial, p.161-179, 2014.

MOELLERING, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdã, v. 37, n. 1, p. 2–9, 2011.

MOHAN, M.; KUMARI, M.; ELYAS, K. K. Antifungal and Antimicrobial Properties of a Purified Protease Inhibitor from *Macrotyloma uniflorum* Seeds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 18, n. 29, p. 2491–2501, 2018.

MUHAMMAD, M. H. *et al.* Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, p. 1–20, 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 481-511, 2016.

MUÑOZ, L. A. *et al.* Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. **Food Reviews International**, Londres, v. 29, n. 4, p. 394–408, 2013.

NAWROT, R. *et al.* Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 59, n. 3, p. 181–196, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2018.

NICOLAOU, K. C.; RIGOL, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **Journal of Antibiotics**, Tóquio, v. 71, n. 2, p. 153–184, 2018.

NIEMAN, D. C. *et al.* Chia seed supplementation and disease risk factors in overweight women: A metabolomics investigation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, Nova Iorque, v. 18, n. 7, p. 700–708, 2012.

NIEMAN, D. C. *et al.* No positive influence of ingesting chia seed oil on human running performance. **Nutrients**, Basileia, v. 7, n. 5, p. 3666–3676, 2017.

NIZAR, F.M. *et al.* Higher Occurrence of Hepatotoxicity and Rash in Patients Treated with Oxacillin, Compared with Those Treated with Nafcillin and Other Commonly Used Antimicrobials. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, p. 50 – 54, 2002.

OLIVEIRA, C.F.R. de *et al.* Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium timbouva* with activity against *Candida* species. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v. 119, p. 645-653, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. Geneva: WHO, 2017.

OYALO, J.; MBURU, M. Health Potential of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds-Derived α -linoleic Acid and α -linolenic Acids : A Review. **European Journal of Agriculture and Food Sciences**, Bruxelas, v. 3, n. 4, p. 5–10, 2021.

PABLO-OSORIO, B. SAN; MOJICA, L.; URÍAS-SILVAS, J. E. Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Pepsin Hydrolysates Inhibit Angiotensin-Converting Enzyme by Interacting with its Catalytic Site. **Journal of Food Science**, Malden, v. 84, n. 5, p. 1170–1179, 2019.

PIEROZAN, M. K. *et al.* Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 764–770, 2009.

QUINTAL-BOJÓRQUEZ, N. DEL C. *et al.* Anticancer activity of protein fractions from chia (*Salvia hispanica* L.). **Journal of Food Science**, Malden, v. 86, p. 2861–2871, 2021.

RAWLINGS, N. D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. **Biochimie**, Paris, v. 92, n. 11, p. 1463–1483, 2010.

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**, Oxford, v. 46, n. D1, p. 624–632, 2018.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemical Journal**, Londres, v. 378, n. 3, p. 705–716, 2004.

RUSTGI, S. *et al.* The complex world of plant protease inhibitors: Insights into a Kunitz-type cysteine protease inhibitor of *Arabidopsis thaliana*. **Communicative and Integrative Biology**, Londres, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018.

SHWAIKI, L. N.; LYNCH, K. M.; ARENDT, E. K. Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application – A focus on synthetic peptides. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 112, p. 312–324, 2021.

SAMRITI; BISWAS, R.; BISWAS, K. Plant antimicrobial peptides: a novel approach against drug resistant microorganisms. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Panchkula, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2018.

SANDOVAL-OLIVEROS, M. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 1, p. 193–201, 2013.

SANTAMARÍA, M. E. *et al.* Plant protein peptidase inhibitors: An evolutionary overview based on comparative genomics. **BMC Genomics**, Londres, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.

SATHEESH, L. S.; MURUGAN, K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L .) Voigt. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Delhi, v. 49, p. 366-374, 2011.

SATPATHY, S. *et al.* Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 7, p. 56–66, 2016.

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

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2019.

SIDDIQUI, A. A. *et al.* Role of natural products in drug discovery process. **International Journal of Drug Development and Research**, Londres, v. 6, n. 2, p. 172–204, 2014.

SILVA, L. A. *et al.* Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.) Consumption and Lipid Profile: A Systematic Review and Meta-analysis. **Food & Function**, Cambridge, v. 12, p. 8835–8849, 2021.

SILVA, R. G. G. *et al.* Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 70, p. 48–55, 2015.

SINGH, S. *et al.* Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 186–201, 2020.

SOSA-BALDIVIA, A. *et al.* The chia (*Salvia hispanica*): Past, present and future of an ancient Mexican crop. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 12, n. 10, p. 1626–1632, 2018.

SOUZA, A. A. *et al.* Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays

antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Biochimie**, Paris, v. 149, p. 9–17, 2018.

SOUZA, A. P. A. de *et al.* Atividade antitriptica em semente e produto alimentício de chia (*Salvia hispanica* L.). **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 319–332, 2017.

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 7, p. 470–489, 2016.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 35, n. 1, p. 256–277, 2021.

STACHELEK, M. *et al.* Overcoming bacterial resistance to antibiotics: The urgent need – A review. **Annals of Animal Science**, Varsóvia, v. 21, n. 1, p. 63–87, 2021.

TIMILSENA, Y. P. *et al.* Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. **Food Chemistry**, Barking v. 212, p. 648–656, 2016.

TOSCANO, L. T. *et al.* Chia Flour Supplementation Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 392–398, 2014.

ULLAH, R. *et al.* Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 1750–1758, 2016.

VERDEROSA, A. D.; TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 7, p. 1–17, 2019.

VUKSAN, V. *et al.* Salba-chia (*Salvia hispanica* L.) in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized controlled trial. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Milão, v. 27, n. 2, p. 138–146, 2017a.

VUKSAN, V. *et al.* Comparison of flax (*Linum usitatissimum*) and Salba-chia (*Salvia hispanica* L.) seeds on postprandial glycemia and satiety in healthy individuals: A randomized, controlled, crossover study. **European Journal of Clinical Nutrition**, Londres, v. 71, n. 2, p. 234–238, 2017b.

WARGO, K. A.; EDWARDS, J. D. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. **Journal of Pharmacy Practice**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 573–577, 2014.

YACOUB, T. *et al.* Antimicrobials from venomous animals: An overview. **Molecules**, Basileia, v. 25, n. 10, p. 2402–2421, 2020.

YILI A. *et al.* Antimicrobial Peptides from the Plants. **Journal of Pharmacy and**

Pharmacology, Londres, v. 2, n. 11, p. 627–641, 2014.

ZHAO, J.; EE, K. Y. **Protease inhibitors**. [s. l.]: Elsevier, 2018.

APÊNDICE A – FIGURAS PRESENTES NO ARTIGO DA TESE

Graphical – abstract	50
Figure 1 – Chromatogram profiles and polyacrylamide gel electrophoresis of <i>ShTI</i> purification.....	63
Figure 2 – Stability analysis of <i>ShTI</i>	66
Figure 3 – Inhibitory activity of <i>ShTI</i> against bovine trypsin.....	68
Figure 4 – Inhibition kinetics of <i>ShTI</i> toward bovine trypsin.....	69
Figure 5 – Fluorescence microscopy of <i>S. aureus</i> cells after distilled water (control) or MIC/2 <i>ShTI</i> (7.91 µM) incubation.....	73
Figure 6 – Scanning electron microscopy (SEM) analysis of <i>S. aureus</i> cells exposed to distilled water (A, control) or MIC/2 <i>ShTI</i> (B – D, 7.91 µM)...	74

APÊNDICE B – TABELAS PRESENTES NO ARTIGO DA TESE

Table 1	– <i>ShTI</i> purification steps from <i>Salvia hispanica</i> seeds.....	64
Table 2	– Minimum inhibitory concentrations (MICs) of <i>ShTI</i> against the standard and clinical bacterial strains.....	70
Table 3	– Synergistic activity between <i>ShTI</i> and oxacillin against <i>S. aureus</i> .	71