



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

---

**RODOLPHO GLAUBER GUEDES SILVA**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DA TORTA DA  
MAMONA (*Ricinus communis* L.)**

FORTALEZA  
2012

RODOLPHO GLAUBER GUEDES SILVA

---

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM  
INIBIDOR DE TRIPSINA DA TORTA DA MAMONA (*Ricinus communis* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

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

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- S583p Silva, Rodolpho Glauber Guedes.  
Purificação, caracterização bioquímica e atividade biológica de um inibidor de tripsina da torta da mamona (*Ricinus communis L.*) / Rodolpho Glauber Guedes Silva. – 2012.  
96 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.  
Area de Concentração: Bioquímica e Química de Macromoléculas.  
Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.
1. Mamona - subproduto. 2. Fungo fitopatogênico – controle biológico. 3. *Aedes aegypti* – mamona - combate. I. Título.

---

CDD 574.192

RODOLPHO GLAUBER GUEDES SILVA

---

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM  
INIBIDOR DE TRIPSINA DA TORTA DA MAMONA (*Ricinus communis* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 29/02/2012.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilka Maria Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

“Ambas, a religião e a ciência da natureza, envolvem, em seu exercício, a afirmação de Deus.”

(Max Planck)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, por ter me acolhido em seu laboratório, pela criteriosa orientação, dedicação, apoio, incentivo, confiança e, principalmente, pela grande contribuição na minha formação científica.

À Professora Dra. Ilka Vasconcelos pelos ensinamentos, apoio, e carinho, sempre demonstrados. Também pela aceitação em participar da avaliação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Renato Moreira pela pronta aceitação em participar da avaliação deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular representados pelo Prof. Dr. Márcio Viana Ramos que muito contribuíram para a minha formação intelectual e científica.

A Terezinha e Luiz Filho, do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais do Departamento de Biologia, por terem cedido gentilmente as larvas de *Aedes aegypti*.

Aos amigos do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (Alexandra, Hudson, Ana Lu, Fredy, Vladimir, Pedro, Roberta, Acrísio, Handerson e Diego) pela companhia, auxílio e momentos de descontração.

Ao grupo do Laboratório de Proteínas Tóxicas Vegetais (Daniele, Juliana, Vanessa, Lucas, Paulo, Henrique, Adelina, Mirella, Helen, Raquel Rocha, Raquel Coelho, Marina e todos os outros) pelo apoio e companheirismo sempre prestados.

Ao secretário da Coordenação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Márcio, pela atenção sempre prestada.

MUITO ESPECIALMENTE, a minha irmã Anna Lídia Nunes, por ter cruzado o meu caminho e ser parte essencial da minha vida.

Ao amigo, Felipe Fernandes, pelo carinho, incentivo e momentos de descontração.

À grande amiga, Darcy Mayra, pelas conversas, momentos de descontração, incentivo, e carinho nem sempre demonstrado (por causa do lundu dela, rs).

Aos meus grandes amigos, Hermínio Ismael e Marcos Sebastião, por estarem sempre presentes nas horas que mais precisei, pelos momentos de descontração, carinho e incentivo.

Ao amigo, Arinaldo Maia, por fazer parte da minha vida, pelo carinho e incentivo.

De forma muito especial, à minha mãe, Rosangela Guedes, pela dedicação em toda a minha formação, que me permitiu chegar até aqui.

Ao meu pai, José Maria, pelo carinho e incentivo.

A toda minha família.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (**DBBM-UFC**).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (**CAPES**), pela bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**FUNCAP**), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

## RESUMO

A cultura da mamoneira (*Ricinus communis* L.) é de grande importância socioeconômica devido às suas sementes, que são utilizadas, principalmente, na produção do óleo que pode ser empregado para diversos fins industriais. A extração do óleo gera um subproduto de alto valor nutricional, conhecido como torta da mamona. Porém, a presença de compostos tóxicos e alergênicos dificulta utilização desse resíduo como fonte de alimentação animal. Outra forma de agregar valor à torta da mamona seria buscar moléculas bioativas que pudessem ter aplicações na agricultura e saúde humana. O presente trabalho teve como objetivos purificar e caracterizar um inibidor de tripsina da torta da mamona, bem como, testar a atividade deste *in vitro* contra fungos fitopatogênicos de importância agrícola e proteases do intestino médio de *Aedes aegypti*. O inibidor de tripsina da torta da mamona, nomeado RcTI, foi purificado através de tratamento térmico, coluna de afinidade em matriz de anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B e cromatografia de troca iônica em Resource<sup>™</sup> Q. Essa proteína apresentou massa molecular aparente de 14,0 kDa na ausência ou presença de agente redutor, pI 5,2 e não é uma glicoproteína. A sequência NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI purificado mostrou similaridade de 83% com uma proteína de armazenamento rica em enxofre (albumina 2S) de *R. communis* e de 48% com uma *napin-like* (albumina 2S) de *R. communis*. O RcTI mostrou-se estável após tratamento térmico a 98 °C durante duas horas. Da mesma forma, permaneceu com atividade inibitória estável na faixa de pHs ácidos. No entanto, houve uma perda de, aproximadamente, 20% na capacidade inibitória em pHs alcalinos (pH 8-11). O RcTI (13 µg) não foi capaz de inibir a germinação de esporos dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. No entanto, foi capaz de inibir a germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. O RcTI não foi efetivo na inibição de crescimento vegetativo dos fungos mencionados acima. Esse inibidor foi efetivo contra as proteases intestinais de *Aedes aegypti* com 91% de inibição. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o RcTI tem potencial biotecnológico, podendo ser utilizado como uma alternativa para o combate do importante fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* e larvas de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** Inibidor de tripsina, *Ricinus communis*, torta da mamona, fungos fitopatogênicos, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

The castor bean (*Ricinus communis* L.) culture is of great socioeconomic importance because of its seeds, which are used mainly for production of oil that can be used for various industrial purposes. The oil extraction generates a by-product of high nutritional value known as the castor cake. However, the presence of toxic and allergenic compounds hinders the use of this residue as a feeding source. Another way to add value to the castor cake would be to seek bioactive molecules that could have applications in agriculture and human health. This study aimed to purify and characterize a trypsin inhibitor of castor cake and, to test this *in vitro* activity against phytopathogenic fungi of agricultural importance and proteases from the midgut of *Aedes aegypti*. The trypsin inhibitor of castor cake, named RcTI, was purified by heat treatment, affinity column in anhydrotrypsin-Sepharose<sup>®</sup> 4B and ion-exchange chromatography Resource<sup>™</sup> Q. RcTI has an apparent molecular mass of 14 kDa in the absence or presence of a reducing agent, pI 5.2 and isn't a glycoprotein. The NH<sub>2</sub>-terminal sequence of purified RcTI showed 83% similarity with sulfur-rich storage protein (2S albumin) *R. communis* and 48% with napin-like (2S albumin) *R. communis*. The RcTI was stable after heat treatment at 98 °C for two hours. The inhibition on trypsin was stable in the acid pH range. However, there was a loss of approximately 20% inhibitory effect on alkaline pH (pH 8-11). The RcTI (13 µg) was unable to inhibit the germination of spores of the fungus *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. However, it was able to inhibit the germination of spores of *Colletotrichum gloeosporioides*. RcTI 100 µg was not effective in the inhibition of vegetative growth of the fungi mentioned above. This inhibitor was effective against proteases from the midgut of *Aedes aegypti* with 91% inhibition. The results of the present study indicate that RcTI has biotechnological potential, can be used as an alternative to combat the important plant pathogenic fungus *C. gloeosporioides* and larvae of *A. aegypti*.

**Keywords:** trypsin inhibitor, *Ricinus communis*, castor cake, phytopathogenic fungi, *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mamoneira ( <i>Ricinus communis</i> L.) e suas sementes .....	20
<b>Figura 2</b>	Estrutura do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico) .....	21
<b>Figura 3</b>	Composição proteica geral da torta da mamona segundo Bon (1977) .....	22
<b>Figura 4</b>	Estrutura tridimensional de famílias de inibidores de proteases de plantas .....	26
<b>Figura 5</b>	Resíduos da interação protease-inibidor segundo Schechter e Berger (1967) .....	32
<b>Figura 6</b>	Esquema do modelo de interação protease serínica e seu inibidor proteico segundo Schechter e Berger (1967) .....	32
<b>Figura 7</b>	Esquema de inibição segundo Laskowski e Kato, 1980 .....	33
<b>Figura 8</b>	Conversão de serina em dehidroalanina através da reação com fluoreto de fenilmetilsulfonil .....	40
<b>Figura 9</b>	Esquema da anidrotripsina acoplada a Sepharose <sup>®</sup> 4B .....	41
<b>Figura 10</b>	Esquema geral de purificação do RcTI .....	43
<b>Figura 11</b>	Concentração de proteínas totais de extratos da torta da mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) obtidos em diferentes soluções .....	52

<b>Figura 12</b>	Eletoforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) de proteínas extraídas da torta da mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) em diferentes soluções de extração .....	52
<b>Figura 13</b>	Atividade inibitória de tripsina (UI/mgP) de extratos proteicos totais da torta da mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) obtidos em diferentes soluções .....	53
<b>Figura 14</b>	Efeito do tratamento térmico sobre a concentração de proteínas do extrato total da torta da mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) em função do tempo .....	54
<b>Figura 15</b>	Efeito do tratamento térmico sobre a atividade inibitória de tripsina do extrato proteico total da torta da mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) em função do tempo .....	54
<b>Figura 16</b>	Perfil eletroforético (15%; SDS-PAGE) do extrato proteico total da torta da mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) após ter sido submetido a tratamento térmico (98 °C) durante diferentes tempos .....	55
<b>Figura 17</b>	Perfil cromatográfico da eluição das proteínas retidas em coluna de anidrotripsina-Sepharose <sup>®</sup> 4B .....	56
<b>Figura 18</b>	Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca iônica (Resource <sup>™</sup> Q) acoplada a FPLC .....	57
<b>Figura 19</b>	Eletoforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) das etapas de purificação do RcTI .....	58

<b>Figura 20</b>	Eletrforese (12,5 %; SDS-PAGE) revelada pelo método do ácido periódico de Schiff .....	58
<b>Figura 21</b>	Alinhamento da sequência NH <sub>2</sub> -terminal do RcTI com sequências de proteínas vegetais, usando o ClustalW .....	60
<b>Figura 22</b>	Eletrforese bidimensional do RcTI .....	60
<b>Figura 23</b>	Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca iônica (Resource <sup>TM</sup> Q) acoplada a FPLC .....	61
<b>Figura 24</b>	Estabilidade do RcTI à temperatura (A) e a diferentes pHs (B) .....	63
<b>Figura 25</b>	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de <i>Fusarium oxysporum</i> incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C) .....	65
<b>Figura 26</b>	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de <i>Fusarium solani</i> incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C) .....	66
<b>Figura 27</b>	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de <i>Rhizoctonia solani</i> incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C) .....	67
<b>Figura 28</b>	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água	

	estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C) .....	68
<b>Figura 29</b>	Curva de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> na ausência (controle) e presença do RcTI purificado (100 µg) .....	69
<b>Figura 30</b>	Curva de crescimento vegetativo de <i>Rhizoctonia solani</i> na ausência (controle) e presença do RcTI purificado (100 µg) .....	70
<b>Figura 31</b>	Curva de crescimento vegetativo de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> na ausência (controle) e presença do RcTI purificado (100 µg) .....	71
<b>Figura 32</b>	Efeito do RcTI sobre proteases do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classes e famílias de inibidores de proteases de plantas .....	25
<b>Tabela 2</b>	Etapas de purificação do inibidor de tripsina da torta da mamona ( <i>R. communis</i> L.) .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
ApTI	Inibidor de Tripsina de <i>Acacia plumosa</i>
Ara h 2	Proteína alergênica do amendoim
BAPNA	<i>N</i> -benzoyl-L-arginine <i>p</i> -nitroanilide
BgPI	Inibidor de Tripsina de <i>Vigna mungo</i>
BTI-CMe	Inibidor de Tripsina de cevada
BjTI	Inibidor de Tripsina de <i>Brassica juncea</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate
DMSO	Dimetilsufóxido
FPLC	Cromatografia Líquida de Rápido Desempenho
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	Gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida
LbAPI	Inibidor de protease aspártica de <i>Lupinus bogotensis</i>
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PdKI	Inibidor de Tripsina de <i>Pithecellobium dumosum</i>
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
RcTI	Inibidor de Tripsina de <i>Ricinus communis</i>
RgPI	Inibidor de Tripsina de <i>Cajanus cajan</i>
SAP16	Inibidor de Tripsina de <i>Helianthus annuus</i>
SBTI	Inibidor de Tripsina da Soja
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS
TTI	Inibidor de Tripsina <i>Tamarindus indica</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
UI	Unidade de Inibição
Xb-KTI	Inibidor de Tripsina de <i>Xanthosoma blandum</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
™	Trade mark

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1 Mamoneira</b> .....	20
<b>1.1.1 Torta da mamona</b> .....	22
<b>1.2 Inibidores de proteases</b> .....	23
<b>1.3 Classificação dos inibidores de proteases</b> .....	24
<b>1.3.1 Albuminas 2S</b> .....	27
<b>1.4 Inibidores de proteases associados com a defesa de plantas contra patógenos e insetos</b> .....	28
<b>1.5 Inibidores de proteases serínicas</b> .....	30
<b>1.6 Justificativa</b> .....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	36
<b>2.1 Geral</b> .....	36
<b>2.2 Específicos</b> .....	36
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
<b>3. 1 Materiais Biológicos</b> .....	37
<b>3.1.1 Torta da mamona</b> .....	37
<b>3.1.2 Fungos fitopatogênicos e larvas de <i>Aedes aegypti</i></b> .....	37
<b>3.2 Reagentes e soluções</b> .....	37
<b>3.3 Metodologia experimental</b> .....	38
<b>3.3.1 Obtenção do extrato total da torta da mamona</b> .....	38
<b>3.3.2 Purificação do RcTI</b> .....	38
<b>3.3.2.1 Tratamento térmico do extrato total da torta da mamona (<i>R. communis</i> L.)</b> .....	38
<b>3.3.2.2 Cromatografia de afinidade em anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B</b> .....	39
<b>3.3.2.2.1 Preparo da anidrotripsina</b> .....	39
<b>3.3.2.2.2 Acoplamento da anidrotripsina em Sepharose<sup>®</sup> 4B</b> .....	40
<b>3.3.2.3 Cromatografia de troca iônica (aniônica) em Resource<sup>™</sup> Q</b> .....	41
<b>3.3.3 Dosagem de proteínas</b> .....	44
<b>3.3.4 Determinação da atividade anti-trípica</b> .....	44
<b>3.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	44

<b>3.3.6 Detecção de glicoproteína em gel .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.7 Sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.8 Determinação do ponto isoelétrico do RcTI .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.9 Estabilidade térmica do RcTI .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.10 Estabilidade do RcTI em diferentes pHs .....</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Atividades biológicas .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4.1 Avaliação da atividade antifúngica in vitro do RcTI .....</b>	<b>48</b>
3.4.1.1 Obtenção dos esporos .....	48
3.4.1.2 Ensaio de inibição da germinação de esporos .....	48
3.4.1.3 Ensaio de inibição do crescimento micelial de fungos .....	49
<b>3.4.2 Avaliação do efeito do RcTI sobre proteases do intestino médio de larvas de <i>A. aegypti</i> .....</b>	<b>49</b>
3.4.2.1 Obtenção das proteases intestinais das larvas de <i>A. aegypti</i> .....	49
3.4.2.2 Ensaio de inibição das proteases de <i>A. aegypti</i> .....	49
<b>3.5 Análise estatística .....</b>	<b>50</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Obtenção do extrato total da torta da mamona .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.2 Seleção do tampão de extração .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Purificação do RcTI .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.2 Tratamento térmico do extrato total da torta da mamona .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.3 Cromatografia de Afinidade em anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.4 Cromatografia de troca iônica (aniônica) em Resource<sup>™</sup> Q .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 Sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI .....</b>	<b>59</b>
<b>4.4 Determinação do ponto isoelétrico do RcTI .....</b>	<b>60</b>
<b>4.5 Cromatografia de troca iônica (aniônica) em Resource<sup>™</sup> Q – RcTI recromatografado .....</b>	<b>61</b>
<b>4.6 Estabilidade térmica do RcTI .....</b>	<b>62</b>
<b>4.7 Estabilidade do RcTI em diferentes pHs .....</b>	<b>62</b>
<b>4.8 Avaliação da atividade antifúngica do RcTI in vitro .....</b>	<b>64</b>
<b>4.8.1 Efeito do RcTI na germinação de esporos de fungos fitopatogênicos .....</b>	<b>64</b>

<b>4.8.2 Efeito do RcTI no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.....</b>	<b>64</b>
<b>4.9 Efeito do RcTI sobre proteases do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Mamoneira

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) (FIGURA 1) pertence à família *Euphorbiaceae*, que possui 222 gêneros e cerca de 5970 espécies. É uma planta perene, anual, arbustiva, muito ramificada, glabra; as folhas são grandes, alternadas, longas (pecioladas), peltadas, palmatifendidas, lobadas, dentadas; inflorescências quase paniculadas; as flores são monóicas, dispendo-se superiormente as femininas e inferiormente as masculinas, com cálice partido; estames indefinidos, compactos, densos, poliadelfos, filetes repetidamente ramificados, anteras biloculares, separadas, introrsas, quase esféricas. As flores femininas possuem cálice muito débil, caduco, ovário trilocado, com estilete mais ou menos curto, estigmas bifendidos, raramente indivisos, afastados, peniformes. As cápsulas se abrem em três cocas bivalves, lisas ou aculeadas. As sementes são ovaladas, carunculadas, marmoreadas, com tegumento crustáceo e albúmen carnudo (PORTAL DA MAMONA, 2011).

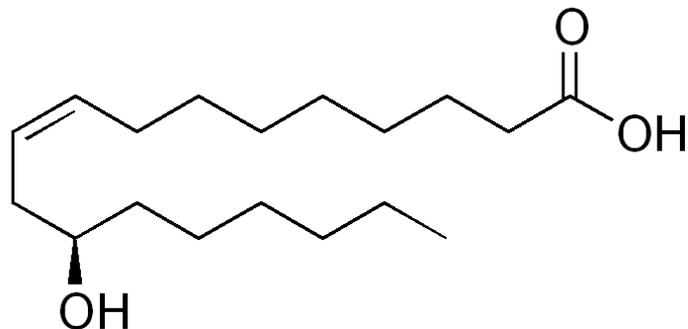


**Figura 1** - Mamoneira (*Ricinus communis* L.) e suas sementes. (Fonte: COOPMAN *et al.*, 2009).

No Brasil, as sementes da mamoneira são popularmente conhecidas como mamona, rícino, carrapateira, baga, bafueira e palma-criste. Em países como Inglaterra e Estados Unidos, recebem o nome de *castor bean* ou *castor seed*.

Apesar de ser uma planta provavelmente nativa da África, o maior produtor mundial de mamona é a Índia, sendo responsável por 60% da produção (SANTHI; MANONMANI; SMITHA, 2010), seguida pela China, Brasil, União Soviética e Tailândia (SUJATHA; REDDY; MAHASI, 2008). No Brasil, o estado da Bahia se destaca por ser responsável por 85% da produção nacional (SOUZA, 2007; QUEIROGA; SANTOS; QUEIROGA, 2011).

A mamoneira tem importância socioeconômica, principalmente, por ser fonte do ácido ricinoléico (FIGURA 2), um óleo que apresenta características que o torna especial: é monoinsaturado, possui uma hidroxila na cadeia carbônica, baixo ponto de fusão, baixo ponto de solidificação e alta viscosidade, sendo solúvel em álcool em baixas temperaturas. Assim, esse óleo pode ser empregado para diversos fins industriais, tais como: produção de biodiesel, fabricação de tintas, cosméticos, lubrificantes, remédios, corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, além de outros (AMORIM, 2005).



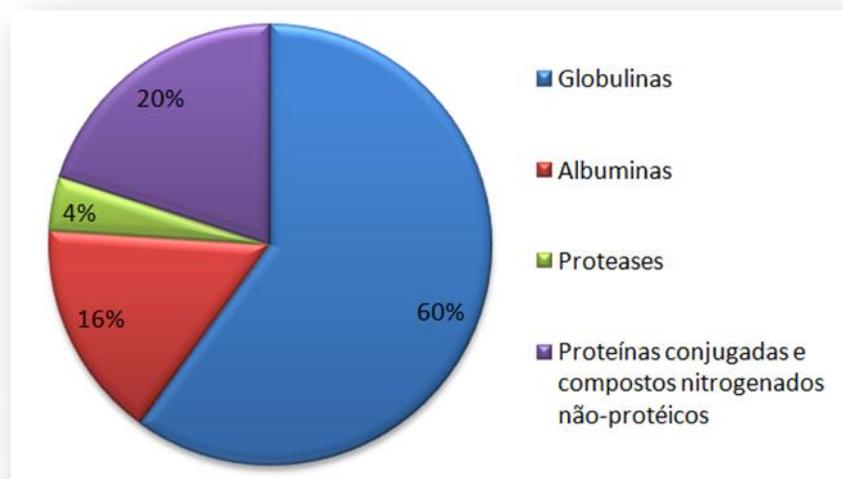
**Figura 2** - Estrutura do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico).

O óleo da mamona pode ser extraído através de solventes orgânicos ou prensagem a frio ou a quente. O óleo que é empregado para fins medicinais é extraído por prensagem a frio, porque, assim, obtém-se um óleo mais límpido, pouco

ácido e isento de impurezas. Já para o óleo industrial, é preferível em extração a quente (PORTAL DA MAMONA, 2012).

### 1.1.1 Torta da mamona

O processo de extração do óleo da mamona gera um subproduto conhecido como torta de mamona, com alto conteúdo proteico, cuja composição é mostrada na Figura 3.



**Figura 3** - Composição proteica geral da torta da mamona segundo Bon (1977).

De acordo com Severino (2005), no Brasil, são produzidas, aproximadamente, 1,2 toneladas de torta para cada tonelada de óleo extraída. Dessa forma, o aumento na produção de óleo gera bastante subproduto, sendo importante buscar formas de agregar valor à torta. Um das principais aplicações, em escala mundial, para a torta de mamona, é como fertilizante, apesar de que seu uso como ração animal pudesse ser bem melhor aproveitado, devido ao alto teor de proteínas (SEVERINO, 2005). Entretanto, a presença de componentes tóxicos (ricina e ricinina) e alergênicos (albuminas 2S) torna essa utilização inviável (WEISS, 1983). A maioria dos métodos que buscam eliminar estes componentes é complexa e de alto custo financeiro (PINA *et al.*, 2005).

Além das utilizações citadas acima, a torta da mamona pode ser empregada como inseticida e nematicida (SEVERINO, 2005). Alguns trabalhos têm mostrado o potencial de extratos de sementes da mamona contra insetos (BATABYAL *et al.*, 2007; BATABYAL *et al.*, 2009; MANDAL, 2010). Parte dessa atividade poderia ser atribuída aos inibidores de proteases, por serem moléculas que, reconhecidamente, apresentam essa característica biológica e estão presentes em sementes.

## 1.2 Inibidores de proteases

Inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos capazes de se complexar, reversivelmente, com proteases, interrompendo a catálise (LASKOWSKI; KATO, 1980; BODE; HUBER, 1992; VALUEVA; MOSOLOV, 1999; CHOI; PARK; KIM, 2002; FAN; WU, 2005). Em geral, apresentam baixa massa molecular, resistência à proteólise (TELES *et al.*, 2004) e extremos de pH e temperatura (KLOMKLAO *et al.*, 2010, KLOMKLAO *et al.*, 2011). A massa molecular desses inibidores pode variar de 4 a 85 kDa, mas a maioria deles se encontra numa faixa de 8 a 20 kDa (HUNG *et al.*, 2003). Possuem forma compacta e alguns deles têm várias pontes dissulfeto (BODE; HUBER, 1993).

Os inibidores de proteases são ubiquamente distribuídos em animais, plantas e microrganismos e já foram descritos em todos os reinos (KATUNUMA *et al.*, 2003; SANO *et al.*, 2005; ISHIHARA *et al.*, 2006). São abundantes em plantas (RICHARDSON, 1991; BIRK, 2003) e estão, geralmente, presentes em concentrações consideráveis nos órgãos de armazenamento como sementes, tubérculos e frutos (EL-SHAMEI; WU; HAARD, 1996). Em sementes, os teores de inibidores de proteases podem variar entre 5 a 10% das proteínas totais (LIENER, 1980; RICHARDSON, 1991; BHATTACHARYYA *et al.*, 2006).

Em relação à composição aminoacídica, os inibidores de proteases de plantas possuem, normalmente, boas quantidades de ácido aspártico, glutâmico, lisina, serina e cisteína. No entanto, são pobres nos aminoácidos histidina, triptofano e metionina (BOWLES, 1990).

Nos órgãos e tecidos vegetais, os inibidores de proteases estão associados a diferentes papéis, tais como: regulação e controle de proteases endógenas durante desenvolvimento e germinação de sementes (XAVIER-FILHO; CAMPOS, 1989; RICHARDSON, 1991; CHYE *et al.*, 2006) ou em outros órgãos como raiz (HOU; LIN, 2002); proteínas de reserva (XAVIER-FILHO, 1992; MANDAL *et al.*, 2002); regulação da morte celular programada (SOLOMON *et al.*, 1999) ou, ainda, à resposta a estresses abióticos (FRANCO; MELO, 2000; PERNAS; SANCHEZ-MONG; SALCEDO, 2000) e à defesa contra patógenos e insetos (RYAN, 2000; SOARES-COSTA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2009).

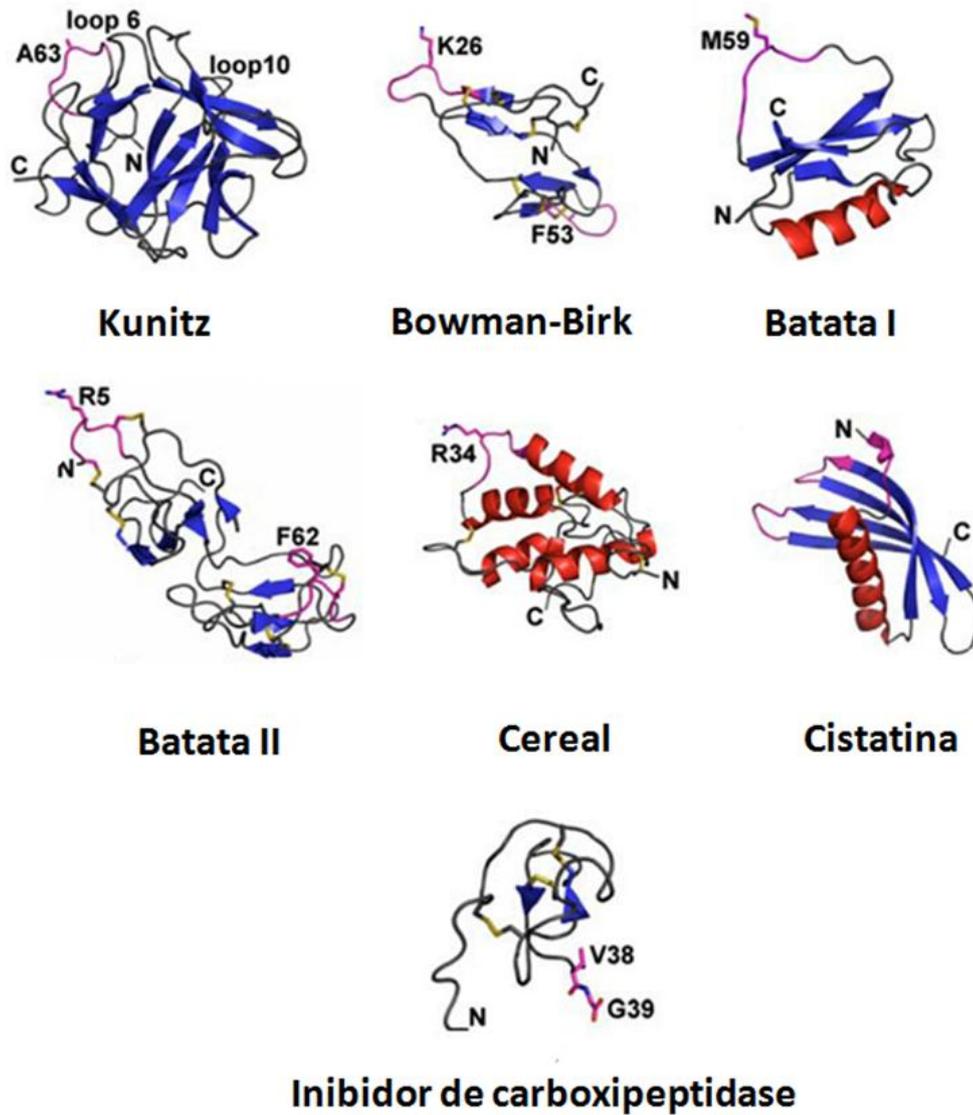
### **1.3 Classificação dos inibidores de proteases**

Os inibidores de proteases são classificados de acordo com a classe mecanística das proteases que inibem: inibidores de proteases serínicas, de proteases cisteínicas, de proteases aspárticas e metaloproteases (Tabela 1) (LASKOWSKI; KATO, 1980; RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991). As classes de inibidores de proteases mais estudadas são as serínicas e cisteínicas, por estarem mais presentes em sementes e órgãos de armazenamento.

Além da classificação descrita acima, em vegetais, os inibidores de proteases podem ser agrupados em famílias de acordo com a estrutura primária e tridimensional (FIGURA 4), massa molecular e conteúdo de cisteína e pontes dissulfeto (RICHARDSON, 1991; KOIWA *et al.*, 1997; BHATTACHARYYA; BABU, 2009; RAWLINGS *et al.*, 2010) (TABELA 1). Das dez famílias mostradas na tabela 1, sete são capazes de inibir proteases serínicas.

**Tabela 1** - Classes e famílias de inibidores de proteases de plantas

<b>Classe das proteases</b>	<b>Classe dos inibidores correspondentes</b>	<b>Família dos inibidores em tecidos vegetais</b>
Serínicas	Inibidores de proteases serínicas	Kunitz Bowman-Birk Superfamília de cereais Batata I e II Taumatina Ragi I-2/milho
Cisteínicas	Inibidores de proteases cisteínicas	Fitocistatinas
Aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas
Metaloproteases	Inibidores de metaloproteases	Inibidores de carboxipeptidases A e B



**Figura 4** - Estrutura tridimensional de famílias de inibidores de proteases de plantas. (Modificado de Bateman e James, 2011).

Além dos inibidores de proteases mencionados acima, existem albuminas 2S que possuem domínios de inibição de tripsina/ $\alpha$ -amilase (CHEN *et al.*, 2004).

### 1.3.1 Albuminas 2S

Albuminas 2S são proteínas de armazenamento de sementes, solúveis em água, encontradas tanto em Monocotiledôneas, quanto em Dicotiledôneas (SHEWRY; PANDYA, 1999), acumuladas em corpos proteicos (MENÉNDEZ-ARIAS *et al.*, 1988). Em geral, a massa molecular dessas proteínas varia entre 12 a 15 kDa (LEHMANN *et al.*, 2006). Em muitas espécies de plantas, as albuminas 2S possuem altas quantidades de aminoácidos sulfurados, sendo, portanto, ricas em enxofre (YOULE; HUANG, 1978).

As albuminas 2S são agrupadas na superfamília das prolaminas (SHEWRY *et al.*, 2002). Nessa superfamília também estão incluídas as proteínas transportadoras de lipídios não específicas, prolaminas de armazenamento de cereais e inibidores de tripsina/ $\alpha$ -amilase (SHEWRY *et al.*, 2002). Uma característica comum das proteínas pertencentes a essa superfamília é um padrão conservado de cisteínas: ..C..C../..CC..CXC..C..C.. (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2002).

As albuminas 2S são proteínas heterodiméricas codificadas por uma família multigênica, sintetizadas como uma proteína precursora que é transportada para o retículo endoplasmático, no qual sofre processamento pós-traducional (SHEWRY; PANDYA, 1999). São formadas quatro pontes dissulfeto intracadeia envolvendo os oito resíduos de cisteína conservados. Após o processamento, são direcionadas para o complexo de Golgi, no qual são dispostas em vesículas para serem direcionadas ao vacúolo (SAALBACH; ROSSO; SCHUMANN, 1996).

Os principais papéis das proteínas de armazenamento é funcionar como reserva de nutrientes (MORENO; CLEMENTE, 2008) e/ ou proteger as sementes contra ataques de patógenos (AGIZZIO *et al.*, 2006). Pelegrini *et al.* (2006) observaram que um peptídeo purificado de sementes de *Passiflora edulis* (Pe-AFP1), apresentando similaridade com albuminas 2S, foi efetivo em inibir o crescimento micelial dos fungos *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum*, e *Aspergillus fumigatus*. Já o peptídeo purificado de *Passiflora alata* (Pa-AFP1), com similaridade com albuminas 2S, apresentou atividade inibitória do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Existem albuminas 2S que possuem domínios de inibição de tripsina/ $\alpha$ -amilase (CHEN *et al.*, 2004). Assim, elas também podem funcionar como inibidores de proteases nas sementes. Segundo o banco de dados do *Food Allergy Research Resource Program* (<http://www.allergenonline.com>), cerca de 33% das proteínas alergênicas de alimentos vegetais conhecidas pertencem à família de inibidores de tripsina/ $\alpha$ -amilase (CHEN *et al.*, 2004).

Alguns inibidores de proteases pertencem à mesma família de proteínas de armazenamento, sugerindo uma origem comum para essas proteínas. Por exemplo, os inibidores de protease de trigo e cevada pertencem à superfamília das prolaminas (KREIS *et al.*, 1985). Odani *et al.* (1983) verificaram que o inibidor de tripsina de cevada apresenta similaridade com a proteína de armazenamento rica em glutamina de *R. communis* L. O inibidor de tripsina de *Brassica juncea* (BjTI) é um precursor de albumina 2S (MANDAL *et al.*, 2002). Do mesmo modo, uma das principais proteínas alergênicas do amendoim (Ara h 2) também funciona como inibidor de tripsina (MALEKI *et al.*, 2003).

#### **1.4 Inibidores de proteases associados com a defesa de plantas contra patógenos e insetos**

Os inibidores de proteases podem ser expressos de forma constitutiva ou induzida (TORNERO; CONEJERO; VERA, 1997; VAN DER HOORN; JONES, 2004). Eles são constitutivos quando já estão naturalmente presentes nas plantas. Já a expressão induzida ocorre quando a planta se depara com algum estímulo biótico ou abiótico. Assim, os genes dos inibidores de proteases, antes não expressos, podem ser induzidos a se expressarem, ou haver aumento dessa expressão se a planta for desafiada por algum agressor (vírus, bactérias, fungos, nematóides, insetos) (KLOMKLAO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Segundo Speransky *et al.* (2007), inibidores de proteases serínicas podem ser induzidos durante o processo de infecção, reforçando o papel dessas proteínas na defesa contra patógenos e insetos. Oliveira *et al.* (2012) verificaram que as concentrações de inibidores de proteases cisteínicas em raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) são aumentadas por

indução através da infecção pelo nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*). Após 2 horas de infecção, a atividade inibitória de protease cisteínica nas plantas inoculadas já se encontrava aumentada em relação às plantas não inoculadas, chegando à atividade máxima em 8 horas.

Diversos microrganismos produzem enzimas proteolíticas extracelulares que são importantes para a patogênese. Um bom exemplo disso é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, que secreta uma protease de 25 kDa que contribui para o desencadeamento da infecção (RIES; ALBERSHEIM, 1973). Além desse, os fungos *Cochliobolus carbonum* (MURPHY; WALTON, 1996), *Stagonospora nodorum* (CARLILE *et al.*, 2000), *Trichoderma harzianum* (DUNAEVSKY *et al.*, 2000), *Phytophthora infestans* (GVOZDEVA *et al.*, 2004), *Leptosphaeria maculans*, (WILSON; HOWLETT, 2005), *Fusarium culmorum* (IEVLEVA *et al.*, 2006), dentre outros, secretam enzimas proteolíticas. Da mesma forma, bactérias fitopatogênicas como *Xanthomonas campestris* (KALASHNIKOVA; CHERNYSHOVA; IGNATOV, 2003), também secretam proteases extracelulares. Assim, os inibidores de proteases interferem no processo de infecção através da inibição dessas enzimas, importantes para a patogênese (MOSOLOV; VALUEVA, 2008). No entanto, Giudici *et al.* (2000) sugerem que a inibição da germinação de esporos de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo inibidor de protease serínica de *Helianthus annuus* não resulta da ação contra proteases fúngicas, mostrando que pode haver outros mecanismos de ação antifúngica para inibidores de proteases.

A importância das proteases na patogênese pode ser exemplificada com o fungo *Pyrenopeziza brassicae*, não patogênico, que é incapaz de produzir proteases cisteínicas extracelulares. No entanto, a patogênese é desencadeada quando essas enzimas proteolíticas passam a ser produzidas por essa espécie, evidenciando o papel crucial dessas enzimas na patogênese (BALL *et al.*, 1991). Outro exemplo que reforça essa idéia é com o fungo *Botrytis cinerea*, que secreta uma protease aspártica indutora de morte celular em plantas, cujos esporos quando foram submetidos ao pré-tratamento com um inibidor de protease aspártica (pepstatina) se tornaram menos agressivos à planta (MOVAHEDI; HEALE, 1990).

Alguns trabalhos relatam os efeitos de inibidores de proteases no crescimento e desenvolvimento de nematóides (URWIN *et al.*, 1995; URWIN *et al.*, 1997). Andrade *et al.* (2010) verificaram que o inibidor de papaína purificado de raízes de *Crotalaria pallida* (CpRI) é capaz de agir contra proteases digestivas de *M. incognita*. Ainda no mesmo trabalho, foi observado que o CpRI é internalizado por *M. incognita*, apresentando efeito nematicida e nematostático.

Os estudos dos efeitos danosos de inibidores de proteases a insetos ocorreram no início da década de 50 por Lipke, Fraenkel e Liener (1954). Eles verificaram que frações protéicas de sementes de soja inibiam tanto a atividade proteolítica *in vitro* quanto o crescimento de *Tribolium confusum*. A partir de então, diversos trabalhos demonstraram que inibidores de proteases, principalmente os de proteases serínicas e cisteínicas, são capazes de afetar o crescimento e desenvolvimento de espécies de insetos pertencentes às ordens Lepidoptera e Coleoptera (JOUANIN *et al.*, 1998).

O inibidor de tripsina purificado de sementes *Tamarindus indica* (TTI) tem atividade bioinseticida contra *Ceratitidis capitata* e *Callosobruchus maculatus*, e é capaz de inibir proteases intestinais de diferentes ordens de insetos *in vitro* (ARAÚJO *et al.*, 2005). Já o inibidor de protease aspártica de sementes de *Lupinus bogotensis* (LbAPI) mostrou-se altamente efetivo contra as proteases aspárticas da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (MOLINA; ZAMORA; BLANCO-LABRA, 2010).

A inibição das proteases do intestino de insetos resulta na pobre absorção de nutrientes, gerando retardo no crescimento e desenvolvimento e até mesmo morte por inanição (GATEHOUSE *et al.*, 1999). Entretanto, devido à variedade de proteases presentes no intestino dos insetos, os inibidores podem não possuir um amplo espectro de ação inseticida (ORTEGO; NOVILLO; CASTAÑERA, 1996).

### **1.5 Inibidores de proteases serínicas**

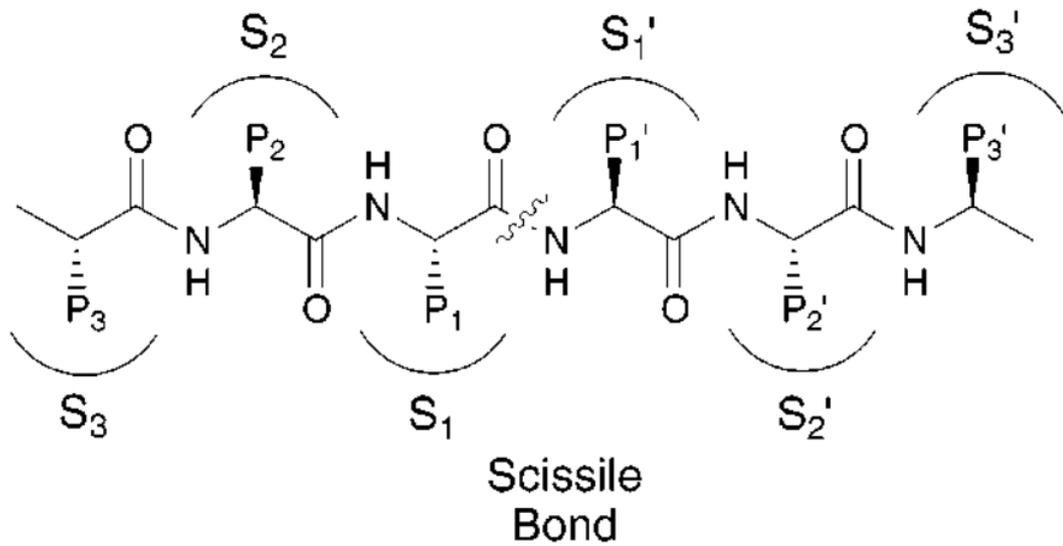
Os inibidores de proteases serínicas inibem proteases que possuem um resíduo de serina no sítio catalítico (tríade catalítica normalmente formada por Ser,

His e Asp). O inibidor de soja tipo Kunitz (SKTI) é específico para proteases tipo tripsina (*trypsin-like*) (GATEHOUSE *et al.*, 1999) Entretanto, existem trabalhos que relatam inibidores de proteases serínicas que inibem, também, papaína (protease cisteínica) (OLIVEIRA *et al.*, 2007ab; MIGLIOLO *et al.*, 2010) e  $\alpha$ -amilase (KOWIA *et al.*, 1997; BELITZ; GROSCH, 1997), evidenciando que esses inibidores podem ter dupla atividade.

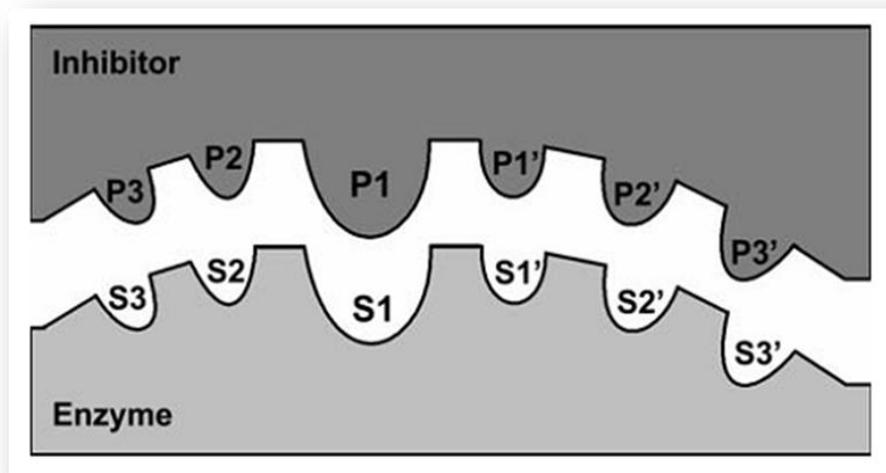
As principais famílias de inibidores de proteases serínicas são as de Kunitz e Bowman-Birk. Os inibidores do tipo Kunitz possuem massa molecular em torno de 20 kDa, uma ou duas cadeias polipeptídicas e baixo conteúdo de cisteína (SVENDSEN *et al.*, 1984; KIM; LAMBOY, 1985; RICHARDSON, 1991; BATISTA *et al.*, 1996). Já os inibidores do tipo Bowman-Birk têm massa molecular que varia de 8 a 10 kDa, são compostos por cadeia polipeptídica única, possuem alto conteúdo de cisteína (LASKOWSKI; KATO, 1980; RICHARDSON, 1991; BIRK, 1994) e dois sítios reativos (podendo inibir tripsina e quimotripsina, simultaneamente), sendo, por isso, conhecidos como inibidores de “duas-cabeças” (BIRK, 1985).

No mecanismo de ação desses inibidores, a interação não covalente protease-inibidor é semelhante à interação protease-substrato, sendo um modo comum de inibição (LASKOWSKI; KATO, 1980). Segundo Laskowski *et al.* (1987), estas proteínas são consideradas bons inibidores porque interagem com a enzima de forma específica (baixo  $K_m$ ) e são hidrolisadas lentamente (Baixo  $K_{cat}$ ).

A nomenclatura padrão para descrever os resíduos da interação protease-inibidor descrita por Schechter e Berger (1967) é mostrada na Figura 5, onde P3, P2, P1, P1', P2', P3' representam os resíduos do inibidor e S3, S2, S1, S1', S2', S3' representam os resíduos da enzima correspondente inibida. A associação da maioria das proteases serínicas com o inibidor envolve o ajustamento do resíduo S1 da enzima com o resíduo P1 do inibidor (SCHECHTER; BERGER, 1967), sendo, portanto, o resíduo P1 bastante importante para a especificidade e força da associação (KROWARSCH *et al.*, 1999). As áreas regiões P2'-P3' do inibidor que interagem com as regiões S2'-S3' da enzima (FIGURA 6) são fundamentais para a formação do complexo protease-inibidor (KROWARSCH *et al.*, 1999).

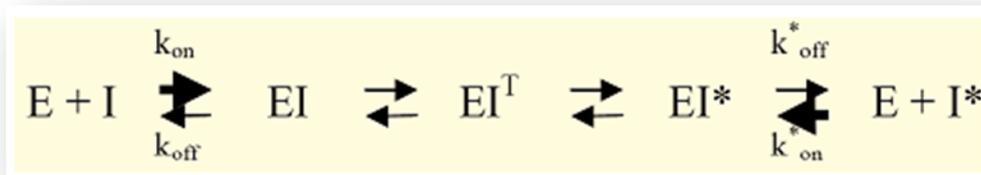


**Figura 5** - Resíduos da interação protease-inibidor segundo Schechter e Berger (1967). (Fonte: LEUNG; ABBENANTE; FAIRLIE, 2000).



**Figura 6** - Esquema do modelo de interação protease serínica e seu inibidor proteico segundo Schechter e Berger (1967). (Fonte: DELL'ORCO; DE BENEDETTI, 2008).

O mecanismo padrão de inibição está mostrado na Figura 7, na qual E representa a enzima, I representa o inibidor e EI o complexo enzima-inibidor. Após interação das duas proteínas, um intermediário ( $EI^T$ ) é formado. Subsequentemente, o inibidor é clivado ( $EI^*$ ) pela enzima, mas muito lentamente, e o complexo é desfeito gerando a enzima livre (E) e o inibidor clivado ( $I^*$ ).



**Figura 7** - Esquema de inibição segundo Laskowski e Kato, 1980. (Fonte: BATEMAN; JAMES, 2011).

Os inibidores de proteases serínicas são classificados de acordo com a especificidade pelo substrato, mais precisamente, pelo resíduo encontrado no sítio P1. Os inibidores tipo tripsina (*trypsin-like*) possuem aminoácidos positivamente carregados na região P1 (Lisina ou Arginina). O tipo elastase (*elastase-like*) possui resíduos hidrofóbicos pequenos (Alanina ou Valina). Já o tipo quimotripsina (*chymotrypsin-like*) possui aminoácidos hidrofóbicos maiores como Fenilalanina, Tirosina ou Leucina (LEUNG; ABBENANTE; FAIRLIE, 2000). Os mais estudados são os inibidores de tripsina (LASKOWSKI; KATO, 1980; BARRETT; SALVESEN, 1986).

Diversos trabalhos têm mostrado a ação de inibidores de tripsina contra patógenos e insetos. O inibidor de tripsina de flores de *H. annuus* (SAP16) inibe a germinação de esporos e reduz o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* (GIUDICI *et al.*, 2000). Lopes *et al.* (2009) verificaram que três isoformas de inibidores de tripsina de *Acacia plumosa* (ApTIA, ApTIB e ApTIC) são capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus niger*, *Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum sp.* Carrillo *et al.* (2011) observaram a inibição de germinação de esporos e crescimento micelial dos fungos *Magnaporthe grisea*, *Plectosphaerella cucumerina* e *F. oxysporum* pelo inibidor de tripsina de cevada (BTI-CMe). O inibidor de tripsina de *Xanthosoma blandum* (Xb-KTI) é efetivo contra a bactéria *Salmonella typhimurium*

(LIMA *et al.*, 2011). Oliveira *et al.* (2007) mostraram que o inibidor de tripsina de sementes de *Pithecellobium dumosum* (PdKI) inibe as proteases digestivas de *Zabrotes subfasciatus*, *C. capitata*, *Plodia interpunctella*, *Alabama argillaceae* e *C. maculatus*. Inibidores de tripsina de *Cajanus cajan* e *Vigna mungo*, RgPI e BgPI, respectivamente, mostraram atividade inibitória contra proteases intestinais de *Achaea janata*. Ademais, RgPI mostrou-se bastante efetivo na redução da taxa de peso e sobrevivência de *A. janata* em relação a BgPI, enquanto BgPI foi mais efetivo em reduzir o peso corporal de *Spodoptera litura* comparado a RgPI (PRASAD; DUTTA-GUPTA; PADMASREE, 2010).

## 1.6 Justificativa

Muitos inibidores de tripsina já foram purificados e caracterizados das famílias *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* e *Poaceae* (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1987). Já em famílias como *Rutaceae* (SHEE; SHARMA, 2007; SHEE *et al.*, 2007a,b) e *Euphorbiaceae* (SRITANYARAT *et al.*, 2006; CHAUDHARY *et al.*, 2008) existem poucos trabalhos de purificação e caracterização. Diante do exposto, é importante purificar, caracterizar e buscar aplicações biotecnológicas para inibidores de tripsina dessas famílias.

Até o presente, não existem relatos de ensaios biológicos realizados com inibidores de tripsina purificados da mamona (*R. communis* L.). Prospear e desvendar as características físico-químicas e propriedades biológicas desses inibidores presentes no resíduo proveniente da extração do óleo das sementes da mamona consistem em excelentes formas de agregar valor a esse material, que seria, inicialmente, descartado. Assim, os inibidores purificados desse resíduo poderiam ser empregados para utilização na agricultura (contra fitopatógenos e insetos pragas) e/ou na saúde humana (contra tumores, patógenos e insetos transmissores de doenças) como ferramentas biotecnológicas.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Geral

- Purificar e caracterizar um inibidor de tripsina da torta da mamona (*Ricinus communis* L.), bem como, avaliar seus efeitos antifúngicos e contra proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti*.

### 2.2 Específicos

- Purificar um inibidor de tripsina, a partir da torta da mamona, através de técnicas cromatográficas;
- Caracterizar a proteína purificada através da determinação da massa molecular e ponto isoelétrico, sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal, detecção de glicoproteína, estabilidade térmica e em diferentes pHs;
- Investigar o potencial antifúngico da proteína purificada sobre a germinação de esporos e crescimento das hifas de diferentes fungos fitopatogênicos de importância agrícola;
- Avaliar o potencial inibitório da proteína purificada sobre proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 Materiais Biológicos

##### 3.1.1 Torta da mamona

A torta da mamona (*R. communis* L.), de onde foi extraído óleo para produção do biodiesel, foi obtida na OLVEQ - Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda, localizada na cidade de Quixadá-CE. No Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), a torta foi triturada em pedaços menores utilizando um moedor de café (Cuisinart® Coffee Grinder, Modelo DCG-20) e armazenada em *freezer* (-20 °C) até a utilização.

##### 3.1.2 Fungos fitopatogênicos e larvas de *Aedes aegypti*

*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani* foram obtidos da micoteca do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). Os fungos foram mantidos em meio de cultura estéril e apropriado (Batata Dextrose Ágar - BDA) para crescimento *in vitro*.

As larvas de *Aedes aegypti* (3<sup>o</sup> estágio de desenvolvimento – 6 a 7 dias após eclosão do ovo) foram obtidas no Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais do Departamento de Biologia (UFC). As larvas foram mantidas em uma temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10% fotoperíodo de 12 horas de luz e alimentadas com ração para tartarugas (ReptoLife, Alcon Club®).

#### 3.2 Reagentes e soluções

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, tetrametiletenodiamina (TEMED), persulfato de amônio, azul brilhante de Coomassie G-250, azul de bromofenol, nitrato de prata, β-mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio (SDS), uréia, tiouréia,

CHAPS, tampão IPG, marcadores de massa molecular, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), tripsina (*Trypsin from bovine pancreas, Type I, ~10,000 BAEE units/mg protein*), SBTI (*Soyben Trypsin Inhibitor*), *N*-benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA), albumina sérica bovina e marcadores protéicos de massa molecular foram obtidos da Sigma Chemical Co. A matriz e coluna cromatográfica (Sepharose<sup>®</sup> 4B Ativada com Brometo de Cianogênio e Resource<sup>™</sup> Q, respectivamente), fitas de gradientes de pH imobilizados em géis foram obtidas da GE Healthcare<sup>®</sup>. Demais reagentes de grau analítico como: cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e meios de cultura para crescimento de fungos foram obtidos comercialmente.

### **3.3 Metodologia experimental**

#### **3.3.1 Obtenção do extrato total da torta da mamona**

A torta da mamona foi previamente delipidada com éter de petróleo (1:5, m/v) até eliminação total dos lipídios. Para determinação da melhor solução de extração de proteínas, a torta delipidada foi macerada nas seguintes soluções: água ultrapura, NaCl 150 mM, NaCl 500 mM, glicina-HCl 50 mM, pH 2,1, glicina-HCl 50 mM, pH 3,0, acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, fosfato de sódio pH 7,21, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, Tris-HCl 50 mM, pH 8,1 e glicina-NaOH 50 mM, pH 9,8, na proporção de 1:10 (m/v), durante 30 minutos, em graal, sob banho de gelo. Após maceração, cada suspensão foi filtrada em pano de trama fina e centrifugada (12.000 x *g*, 4 °C, 30 minutos). Os sobrenadantes (extrato total) foram dialisados (*cut-off* 12 kDa) contra o tampão de extração para eliminar moléculas de baixa massa molecular (abaixo de 12 kDa) e estocados em *freezer* (-20 °C) para análises posteriores.

#### **3.3.2 Purificação do RcTI**

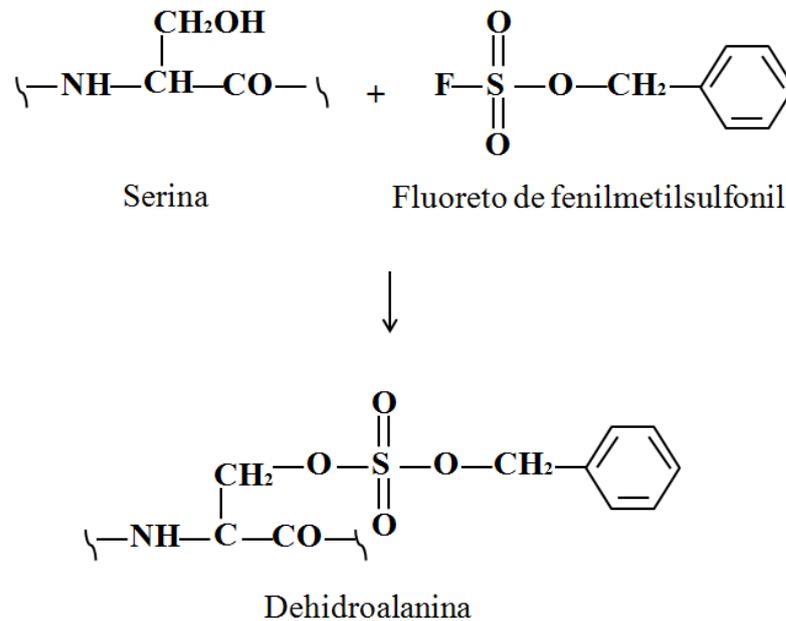
##### **3.3.2.1 Tratamento térmico do extrato total da torta da mamona (*R. communis* L.)**

O extrato total da torta da mamona foi, inicialmente, aquecido em banho-maria (98 °C) em diferentes tempos (20, 30, 40, 50 e 60 minutos). Após o tempo de aquecimento, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g*, por 30 minutos. A fração solúvel que apresentou maior atividade inibitória de tripsina e menor número de bandas proteicas foi utilizada nos passos subsequentes de purificação.

### 3.3.2.2 *Cromatografia de afinidade em anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B*

#### 3.3.2.2.1 *Preparo da anidrotripsina*

A anidrotripsina é um derivado inativo da tripsina no qual o resíduo de serina do sítio catalítico é convertido em dehidroalanina (AKO; FOSTER; RYAN, 1974) (FIGURA 8). Nesse trabalho, anidrotripsina foi preparada segundo Fahrney e Gold (1963). Tripsina bovina (187,5 mg) foi dissolvida em 187,5 mL de tampão Tris-HCl 75 mM, pH 7,2, contendo CaCl<sub>2</sub> 3 mM. Essa solução foi misturada com 187,5 mL de uma solução de PMSF (46,87 mg) e 2-propanol (18,75 mL), e incubada por 30 minutos a 25 °C. Subsequentemente, essa mistura foi dialisada contra água ultrapura (Milli-Q, 5 L), trocada cinco vezes, sendo mantida à temperatura de 0-4 °C. Após diálise, a solução foi liofilizada. O liofilizado (PMSF-tripsina) foi tratado com KOH 50 mM gelado na taxa de 50 mg para 20 mL por 12 minutos. A reação foi parada ajustando o pH para 7,0. A mistura foi novamente dialisada e posteriormente liofilizada.

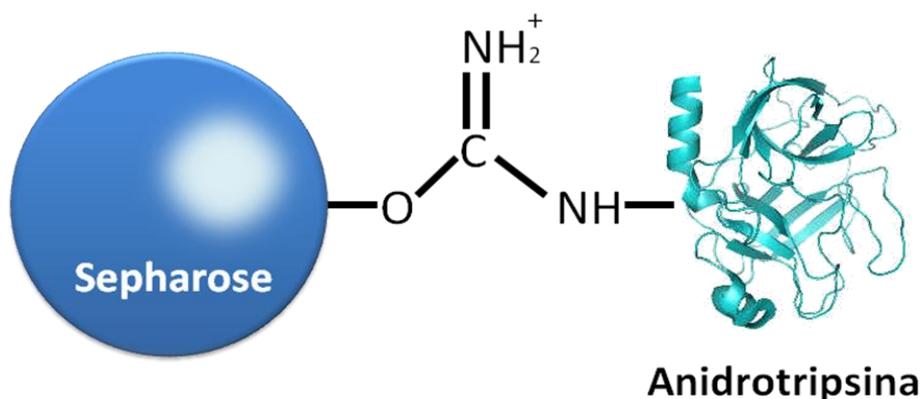


**Figura 8** - Conversão de serina em dehidroalanina através da reação com fluoreto de fenilmetilsulfonil.

#### 3.3.2.2.2 Acoplamento da anidrotripsina em Sepharose<sup>®</sup> 4B

A anidrotripsina foi acoplada à matriz Sepharose<sup>®</sup> 4B ativada com brometo de cianogênio seguindo as recomendações do fabricante (GE Healthcare<sup>®</sup>) (FIGURA 9). 7,5 g da matriz foram lavados com 1500 mL de HCl 1 mM durante 15 minutos, sendo este adicionado em seis alíquotas de 250 mL, cada. Posteriormente, a suspensão foi lavada com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 8,0, contendo NaCl 500 mM (tampão de acoplamento). A anidrotripsina (cerca de 187,5 mg), previamente dissolvida em 37,5 mL do tampão de acoplamento, foi misturada com a suspensão e incubada sob agitação rotatória branda, por 12 horas, a 4 °C. Decorrido o tempo de acoplamento, o excesso de ligante foi removido por lavagem com tampão de acoplamento (5 vezes o volume da suspensão). Os grupos reativos remanescentes na matriz ativada foram bloqueados com Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, através de incubação por 16 horas, a 4 °C. Subsequentemente, a suspensão foi lavada (com 5

vezes o volume da suspensão) em três ciclos alternando o pH, com os tampões acetato de sódio 100 mM, pH 4,0 contendo NaCl 500 mM e Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 contendo NaCl 500 mM. Após esse procedimento, a matriz agora acoplada à anidrotripsina (FIGURA 9) foi acondicionada em uma coluna de vidro (6,5 x 2,1 cm).



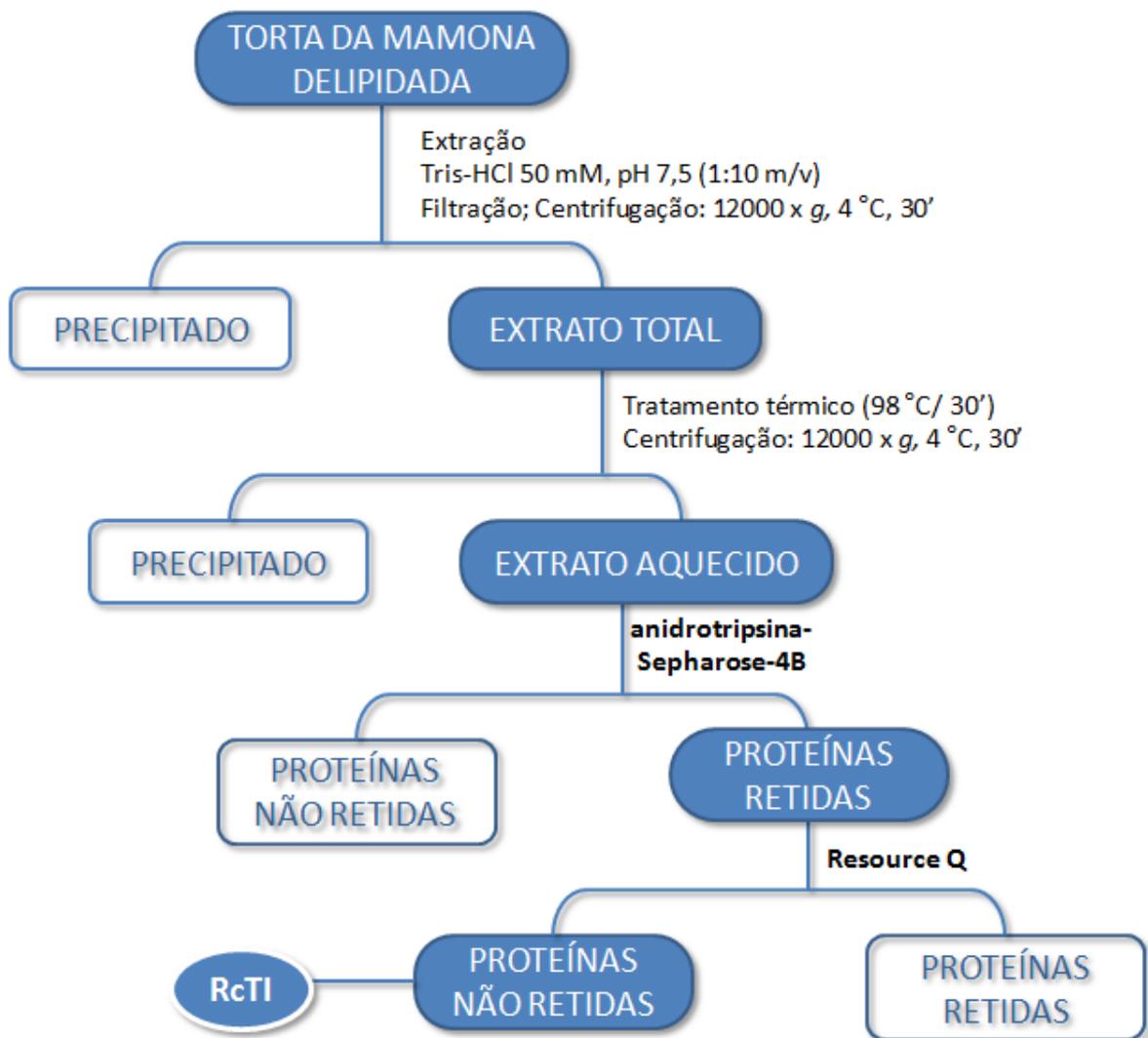
**Figura 9.** Esquema da anidrotripsina acoplada a Sepharose<sup>®</sup> 4B.

Para cromatografia de afinidade em anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B, a fração (cerca de 10 mgP) tratada termicamente (3.3.2.1), na temperatura que apresentou maior atividade inibitória de tripsina, foi aplicada na coluna previamente equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo galactose 50 mM (para evitar interações de moléculas de ricina remanescentes com a matriz Sepharose<sup>®</sup>) e NaCl 500 mM (para evitar interações inespecíficas). O material não retido à matriz foi eluído com o tampão de equilíbrio e o material retido eluído com tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 2,2, contendo galactose 50 mM e NaCl 500 mM. O perfil cromatográfico foi obtido através da leitura de cada fração a 280 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis).

### 3.3.2.3 Cromatografia de troca iônica (aniônica) em Resource<sup>™</sup> Q

A fração retida na cromatografia em anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B foi dialisada contra água ultrapura, liofilizada e, posteriormente, solubilizada em tampão

Tris-HCl 50 mM, pH 8,5. Uma alíquota contendo 1,5 mg dessa amostra foi aplicada na coluna de troca aniônica (Resource<sup>TM</sup> Q), acoplada a um sistema de cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC Pharmacia<sup>®</sup> LKB), sendo, previamente, equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5. Para eluição das proteínas não retidas, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio. Já as proteínas retidas na matriz foram eluídas com concentrações crescentes de NaCl (0,025; 0,050; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1 M) adicionado ao tampão de equilíbrio. A cromatografia foi realizada em fluxo constante de 60 mL/h e monitorada através de leitura a 280 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis). As frações proteicas obtidas foram testadas quanto à presença de atividade anti-trípica. Todas as etapas de purificação do inibidor de tripsina da torta da mamona são mostradas na Figura 10.



**Figura 10** - Esquema geral de purificação do RcTI.

### **3.3.3 Dosagem de proteínas**

A determinação dos teores de proteínas foi feita seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a alíquotas de 0,1 mL das amostras, previamente diluídas. Após 10 minutos, as leituras das absorvâncias foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis).

### **3.3.4 Determinação da atividade anti-trípica**

A atividade anti-trípica do extrato total e das demais frações proteicas foi determinada como descrito por Erlanger, Kokowsky e Cohen (1961). Alíquotas de 15 µL de tripsina bovina (0,15 mg/mL), solubilizadas em HCl 1 mM, foram, cada uma, pré-incubadas com 685 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM + 100 µL da amostra por 10 minutos a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 500 µL de BApNA 1,5 mM, sendo mantida na mesma temperatura de incubação descrita anteriormente. Após 15 minutos, a reação foi parada pela adição de 120 µL de ácido acético 30%. As provas em branco foram feitas adicionando-se o substrato após a adição do ácido acético. A atividade proteolítica residual, em triplicata, foi mensurada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) pela absorvância a 410 nm, indicando a hidrólise de *p*-nitroanilida. Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a diminuição de 0,01 na absorvância em relação ao controle positivo (100% de atividade da tripsina na ausência do inibidor) e expressa como UI/mgP.

### **3.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As eletroforeses foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas (10,5 x 10 cm). O gel de empilhamento continha 3,5% de acrilamida e 1% de SDS, preparados em tampão

Tris-HCl 1 M, pH 6,8. O gel de separação foi feito com 12,5% de acrilamida e 1% de SDS, solubilizados em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. As amostras foram preparadas através da diluição em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1% e azul de bromofenol 0,1%), na presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol 2%. As amostras foram dissolvidas em tampão apropriado, aquecidas a 98 °C durante três minutos e, subsequentemente, centrifugadas a 12.000 x *g* por 3 minutos, a 10 °C. As amostras foram aplicadas nos poços presentes no gel e a corrida eletroforética realizada em cerca de 2 horas, com a seguinte programação: 20 mA (constante) 200 V/4 W (início), por placa. As proteínas foram visualizadas através de incubação do gel, após eletroforese, com azul brilhante de Coomassie G-250 (CANDIANO *et al.*, 2004). Como marcadores de massa molecular, foram utilizados: fosforilase B (97,0 kDa); albumina sérica bovina (67,0 kDa); albumina do ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa); inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa).

### **3.3.6 Detecção de glicoproteína em gel**

A determinação de carboidratos presentes na estrutura do RcTI foi realizada através de eletroforese na presença de SDS, cujo gel foi revelado pelo método do Ácido Periódico de Schiff (PAS), descrito por Kapitany e Zebrowski (1973). O gel e as amostras foram preparados como descrito no item 3.3.5, bem como as condições de corrida utilizadas. Ao término da corrida, o gel foi imerso em uma solução fixadora de ácido tricloroacético (TCA) 12% e, após 30 minutos, foi transferido para uma solução de ácido periódico a 1%, na qual permaneceu por 1 hora. Posteriormente, o gel foi corado com o reagente de Schiff por 50 minutos no escuro. Em seguida, o gel foi lavado repetidas vezes com uma solução de metabissulfito de sódio 0,5%.

### **3.3.7 Sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal**

A sequência de aminoácidos situados na região NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI purificado foi obtida em sequenciador automático “PPSQ-10 Sequencer” da Shimadzu Co<sup>®</sup>, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), seguindo o método de degradação de Edman (EDMAN, 1949). Derivados PHT dos aminoácidos foram detectados a 269 nm, após separação em coluna C18 (4.6 x 2.5 mm), eluída em condições isocráticas, de acordo com as instruções do fornecedor. A sequência NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI foi submetida a buscas por sequências semelhantes no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) através da ferramenta de busca BLASTP (Altschul *et al.*, 1990). Aquelas que apresentaram maior percentual de identidade foram escolhidas e alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW.

### **3.3.8 Determinação do ponto isoelétrico do RcTI**

Na eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE), realizada com o objetivo de determinar o ponto isoelétrico e confirmar a massa molecular do RcTI purificado, 45 µg do inibidor foram solubilizados em 250 µL de tampão de rehidratação [uréia 8 M, tiouréia 1 M, glicerol 10% (v/v), CHAPS 2% (m/v), tampão IPG (pH 3-10) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)] e colocados em contato com fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) de 13 cm de comprimento e faixa de pH 3-10, durante 12 h. A focalização isoelétrica foi realizada em sistema Ettan IPGphor-II (Amersham Bioscience<sup>®</sup>) com a seguinte programação: 200 V por 1 h; 500 V por 1 h; 1000 V por 1 h e um gradiente de 4000 V até atingir 18000 V/h totais a 20 °C; e uma corrente de 50 µA.

Após a IEF, as fitas foram equilibradas, sob agitação, em solução de equilíbrio e redução [Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, contendo glicerol 30% (v/v), uréia 6 M, SDS 2% (m/v), DTT 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,1%] durante 15 minutos em agitação lenta. Posteriormente, essas fitas foram lavadas com uma solução de alquilação [Tris-HCl 50 mM pH 8,8, contendo glicerol 30% (v/v), uréia 6 M, SDS 2% (m/v),

iodoacetamida 2,5% (m/v) e azul de bromofenol 0,1%], por 15 minutos, sob leve agitação orbital. Para eletroforese em segunda dimensão, a fita foi colocada no topo de um gel de poliacrilamida a 12,5% (contendo SDS, como descrito em 3.3.5) e a eletroforese realizada sob corrente constante de 30 mA e tensão máxima de 250 V. Este procedimento foi realizado em um sistema de eletroforese vertical (Hoefer SE 600 Ruby, Amersham Bioscience®). Após a corrida, o gel foi incubado com azul brilhante de Commassie G-250 (CANDIANO *et al.*, 2004), lavado com água destilada, e analisado usando *scanner* (HP - resolução de 1200 x 600 dpi) e *software* Marter II (Amersham Bioscience®).

### **3.3.9 Estabilidade térmica do RcTI**

Alíquotas de 0,5 mL do inibidor (0,020 mg/mL) foram incubadas a 98 °C (temperatura de fervura) durante 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 e 120 minutos, em banho-maria. Decorrido cada tempo de incubação, as amostras foram resfriadas a 4 °C. Subsequentemente, 100 µL (2 µg) do inibidor foram utilizados no ensaio de atividade anti-trípica, que foi realizado em triplicata como descrito no item 3.3.4.

### **3.3.10 Estabilidade do RcTI em diferentes pHs**

O efeito do pH na estabilidade do RcTI foi avaliado de acordo com Gomes *et al.* (2005), com pequenas modificações. Alíquotas de 1 mL do inibidor (0,020 mg/mL) foram dialisadas a 4 °C contra os seguintes tampões, todos na concentração de 50 mM: glicina-HCl, pHs 2 e 3; acetato de sódio, pHs 4 e 5; fosfato de potássio, pH 6; Tris-HCl, pHs 7 e 8; e glicina-NaOH, pHs 9, 10 e 11 por, aproximadamente, 16 horas. Após o tempo de diálise, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as amostras foram dialisadas a 4 °C contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, durante 4 horas (1 L), objetivando ajustar ao pH do ensaio de atividade anti-trípica. O ensaio de inibição, realizado como descrito no item 3.3.4, foi feito em triplicata, utilizando 100 µL do inibidor (2 µg).

### 3.4 Atividades biológicas

#### 3.4.1 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do RcTI

##### 3.4.1.1 Obtenção dos esporos

Os fungos *F. oxysporum*, *F. solani*, *C. lindemuthianum* e *R. solani* foram crescidos em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio BDA estéril, durante cerca de 15 dias. As placas foram, então, abertas em câmara de fluxo laminar, 10 mL de água estéril foram adicionados sobre o micélio e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, através de manuseio suave, os esporos foram liberados. Os resquícios de hifas foram removidos através da filtração dessa suspensão em pano de trama fina. A suspensão foi ajustada para a concentração de  $2,0 \times 10^5$  esporos/mL, para serem utilizados no ensaio de inibição de germinação.

##### 3.4.1.2 Ensaio de inibição da germinação de esporos

O efeito inibitório do RcTI na germinação dos fungos *F. oxysporum*, *F. solani*, *C. lindemuthianum* e *R. solani* foi avaliado em placas de germinação apropriadas, onde 10  $\mu$ L de suspensão de esporos ( $2,0 \times 10^5$  células/mL) + 10  $\mu$ L (13  $\mu$ g) do RcTI purificado foram incubados. Água estéril foi usada com controle negativo e peróxido de hidrogênio como controle positivo, ambos substituindo o inibidor. As placas utilizadas no ensaio foram mantidas a 37 °C durante 24 h em recipiente contendo papéis de filtro umedecidos (umidade cerca de 100%) com água estéril. Decorrido o tempo do ensaio (24 h), as placas foram analisadas por microscopia óptica (*Olympus System Microscope BX 60*), sendo considerado como tendo germinado o esporo que apresentou hifa de germinação com tamanho correspondendo ao dobro do seu maior diâmetro.

### 3.4.1.3 Ensaio de inibição do crescimento micelial de fungos

Para avaliação da atividade do RcTI sobre o crescimento vegetativo (micelial) dos fungos, foi utilizada a metodologia descrita por Freire *et al.* (2002), com modificações. Em placas de ELISA de 96 poços, alíquotas de 10 µL da suspensão de esporos ( $2,0 \times 10^5$  células/mL) foram incubadas com 100 µL de meio YPD (do Inglês *yeast potato dextrose*), durante 12 h, a 37 °C na ausência de luz, para que os fungos germinassem. Comprovada a germinação, 100 µL da solução de RcTI (1 mg/mL em água ultrapura), previamente filtrados em filtro Millex GV (0,22 µm), foram incubados com cada fungo testado. As leituras de absorbância foram feitas em leitor de ELISA (ELx800, BIO-TEK) a 630 nm, em intervalos de 12 h, até 96 h após o início da incubação. Como controles, negativo e positivo respectivamente, foram utilizados água estéril e peróxido de hidrogênio (100 mM).

### 3.4.2 Avaliação do efeito do RcTI sobre proteases do intestino médio de larvas de *A. aegypti*

#### 3.4.2.1 Obtenção das proteases intestinais das larvas de *A. aegypti*

As larvas de 3º estágio de desenvolvimento foram imobilizadas em gelo e os intestinos médios removidos com a utilização de pinças e lupa estereoscópica, homogeneizados com auxílio de um *potter*, em banho de gelo, por aproximadamente 5 minutos, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Subsequentemente, o homogenato foi centrifugado a  $12.000 \times g$  por 30 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes obtidos foram utilizados imediatamente como fonte das enzimas para os ensaios de inibição.

#### 3.4.2.2 Ensaio de inibição das proteases de *A. aegypti*

Para o ensaio de inibição das proteases de *A. aegypti* foram utilizados 60 µL do homogenato intestinal das larvas e 100 µL do RcTI na concentração de 0,1 mg/mL. O inibidor de tripsina da soja (SBTI) foi utilizado como padrão de referência

na mesma concentração (0,1 mg/mL). O ensaio de inibição foi conduzido de acordo com o item 3.3.4.

### **3.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e a significância das diferenças entre as médias, determinada por teste de Duncan ( $p < 0,05$ ), através do *software* Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

## 4 RESULTADOS

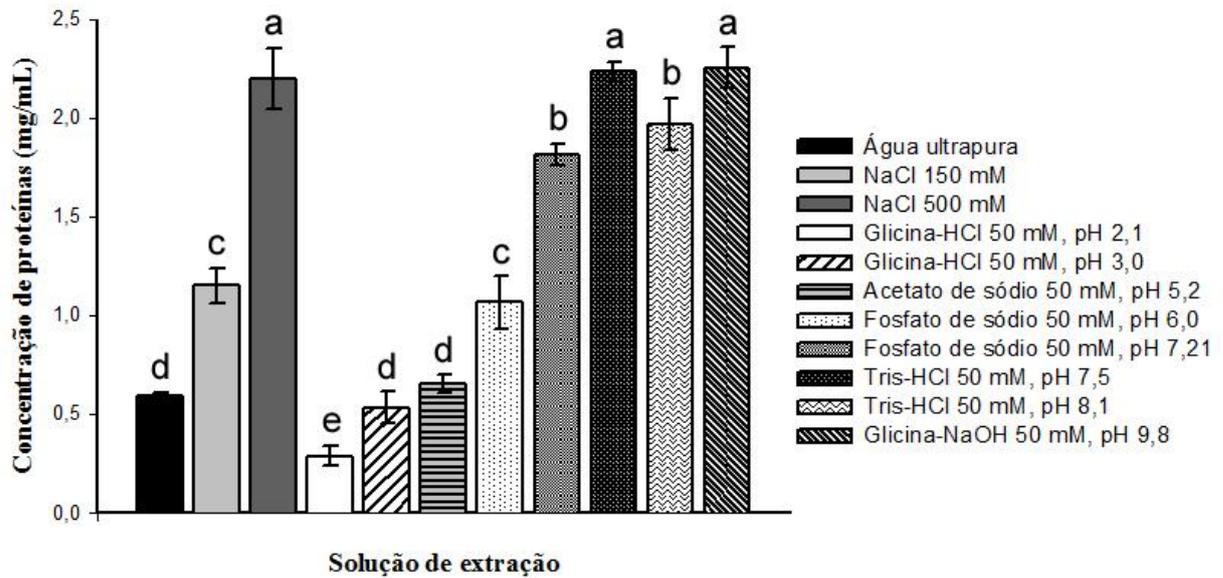
---

### 4.1 Obtenção do extrato total da torta da mamona

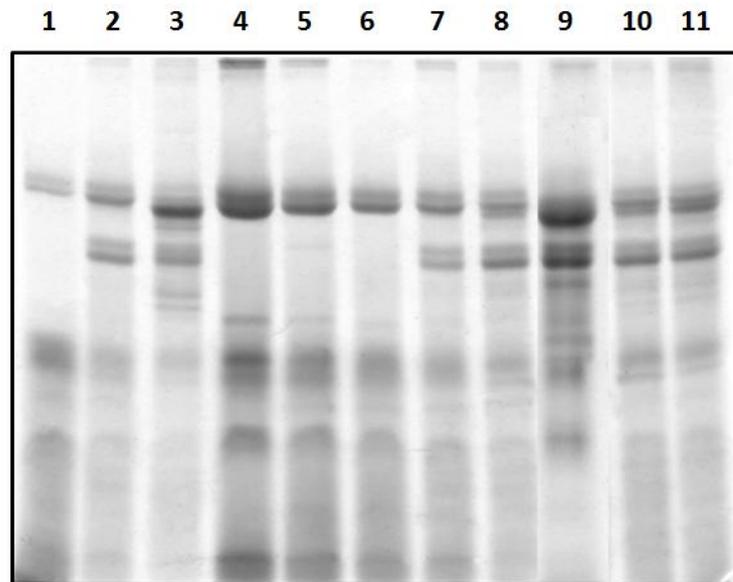
#### 4.1.2 Seleção do tampão de extração

A Figura 11 mostra que a concentração de proteínas de extratos da torta da mamona delipidada varia de acordo com a solução extratora utilizada. Água ultrapura (0,59 mgP/mL), NaCl 150 mM (1,15 mgP/mL) e as soluções com pHs ácidos: glicina-HCl 50 mM, pH 2,1 (0,29 mgP/mL); glicina-HCl 50 mM, pH 3,0 (0,53 mgP/mL); acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 (0,65 mgP/mL) e fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 (0,65 mgP/mL) apresentaram baixas concentrações de proteínas. A solução de NaCl 500 mM (2,19 mgP/mL), as de pHs neutros: fosfato de sódio pH 7,21 (1,81 mgP/mL) e Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (2,2 mg/mL) e pHs alcalinos: Tris-HCl 50 mM, pH 8,1 (1,9 mg/mL) e glicina-NaOH 50 mM, pH 9,8 (2,2 mg/mL) apresentaram maior capacidade de extração das proteínas da torta da mamona. A Figura 12 mostra o perfil eletroforético de cada extração.

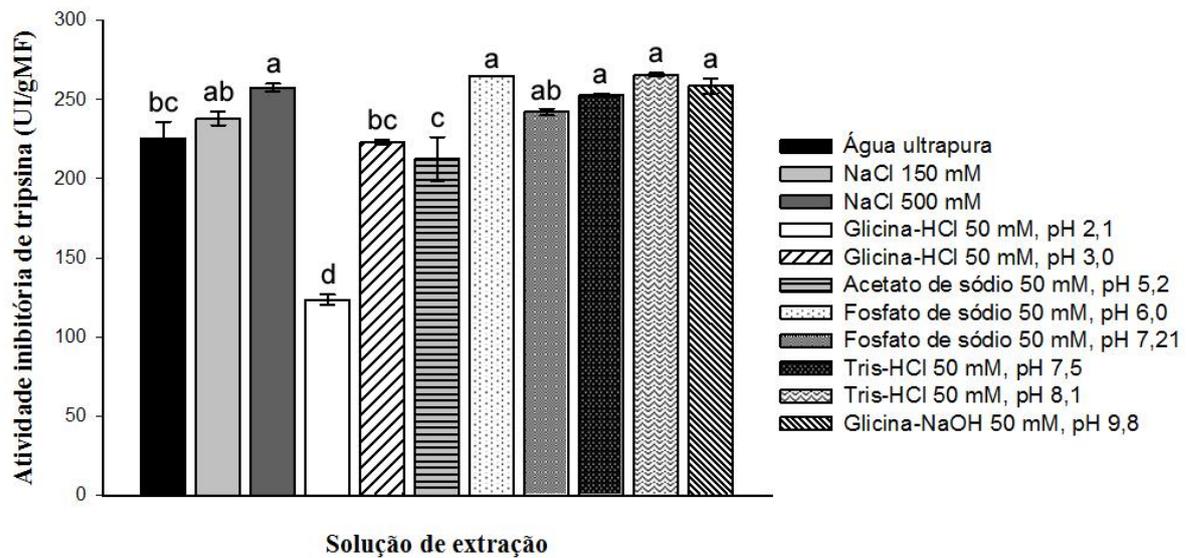
Todas as soluções testadas apresentaram atividade inibitória de tripsina acima de 200 UI/gMF, exceto o tampão glicina-HCl 50 mM, pH 2,1 (123,5 UI/gMF) (FIGURA 13). A solução escolhida para extração das proteínas solúveis da torta da mamona foi Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, por ser o tampão do ensaio de inibição de tripsina e ter extraído altas quantidades de inibidores (253 UI/gMF).



**Figura 11 - Concentração de proteínas totais de extratos da torta da mamona (*Ricinus communis* L.) obtidos em diferentes soluções.** Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam valores que não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) de proteínas extraídas da torta da mamona (*Ricinus communis* L.) em diferentes soluções de extração.** 1, Água ultrapura; 2, NaCl 150 mM; 3, NaCl 500 mM; 4, Glicina-HCl 50 mM, pH 2,1; 5, Glicina-HCl 50 mM, pH 3,0; 6, Acetato de sódio 50 mM, pH 5,2; 7, Fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0; 8, Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,21; 9, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; 10, Tris-HCl 50 mM, pH 8,1; 11, Glicina-NaOH 50 mM, pH 9,8. Em cada raia foram aplicados 6,5  $\mu$ g de proteína (em 30  $\mu$ L de volume de amostra).

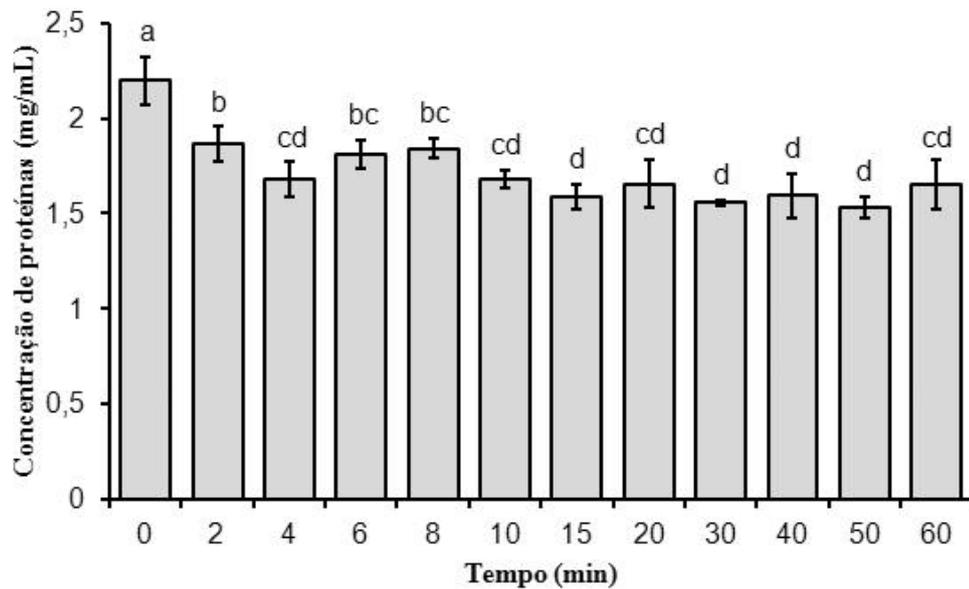


**Figura 13 - Atividade inibitória de tripsina (UI/gMF) de extratos proteicos totais da torta da mamona (*Ricinus communis* L.) obtidos em diferentes soluções.** Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam valores que não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

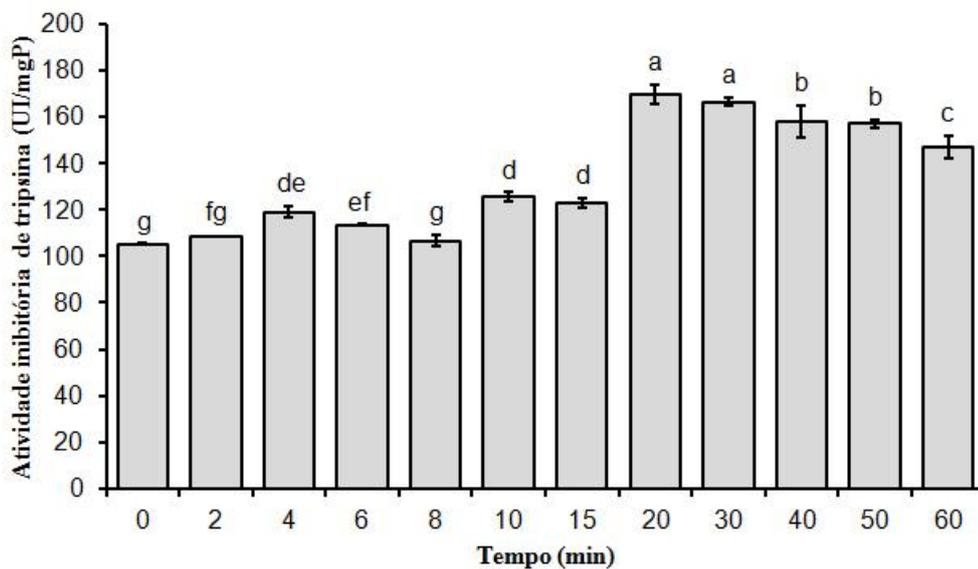
## 4.2 Purificação do RcTI

### 4.2.2 Tratamento térmico do extrato total da torta da mamona

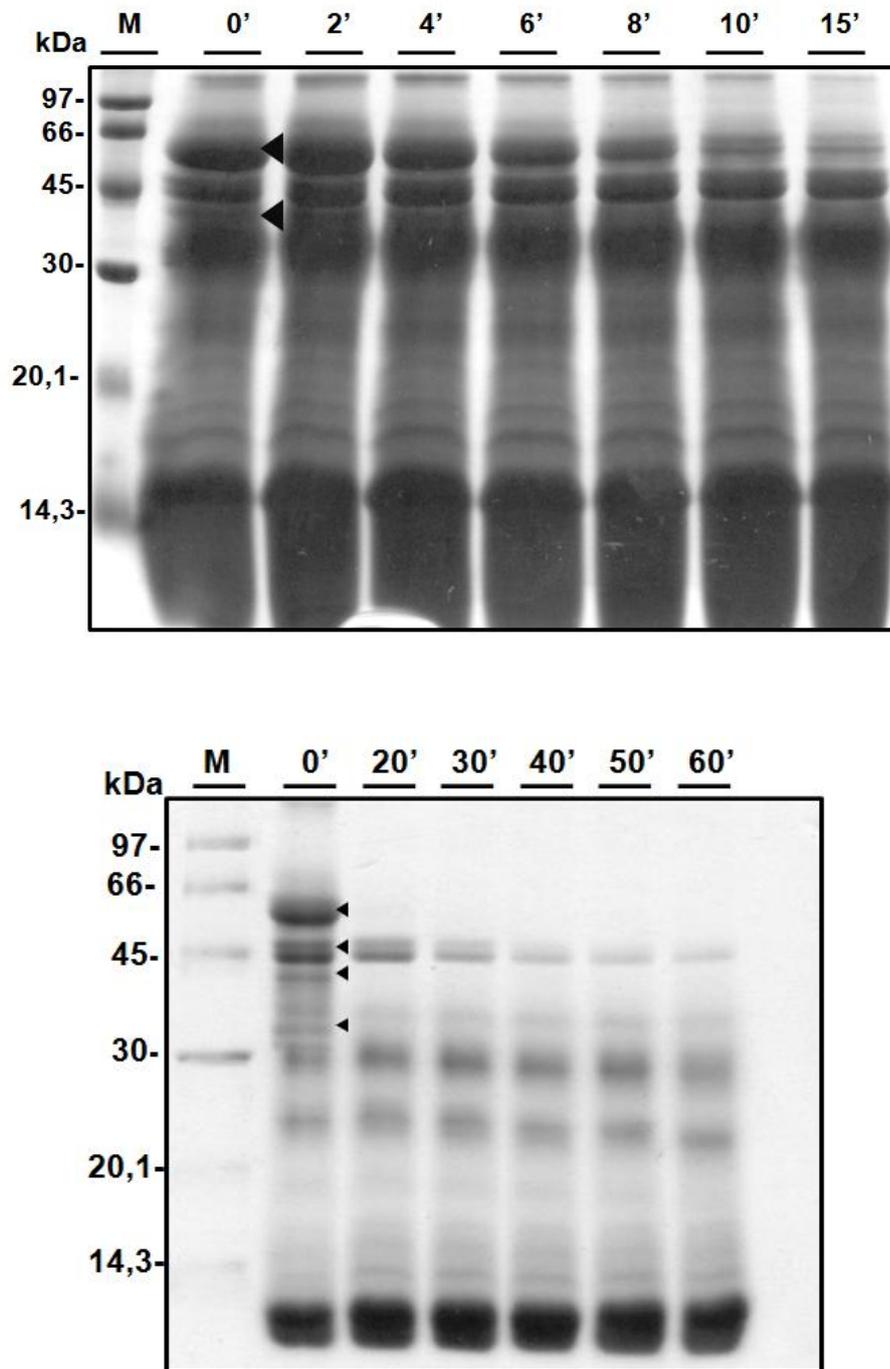
Devido à presença de atividade proteásica no extrato da torta de mamona, que interferia na detecção de atividade inibitória, o extrato foi tratado a 98 °C (temperatura de fervura) por diversos tempos. Após tratamento térmico, a concentração de proteínas foi diminuída (FIGURA 14) em cerca de 15%-30% e a atividade inibitória de tripsina elevada (FIGURA 15) em, aproximadamente, 13-61% em relação ao controle dependendo do tempo de exposição ao calor. O perfil eletroforético mostrou que a maior diminuição no número de bandas de proteínas ocorreu a partir de 30 minutos de aquecimento (FIGURA 16). Portanto, essa fração foi escolhida para os passos de purificação subsequentes.



**Figura 14 - Efeito do tratamento térmico sobre a concentração de proteínas do extrato total da torta da mamona (*Ricinus communis* L.) em função do tempo.** Extrato total da torta da mamona foi aquecido a 98 °C em diferentes tempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) e a concentração de proteínas foi mensurada posteriormente. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam valores que não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).



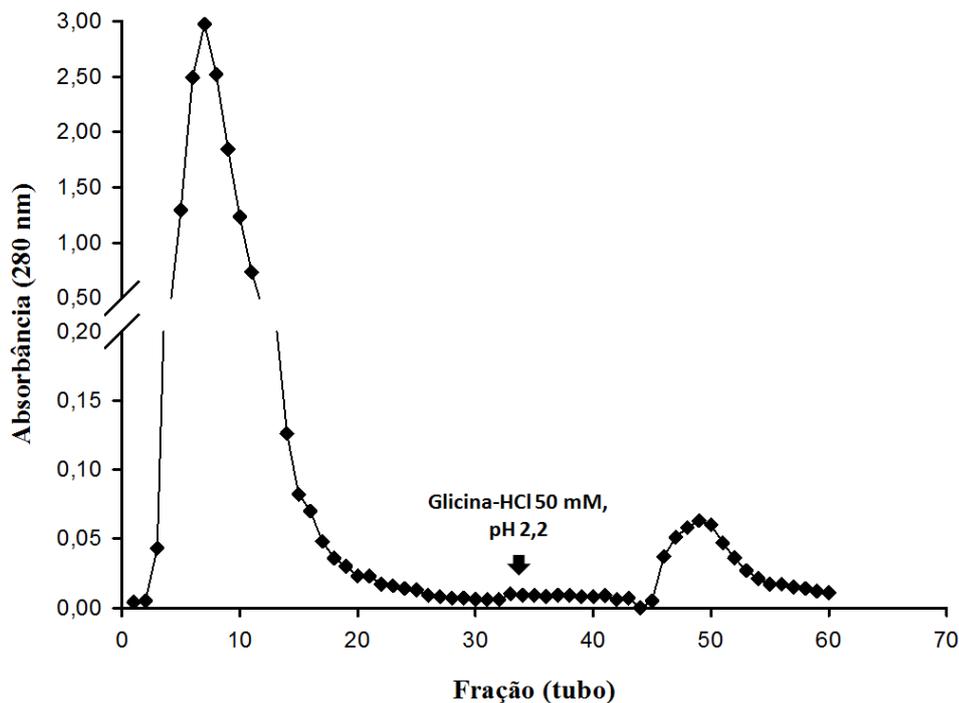
**Figura 15 - Efeito do tratamento térmico sobre a atividade inibitória de tripsina do extrato proteico total da torta da mamona (*Ricinus communis* L.) em função do tempo.** Extrato total da torta da mamona foi aquecido a 98 °C em diferentes tempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) e a atividade inibitória de tripsina foi mensurada posteriormente. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam valores que não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16 - Perfil eletroforético (15%; SDS-PAGE) do extrato proteico total da torta da mamona (*Ricinus communis* L.) após ter sido submetido a tratamento térmico (98 °C) durante diferentes tempos. M, Marcadores de massa molecular; 0', Controle (sem aquecimento); 2'-60', tempos de aquecimento (minutos). Em cada raia foram aplicados 34,4 µg de proteína (em 20 µL de volume de amostra).**

### 4.2.3 Cromatografia de Afinidade em anidrotripsina-Sepharose® 4B

O extrato tratado termicamente a 98 °C, durante 30 minutos, foi submetido à cromatografia de afinidade em anidrotripsina-Sepharose® 4B, resultando em uma fração proteica não retida e uma retida, que foi eluída com tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 2,2 contendo NaCl 500 mM e galactose 50 mM (FIGURA 17).

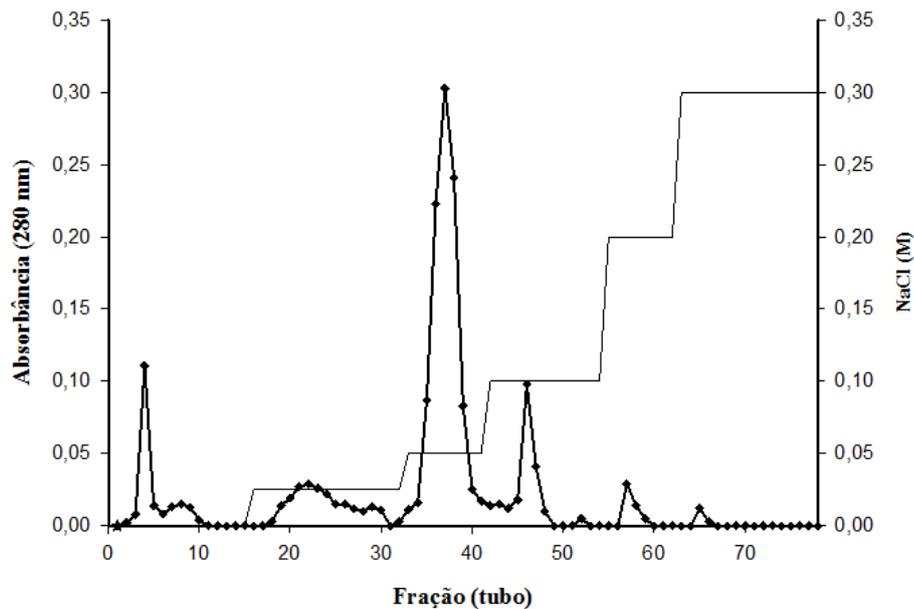


**Figura 17 - Perfil cromatográfico da eluição das proteínas retidas em coluna de anidrotripsina-Sepharose® 4B.** A fração tratada termicamente a 98 °C, por 30 minutos (10 mgP/4 mL), foi aplicada na matriz de afinidade para separação de inibidor de tripsina. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo Galactose 50 mM e NaCl 0,5 M, o qual também foi utilizado para remoção das proteínas não retidas. Para remoção do material retido, foi utilizado tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 2,2, contendo Galactose 50 mM e NaCl 500 mM. (Fluxo: 45 mL/h; Frações: 2 mL por tubo).

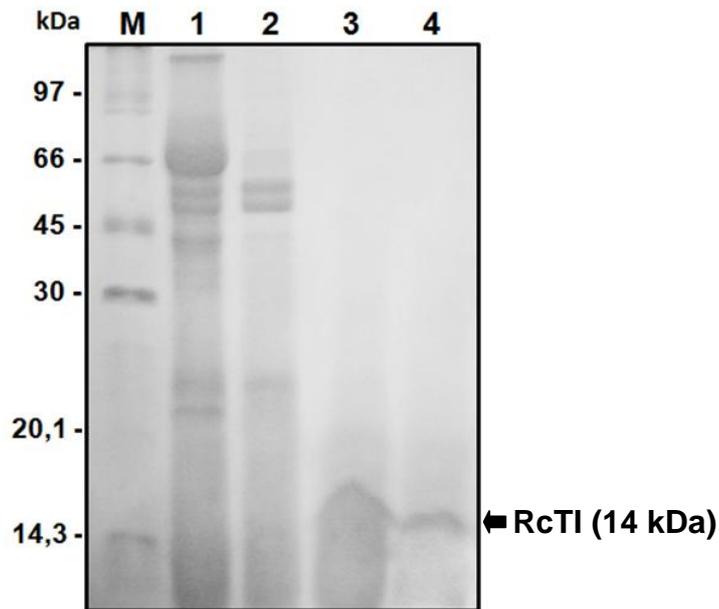
### 4.2.4 Cromatografia de troca iônica (aniônica) em Resource™ Q

A fração retida em anidrotripsina-Sepharose® 4B foi aplicada em uma coluna de troca aniônica (Resource™ Q). A fração não retida na coluna foi eluída com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5). As frações retidas na matriz foram eluídas com concentrações crescentes de NaCl entre 0,025 a 0,30 M, sendo que, a

partir 0,40 M até 1,0 M não mais foi eluído qualquer material proteico (FIGURA 18). Todas as frações proteicas obtidas (não retida e retidas) apresentaram atividade anti-tríptica, sendo que a fração não retida nessa coluna se apresentou como banda única quando analisada em gel de eletroforese na presença de SDS, com massa molecular aparente de 14 kDa, na ausência (FIGURA 19) ou presença de agentes redutores (não mostrado). Essa banda proteica não possui polissacarídeos covalentemente ligados à sua estrutura, não sendo, portanto, uma glicoproteína, como deduzido pela análise do experimento da Figura 20. Como se apresentou como proteína única, altamente pura, e com atividade anti-tríptica, passou a ser denominada de inibidor de tripsina de *Ricinus communis* ou, abreviadamente RcTI, em referência ao termo em Inglês *Ricinus communis trypsin inhibitor*. No final do processo de purificação, foi obtido um rendimento de 0,1% para o RcTI (TABELA 2).



**Figura 18 - Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca iônica (Resource™ Q) acoplada a FPLC.** A fração retida (1,5 mg/2mL) em anidrotripsina-Sepharose® 4B foi aplicada na coluna de troca iônica. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5. Para remoção do material retido, foram utilizadas concentrações crescentes de NaCl. (Fluxo: 60 mL/h; Frações: 2 mL por tubo).



**Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%; SDS-PAGE) das etapas de purificação do RcTI.** M, Marcadores de massa molecular; 1, Extrato total; 2, Extrato total tratado termicamente; 3, Fração retida em Anidrotipsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B; 4, Material não retido em Resource<sup>™</sup> Q (RcTI purificado). Em cada raia (indicadas por 1, 2, 3 e 4) foram aplicados cerca de 20 µg de proteína (em 15 µL de volume de amostra).



**Figura 20 - Eletroforese (12,5 %; SDS-PAGE) revelada pelo método do ácido periódico de Schiff.** 1, RcTI; 2, fetuína (controle positivo); 3, SBTI (controle negativo). Em cada raia foram aplicados 10 µg de proteína.

**Tabela 2** - Etapas de purificação\* do inibidor de tripsina da torta da mamona (*R. communis* L.)

Etapas	Atividade total (UI**)	Proteína (mg)	Atividade específica (UI/mg)	Purificação (X)	Rendimento (%)***
Extrato total	214293,33	392,00	546,67	1,00	100
Extrato tratado termicamente (98 °C, 30')	121589,44	210,12	578,67	1,06	53,6
Anidrotripsina-Sepharose® 4B	18919,11	0,80	23648,89	43,26	0,2
Resource™ Q	11980,00	0,45	26622,22	48,67	0,1

\*Purificação a partir de 15,68 g da torta da mamona delipada.

\*\* UI refere-se à unidade de inibição, onde 1 UI representa a diminuição da atividade da tripsina em 0,01 unidade de absorbância, lida em 410 nm.

\*\*\* Calculado com base na proteína recuperada.

### 4.3 Sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI

Foi obtida uma sequência NH<sub>2</sub>-terminal de 32 aminoácidos (FIGURA 21), através do sequenciamento automático. A análise comparativa com outras proteínas depositadas em bancos de dados mostrou que a sequência NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI possui similaridade de 83% com uma sequência interna de uma proteína de armazenamento rica em enxofre (albumina 2S) de *R. communis* e de 48% com uma sequência interna de uma proteína do tipo “napin” (albumina 2S) de *R. communis*.

```

RcTI      -----MDYSAEIEKQQL 13
2Ssulfur-rich  MAKLAILLASFIALLFLVDASIYRTTVIVDAEDANNILRQDIHQQQRGSCSAEIEKQQL 60
Napin-like  -----PSQQGCRGQIQEQQL 16
           . . :*:****

RcTI      WTSQQYIEKEVTGIGPQMD----- 32
2Ssulfur-rich  WRCQQYIKKEVTGWGPRMDYYPLCCDHLEQMTSQCRCEGLRQAIKQQSEGQIEGEDVRE 120
Napin-like  RQCQYIKQQVSGQGPRRS----- 35
           .*:***::*: * *: .

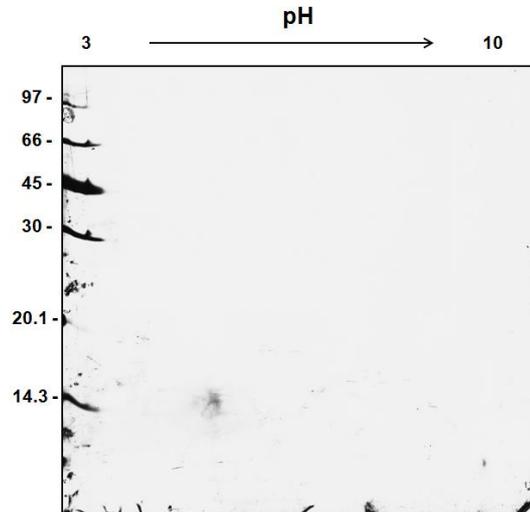
RcTI      -----
2Ssulfur-rich  AFRIAQDLPSRCGVSPSPCQFEPGLGF 147
Napin-like  -----

```

**Figura 21 - Alinhamento da sequência NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI com sequências de proteínas vegetais, usando o ClustalW.** Os números de acesso das sequências utilizadas na análise comparativa são: XP\_002522856.1 (*2S sulfur-rich seed storage protein*) e AAB50870.1 (*Napin-like protein*), ambas de *R. communis*. (\*) indica aminoácidos idênticos; (.) indica aminoácidos semi conservados e (:) indica aminoácidos conservados.

#### 4.4 Determinação do ponto isoelétrico do RcTI

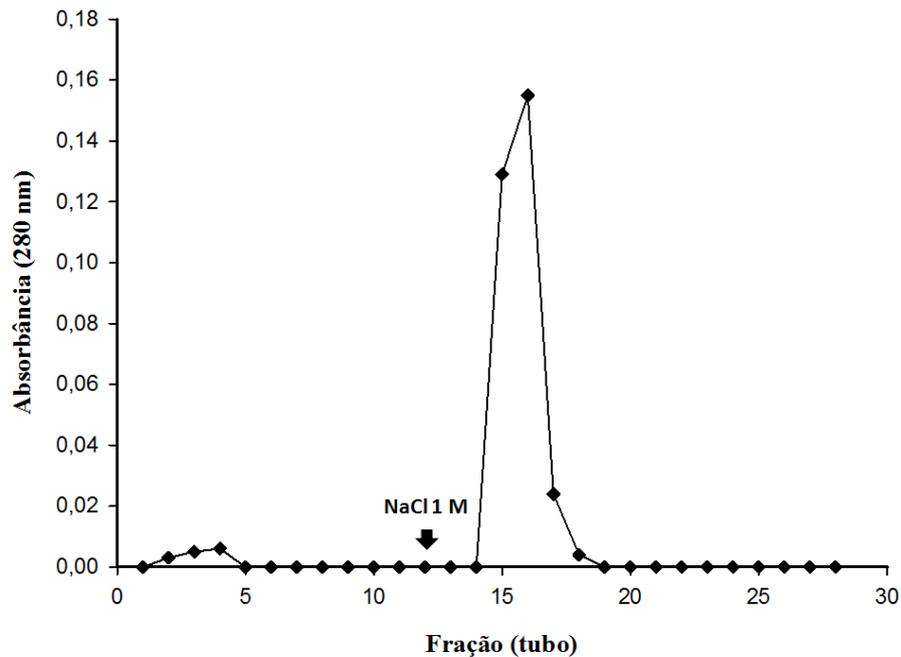
Através da eletroforese bidimensional, RcTI apresentou-se como um *spot* de massa molecular de 14 kDa e ponto isoelétrico ácido de 5,2 (FIGURA 22).



**Figura 22 - Eletroforese bidimensional do RcTI.** Os marcadores de massa molecular utilizados estão assinalados à esquerda do gel de poliacrilamida (12,5%). A amostra foi submetida à focalização isoelétrica em fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida, na faixa de 3-10 (mostrada acima da figura).

#### 4.5 Cromatografia de troca iônica (aniônica) em Resource™ Q – RcTI recromatografado

Após constatar que o ponto isoelétrico do RcTI é ácido, este foi recromatografado em Resource™ Q, nas mesmas condições de corrida mencionadas no item 3.3.2.3, com o objetivo de verificar se, livre de contaminantes, haveria ou não interação com a matriz positiva. A Figura 23 mostra que esta proteína é capaz de interagir com a matriz. Entretanto, quando é aplicada com outras proteínas (fração retida em anidrotripsina-Sepharose® 4B), esse fato não é observado (FIGURA 18).



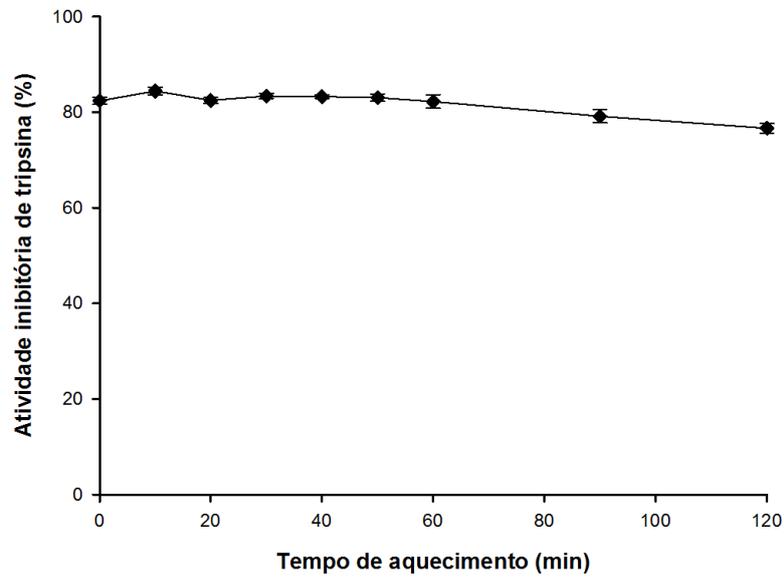
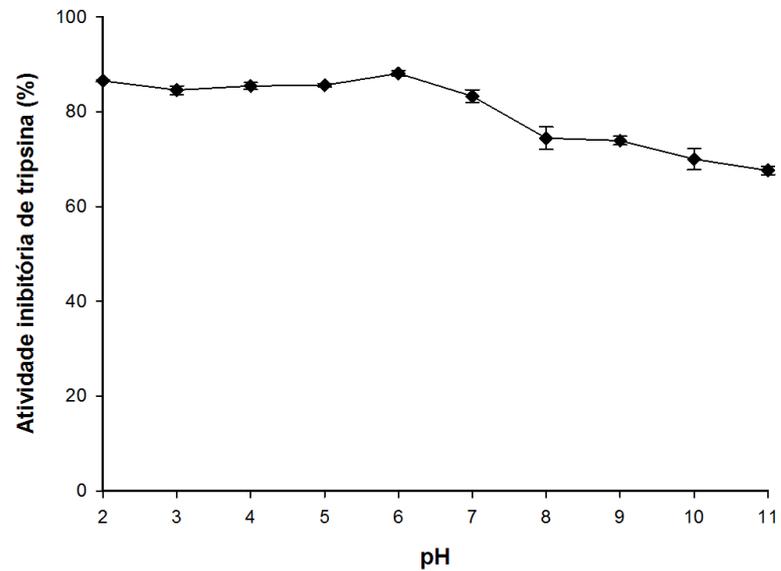
**Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido em coluna de troca iônica (Resource™ Q) acoplada a FPLC.** O RcTI (0,19 mg/2 mL) foi recromatografado na coluna de troca iônica. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5. Para remoção do material retido, foram utilizadas concentrações crescentes de NaCl. (Fluxo: 60 mL/h; Frações: 2 mL por tubo).

#### **4.6 Estabilidade térmica do RcTI**

A estabilidade térmica do RcTI foi testada incubando a proteína purificada a 98 °C durante 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 e 120 minutos. Nesse ensaio, foi observado que a proteína se manteve praticamente estável mesmo após 120 minutos de aquecimento a 98 °C, sendo perdida apenas 7% da atividade inibitória inicial, nesse tempo (FIGURA 24A).

#### **4.7 Estabilidade do RcTI em diferentes pHs**

A estabilidade do RcTI em diferentes pHs foi testada através da incubação da proteína purificada em diferentes soluções tampões com pHs variados (2-11) a 37 °C por 30 min. A Figura 24B revelou que o RcTI permaneceu com atividade inibitória estável na faixa de pHs ácidos (pH 2-6), tendo diminuído de, aproximadamente, 20% sua capacidade inibitória em pHs alcalinos (pH 8-11).

**A****B**

**Figura 24 - Estabilidade do RcTI à temperatura (A) e a diferentes pHs (B).** A estabilidade térmica foi testada após incubação do RcTI a 98 °C em diferentes tempos. O RcTI foi pré-incubado por 30 minutos a 37 °C em diferentes intervalos de pH e posteriormente, a atividade anti-tripsina foi mensurada em pH 7,5. Barras indicam o desvio padrão da determinação em triplicata.

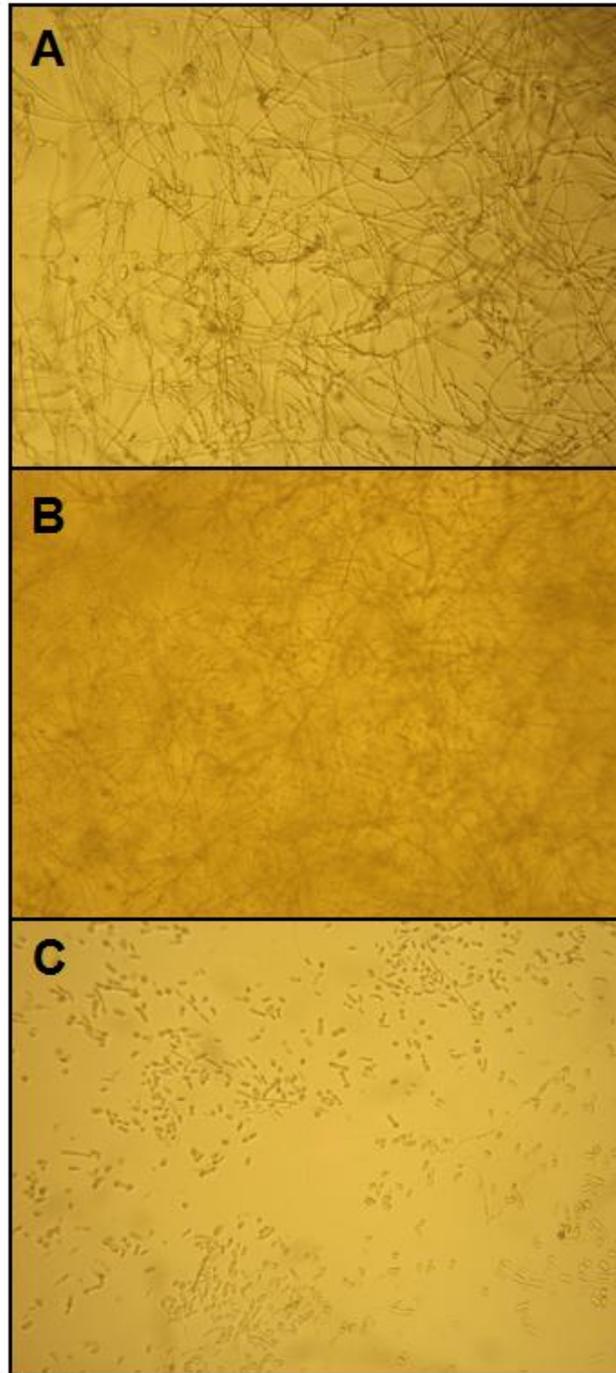
## **4.8 Avaliação da atividade antifúngica do RcTI *in vitro***

### **4.8.1 Efeito do RcTI na germinação de esporos de fungos fitopatogênicos**

RcTI (13 µg) não foi capaz de inibir a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* (FIGURA 25), *F. solani* (FIGURA 26) e *R. solani* (FIGURA 27), mas foi capaz de inibir a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides* (FIGURA 28).

### **4.8.2 Efeito do RcTI no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos**

RcTI (100 µg) não foi capaz de inibir o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* (FIGURA 29), *R. solani* (FIGURA 30) e *C. gloeosporioides* (FIGURA 31).



**Figura 25 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C). Fotomicrografias obtidas após 24 h de incubação do fungo com as amostras indicadas. Aumento: 10 X.**

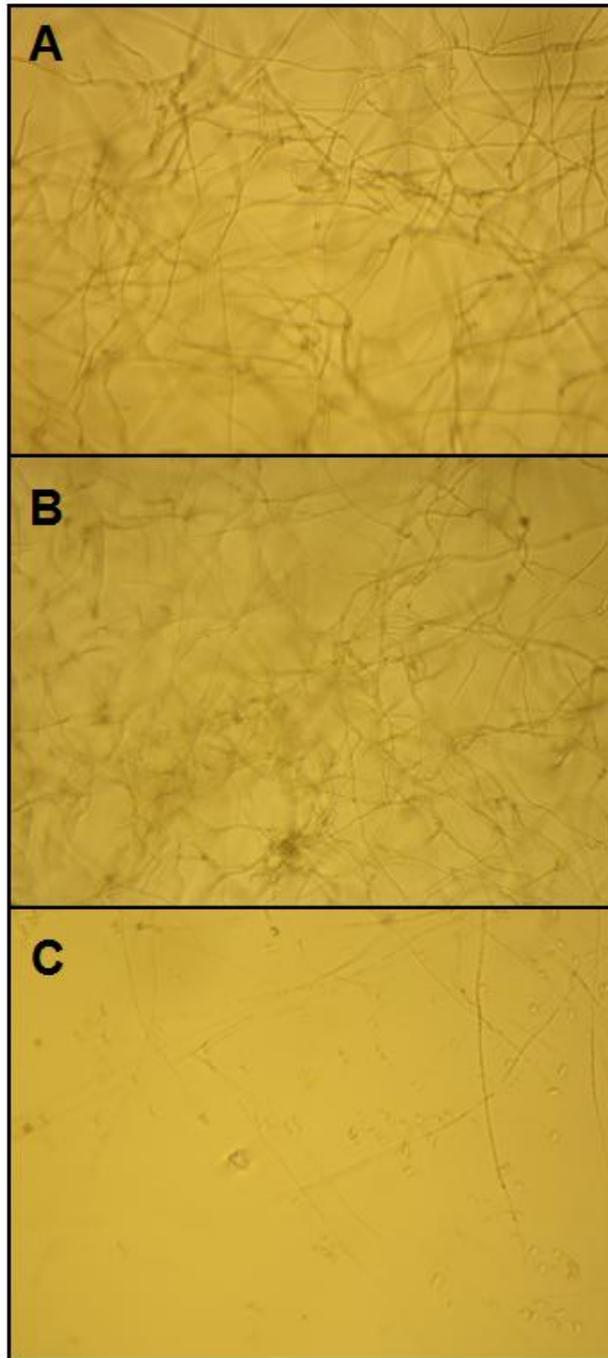
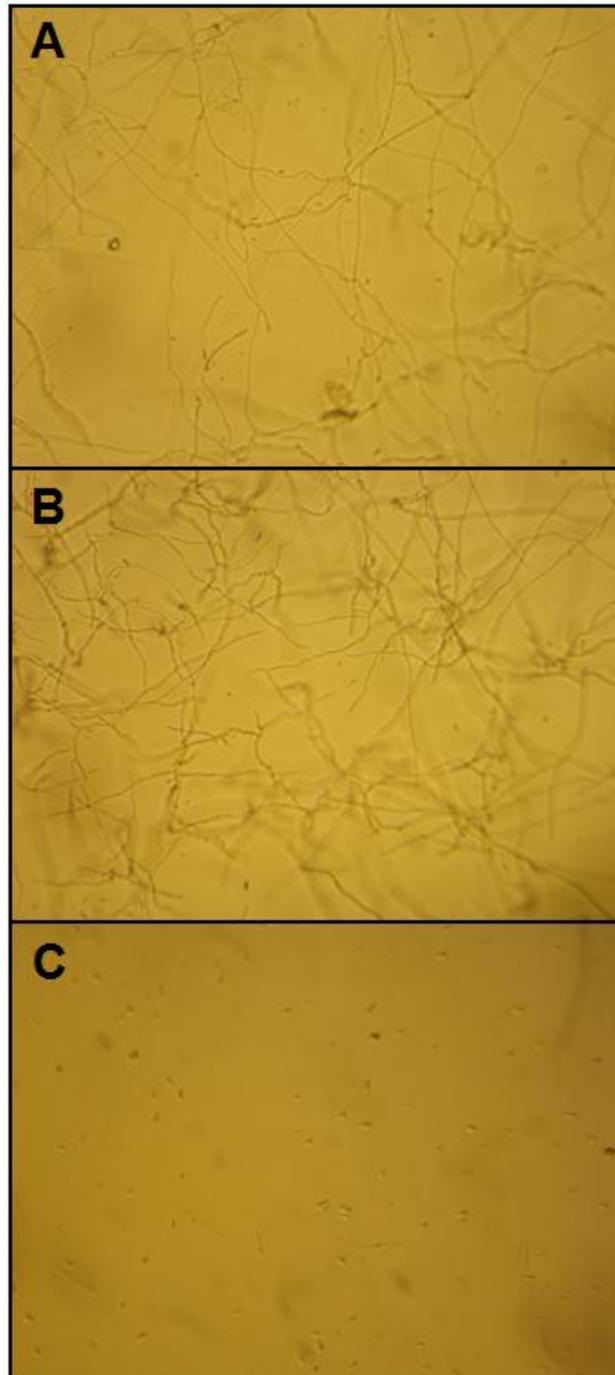
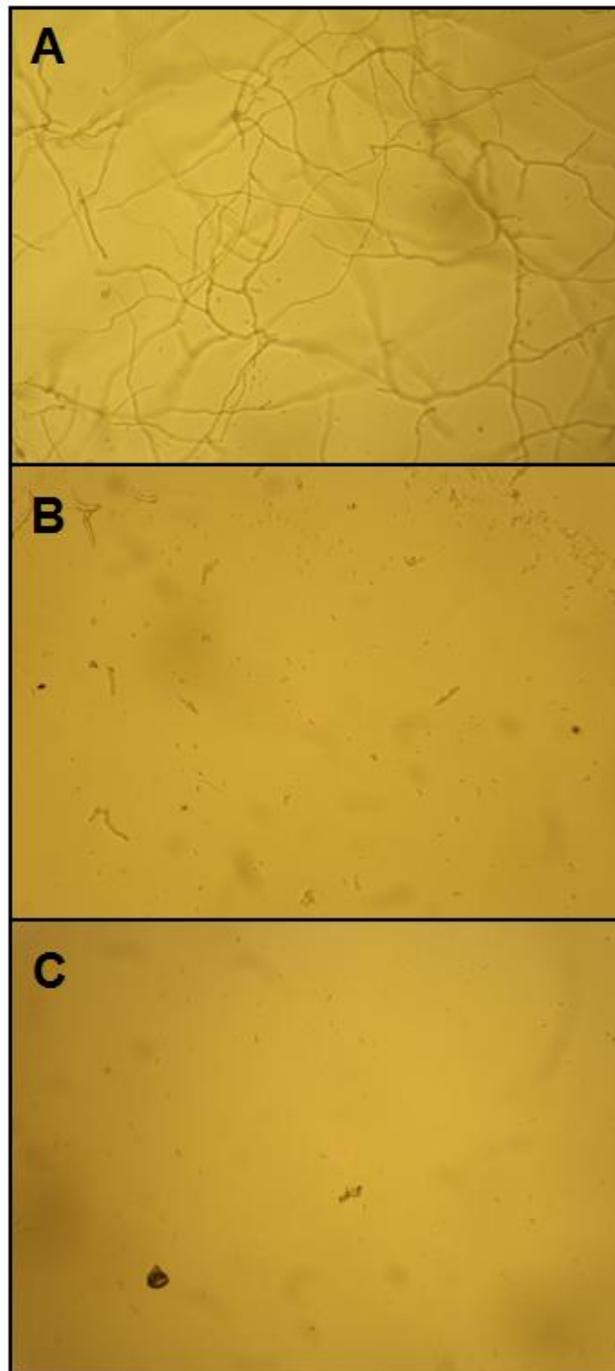


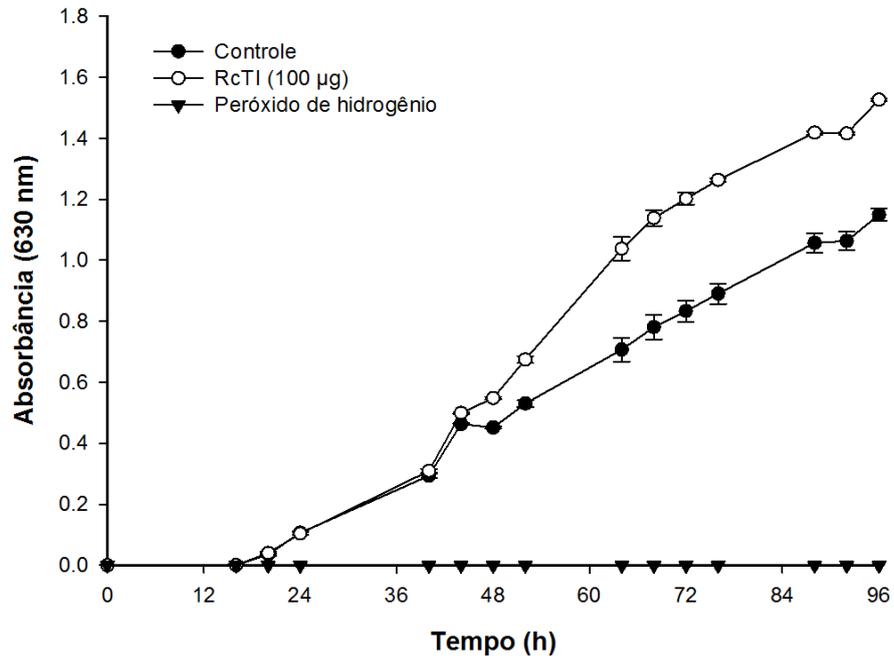
Figura 26 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Fusarium solani* incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C). Fotomicrografias obtidas após 24 h de incubação do fungo com as amostras indicadas. Aumento: 10 X.



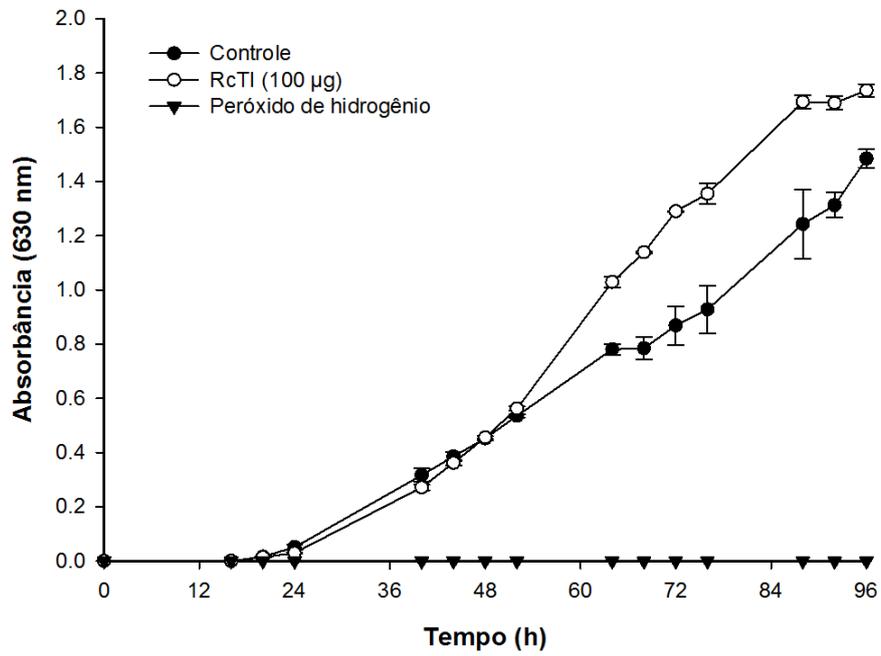
**Figura 27 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Rhizoctonia solani* incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C). Fotomicrografias obtidas após 24 h de incubação do fungo com as amostras indicadas. Aumento: 10 X.**



**Figura 28** - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* incubados com água destilada estéril (A), 13 µg de RcTI (em 10 µL de água estéril) (B) e peróxido de hidrogênio 100 mM (C). Fotomicrografias obtidas após 24 h de incubação do fungo com as amostras indicadas. Aumento: 10 X.



**Figura 29 - Curva de crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* na ausência (controle) e presença do RcTI purificado (100 µg).** Peróxido de hidrogênio (100 mM) foi utilizado como controle positivo. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata.



**Figura 30 - Curva de crescimento vegetativo de *Rhizoctonia solani* na ausência (controle) e presença do RcTI purificado (100 µg). Peróxido de hidrogênio (100 mM) foi utilizado como controle positivo. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata.**

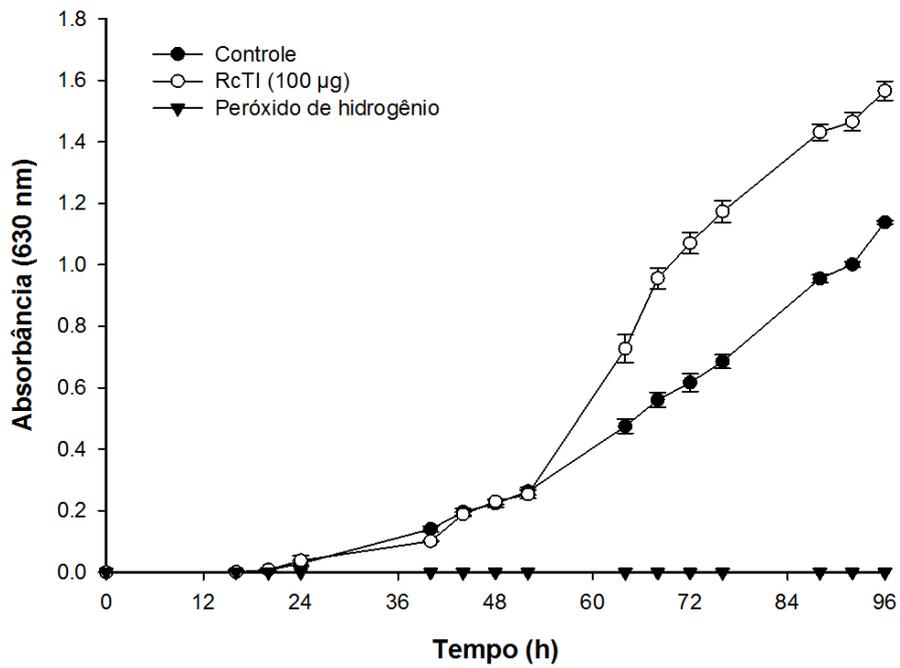
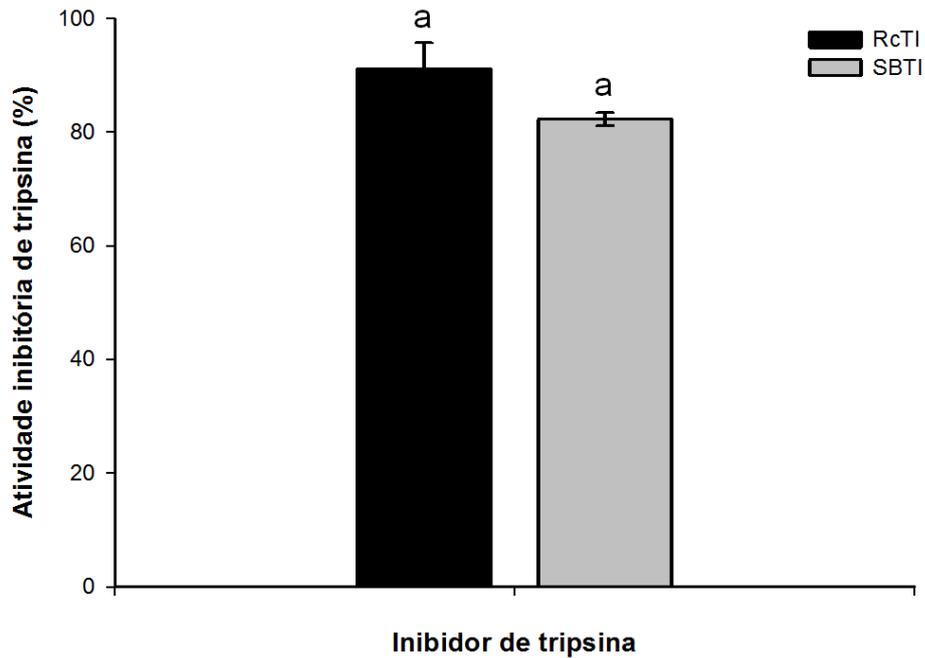


Figura 31 - Curva de crescimento vegetativo de *Colletotrichum gloeosporioides* na ausência (controle) e presença do RcTI purificado (100 µg). Peróxido de hidrogênio (100 mM) foi utilizado como controle positivo. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata.

#### 4.9 Efeito do RcTI sobre proteases do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*

RcTI (10 µg) foi capaz de inibir as proteases intestinais de *Aedes aegypti* com cerca de 91% de inibição. Comparativamente, o inibidor de tripsina da soja (SBTI) inibiu cerca de 82% (FIGURA 32).



**Figura 32 - Efeito do RcTI sobre proteases do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*.** SBTI foi utilizado como padrão de referência. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam valores que não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

---

A torta da mamona possui alto conteúdo proteico e, por isso, pode ser empregada para objetivos importantes como a utilização em plantas na forma adubo orgânico (SEVERINO, 2005). O aumento do cultivo da mamoneira para extração do óleo gera a necessidade de agregar valor ao resíduo que é descartado (SEVERINO, 2005). A busca por proteínas biologicamente ativas poderia trazer novas aplicações biotecnológicas para esse material. Por isso, o presente trabalho teve como foco principal, a purificação e caracterização de um inibidor de tripsina da torta da mamona. Essa molécula, denominada RcTI, trata-se do primeiro inibidor de tripsina purificado de *Ricinus communis* L.

O extrato total da torta da mamona, obtido em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, foi submetido a tratamento térmico com o objetivo de eliminar proteínas indesejadas (como proteases, que interferem no ensaio de inibição de tripsina) com base na termoestabilidade, já que os inibidores de proteases, em geral, são termoestáveis (FANG; WONG; NG, 2010; KLOMKLAO *et al.*, 2010, KLOMKLAO *et al.*, 2011). Assim, aquelas proteínas lábeis seriam depletadas, resultando em uma alta atividade inibitória específica de tripsina no extrato tratado termicamente. Mesmo após uma hora de aquecimento, a 98 °C, a atividade inibitória de tripsina não foi perdida no extrato da torta da mamona (FIGURA 15). O uso de calor como etapa de purificação é uma prática usual quando a proteína de interesse é termoestável. A primeira etapa de purificação do inibidor de tripsina de *Vigna angularis* consiste no tratamento térmico do extrato total a 90 °C durante 10 minutos, na qual a atividade inibitória específica de tripsina aumenta cerca de 6 vezes em relação ao controle (KLOMKLAO *et al.*, 2010). Do mesmo modo, essa etapa é realizada para a purificação do inibidor de tripsina de *Vigna radiata*, na qual a atividade inibitória de tripsina específica aumenta cerca de 3 vezes em comparação ao controle (KLOMKLAO *et al.*, 2011).

O extrato da torta da mamona tratado termicamente a 98 °C por 30 minutos foi escolhido para ser aplicado em uma coluna de afinidade constituída de matriz de Sepharose<sup>®</sup> acoplada a anidrotripsina (anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B). A

cromatografia de afinidade é vantajosa, principalmente, por ser altamente seletiva. Portanto, diversos protocolos de purificação de inibidores de tripsina são compostos por etapas envolvendo o uso de colunas de afinidade com matriz acoplada à tripsina (MACEDO *et al.*, 2000, MACEDO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2007; YOSHIZAKI *et al.* 2007). No entanto, segundo Macedo *et al.* (2003), a possibilidade de haver quebra de inibidores durante a cromatografia não deve ser descartada, já que a tripsina imobilizada na matriz é cataliticamente ativa. Portanto, os inibidores de tripsina podem ser proteoliticamente modificados no sítio reativo. Levando em consideração esse aspecto, o ligante escolhido para ser acoplado em matriz Sepharose<sup>®</sup> 4B para purificação do RcTI, foi a anidrotripsina. Essa proteína consiste em um derivado da tripsina cataliticamente inativo (AKO; FOSTER; RYAN, 1974), na qual a interação com o inibidor é estabelecida, mas não há clivagem. Na década de 80, Pusztai *et al.* (1988) estabeleceram um novo protocolo de purificação para o inibidor de tripsina da soja utilizando anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B. Do mesmo modo, o inibidor bifuncional de  $\alpha$ -amilase/tripsina de sementes de *Eleusine coracana* também foi purificado através de anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B (STROBL *et al.*, 1995).

Apesar da banda proteica que representa a ricina ter desaparecido após tratamento térmico do extrato total da torta da mamona (FIGURA 16), na cromatografia em anidrotripsina-Sepharose<sup>®</sup> 4B foi utilizada galactose no tampão de equilíbrio com o objetivo de evitar interações de moléculas de ricina remanescentes com a matriz Sepharose<sup>®</sup>. A cadeia B dessa toxina possui domínio de ligação a carboidratos (específico para galactose e N-acetilgalactosamina) (WU *et al.*, 2006) que, portanto, poderia se ligar à galactose que constitui a Sepharose<sup>®</sup> (SIMMONS; RUSSEL, 1985).

O último passo de purificação do RcTI consistiu em cromatografia de troca aniônica em matriz Resource<sup>™</sup> Q, na qual a fração não retida mostrou apenas uma banda proteica, com massa molecular aparente de 14 kDa, em gel de poliacrilamida na ausência (FIGURA 19) ou presença de agentes redutores, o que é condizente com a maioria dos inibidores de proteases, que apresenta baixa massa molecular (HUNG *et al.*, 2003). Os inibidores de tripsina de sementes de *Dimorphandra mollis*

(MACEDO *et al.*, 2000), *Vigna angularis* (KLOMKLAO *et al.*, 2010), *Lupinus bogotensis* (MOLINA; ZAMORA; BLANCO-LABRA, 2010) possuem massa molecular de 20, 14 e 12,84 kDa, respectivamente.

A revelação do RcTI em gel de poliacrilamida através do ácido periódico de Schiff, mostrou que essa molécula não é uma glicoproteína (FIGURA 20). No entanto, existem relatos de inibidores de tripsina com carboidratos nas suas estruturas. Por exemplo, o inibidor de tripsina de *Acacia victoriae* (AvTI) possui grau de glicosilação de 2,06% (EE *et al.*, 2011). Os inibidores de protease de *Swartzia pickellii* (DO SOCORRO *et al.*, 2002), *Echinodorus paniculatus* (PAIVA *et al.*, 2003) e *Peltophorum dubium* (MACEDO *et al.*, 2003) também são proteínas glicosiladas.

O sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal do RcTI sugere que essa proteína se trata de uma albumina 2S, pois mostrou similaridade com uma proteína de armazenamento rica em enxofre (83%) e com uma “napin-like” (48%), ambas de *R. communis* (FIGURA 21). Alguns inibidores de proteases são membros de famílias de proteínas de armazenamento, como, por exemplo, o inibidor de tripsina purificado de *Brassica juncea* (BjTI) (MANDAL *et al.*, 2002) e uma proteína alergênica do amendoim, denominada Ara h 2 (MALEKI *et al.*, 2003). Ademais, albuminas 2S podem ter domínios de inibição de tripsina/ $\alpha$ -amilase (CHEN *et al.*, 2004).

A eletroforese bidimensional mostrou o RcTI como um único *spot* de massa molecular de 14 kDa e ponto isoelétrico ácido de 5,2 (FIGURA 22). Este resultado é condizente com a maioria dos inibidores de tripsina. As quatro isoformas de inibidores de tripsina purificados de sementes de *Archidendron ellipticum* possuem pontos isoelétricos de 4,1, 4,55, 5,27 e 5,65 (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006). Da mesma forma, o inibidor de tripsina de *Calliandra selloi* possui pI 4,00 (YOSHIZAKI *et al.*, 2007).

Por possuir ponto isoelétrico ácido, seria esperado que o RcTI em pH 8,5 estivesse carregado negativamente e, assim se ligasse na matriz Resource<sup>TM</sup> Q. Curiosamente, esse fato não foi observado. No entanto, após recromatografar o RcTI puro em Resource<sup>TM</sup> Q, nas mesmas condições de corrida mencionadas no item 3.3.2.3, foi observado que essa proteína passa a interagir com a matriz (FIGURA 23). Portanto, presumimos que, quando a fração retida em anidrotripsina-

Sepharose<sup>®</sup> 4B é aplicada em Resource<sup>™</sup> Q, as outras proteínas (mais carregadas negativamente) ligam-se à matriz, de forma a saturá-la, fazendo com que o RcTI não se ligue.

A presença de pontes dissulfeto em inibidores de proteases pode conferir estabilidade funcional a essas proteínas na presença de agentes desnaturantes como, por exemplo, temperatura e pH (BROZE; GIRARD; NOVOTNY, 1990; GARCIA *et al.*, 2004). Assim, o RcTI foi ensaiado quanto à estabilidade térmica, em diferentes tempos, bem como quanto à estabilidade em diferentes pHs.

O teste de termoestabilidade do RcTI mostrou que essa proteína continua com atividade inibitória de tripsina praticamente constante, mesmo após tratamento térmico (98°C) por 2 horas, havendo apenas 7% de queda na atividade inibitória em relação ao controle (FIGURA 24A). Similarmente, o inibidor de tripsina de *Vigna radiata* perdeu apenas cerca de 5% na atividade inibitória de tripsina após aquecimento a 90 °C por 1 hora. (KLOMKLAO *et al.*, 2011). Já os inibidores de tripsina de fava, amendoim e cereais são sensíveis a tratamento térmico (LIENER; KAKADE, 1969). Vasconcelos *et al.* (1997) verificaram que os inibidores de tripsina da soja brasileira (cultivares Bays, BR-10, Rio Balsas, Seridó e Tropical) são completamente eliminados após tratamento térmico a 92 °C por 5 minutos. A diferença de sensibilidade ao calor observada entre inibidores de proteases pode estar relacionada a aspectos estruturais, tais como, variação na quantidade de pontes dissulfeto ou conformação (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1985).

A análise de estabilidade em diferentes pHs revelou que o RcTI é mais estável na faixa de pH ácido, perdendo cerca de 20% da atividade inibitória máxima sobre a atividade catalítica da tripsina em pHs alcalinos (FIGURA 24B). Resultados semelhantes foram encontrados para os inibidores de tripsina de Jurema Branca (JB1, JB3-1 e JB3-2), os quais perderam cerca de 20%, 30% e 10% da atividade inibitória após incubação em pHs alcalinos durante 30 minutos a 37 °C, respectivamente (OLIVEIRA, 2007). Da mesma forma, Benjakul, Visessanguan e Thummaratwasik (2000) relataram que o inibidor de tripsina de *Voandzeia subferranea* diminui a atividade inibitória de tripsina em pHs alcalinos. Já o inibidor de tripsina purificado de *Vigna angularis* permaneceu estável na faixa de pH 4-10

(KLOMKLAO *et al.*, 2010) e o inibidor de tripsina purificado de *Vigna radiata* estável na faixa de 5-10 (KLOMKLAO *et al.*, 2011). O inibidor de tripsina de “soja preta Coreana” (*Glycine max*) apresentou estabilidade na faixa de pH 3-10 (FANG; WONG; NG, 2010). Outros inibidores demonstraram ser ainda mais estáveis à variação de pH, como é o caso do inibidor de tripsina purificado de tubérculo de inhame-selvagem (*Colocasia esculenta*), o qual manteve atividade inibitória de tripsina máxima tanto em pH ácido quanto básico, mesmo após incubação por 17 horas (OLIVEIRA, 2001). As diferenças de estabilidade em pHs verificadas entre inibidores de proteases de espécies distintas podem estar relacionadas a aspectos como, variação na quantidade de pontes dissulfeto, conformação da molécula ou disposição de átomos (KLOMKLAO *et al.*, 2011).

O inibidor de tripsina purificado neste trabalho foi caracterizado como uma proteína formada por cadeia polipeptídica única com alta similaridade (83%) com uma proteína rica em enxofre (*2S sulfur-rich seed storage protein*). Sabe-se que, uma característica comum das albuminas 2S é um padrão conservado de 8 cisteínas (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2002). Estas podem formar quatro pontes dissulfeto intracadeia envolvendo os resíduos de cisteína conservados. Assim, é provável que o RcTI possua pontes dissulfeto intracadeia que explicam, em parte, a resistência a altas temperaturas e variações de pH.

Havendo indícios de que inibidores de proteases podem atuar na defesa contra patógenos e insetos (RYAN, 2000; SOARES-COSTA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2009), o RcTI foi testado contra a germinação e crescimento vegetativo de fungos fitopatogênicos, assim como, contra proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti*.

A concentração de inibidor utilizada no ensaio de inibição de germinação foi de 1300 µg/mL, o que equivale a uma concentração molar de 92,86 µM. Dos fungos testados, RcTI não foi capaz de inibir a germinação de esporos de *F. oxysporum* (FIGURA 25), *F. solani* (FIGURA 26) e *R. solani* (FIGURA 27), mas inibiu a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides* (FIGURA 28). Giudici, Regente e Canal (2000) verificaram que a concentração de 5 µg/mL (0,31 µM) do inibidor de tripsina purificado de flores de *Helianthus annuus* foi capaz de inibir completamente

a germinação dos ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*, ou seja, uma concentração cerca de 300 vezes menor do que a utilizada com o RcTI no presente trabalho. Já o inibidor de tripsina de cevada (BTI-CMe) inibiu a germinação de esporos dos fungos *Magnaporthe grisea*, *Plectosphaerella cucumerina* e *F. oxysporum* em concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (CARRILLO *et al.*, 2011). Em geral, os efeitos dos inibidores de proteases contra fungos fitopatogênicos podem estar associados à inibição de proteases presentes nesses microrganismos, envolvidas no crescimento e diferenciação.

RcTI não foi capaz de inibir o crescimento vegetativo de *F. oxysporum* (FIGURA 29), *R. solani* (FIGURA 30) e *C. gloeosporioides* (FIGURA 31). Interessantemente, após cerca de 48 horas de crescimento, os fungos tratados com RcTI passaram a ter taxa de crescimento mais elevada em comparação ao controle. Provavelmente, essa proteína estaria funcionando como fonte de aminoácidos para os microrganismos, levando-os a um crescimento maior.

Como mencionado anteriormente, a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides* foi inibida, no entanto, não houve inibição de crescimento vegetativo do mesmo fungo pelo RcTI. Chen *et al.* (1999) verificaram que o inibidor de tripsina recombinante de milho superexpresso em *Escherichia coli* foi capaz de inibir a germinação de esporos e crescimento vegetativo de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, e *Fusarium moniliforme*. No entanto, o efeito desse inibidor recombinante sobre a germinação dos conídios não se correlacionou com o efeito no crescimento vegetativo, sendo mais potente em inibir a germinação. Assim, a inibição da germinação de esporos não implica na inibição do crescimento vegetativo, já que são estágios de desenvolvimento distintos.

Os inibidores de proteases possuem bom potencial para serem utilizados como estratégia para o controle de insetos através da inibição das enzimas digestivas desses animais. Araújo *et al.* (2005) verificaram que o inibidor de tripsina purificado de *Tamarindus indica* (TTI) foi capaz de inibir as proteases de coleópteros, *Anthonomus grandis* (29,6%), *Zabrotes subfasciatus* (51,6%), *Callosobruchus maculatus* (86,7%), *Rhyzopertha dominica* (88,2%), de lepidópteros

*Plodia interpunctella* (26,7%), *Alabama argillacea* (53,8%), *Spodoptera frugiperda* (75,5%) e do díptero, *Ceratitis capitata* (fruit fly) (52,9%).

O ensaio para avaliar o efeito do RcTI sobre as proteases do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*, foi conduzido utilizando o SBTI como padrão de referência. Ambos inibidores (RcTI e SBTI) encontravam-se nas mesmas concentrações (0,1 mg/mL). Foi observado que, RcTI inibiu as proteases intestinais do *A. aegypti* em cerca de 91%, enquanto o SBTI apresentou inibição de 82% (FIGURA 32). No entanto, não houve diferença significativa entre esses dois valores de inibição. O inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum* se mostrou mais efetivo em inibir proteases do intestino médio de larvas de *Spodoptera litura* quando comparado ao SBTI (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006). A eficácia dos inibidores de proteases em inibir proteases digestivas de insetos depende do sítio de especificidade dessas enzimas no organismo alvo (JONGSMA *et al.*, 1995; GARCIA *et al.*, 2004). Segundo Kunz (1978), a maioria das proteases intestinais de *A. aegypti* é do tipo serínica, concordando com o resultado de inibição observado para o RcTI, já que esse é um inibidor de tripsina.

## 6 CONCLUSÕES

---

No presente trabalho, foi purificado o primeiro inibidor de tripsina da torta da mamona (*R. communis* L.), denominado RcTI, que se apresentou com massa molecular aparente de 14 kDa, em condições redutoras ou não, e ponto isoelétrico de 5,2. Essa proteína não possui polissacarídeos covalentemente ligados à sua estrutura, não sendo, portanto, uma glicoproteína. O sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal revelou que a proteína purificada pertence à família das albuminas 2S. O inibidor de tripsina purificado permaneceu estável mesmo após aquecimento a 98 °C durante duas horas. Também permaneceu estável após incubação em diferentes pHs ácidos, havendo queda de 20% na atividade inibitória máxima sobre a tripsina em pHs alcalinos. RcTI foi capaz de inibir a germinação de esporos do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* e apresentou potente inibição contra proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti*. Conclui-se, portanto, que o RcTI tem potencial biotecnológico para uso na agricultura, como uma alternativa para o combate do importante fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides*.

## REFERÊNCIAS

---

- AGIZZIO, A. P.; CUNHA, M. DA; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. F. F.; GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171, p. 515-522, 2006.
- AKO, H.; FOSTER, R. J.; RYAN, C. A. Mechanism of action of naturally occurring proteinase inhibitors. Studies with anhydrotrypsin and anhydrochymotrypsin purified by affinity chromatography. **Biochemistry**, v. 13, p. 132-139, 1974.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMORIM, P. Q. R. **Perspectiva histórica da cadeia da mamona e a introdução da produção do biodiesel no semi-árido brasileiro sob o enfoque da teoria dos custos de transação**. 2005. 94p. Monografia (Bacharelado em Ciências Econômicas), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
- ANDRADE, L. B. S.; OLIVEIRA, A. S.; RIBEIRO, J. K. C.; KIYOTA, S., VASCONCELOS, I. M. V.; OLIVEIRA, J. T. A.; SALES, M. P. Effects of a novel pathogenesis-related class 10 (PR-10) protein from *Crotalaria pallida* roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4145-4152, 2010.
- ARAÚJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, F. T.; MACEDO, L. L. P.; GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, F. P.; SOUZA, T. M. S.; FRANCO, O. L.; BLOCH-J, C.; SALES, M. P. In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (Fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4381-4387, 2005.
- BALL, A. M.; ASHBY, A. M.; DANIELS, M. J.; INGRAM, D. S.; JOHNSTONE, K. Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 38, p. 147-161, 1991.
- BARRETT, A.J.; SALVESEN, G. Proteinase inhibitors: research monographs in cell and tissue physiology. **Elsevier**, Amsterdam. p. 301-627, 1986.
- BATABYAL, L.; SHARMA, P.; MOHAN, L.; MAURYA, P.; SRIVASTAVA, C. N. Relative toxicity of neem fruit, bitter guard, and castor seed extracts against the larvae of filarial vector, *Culex quinquefasciatus*. **Parasitology Research**; v. 105, p. 1205-10, 2009.

- BATABYAL, L.; SHARMA, P.; MOHAN, L.; MAURYA, P.; SRIVASTAVA, C. N. Larvicidal efficiency of certain seed extracts against *Anopheles stephensi*, with reference to *Azadirachta indica*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 10, p. 251-255, 2007.
- BATEMAN, K. S.; JAMES, M. N. G. Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, 341-347, 2011.
- BATISTA, I. F. C.; OLIVA, M. L. V.; ARAUJO, M. S.; SAMPAIO, U. M.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C. A. M. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1017-1022, 1996.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. Quimica de los alimentos. 2ª ed. **Espanha: Acribia**, 1087 p., 1997.
- BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; THUMMARATWASIK, P. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 107-127, 2000.
- BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. R. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: Insight into structural and antimalarial features. **Phytochemistry**, v. 70, n. 6, p. 703-712, 2009.
- BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S. M.; BABU, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seed: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, v. 67, p. 232-241, 2006.
- BIRK, Y. Plant protease inhibitors: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering. **Springer-Verlag**, Berlin, 170 p., 2003.
- BIRK, Y. Protein proteinase inhibitors in legume seeds-overview. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 44, n. 4, p. 26-30, 1994.
- BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 25, n. 2, p. 113-131, 1985.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, n. 2, p. 433-451, 1992.
- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the proteinase–protein inhibitor interaction. In: Avile´s, F.X. (Ed.), **Innovations in proteases and their inhibitors**. Walter de Gruyter, Berlin, p. 81-122, 1993.

BON, J. H. **Solubilização das proteínas da mamona por enzimas proteolíticas.** 136 p. Dissertação de Mestrado. UFRJ, Rio de Janeiro, 1977.

BOWLES, J. D. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Revision. Biochemistry**, v. 72, p. 218-254, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROZE, G. J.; GIRARD, T. J.; NOVOTNY, W. F. Regulation of coagulation by multivalent Kunitz-type inhibitor. **Biochemistry**, v. 29, p. 7539-7546, 1990.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CARLILE, A. J.; BINDSCHEDLER, L. V.; BAILEY, A. M.; BOWYER, P.; CLARKSON, J. M.; COOPER, R. M. Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by *Stagonospora nodorum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 538-550, 2000.

CARRILLO, L.; HERRERO, I.; CAMBRA, I.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 1191-1200, 2011.

CHAUDHARY, N. S.; SHEE, C.; ISLAMB, A.; AHMAD, F.; YERNOOL, D.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2120-2126, 2008.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Amino acids, peptides, and proteins. In O. R. Fennema (Ed.), New York: Marcel Dekker, **Food Chemistry**, p. 245-369, 1985.

CHEN, G. Q.; HE, X.; LIAO, L. P.; MCKEON, T. A. 2S albumin gene expression in castor plant (*Ricinus communis* L.). **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 81, p. 867-872, 2004.

CHEN, Z. Y.; BROWN, R. L.; LAX, A. R.; CLEVELAND, T. E.; RUSSIN, J. S. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1320-1324, 1999.

CHOI, J. H.; PARK, P. J.; KIM, S. W. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from the egg of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. **Fisheries Science**, v. 68, p. 1367-1373, 2002.

CHYE, M. L.; SIN, S. F.; XU, Z. F.; YEUNG, E. C. Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions. *In vitro* cellular and developmental. **Biology-Plant**, v. 42, p. 100-108, 2006.

COOPMAN, V.; DE LEEUW, M.; CORDONNIER, J.; JACOBS, W. Suicidal death after injection of a castor bean extract (*Ricinus communis* L.). **Forensic Science International**, v. 189, p. 13-20, 2009.

DELL'ORCO, D.; DE BENEDETTI, P. G. Quantitative structure–activity relationship analysis of canonical inhibitors of serine proteases. **Journal of Comput Aided Molecular Design**, v. 22, p. 469-478, 2008.

DO SOCORRO, M.; CAVALCANTI, M.; OLIVA, M. L.; FRITZ, H.; JOCHUM, M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M.; COELHO, L. C. B. B.; BATISTA, I. F. C.; SAMPAIO, C. A. M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, p. 635-639, 2002.

DUNAEVSKY, YA. E.; GRUBAN, T. N.; BELYAKOVA, G. A.; BELOZERSKY, M. A. Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. **Biochemistry** (Moscow), v. 65, p. 723- 727, 2000.

EE, K. Y.; ZHAO, J.; REHMAN, A.; AGBOOLA, S. Glycosylation, amino acid analysis and kinetic properties of a major Kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Bentham seeds. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1224-1227, 2011.

EDMAN, P. A method for the determination of the amino acid sequence in peptides, **Archives of Biochemistry**, v. 22, p. 475-476, 1949.

EL-SHAMEI, Z.; WU, J. W.; HAARD, N. F. Influence of wound injury on accumulation of proteinase inhibitors in leaf and stem. **Journal of Food Biochemistry**, v. 20, p. 155-171, 1996.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, 1961.

FAHRNEY, D. E.; GOLD, A. M. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of Reaction with acetylcholinesterase,  $\alpha$ -chymotrypsin, and trypsin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 997-1000, 1963.

FAN, S. G.; WU, G. J. Characteristic of plant protease inhibitors and their applications in combating Phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 273-292, 2005.

- FANG, A. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from Korean large black soybeans. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 211-217, 2010.
- FRANCO, O. L.; MELO, F. R. Osmoprotectants - A plant strategy in response to osmotic stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 47, p. 137-144, 2000.
- FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.
- GARCIA, V. L.; FREIRE, G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Trypsin inhibitor from *Poecilantha parviflora* seeds.: Purification, characterization, and activity against pest protease. **The Protein Journal**, v. 23, p. 343-350, 2004.
- GARCIA-OLMEDO, F.; SALCEDO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; GOMEZ, L.; ROYO, J.; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and  $\alpha$ -amylases. **Plant Molecular and Cellular Biology**, v. 4, p. 275-334, 1987.
- GATEHOUSE, A. M. R.; NORTON, E.; DAVISON, G. M.; BABBÉ, S. M.; NEWELL, C. A.; GATEHOUSE, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleraceae*; effects of plant protease inhibitors *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, 545-558, 1999.
- GIUDICI, A. M.; REGENTE, M. C.; CANAL, L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 881-888, 2000.
- GOMES, C. E. M.; BARBOSA, E. A. D.; MACEDO, L. L. P.; PITANGA, J. C. M.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; MACEDO, F. P.; ANDRADE, L. B. S.; VIDAL, M. S.; SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 1095-1102, 2005.
- GVOZDEVA, E. L.; IEVLEVA, E. V.; GERASIMOVA, N. G.; OZERETSKOVSKAYA, O. L.; VALUEVA, T. A. Exoproteinases of the Oomycete *Phytophthora infestans*. **Applied Biochemistry and Microbiology**. (Moscow), v. 40, p. 165-169, 2004.
- HOU, W. C.; LIN, Y. H. Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) trypsin inhibitors, the major root storage proteins, inhibit one endogenous serine protease activity. **Plant Science**, v. 163, p. 733-739, 2002.
- HUNG, C. H.; HUANG, C. C.; TSAI, W. S.; WANG, H. L.; CHEN, Y. L. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Brassica campestris* seeds. **Journal of Yuanpei University of Science and Technology**, v. 10, p. 13-22, 2003.

IEVLEVA, E. V.; REVINA, T. A.; KUDRYAVTSEVA, N. N.; SOF'IN, A. V.; VALUEVA, T. A. Extracellular proteinases from the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 298-303, 2006.

ISHIHARA, M.; SHIROMA, T.; TAIRA, T.; TAWATA, S. Purification and characterization of extracellular cysteine protease inhibitor, ECPI-2, from *Chlorella* sp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 166-171, 2006.

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; WILLEM, J.; STIKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 8041-8045, 1995.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11, 1998.

KALASHNIKOVA, E. E.; CHERNYSHOVA, M. P.; IGNATOV, V. V. The extracellular proteases of the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, v. 72, p. 443-44, 2003.

KAPITANY, R. A.; ZEBROWSKI, E. J. A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 56, p. 361-369, 1973.

KATUNUMA, N.; MATSUNAGA, Y.; HIMENO, K.; HAYASHI, Y. Insights into the roles of cathepsins in antigen processing and presentation revealed by specific inhibitors. **Biological Chemistry**, v. 384, p. 883-890, 2003.

KIM, Y. S.; LAMBOOY, J. P. Covalent bonding of riboflavin homologs by hepatics mitochondrial membrane enzymes. **Internation Journal Biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 975-981, 1985.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; CHAIJAN, M. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1348-1354, 2011.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; OSAKO, K.; TANAKA, M. A heatstable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 163-169, 2010.

KOIWA, H.; SUBRAMANIAN, L.; SHADE, R. E.; ZHU, K. Y.; NIELSEN, S. S.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Insecticidal activities of soybean cysteine protease inhibitors are correlated with their papain-binding affinities as phage-displayed proteins. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1115-1120, 1997.

KREIS, M.; FORDE, B. G.; RAHMAN, S.; MIFLIN, B. J.; SHEWRY, P. R. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. **Journal of Molecular Biology**, v. 183, n. 3, p. 499-502, 1985.

KROWARSCH, D.; DADLEZ, M.; BUCZEK, O.; KROKOSZYNSKA, I.; SMALAS, A.O.; OTLEWSKI, J. Interscaffolding additivity: Binding of P1 variants of bovine pancreatic trypsin inhibitor to four serine proteases. **Journal of Molecular Biology**, v. 289, p. 175-186, 1999.

KUNZ, P. A. Resolution and properties of the proteinases in the larva of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry**, v. 8, p. 43-51, 1978.

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

LASKOWSKI, M. J.; KATO, I.; ARDELT, W.; COOK, J.; DENTON, A.; EMPIE, M. W.; KOHR, W. J.; PARK, S. J.; PARKS, K.; SCHATZLEY, B. L.; SCHOENBERGER, O. L.; TASHIRO, M.; VICHOT, G.; WHEATLEY, H. E.; WIECZOREK, A.; WIECZOREK, M. Ovomuroid third domains from 100 avian species: isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. **Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 202-221, 1987.

LASKOWSKI, M. J.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 593-626, 1980.

LEHMANN, K.; SCHWEIMER, K.; REESE, G.; RANDOW, S.; SUHR, M.; BECKER, W. M.; VIETHS, S.; RÖSCH, P. Structure and stability of 2S albumin type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. **Biochemical Journal**, v. 395, p. 463-472, 2006.

LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Protease inhibitors: Current status and future prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 305-341, 2000.

LIENER, I. E. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Food Science and Technology. **A Series of Monographs** (2nd ed.). New York: Academic Press, p. 1-57, 1980.

LIENER, I. E.; KAKADE, M. L. Protease inhibitors. In I. E. Liener (Ed.), Toxic constituents of plant foodstuffs. **London: Academic Press**, p. 14-25, 1969.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; MIGLIOLO, L.; SOUZA-FILHO, C. R.; GONÇALVES, E. G.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; AMARAL, A. C.; FRANCO, O. L. A Kunitz Proteinase Inhibitor from Corms of *Xanthosoma blandum* with Bactericidal Activity. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 969-975, 2011.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G. S.; LIENER, E. I. E. Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 2, p. 410-414, 1954.

LOPES, J. L. S.; VALADARES, N. F.; MORAES, D. I.; ROSA, J. C.; ARAUJO, H. S. S.; BELTRAMINI, L. M. Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 871-879, 2009.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, n. 2, p. 170-182, 2003.

MACEDO, M. L. R.; MATOS, D. G. G.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 54, p. 553-558, 2000.

MALEKI, S. J.; VIQUEZ, O.; JACKS, T.; DODO, H.; CHAMPAGNE, E. T.; CHUNG, S.; LANDRY, S. J. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 1, 190-195, 2003.

MANDAL, S. Exploration of larvicidal and adult emergence inhibition activities of *Ricinus communis* seed extract against three potential mosquito vectors in Kolkata, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 605-609, 2010.

MANDAL, S.; KUNDU, P.; ROY, B.; MANDAL, R. K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 37161-37168, 2002.

MENÉNDEZ-ARIAS, L.; MONEO, I.; DOMÍNGUEZ, J.; RODRÍGUEZ, R. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed. **European Journal of Biochemistry**, v. 177, p. 159-166, 1988.

MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOSA, E. A.; FRANCO, O. L.; SALESA, M. P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cysteine-proteinases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, p. 148-156, 2010.

MOLINA, D.; ZAMORA, H.; BLANCO-LABRA, A. An inhibitor from *Lupinus bogotensis* seeds effective against aspartic proteases from *Hypothenemus hampei*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 923-929, 2010.

MORENO, F. J.; CLEMENTE, A. 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? **The Open Biochemistry Journal**, v. 2, p. 16-28, 2008.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 233-240, 2008.

MOVAHEDI, S.; HEALE, J. B. The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerae* Pers. ex. Pers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 36, p. 303-324, 1990.

MURPHY, J. M.; WALTON, J. D. Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: cloning and targeted disruption of *ALP1*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 9, 290-297, 1996.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T.; OHNISHI, K. Structural relationship between barley (*Hordeum vulgare*) trypsin inhibitor and castor-bean (*Ricinus communis*) storage protein. **Biochemical Journal**, v. 213, n. 2, p. 543-545, 1983.

OLIVEIRA, A. S. **Purificação e caracterização de inibidores de tripsina da família Kunitz de sementes de *Pithecellobium dumosum* e seus efeitos *in vitro* sobre insetos praga**. 2007, 157 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; SALES, M. P. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7342-7349, 2007a.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 858-865, 2007b.

OLIVEIRA, C. M. **Isolamento e caracterização parcial de inibidores de tripsina e quimotripsina de tubérculos de *Colocasia esculenta***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

OLIVEIRA, J. T. A.; ANDRADE, N. C.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; SOARES, A. A.; GONDIMA, D. M. F.; ARAÚJO-FILHO, J. H.; FREIRE-FILHO, F. R.; VASCONCELOS, I. M. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 145-152, 2012.

ORTEGO, F.; NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P. Characterization and distribution of digestive proteases of the salk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae), **Archives of Insect Biochemistry Physiology**, v. 33, p. 163-18, 1996.

PAIVA, P. M. G.; SOUZA, A. F.; OLIVA, M. L. V.; KENNEDY, J. F.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B.; SAMPAIO, C. A. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. **Bioresource Technology**, v. 88, 75-79, 2003.

PANTOJA-UCEDA, D.; BRUIX, M.; SANTORO, J.; RICO, M.; MONSALVE, R.; VILLALBA, M. Solution structure of allergenic 2S albumins. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 919-24, 2002.

PELEGRINI, P. B.; NORONHA, E. F.; MUNIZ, M. A. R.; VASCONCELOS, I. M.; CHIARELLO, M. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; FRANCO, O. L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to S2 albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 764, p. 1141-1146, 2006.

PERNAS, M.; SANCHEZ-MONG, R.; SALCEDO, G. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. **FEBS Letters**, v. 467, n. 23, p. 206-210, 2000.

PINA, M.; SEVERINO, L. S.; BELTRÃO, N. E. M.; VILLENEUVES, P.; LAGO, R. Novas alternativas de valorização para dinamizar a cultura da mamona no Brasil. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 453-462, 2005.

PORTAL DA MAMONA. **Descrição Botânica da Mamona**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/descricao-botanica-mamona.htm>>. Acesso em: 21 de Dezembro de 2011.

PORTAL DA MAMONA. **Óleo de Mamona**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/co-produto-oleo-de-mamona.htm>>. Acesso em: 14 de Janeiro de 2012.

PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 80-88, 2010.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; STERWART, J. C.; WATT, W. B. Isolation of soybean trypsin inhibitors by affinity chromatography on anhydrotrypsin-Sepharose 4B. **Analytical Biochemistry**, v. 172, p. 108-112, 1988.

QUEIROGA, V. P.; SANTOS, R. F.; QUEIROGA, D. A. N. Levantamento da produção de mamona (*Ricinus communis* L.) em uma amostra de produtores em cinco municípios do Estado da Bahia. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 5, n. 2, p.148-157, maio-agosto, 2011.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database, **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 227-233, 2010.

REGENTE, M.; LA CANAL, L. DE. Are storage 2S albumins also defensive proteins? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 275-276, 2001.

RIBEIRO, S. M.; ALMEIDA, R. G.; PEREIRA, C. A.; MOREIRA, J. S.; PINTO, M. F.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS, M. O.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins. **Peptides**, v. 32, p. 868-874, 2011.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: **Methods in Plant Biochemistry**, New York, Academic Press, Press, New York, v. 5, p. 259-305, 1991.

RIES, S. M.; ALBERSHEIM, P. Purification of a protease secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, v. 63, p. 625-629, 1973.

RYAN, C. A. Protease inhibitor in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes, **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1477, p. 112-121, 2000.

SAALBACH, G.; ROSSO, M.; SCHUMANN, U. The vacuolar targeting signal of the 2S albumin from brazil nut resides at the C terminus and involves the C-terminal propeptide as an essential element. **Plant Physiology**, v. 112, p. 975-985, 1996.

SANO, J.; OHKI, K.; HIGUCHI, T.; AIHARA, K.; MIZUNO, S.; KAJIMOTO, O.; NAKAGAWA, S.; KAJIMOTO, Y.; NAKAMURA, Y. Effect of casein hydrolysate, prepared with protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 4, p. 423-430, 2005.

SANTHI, T.; MANONMANI, S.; SMITHA, T. Removal of malachite green from aqueous solution by activated carbon prepared from the epicarp of *Ricinus communis* by adsorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 178-186, 2010.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, p. 157-162, 1967.

SEVERINO, L. S. O que sabemos sobre a torta de mamona. Campina Grande: **Embrapa Algodão**, (Documentos, 134), 2005.

SHEE, C.; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from seeds of *Murraya koenigii*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 115-120, 2007.

SHEE, C.; ISLAM, A.; AHMED, F.; SHARMA, A. K. Structure-function studies of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor revealed a stable core beta sheet structure surrounded by  $\alpha$ -helices with a possible role for  $\alpha$ -helix in inhibitory function. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 410-414, 2007a.

SHEE, C.; SINGH, T. P.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, p. 318-319, 2007b.

SHEWRY, P. R.; BEAUDOIN, F.; JENKINS, J.; GRIFFITHS-JONES, S.; MILLS, E. N. C. Plant protein families and their relationships to food allergy. **Biochemical Society Transaction**, v. 30, p. 906-909, 2002.

SHEWRY, P. R.; PANDYA, M. J. The 2 S albumin storage proteins. **Seed Proteins**, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 619-643, 1999.

SILVA, F. DE A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. DE. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SIMMONS, B. M.; RUSSELL, J. H. A single affinity column step method for the purification of ricin toxin from castor beans (*Ricinus communis*). **Analytical Biochemistry**, v. 146, p. 206-210, 1985.

SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L. M.; THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression purification and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 296, p. 1194-1199, 2002.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 11, p. 431-443, 1999.

SOUZA, A. S. **Manejo cultural da mamoneira: época de plantio, irrigação, espaçamento e competição de cultivares**. 211 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SPERANSKY, A. S.; CIMAGLIA, F.; KRINITSINA, A. A.; POLTRONIERI, P.; FASANO, P.; BOGACHEVA, A. M.; VALUEVA, T. A.; HALTERMAN, D.; SHEVELEV, A. B.; SANTINO, A. Kunitz-type protease inhibitors group B from *Solanum palustre*. **Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 11, p. 1417-1424, 2007.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of

iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1644-1650, 2006.

STROBL, S.; MUHLHAHN, P.; BERNSTEIN, R.; WILTSCHECK, R.; MASKOS, K.; WUNDERLICH, M.; HUBER, R.; GLOCKSHUBER, R.; HOLAK, T. A. Determination of the 3-dimensional structure of the bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from ragi seeds by NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 34, p. 8281-8293, 1995.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P.; MAHASI, M. J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.424-435, 2008.

SVENDSEN I.; HANSEN, S. I.; HOLM, J.; LYNGBYE, J. The complete amino acid sequence of the folate-binding protein from cow's milk. **Carlsberg Research Communications**, v. 49, p. 123-131, 1984.

TELES, R. C. L.; SOUZA, E. M. T.; CALDERON, L. A.; FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, v. 65, p. 793-799, 2004.

TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p. 14412-14419, 1997.

URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J.; WALLER, D. A.; MCPHERSON, M. J. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallid*. **The Plant Journal**, v. 8, p. 121-131, 1995.

URWIN, P. E.; LILLEY, C. J.; MCPHERSON, M. J.; ATKINSON, H. J. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. **The Plant Journal**, v. 12, p. 455-461, 1997.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure, and properties, **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 46, p. 362-378, 1999.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion Plant Biology**, v. 7, p. 400-407, 2004.

VASCONCELOS, I. M.; SIEBRA, E. A.; MAIA, A. A. B.; MOREIRA, R. A.; NETO, A. F.; CAMPELO, G. J. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 419-426, 1997.

WEISS, E. A. **Oilseed crops**. London: Longman, 660 p., 1983.

WILSON, L. M.; HOWLETT, B. J. *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica napus*, secretes a subtilisin-like serine protease. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, p. 112-232, 2005.

WU, J. H.; SINGH, T.; HERP, A.; WU, A. M. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin). **Biochimie**, v. 88, p. 201-217, 2006.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, p. 1-6, 1992.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In: **CHEEKE, P. R. (ed.). Toxicants of Plant Origin**. Boca Raton, CCR Press, v. 3, p. 1-27, 1989.

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. C. Evidence that castor bean allergens are albumin storage proteins in protein bodies of castor bean. **Plant Physiology**, v. 61, p. 1040-1042, 1978.

YOSHIZAKI, L.; TRONCOSO, M. F.; LOPES, J. L. S.; HELLMAN, U.; BELTRAMINI, L. M.; WOLFENSTEIN-TODEL, C. *Calliandra selloi* Macbride trypsin inhibitor: Isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2625-2634, 2007.