



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

WALLACE TEIXEIRA DA CRUZ

**ANÁLISE PROTEÔMICA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PEPTIDASE CISTEÍNICA OLIGOMÉRICA DO LÁTEX DE *Thevetia peruviana*
(Pers.) Schum.**

FORTALEZA

2015

WALLACE TEIXEIRA DA CRUZ

ANÁLISE PROTEÔMICA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PEPTIDASE CISTEÍNICA OLIGOMÉRICA DO LÁTEX DE *Thevetia Peruviana*
(Pers.) Schum.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Diniz
Teixeira de Freitas

FORTALEZA

2015

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

-
- C965a Cruz, Wallace Teixeira da.
Análise proteômica, purificação e caracterização de uma peptidase cisteínica oligomérica do látex de *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. / Wallace Teixeira da Cruz. – 2015.
110 f. : il., color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas.
1. Química vegetal. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Protease. 4. Germinas. 5. Laticífero. I. Título.

CDD 574.192

WALLACE TEIXEIRA DA CRUZ

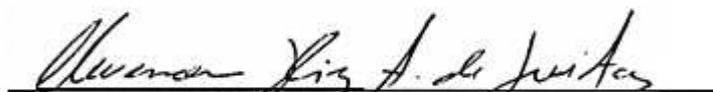
ANÁLISE PROTEÔMICA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PEPTIDASE CISTEÍNICA OLIGOMÉRICA DO LÁTEX DE *Thevetia peruviana*

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

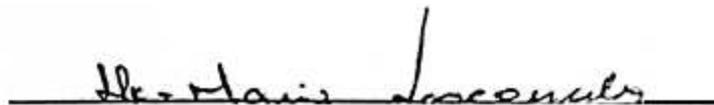
Orientador: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas

Aprovada em: 23/02 /2015

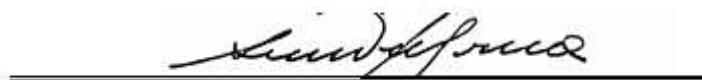
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas



Prof^a. Dr^a. Ilka Maria Vasconcelos



Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

Aos meus queridos Pais.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira da Freitas**, por todos os conhecimentos concedidos, pela disponibilidade, assim como pela paciência e dedicação propiciada durante toda a orientação, o que tornou muito gratificante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**, por me acolher em seu laboratório e, principalmente, pelos momentos de grande aprendizado, tanto de cunho científico como pessoal.

Ao **Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira** e a **Prof. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira**, os quais tenho um grande respeito e admiração. Também agradeço o ótimo tratamento que recebi durante a minha permanência no laboratório.

Ao **Frederico Bruno Mendes Batista Moreno (Pepeu)** e à **Marina Lobo**, por todas as contribuições referentes a purificação da proteína, assim como nas análises de espectrometria de massas.

À **Prof. Dr. Ilka Maria Vasconcelos**, por todos os ensinamentos, muito bem ministrados, durante a disciplina de bioquímica. Além do mais, por fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jeanlex S. Sousa** e a pós-doutoranda **Luciana M. R. Alencar**, pelas análises estruturais concedidas através da Microscopia de Força Atômica.

A todos os amigos do laboratório de plantas laticíferas, **Diego Souza, Carol Viana e Danielle Pereira**, por todo o auxílio nos experimentos, principalmente na etapa inicial deste trabalho; **Zelândia**, por contribuir em grande parte dos resultados; **Beatriz Nishi, Jackson Lima, Hugo Brito, Daniel Brito, Juliany Fátima, Isabel Costa, Rayanne Farias e Raíssa Lima** por todos os momentos de apoio e descontração. De forma direta ou indireta vocês contribuíram para a construção deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, **Antonio Neto, Antônio Edson e Ana Luiza**. Por todos os maravilhosos momentos que vocês me proporcionaram, as palhaçadas, as cervejas tomadas, os estudos também. Enfim, sou muito grato pelo companheirismo de vocês.

Ao amigo **Pedro Filho**, por todo o tempo concedido para a realização das cromatografias.

Ao **Adilton**, pela colaboração na realização de ensaios enzimáticos.

Aos amigos da UNIFOR: **Camilo Torres, Felipe Sousa, Márcio Cavalcante, Rossueti Diógenes, Rogênio Mendes, Hyldecia Lellis**, pela ótima convivência e prestatividade.

À minha namorada, **Tamilis**, pelo apoio incondicional durante toda esta etapa, pela paciência e por todos os grandiosos momentos compartilhados. Obrigado por ser esta pessoa incrivelmente encantadora.

À minha família: **meus pais**, pelos sagrados ensinamentos, o carinho, e por todo o incentivo às minhas escolhas; meu irmão, **Wilami Teixeira**, pelo apoio, colaboração e confiança.

Muito Obrigado!!

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Plantas Laticíferas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, coordenado pelo Professor Márcio Viana Ramos.

Universidade de Fortaleza (UNIFOR), através do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), coordenado pela Professora Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira e o Professor Dr. Renato de Azevedo Moreira.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do fornecimento da bolsa de estudo.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.” (Mahatma Gandhi)

RESUMO

Um grande número de espécies vegetais produzem látex, incluindo Apocynaceae, Sapotaceae, Papaveraceae e Euphorbiaceae. *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum é um arbusto laticífero pertencente à família Apocynaceae, popularmente conhecido como "chapéu-de-Napoleão". São bastante limitadas as informações proteômicas sobre esta espécie. Por tanto, uma análise proteômica da fração proteica (TpLP) do látex de *T. peruviana* foi realizada a partir de eletroforeses bidimensionais e espectrometria de massas. Um total de 33 proteínas (86%) foi identificado, incluindo proteínas de reserva, inibidor de peptidase, peptidases cisteínicas, peroxidases e osmotinas. As proteínas desta fração apresentaram uma forte atividade proteolítica no pH 5,0, a qual foi aumentada na presença de baixas concentrações do agente redutor DTT. A inibição desta atividade na presença dos inibidores específicos E-64 e IAA e a alta atividade com o substrato BANA evidenciou a predominância de peptidases cisteínicas no látex. Uma peptidase cisteínica denominada peruvianina-I, foi purificada a partir do látex através de um único passo cromatográfico envolvendo filtração em gel. A enzima foi inibida por E-64 e iodoacetamida (IAA) e seguiu a cinética de Michaelis-Menten, apresentando alta afinidade à azocaseína, com um valor de Km de 17,6 μM , exibindo pH e temperatura ótimos de 5,0-6,0 e 25-37 °C, respectivamente. A peruvianina-I não foi reconhecida por anticorpos anti-papaína. As Eletroforeses bidimensionais e a espectrometria de massas revelaram que a peruvianina-I (100 kDa) possui um pI de 4,0 e cinco subunidades (20 kDa). A sequência de aminoácidos N-terminal da peruvianina-I ($_1\text{ADPGPLQDFCLADLNSPLFINGYPCRNPALAISDDF}_{36}$) mostrou similaridade à germinas ou "germin-like proteins". Imagens de alta resolução a partir da microscopia de força atômica indicaram uma possível estrutura hexamérica da peruvianina-I, que está organizada como um trímero de dímeros, formando um canal central. TpLP e Peruvianina-I não exibiram atividade de oxalato oxidase e superóxido dismutase ou efeitos antifúngicos sobre a germinação de esporos de *Fusarium solani*. Este estudo mostrou que o látex de *T. peruviana* é uma fonte rica em proteínas relacionadas à patogênese, incluindo peptidases cisteínicas. Curiosamente, estas peptidases apresentam características estruturais e bioquímicas diferentes, que podem estar relacionadas com as suas funções fisiológicas específicas.

Palavras-chave: Protease; Apocynaceae; Germinas; Laticífero.

ABSTRACT

A great number of plant species produce latex, including Apocynaceae, Sapotaceae, Papaveraceae and Euphorbiaceae. *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum is a laticifer shrub belonging to Apocynaceae family popularly known as “chapéu-de-napoleão”. It is very limited the proteomic information about this specie. Thus, a proteomic analysis of protein fraction (TpLP) from *T. peruviana* latex was performed using two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. A total of 33 proteins (86%) were identified, including storage proteins, peptidase inhibitor, cysteine peptidases, peroxidases and osmotins. This protein fraction showed strong proteolytic activity at pH 5.0 which was increased in the presence of low concentrations of the reducing agent DTT. The inhibition this activity in the presence of specific inhibitors E-64 and IAA and the high activity with BANA showed the predominance of cysteine peptidases in latex. A cysteine peptidase, termed peruvianin-I, was purified from the latex by a single chromatographic step involving gel filtration. The enzyme was inhibited by E-64 and iodoacetamide (IAA) and follows the Michaelis-Menten kinetics, showing high affinity for azocasein, with Km value of 17.6 μ M, exhibiting an optimal pH and temperature of 5.0-6.0 and 25-37 °C, respectively. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry revealed that peruvianin-I (100 kDa) possesses a pI of 4.0 and five subunits (20 kDa). The N-terminal amino acid sequence of peruvianin-I (1ADPGPLQDFCLADLNSPLFINGYPCRNPALAISDDF36) was similar to that of germin or germin-like proteins. High-resolution images from atomic force microscopy indicated the possible hexameric structure of peruvianin-I, which is organized as a trimer of dimers that form a central channel. TpLP and peruvianin-I exhibited no oxalate oxidase and superoxide dismutase activity or antifungal effects on the spore germination of *Fusarium solani*. This study showed that *T. peruviana* latex are a rich source of pathogenesis-related proteins, including cysteine peptidases. Interestingly, these peptidases exhibit different structural and biochemical characteristics that may be related to their specific physiological functions.

Keywords: Protease; Apocynaceae; Germin; Laticifer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das peptidases baseada nos sítios específicos de hidrólise.....	22
Figura 2 - Percentual de distribuição das peptidases em plantas laticíferas...	23
Figura 3 - Estrutura da germina evidenciando o seu arranjo hexamérico.....	27
Figura 4 - Aspectos gerais de <i>Thevetia peruviana</i>	30
Figura 5 - <i>Thevetia peruviana</i> exudando látex após injúria mecânica.....	35
Figura 6 - Esquema geral de obtenção da fração proteica do látex de <i>Thevetia peruviana</i>	36
Figura 7 - Eletroforeses unidimensional e bidimensionais da fração proteica de <i>T. peruviana</i>	53
Figura 8 - Efeito do pH, DTT, temperatura e diferentes inibidores de peptidases na atividade proteolítica.....	58
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) e zimograma para detecção de peptidases.....	59
Figura 10 - Perfis cromatográficos das proteínas do látex de <i>Thevetia peruviana</i> em matriz de troca iônica DEAE-Sepharose <i>Fast Flow</i>	61
Figura 11 - Perfil cromatográfico das proteínas do látex de <i>Thevetia peruviana</i> em matriz de troca iônica CM-Sepharose <i>Fast Flow</i>	62
Figura 12 - Perfil cromatográfico das proteínas do látex de <i>Thevetia peruviana</i> em matriz de exclusão molecular Sephacryl S-100 e eletroforese em gel de poliacrilamida.....	64
Figura 13 - Perfil cromatográfico das proteínas do látex de <i>Thevetia peruviana</i> em matriz de exclusão molecular Superdex-75 e eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas.....	65
Figura 14 - Zimograma e revelação de glicoproteínas de um pico (P1) proveniente da cromatografia de exclusão molecular em Superdex-75.....	66
Figura 15 - Efeito do pH na atividade proteolítica da peruvianina-I.....	70

Figura 16-	Efeito da temperatura na atividade proteolítica da peruvianina-I..	71
Figura 17-	Efeito de inibidores específicos de peptidases na atividade proteolítica da peruvianina-I.....	72
Figura 18-	Cinética enzimática da peruvianina-I sob diferentes concentrações de azocaseína.....	73
Figura 19-	Análise de epítomos criogênicos por Dot blot e Western blot entre peruvianina-I e papaína.....	76
Figura 20-	Eletroforese em gel de poliacrilamida da peruvianina-I exposta à aquecimento e agente redutor	77
Figura 21-	Espectro de massas por ESI-QUAD-TOF e 2D-SDS-PAGE (12.5%) da peruvianina-I.....	79
Figura 22-	Análise estrutural da Peruvianina-I por microscopia de força atômica (AFM)	80
Figura 23-	Determinação da massa molecular da peruvianina-I por filtração em gel em coluna de Superose 12 HR 10/30.....	80
Figura 24-	Localização in situ da atividade oxalato oxidase em folhas de <i>Thevetia peruviana</i> e <i>Oryza sativa</i>	84
Figura 25-	Efeito inibitório de frações proteicas da espécie <i>Thevetia peruviana</i> sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos.....	86
Figura 26-	Efeito de TpLP e peruvianina-I na germinação dos esporos de <i>Fusarium solani</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Rendimento do fracionamento do látex de <i>Thevetia peruviana</i>	51
Tabela 2-	Lista de proteínas identificadas no látex de <i>Thevetia peruviana</i> por espectrometria de massas a partir dos spots da eletroforese bidimensional.....	55
Tabela 3-	Identificação por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF) da proteína purificada (P1) obtida a partir cromatografia de filtração em gel.....	67
Tabela 4-	Tabela de rendimento e índice de purificação de uma peptidase (peruvianina-I) do látex de <i>Thevetia peruviana</i>	68
Tabela 5-	Características da peruvianina-I e outras peptidases cisteínicas de flúidos laticíferos.....	74
Tabela 6-	Sequência de aminoácidos N-terminal de uma peptidase (peruvianina-I), do látex de <i>Thevetia peruviana</i> , comparada com sequências de proteínas de outras plantas.....	82
Tabela 7-	Características predominantes de algumas Germinas e proteínas similares a germina (GLPs).....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BANA	<i>N</i> -Benzoil-arginina-naftilamida (Substrato para peptidases cisteínicas)
2D-SDS-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida na presença de SDS
BAPNA	Benzoil Arginina <i>p</i> -Nitroanilida (Substrato para peptidases serínicas)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (Substrato para fosfatase alcalina)
BSA	Albumina Sérica Bovina
CHAPs	3-[(3-Cloamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato (detergente não carregado)
DMACA	4-Dimetil-amino-cinamaldeído
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol (agente redutor)
E-64	Trans-epoxisuccinil-leucilamido-3-metil-butano (inibidor de peptidases cisteínicas)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (agente quelante)
EGTA	Etilenoglicol-bis-aminoetil éter (agente quelante)
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas
GLPs	<i>Germin-like</i> proteins
IAA	Iodoacetamida (inibidor de peptidases cisteínicas)
IPG Buffer	Solução de anfólitos
Kcat	Constante catalítica
kDa	Kilodalton (1000 Da)
Km	Constante de Michaelis Menten
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (substrato para fosfatase alcalina)
OxO	Oxalato Oxidase
PBS	Tampão fosfato de sódio
PEP	Pepstatin-A (inibidor de peptidases aspárticas)

PMSF	Fenilmetanosulfonilfluorido (inibidor de peptidases serínicas)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona (precipita compostos fenólicos)
P1	Pico obtido após a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex-75
SDS	Dodecil sulfato de sódio (detergente aniônico)
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ácido Tricloroacético
Triton X-100	Detergente não carregado
TpLP	Fração proteica do látex de <i>Thevetia peruviana</i>
UA	Unidade de atividade
YPD	Yeast Peptone Dextrose (meio de cultura para fungos)
Vmax	Velocidade máxima da reação enzimática
µgP	Micrograma de proteína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Defesa Vegetal.....	17
1.2	Látex: aspectos gerais.....	19
1.3	Látex: aspectos químicos.....	19
1.4	Látex: papéis fisiológicos e aplicações biotecnológicas.....	20
1.5	Peptidases em flúidos laticíferos.....	24
1.6	Germinas e <i>Germin-like proteins</i> (GLPs).....	26
1.7	<i>Thevetia peruviana</i>.....	29
2	JUSTIFICATIVA.....	31
3	OBJETIVOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Materiais.....	33
4.1.1	Reagentes.....	33
4.1.2	Material Biológico.....	33
4.1.2.1	Material Vegetal.....	33
4.1.2.2	Fungos.....	34
4.2	Métodos.....	34
4.2.1	Coleta e fracionamento do látex.....	34
4.2.2	Quantificação de proteínas solúveis.....	36
4.2.3	Análise Proteômica.....	36
4.2.3.1	Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida.....	36
4.2.3.2	Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida.....	37
4.2.4	Seleção e processamento dos spots para espectrometria de massas.....	38
4.2.5	Espectrometria de Massas.....	38
4.2.6	Pesquisa no Banco de Dados.....	39
4.2.7	Ensaio Enzimáticos.....	40
4.2.7.1	Atividade Proteolítica Total.....	40
4.2.7.2	Ensaio para a Detecção de Peptidases Cisteínicas.....	40
4.2.7.3	Ensaio para a Detecção de Peptidases Serínicas.....	41
4.2.7.4	Avaliação da atividade proteolítica sob diferentes valores de pH e concentrações de DTT.....	41

4.2.7.5	Estabilidade térmica e o efeito dos inibidores de peptidases.....	41
4.2.8	Zimograma.....	42
4.2.9	Cromatografias em DEAE-Sepharose e CM-Sepharose.....	42
4.2.10	Cromatografias de exclusão molecular.....	43
4.2.11	Análise da sequência de aminoácidos N-terminal.....	43
4.2.12	Detecção de Carboidratos	43
4.2.13	Avaliação da atividade proteolítica na peruvianina-I sob diferentes pHs, temperaturas e inibidores de peptidases.....	44
4.2.14	Parâmetros cinéticos da peruvianina-I.....	45
4.2.15	Detecção em gel da atividade proteolítica da peruvianina-I.....	45
4.2.16	Determinação da massa molecular via filtração em gel e espectrometria de massas.....	45
4.2.17	Imunoensaios: produção de anticorpos, Dot Blotting e Western Blotting.....	46
4.2.18	Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	47
4.2.19	Atividade de Oxalato Oxidase.....	47
4.2.20	Atividade de Superóxido Dismutase.....	48
4.2.21	Ensaio Biológicos.....	49
4.2.21.1	Cultivo dos Fungos.....	49
4.2.21.2	Obtenção da Suspensão de Esporos.....	49
4.2.21.3	Ensaio de Inibição do Crescimento Fúngico em Meio Líquido.....	49
4.2.21.4	Ensaio de Inibição da Germinação de Esporos.....	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Análise Proteômica	51
5.2	Atividade Proteolítica	57
5.3	Purificação de uma peptidase cisteínica (Peruvianina-I)	60
5.4	Caracterização da Atividade proteolítica de peruvianina-I	69
5.5	Análises estruturais da peruvianin-I	75
5.6	Características de proteínas do tipo germina (GLPs) presentes em peruvianina-I	81
5.7	Ensaio Biológicos	85
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÃO	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Defesa Vegetal

As plantas vivem em ambientes complexos, interagindo com uma ampla gama de herbívoros e microrganismos patogênicos que apresentam os mais variados estilos de vida, estratégias de predação e infecção. Devido a esta pressão evolutiva frente ao ataque destes agressores, as plantas, ao longo do tempo, desenvolveram vários mecanismos de proteção que permitem a sua sobrevivência (AGRAWAL *et al.*, 2014; WU; SHAN; HE, 2014). Fungos, bactérias e vírus estão entre os principais agentes fitopatogênicos (GURURANI *et al.*, 2012; van LOON *et al.*, 2001).

De uma forma já bem definida, a doença é qualquer anormalidade fisiológica ou bioquímica que reflete no desenvolvimento normal da planta. Estas alterações são oriundas, em sua grande maioria, de agentes bióticos, como já citado acima, ou por fatores abióticos, relacionados aos elementos ambientais, tais como deficiência de nutrientes, seca, falta de oxigênio, temperatura excessiva, radiação ultravioleta e poluição (FREEMAN; BEATTIE, 2008).

Os mecanismos de defesa desenvolvidos pelos vegetais podem ser classificados, principalmente, em defesas constitutivas e induzidas. Na induzida, há uma ativação dos mecanismos de defesa, intermediada perante a atuação de sucessivos eventos e sinais, onde, de forma inicial, há um reconhecimento do indivíduo agressor, para que, assim, possa se desencadear a ativação de barreiras físicas e químicas (AGRAWAL *et al.*, 2014). A defesa constitutiva é aquela presente no vegetal, independente de estímulos, podendo ser estrutural, baseada em características anatômicas; e química (KACHROO; ROBIN, 2013; MARTINS; LIMA; MACHADO, 2007; SHEWRY; LUCAS, 1997; VAN LOON, 2006). As defesas constitutivas incluem as barreiras pré-formadas, como paredes celulares, a presença de cutículas ou lignina, espinhos, tricomas e, também, os metabólitos secundários e proteínas (SAVATIN *et al.*, 2014).

Adicionalmente às estruturas constitutivas, praticamente todas as células vegetais têm a capacidade de detectar os patógenos invasores e, a partir disso, induzir a ativação de mecanismos de defesa, incluindo a produção de substâncias tóxicas, tais como metabólitos secundários e proteínas relacionadas a patogênese (PR-

proteínas) (SLUSARENKO *et al.*, 2001). Por muitas vezes, a síntese destes compostos ocorre, apenas, subsequente ao reconhecimento dos patógenos, uma vez que todo este processo envolve o desvio de nutrientes e energia, que poderiam ser utilizados para o crescimento e desenvolvimento normal da planta (NEILSON *et al.*, 2013). Esta capacidade da célula ativar respostas de defesa, mediante o reconhecimento de padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs), a padrões moleculares associados a danos endógenos (DAMPs) ou a padrões moleculares associados a herbívoros (HAMPs) são características da imunidade inata da planta (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). As respostas induzidas devem ser rápidas e, muitas vezes, envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a expressão de diversos genes relacionados à síntese de proteínas de defesa (SAVATIN *et al.*, 2014; van LOON *et al.*, 2006).

Dentre estas proteínas, produzidas e acumuladas em resposta a invasão de patógenos ou ataque de insetos, podemos destacar as PR-proteínas. As PR-proteínas podem se acumular no tecido infectado ou em regiões distantes da infecção. Diante desta distribuição sistêmica, as plantas atacadas podem impedir a disseminação do patógeno ou a progressão da herbivoria para outros tecidos (EBRAHIM; USHA; SINGH, 2011).

Inicialmente, as PR-proteínas foram classificadas em 5 famílias, baseada em suas massas moleculares, pontos isoelétricos, localização e atividade biológica. Atualmente, existem 17 famílias que são ordenadas de acordo com seu descobrimento e agrupadas conforme suas propriedades e funções. Proteínas como as quitinases, endoproteinases, inibidores de peptidases, osmotinas, β -1,3-glucanase e enzimas oxidativas são exemplos de PR-proteínas (AZARKAN *et al.*, 2006; CHURNGCHOW; SUNTARO; WITTSUWANNNAKUI, 1995; FARIAS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2010; MURA *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2014).

1.2 Látex: aspectos gerais

Látex é um líquido de aspecto leitoso sintetizado e acumulado sob pressão em canais especializados denominados de laticíferos, que podem ser compostos por várias células ou por uma única célula que se alonga entre os tecidos. Cerca de 10% de todas as angiospermas produzem látex, que é liberado mediante alguma injúria causada por insetos ou patógenos. Os laticíferos estão amplamente disseminados no reino vegetal, achando-se presentes em mais de 20.000 espécies, distribuídas em mais de 40 famílias (AGRAWAL; KONNO, 2009; KEKWICK, 2001; KONNO, 2011).

Diversas partes da planta podem conter látex. Contudo, ele é mais abundante nos tecidos verdes, como as folhas, frutos e caule (AGRAWAL; KONNO, 2009). O látex, na maioria das vezes, apresenta-se esbranquiçado, como em *Calotropis procera* e *Thevetia peruviana*, no entanto, este pode exibir uma coloração amarelada ou alaranjada entre plantas pertencentes à família Papaveraceae; esverdeado ou ciano na espécie *Sebertia acuminata*; avermelhado em *Cannabis* spp. ou pode ser límpido como em *Nerium oleander*. (BANDARA *et al.*, 2010; CALLAHAN *et al.*, 2008; KEKWICK, 2001; KONNO, 2011).

O látex tem sido observado, descrito e usado por seres humanos há milhares de anos. Dentre as inúmeras espécies laticíferas, a *Hevea brasiliensis* (seringueira) tem o látex mais estudado. Isto se deve, principalmente, a sua importância econômica, destacando-se a produção de borracha e seus derivados. A produção global de borracha natural alcançou em 2011 mais de 10 milhões de toneladas por ano, sendo a Tailândia e a Indonésia os principais produtores (HO, 2014). Também vale salientar a importância científica de espécies como *C. procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Plumeria rubra*, no que concerne o potencial biotecnológico de moléculas oriundas de seus látices (FREITAS *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2014).

1.3 Látex: aspectos químicos

A composição química de fluidos laticíferos é bastante complexa, incluindo uma grande variedade de metabólitos secundários (alcalóides, glicosídeos cardíacos, terpenóides, canabinóides, taninos) e de proteínas, assim como substâncias similares

a açúcares e muitos outros componentes (KONNO, 2011). A maioria desses compostos proporciona resistência aos mais variados fitopatógenos e insetos (AGRAWAL; KONNO, 2009; EVERT, 2006; MITHÖFER; BOLAND, 2012). Dentre as moléculas citadas, as proteínas destacam-se devido a sua abundância e frequente ocorrência nos látices. Entre as proteínas, as enzimas são as mais comuns, tais como peptidases, glicosidades, amilases, fosfatases ácidas, quitinases e β -1,3-glucanases (DOMSALLA; MELZIG, 2008; FREITAS *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2013). A grande maioria destas proteínas tem sido relacionada à defesa da planta (KONNO, 2011).

Polifenol oxidases (PPO) e peroxidases (POD) são oxidases de plantas comumente encontradas em látices (SETHI *et al.*, 2009). Estas também são consideradas proteínas de defesa, uma vez que convertem mono e di-hidroxifenol em espécies moleculares reativas, como as quinonas, que em seguida ligam-se covalentemente a nucleófilos de aminoácidos, tornando-os inacessíveis, o que diminui o valor nutritivo das proteínas (KONNO, 2011; ZHU-SALZMAN; LUTHE; FELTON, 2008).

A borracha representa o constituinte de maior proporção do látex, sendo formada por cis-1,4-poliisopreno (SWIEZEWSKA; DANIKIEWICZ, 2005). Mais de 80 % da massa seca do látex de *Calotropis procera* corresponde a borracha, enquanto que a fração restante, livre de borracha, compreende menos do que 20 %. Nesta fração, o conteúdo de proteínas solúveis pode chegar a 8 mg/mL, representando, aproximadamente, 17 % do peso seco do látex. O conteúdo proteico desta fração é representado, em sua maior parte, por peptidases cisteínicas, inibidores de peptidases, quitinases etc (RAMOS *et al.*, 2007).

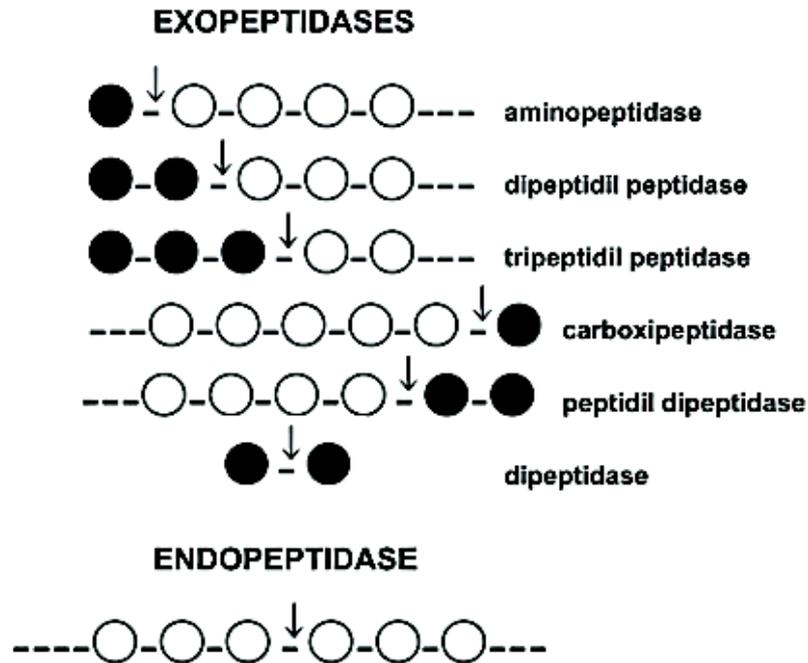
1.4 Peptidases: papéis fisiológicos e aplicações biotecnológicas

As peptidases, também chamadas de proteases ou proteinases, são enzimas encontradas em todos os organismos vivos capazes de hidrolizar ligações peptídicas. Em organismos superiores, ou multicelulares, cerca de 2 % do código genético é representado por essas enzimas (RAWLINGS; BARRETT; BATEMAN, 2010). As peptidases podem ser divididas em exopeptidases e endopeptidases, baseando-se na porção da ligação peptídica na qual ela vai atuar.

Quando a clivagem ocorre entre aminoácidos da porção amino ou carboxiterminal, as peptidases são ditas exopeptidases. Estas ainda subdividem-se em aminopeptidases e carboxipeptidases, baseado nos seus sítios de atuação catalítica N- ou C- terminal, respectivamente (FIGURA 1). As endopeptidases (EC 3.4) atuam internamente nas cadeias polipeptídicas, porém não hidrolisam ligações peptídicas entre os aminoácidos das porções terminais (LEWINSOHN, 1991) (FIGURA 1). Geralmente, estas biomoléculas são sintetizadas como pró-enzimas inativas para impedir uma ação em locais ou momentos indesejados. Tais segmentos peptídicos que mantêm a enzima inativa estão, predominantemente, localizados na extremidade N-terminal do precursor (KARDOS *et al.*, 1999).

As endopeptidases podem ser classificadas de acordo com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima, bem como seu mecanismo de catálise. Peptidases serínicas (EC 3.4.21) apresentam um resíduo de serina no sítio ativo; as que pertencem a subclasse das peptidases cisteínicas (EC 3.4.22) têm resíduo de cisteína; aquelas pertencentes a EC 3.4.23 (peptidases aspárticas) dependem do resíduo de aspartato para sua atividade catalítica; metalopeptidases (EC 3.4.24) utilizam um metal, normalmente o Zn^{2+} , no seu mecanismo catalítico (BARRETT *et al.*, 2013).

Figura 1 – Classificação das peptidases baseada nos sítios específicos de hidrólise.



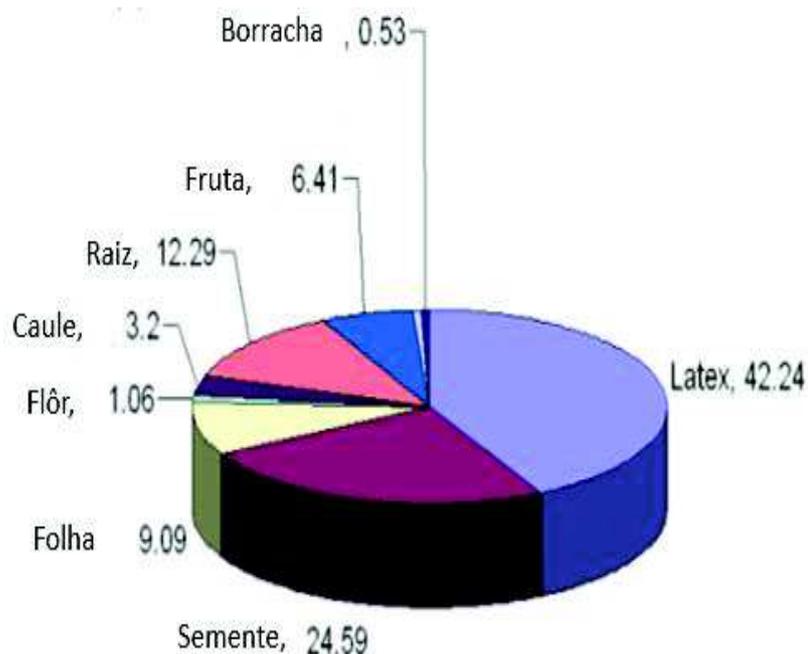
Fonte: Adaptado de Gambôa (2010). Os círculos abertos (○) representam os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica, já os preenchidos (●) correspondem aos aminoácidos das porções terminais. As setas apontam os sítios específicos de clivagem do peptídeo

As treonino e as glutamyl peptidases são um distinto, e recentemente reclassificado grupo de enzimas, que não haviam sido descritas até 1995 e 2004, respectivamente. As peptidases do tipo treonina são caracterizadas pela presença de um resíduo de treonina em seu sítio ativo. Estas são encontradas em fungos, plantas, vírus, animais e bactérias (BARRETT *et al.*, 2013; RAWLINGS *et al.*, 2010). As glutamyl peptidases possuem um resíduo de ácido glutâmico no sítio ativo, sendo descritas apenas em fungos (SIMS *et al.*, 2004). Em geral, as peptidases, dependendo do pH ótimo de atuação, são também nomeadas de: peptidases ácidas, ativas em pH entre 2,0-3,5; peptidases neutras, ativas em pH entre 6,5-7,5 e; peptidases alcalinas, ativas em pH 7,5-10,0 (MAHAJAN; BADGUJAR, 2010).

As peptidases são fundamentais em várias etapas bioquímicas durante o ciclo de vida das plantas, que incluem participação da germinação, senescência, apoptose, turnover e mobilização proteica, além de outros processos (DOMSALLA;

MELZIG, 2008). Em praticamente todas as partes da planta é possível encontrar peptidases (BADGUJAR; MAHAJAN, 2014). A figura 2 sumariza a distribuição dessas peptidases em diferentes partes de plantas laticíferas.

Figura 2 – Percentual de distribuição das peptidases em plantas laticíferas



Fonte: Adaptado de Badgujar (2014).

Além dos papéis fisiológicos desempenhados pelas peptidases, suas aplicações comerciais são de extrema importância, uma vez que estas representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais, constituindo cerca de 60% da totalidade mundial de vendas de enzimas (BADGUJAR *et al.*, 2014). As peptidases são empregadas no desenvolvimento de tecnologias chamadas “amigas do ambiente”, incluindo o tratamento de couro e vários processos de biorremediação, bem como na formulação de detergentes (CHARNOCK; MCCLEARY, 1998; DOMSALLA; MELZIG, 2008). Em termos farmacológicos, elas podem atuar na preparação de medicamentos, como pomadas para desbridamento de feridas, assim como na ciência e tecnologia de alimentos, incluindo a hidrólise de grandes

polipeptídeos em peptídeos menores e aminoácidos, o que facilita a digestão e absorção de proteínas (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2010; MORCELLE *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos atribuem ações farmacológicas às peptidases cisteínicas de plantas. Extratos enzimáticos de *Ananas comosus* (Bromeliaceae), *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Caesalpinia crista* (Caesalpiniaceae), *Vernonia anthelmintica* (Asteraceae), *Fumaria parviflora* (Papaveraceae) e *Embelia ribes* (Myrsinaceae) mostraram eficácia contra helmintos que parasitam o trato gastro intestinal de ruminantes (HÖRDEGEN *et al.*, 2003; THOMSON *et al.*, 2001). A bromelaína apresenta atividade anti-inflamatória, *in vivo*, sem desenvolver efeitos adversos (HALE *et al.*, 2005).

A estabilidade e atividade das peptidases cisteínicas são fatores importantes para determinar a sua viabilidade econômica em processos industriais. Uma alta estabilidade frente a variações de pH e temperatura é considerado uma vantagem econômica, o que promove uma atenção especial por parte de indústrias alimentícias e biotecnológicas (PATEL; JAGANNADHAM, 2003). Em plantas, estas moléculas representam um grupo enzimático com propriedades similares, tais como peso molecular de 20 a 30 kDa e pH ótimo entre 3,5 e 8,0. Essas propriedades podem ser cruciais para a manutenção de sua atividade em condições extremas (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

1.5 Peptidases em flúidos laticíferos

As plantas laticíferas secretam de forma imediata o látex quando suas folhas, caules ou frutos são injuriados (AGRAWAL; KONNO, 2009). A coagulação do látex é essencial, pois permite a formação de uma barreira física que impede, na maioria das vezes, o ataque de patógenos. Neste caso, as enzimas proteolíticas presentes no látex podem participar deste processo de coagulação. Alguns trabalhos já demonstraram que, durante a coagulação do látex, um grande número de peptídeos são proteoliticamente processados de uma maneira não aleatória (BAUER *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 1997).

As enzimas proteolíticas dos tipos serínicas e cisteínicas são as mais abundantes em látices (MORCELLE; CAFFINI; PRIOLO, 2004). Algumas plantas

laticíferas destacam-se, devido as propriedades e aplicabilidade de suas peptidases. Destas, podemos citar: *Ficus carica*, que tem sido usada na medicina tradicional indiana para o tratamento de algumas doenças (BADGUJAR *et al.*, 2014; JOSEPH; RAJ, 2011); as peptidases do látex de *Carica papaya*, que apresentam eficácia antihelmíntica frente a vários parasitas de animais (HÖRDEGEN *et al.*, 2003; MANSUR *et al.*, 2014); Uma peptidase, denominada Nivulian-II, da espécie *Euphorbia nivulia*, mostrou-se atuante no processo de coagulação do leite, o que lhe dá uma prospecção ao desenvolvimento de produtos lácteos diversificados (BADGUJAR; MAHAJAN, 2014b).

O trabalho de Souza e colaboradores (2011) evidenciou que frações proteicas do látex, exibindo atividade proteolítica do tipo cisteínica, bem como duas peptidases cisteínicas purificadas de diferentes látices, foram capazes de inibir a germinação de esporos e o crescimento das hifas de diferentes fungos fitopatogênicos. Além do papel desempenhado na defesa, peptidases têm sido associadas a diversos papéis fisiológicos da planta, por exemplo: atuando como peptídeo sinal na microsporogênese; na simbiose; desenvolvendo respostas hipersensitivas (HR); na diferenciação de tecidos especializados, como o estomático (ANTÃO *et al.*, 2005).

O foco deste trabalho está relacionado à classe das peptidases cisteínicas (EC 3.4.22). Essas enzimas atuam via ataque nucleofílico de um ânion sulfeto, presente no sítio ativo, sobre a ligação peptídica (KUNAKBAEVA *et al.*, 2003). Para estas enzimas, o resíduo de cisteína é fundamental na atividade proteolítica. As peptidases cisteínicas estão divididas em dois clãs (CA e CD), onde cada um desses distribuem-se em famílias e subfamílias (BAH *et al.*, 2006). A maioria das peptidases cisteínicas pertence a família *Papain* (C1), que está inclusa no clã CA. Muitas dessas têm sido isoladas de látices, frutas e sementes (VIERSTRA, 1996).

As peptidases cisteínicas podem intervir no reconhecimento de agentes patogênicos e parasitas, corroborando com a defesa da planta (SOUZA *et al.*, 2011). Adicionalmente, as peptidases cisteínicas oriundas de látex, também têm a capacidade de desempenhar atividade trombolítica, degradando componentes da cascata de coagulação como fibrinogênio e fibrina, o que cientificamente valida o uso de látex de plantas na interrupção do sangramento e na cicatrização de feridas pelos

adeptos da medicina popular em algumas partes do mundo (SHIVAPRASAD *et al.*, 2009; VIANA *et al.*, 2013).

A peptidase cisteínica vegetal mais amplamente estudada é a papaína (EC 3.4.22.2), pertencente ao látex de *Carica papaya*, que também possui outras peptidases, como quimopapaína (EC 3.4.22.6), caricaína (EC 3.4.22.30) e glicil endopeptidase (EC 3.4.22.25), também chamada de proteinase papaia IV (BARRETT; WOESSNER, 2013; OTTO; SCHIRMEISTER, 1997). A papaína foi a primeira enzima da família a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios-X (MONTI *et al.*, 2000). Recentemente, Ramos e colaboradores (2014), identificaram uma peptidase cisteínica (Cg24-I), pertencente ao látex de *Cryptostegia grandiflora*, com atividade antifúngica.

1.6 Germinas e *germin-like proteins* (GLPs)

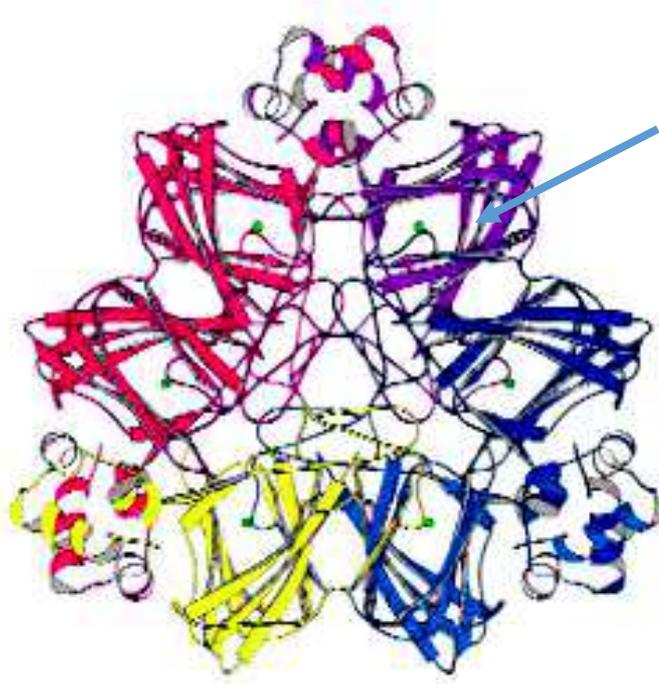
As germinas constituem um grupo de proteínas homólogas encontradas, principalmente, em cereais, incluindo arroz, aveia, trigo, cevada, milho e centeio (LANE, 2002). A germina foi identificada, inicialmente, como um marcador específico relacionado ao início da germinação em embriões de trigo; a partir desta função foi dado o nome “Germina” (THOMPSON; LANE, 1980). Alguns anos depois ela foi caracterizada como uma glicoproteína homopentamérica (FAYE; CHRISPPEELS, 1988; JAIKARAN *et al.*, 1990), com atividade oxalato oxidase (LANE, 1984). Essa atividade enzimática gera como produtos finais o gás carbônico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que pode ajudar a desenvolver barreiras contra a invasão de patógenos (LANE, 2000; SCHWEIZER; CHRISTOFFEL; DUDLER, 1999). Em contraste com o que já havia sido proposto, Woo e colaboradores (1998, 2000) determinaram que a estrutura da germina é composta por seis monômeros contidos dentro de um hexâmero, formando um trímero de dímeros (Figura 3).

Em termos de sequência, todas as germinas compartilham um segmento peptídico característico, PHIHPRATEI, denominado “germin box” (LANE *et al.*, 1991). Proteínas que têm em média de 50% de identidade com a germina do trigo, e que também possuem a sequência “germin box”, foram encontradas em diversas plantas, além dos cereais. Estas foram designadas como proteínas similares a germina ou *germin-like proteins* (GLPs). Tanto as germinas como as GLPs estão incluídas na

superfamília das cupinas, uma vez que estas conservam a estrutura em barril β (DUNWELL *et al.*, 2008).

Diferente das germinas verdadeiras, as GLPs são codificadas por um grupo heterogêneo de genes presentes em muitas plantas terrestres, incluindo as monocotiledôneas, dicotiledôneas, gimnospermas e musgos. Além da presença de sequências características destas proteínas, as GLPs são conhecidas por não apresentarem atividade de oxalato oxidase, o qual está incluso em “germinas verdadeiras”, também chamadas de Oxalato Oxidases (OXO) (DUNWELL *et al.*, 2008).

Figura 3 – Estrutura da germina evidenciando o seu arranjo hexamérico



Fonte: Woo (2000). As esferas verdes, destacadas pela seta, representam íons de manganês.

No entanto, diversas outras atividades enzimáticas estão associadas às GLPs, incluindo isomerases, descarboxilases, dioxigenases, ciclases, e epimerases. A razão para esta diversidade bioquímica reside na flexibilidade do " sítio ativo " da proteína, que está localizado no centro de um octaedro formado por cadeias β -barril (CARTER; THORNBURG, 2000; CHENG *et al.*, 2014; MATHIEU *et al.*, 2006; RAJAVEL *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Muitas GLPs, incluindo as de musgo (*Barbula unguiculata*), cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*, *Triticum monococcum*), tabaco (*Nicotiana sp*), ervilha (*Pisum sativum*), azaléia (*Rhododendron mucronatum*) e uva (*Vitis vinifera*) possuem atividade superóxido dismutase (SOD), a qual converte ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio (DAVIDSON *et al.*, 2009).

Embora as germinas e GLPs tenham sido descritas pela primeira vez no contexto de germinação, sabe-se que elas são expressas em muitos tecidos de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento, e este nível de expressão é frequentemente controlado por diversos estímulos ambientais (SCHLESIER *et al.*, 2004).

OXO e GLPs têm sido especuladas, há muito tempo, como componentes atuantes nos processos basais de respostas de defesa (DUNWELL *et al.*, 2008; GODFREY; ABLE; DRY, 2007; LANE, 2002; ZIMMERMANN *et al.*, 2006). Tanto as germinas verdadeiras como as GLPs são reconhecidamente proteínas relacionadas a patogênese (PR-proteínas), categorizadas como PR-15 e PR-16, respectivamente. A PR-16 foi isolada de pimentas durante respostas de resistência a infecções bacterianas e virais (GUEVARA *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2004). Vale salientar que as OXOs e GLPs também podem atuar reforçando a parede celular por meio da lignificação e formação de papilas, o que impede a penetração e reduz o acesso às enzimas dos agentes patogênicos que degradam a parede celular. Além do mais, o próprio peróxido de hidrogênio produzido pela atividade enzimática pode diretamente tóxico para os organismos invasores (VESELOVA *et al.*, 2014; WOJTASZEK, 1997).

1.7 *Thevetia peruviana*

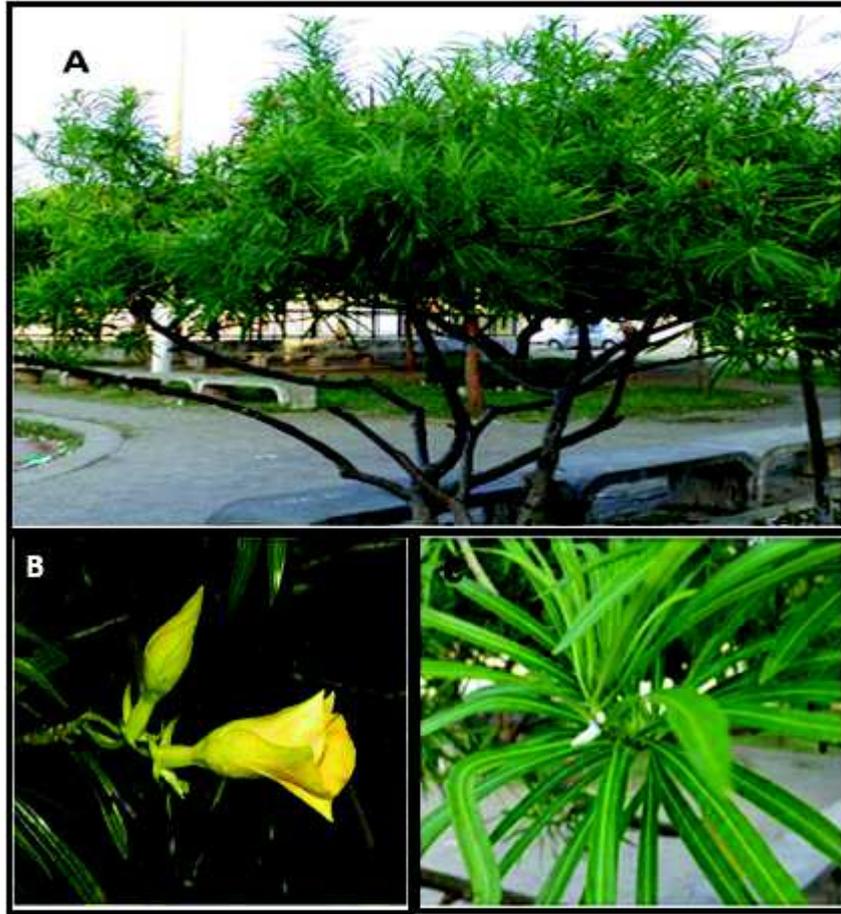
A espécie *Thevetia peruviana* (Figura 4) pertence à família Apocynaceae, que tem como principal característica a produção de látex. Ela é descrita como nativa da América tropical, mas pode ser facilmente encontrada em regiões de clima tropical e subtropical, como o Brasil (SHEPHERD, 2004).

T. peruviana é considerada um arbusto que pode atingir até 8 metros de altura. Apresenta folhas verdes escuras, brilhantes, lineares, simples e curtamente pecioladas. Flores com cerca de 5 x 7 cm, corola afunilada, com 5 pétalas, amarelo-vivo ou pêssego. O fruto é carnudo, drupa triangular, verde amarelado, tornando-se escuro ao amadurecer, apresentando duas sementes em seu interior (SHEPHERD, 2004).

T. peruviana é bem conhecida pela sua toxicidade. Todas as partes da planta contêm glicosídeos cardíacos, incluindo: sementes, folhas, flores, néctar, seiva etc. As suas propriedades cardiotônicas tem sido exploradas terapêuticamente e como um instrumento de suicídio desde a antiguidade (LANGFORD; BOOR, 1996; OJI; OKAFOR, 2000). Esses cardenolídeos são constituintes comuns em plantas tóxicas pertencentes às famílias Apocynaceae, Asclepidaceae, Liliaceae, Moraceae e Scrophulareaceae (OJI; OKAFOR, 2000). Todos os cardenolídeos são identificados por compartilharem similaridades em sua estrutura química e mecanismos de ação. Estruturalmente, essas moléculas são comparáveis a digitoxina, um fármaco utilizado como cardiotônico e antiarritmico (LANGFORD; BOOR, 1996). Estes glicosídeos também têm sido reportados devido ao seu potencial como inseticida, moluscicida, e bactericida (OBASI; IGBOECHI, 1991).

O envenenamento em humanos, a partir da ingestão de *T. Peruviana*, é registrado como uma emergência toxicológica em diferentes partes do mundo. Os fatores clínicos causados devido a essa ingestão são: náuseas, vômito, dores abdominais, diarreia, disritmia e hipercalemia (BANDARA *et al.*, 2010).

Figura 4 – Aspectos gerais de *Thevetia peruviana*



Fonte: Elaborada pelo autor. (A) arbusto, (B) flôr e (C) ramos terminais.

2 JUSTIFICATIVA

As plantas desenvolveram ao longo do tempo uma ampla gama de mecanismos de defesas contra diferentes agentes fitopatogênicos. As peptidases vegetais vêm ganhando destaque dentre as biomoléculas direcionadas a estes processos defensivos. Alguns trabalhos têm reportado a atuação de fluidos laticíferos no processo de defesa vegetal, bem como a associação de enzimas proteolíticas nesta atividade. Recentemente, Ramos e colaboradores (2014) evidenciaram a presença de uma peptidase cisteínica, do látex de *Cryptostegia grandiflora*, com atividade antifúngica. Além do mais, espécies como: *Carica papaya* e *Ficus glabrata* detêm peptidases reconhecidamente atuantes contra bactérias fitopatogênicas (MELZIG *et al.*, 2008). Diante disto, o foco na purificação e caracterização de peptidases são importantes como uma forma de contribuir para o entendimento do seu papel fisiológico no látex, assim como para a prospecção das mesmas como possíveis ferramentas biotecnológicas no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a fitopatógenos.

Thevetia peruviana é uma planta laticífera distribuída em toda a região tropical do nosso continente. Os únicos relatos na literatura sobre esta planta referem-se às suas propriedades tóxicas, que estão associadas aos glicosídeos cardioativos ou cardiotônicos. No entanto, até o momento, não existem trabalhos acerca do perfil proteico, assim como a purificação, caracterização e atividade biológica de proteínas de seu látex.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar o látex de *Thevetia peruviana*, através de estudos proteômicos, assim como purificar e avaliar a atividade antifúngica de uma peptidase cisteínica.

Objetivos específicos

- Fracionar o látex de *Thevetia peruviana* através de centrifugações e diálise contra água para a obtenção de uma fração proteica livre de borracha e de metabólitos secundários;
- Caracterizar as proteínas do látex por eletroforeses bidimensionais e identificá-las através de espectrometria de massas;
- Caracterizar o látex de *T. peruviana* quanto a presença de peptidases, através de zimogramas e ensaios colorimétricos;
- Purificar uma peptidase do látex através de diferentes métodos cromatográficos;
- Caracterizar a atividade proteolítica da peptidase purificada (peruvianin-I) quanto o pH e temperatura ótimos, K_m , V_{max} , K_{cat} , presença de carboidratos, massa molecular, similaridade imunogênica com a papaína e estrutura molecular;
- Avaliar o potencial antifúngico das proteínas do látex de *T. peruviana* e da peptidase purificada;
- Avaliar a atividade oxalato oxidase e superóxido dismutase na fração protéica do látex e na enzima purificada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Tampão IPG, CHAPS, uréia, tiouréia, marcadores de pesos moleculares, dodecil sulfato de sódio (SDS), colunas de Superdex-75 (10/300 GL) e Superose 12 (10/300 GL) foram adquiridas da GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA).

Reagente de Schiff, Ditioneitol (DTT), azocaseína, N-Benzoil-arginina-naftilamida (BANA), Iodoacetamida (IAA), benzoil arginina p-nitroanilida (BAPNA), pepstatina (PEP), fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), etilenoglicol-bis-aminoetil éter (EGTA), trans-epoxisuccinil leucilamido-3-metil-butano (E-64), ácido tricloroacético (TCA), 4-(dimetil amino)cinamaldeído (DMACA), N,N-dimetilanilina, 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona, horseradish peroxidase, 4-cloro-1-naftol, anti-igG de coelho marcado com fosfatase alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitro blue tetrazolium (NBT), acrilamida, bisacrilamida e 2-mercaptoetanol foram obtidos de Sigma-Aldrich Co. USA.

Triton X-100 foi adquirido da USB Corporation, Cleveland, OH. Os demais reagentes foram de grau analítico e adquiridos de diferentes fornecedores.

4.1.2 Material Biológico

4.1.2.1 Material Vegetal

Plantas saudáveis e não cultivadas de *Thevetia peruviana*, localizadas na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, foram utilizadas como fonte de látex fresco. A espécie foi identificada por um taxonomista da Universidade Federal do Ceará, com exsiccata (N. 53020), depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

A planta em estudo possui comprovante de registro para coleta no sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO. Número: 44054-19. Data da Emissão: 23/04/2014. Também possui autorização de acesso e de remessa de

componente do patrimônio genético emitido pelo CNPq, com processo 010425/2014-4. Validade: 10/06/2014 a 01/06/2018.

4.1.2.2 Fungos

Os fungos fitopatogênicos, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*, foram obtidos da micoteca mantida pelos laboratórios de Proteínas Vegetais de Defesa e de Biotecnologia de Peptidases Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e fracionamento do látex

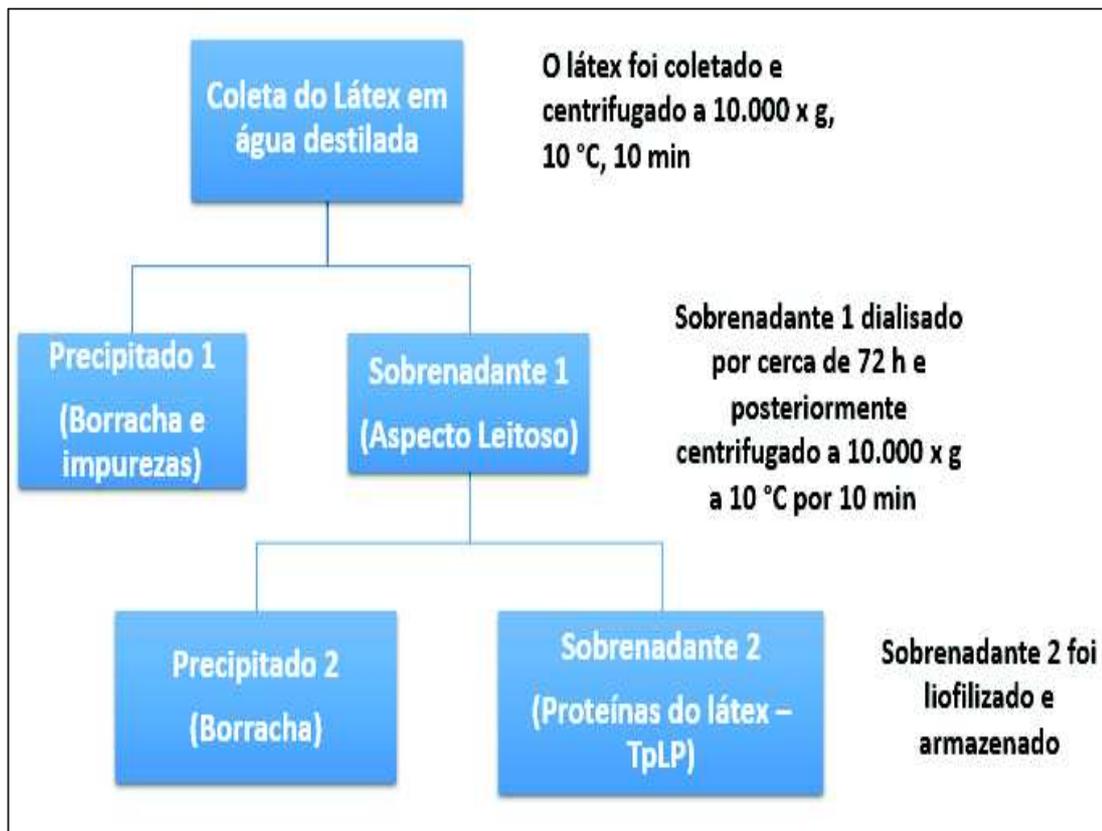
O Látex de *T. peruviana* foi coletado a partir de incisões, manuais, no ápice caulinar de espécimes sadias (FIGURA 5), localizadas em jardins da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza-Ce, Brazil. O látex foi coletado em tubos tipo Falcon, contendo 5 mL de água destilada, sendo o látex misturado para uma proporção final de 1:1 (v/v). Após a coleta, o material foi submetido a um processamento no intuito de separar a borracha, como descrito por Freitas *et al.* (2007), mostrado na Figura 6. O látex coletado foi centrifugado a 10.000 x *g* a 10 °C por 10 min. O precipitado resultante, contendo em sua maior parte a borracha, foi descartado. O sobrenadante foi submetido à diálise contra água destilada a 8 °C durante 3 dias, com trocas constantes. Após a diálise, uma nova centrifugação foi realizada, nas mesmas condições citadas acima. O sobrenadante límpido e completamente desprovido de borracha foi utilizado nos ensaios subsequentes e designado como Proteínas do Látex de *T. peruviana* (TpLP). Importante salientar que a membrana de diálise utilizada tem capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da.

Figura 5 - Aspectos gerais da planta, flores e fruto de *Thevetia peruviana*



Fonte: Elaborada pelo autor. As setas indicam a liberação de látex após injúria mecânica.

Figura 6 – Esquema geral de obtenção da fração proteica do látex de *Thevetia peruviana* (TpLP).



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Quantificação de proteínas solúveis

O método de Bradford (1976) foi empregado para mensurar a quantidade de proteínas solúveis presentes em cada passo da extração, bem como para avaliar a quantidade de proteínas a ser empregada nos ensaios realizados neste trabalho. Albumina sérica bovina foi utilizada para a construção de uma curva padrão.

4.2.3 Análise Proteômica

4.2.3.1 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida

A eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida foi realizada na presença de SDS como descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso de géis de

separação em placas, onde a amostra foi dissolvida em 0.0625 M de tampão Tris-HCl (pH 6,8) contendo 2% de SDS na presença ou ausência de 2-mercaptoetanol 5%, aquecidas (100 °C por 10 min) ou não aquecidas. As corridas eletroforéticas foram realizadas em 3 h, a 20 mA por gel e mantidas a 25 °C. As proteínas foram coradas com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-350. O gel foi descorado em uma solução com água: ácido acético: metanol (6:1:3 v/v/v)

4.2.3.2 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

No intuito de extrair as proteínas da fração TpLP, 10 mg da mesma foram solubilizadas em 400 µL de tampão piridina 50 mM, pH 5,0, contendo tiouréia 10 mM, SDS 1 % e 20 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP), como descrito por Vasconcelos e colaboradores (2005). A mistura ficou sob agitação durante 2 h a 25 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 20.000 x g por 30 min a 4 °C. Ao sobrenadante, foram adicionados 4 mL de acetona gelada contendo 10% de TCA. Depois de 12 horas a -20 °C, a solução foi novamente centrifugada sob as condições já mencionadas. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetona gelada. Para cada passo de lavagem, o material era centrifugado (20.000 x g por 5 min, a 4 °C) e o sobrenadante descartado. Após a última lavagem, o precipitado foi submetido ao vácuo para completa remoção da acetona. Ao fim do processo de precipitação, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) para determinação da quantidade a ser aplicada no gel.

Da fração resultante da extração, 300 µg foram dissolvidos em tampão de hidratação (uréia 7 M, tiuréia 2 M, CHAPS 1%, DTT 1%, 0,1% IpG-buffer pH 3-10 ou 4-7, azul de bromofenol) e aplicados em tiras Immobiline DryStrips, pH 3-10 ou 4-7 (11 cm) (Amersham Biosciences), sendo as mesmas reidratadas por um período de 12 horas. A primeira dimensão foi realizada utilizando um sistema Ettan IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech) sob condições sugeridas pelo fabricante.

Posteriormente à primeira dimensão, as tiras de IPG foram equilibradas sob agitação em uma solução de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, contendo glicerol 30%, uréia 6 M, SDS 2% e azul de bromofenol) com DTT 1%, durante 20 min, para a redução das proteínas e, em seguida, na mesma solução de equilíbrio contendo iodoacetamida 2,5%, por 20 min. Após o equilíbrio, as tiras foram submersas em tampão de corrida, por 10 s, para a retirada do excesso de solução de equilíbrio. A

segunda dimensão foi realizada em sistema vertical com gel de separação 15% (14 x 14 cm), à temperatura ambiente, sendo expostas às condições de corrida de 200 V e 30 mA por placa. Terminado a corrida, os géis foram corados com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-350.

Os géis foram escaneados a partir da utilização do programa LabScan v. 5.0 (GE-Healthcare), no Imager Scanner (Amersham Biosciences). A análise do gel foi realizada no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare) por detecções manuais e automáticas de “spots”. O mesmo programa foi utilizado para estimar os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada “spot”.

4.2.4 Seleção e processamento dos spots para espectrometria de massas

Os “spots” corados, provenientes da eletroforese bidimensional, foram retirados dos géis com o auxílio de um bisturi e transferidos para microtubos de 1 mL. Nestes foram realizadas as digestões trípticas, de acordo com o método de Hellman e colaboradores (1994), adicionado de algumas modificações. Os “spots” foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM/ acetonitrila 50%, em pelo menos 3 lavagens de 30 min, e desidratados, duas vezes, com acetonitrila 100% por 5 min. O solvente remanescente foi removido dos pedaços dos géis em concentrador de amostra Speed Vac (Savant). À reidratação dos spots seguiu-se a adição de 15 µL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 0,2 µg de tripsina grau sequenciamento. Após 1 h a 4 °C, foram adicionados 20 µL do tampão bicarbonato de amônio 50 mM em cada tubo e a digestão realizada em banho a 37 °C, por 16 h. Em seguida, os peptídeos trípticos foram extraídos dos géis com solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético (TFA) 5%, com auxílio de um sonicador, por 30 min.

4.2.5 Espectrometria de Massas

Os produtos das digestões trípticas foram separados em uma coluna de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 C18 (75 µm x 200 mm) utilizando um gradiente de acetonitrila de 7% a 40%, contendo 0,1% de ácido fórmico, a partir de um fluxo de 500 nL/min (PANIS *et al.*, 2013).

Os espectros de massa foram adquiridos em um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema 2D NanoUPLC-ESI. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI (+) através da fonte NanoLockSpray. O canal de coleta do analito foi fechado a cada 30 s para passagem do íon de referência. O espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução de GFP (320 fmol/ml) injetado através do spray de referência da fonte NanoLockSpray. O íon duplamente carregado ($[M + 2H]^2+$) foi usado para a calibração de um ponto inicial (Lteff), e a fragmentação iônica de GFP em MS/MS foi usada para obter a calibração final do instrumento.

4.2.6 Pesquisa no Banco de Dados

Os dados obtidos pelo ESI-QUAD-TOF foram processados usando o software ProteinLynx Global Server v. 2.4 (Waters). O processamento incluiu a correção automática dos valores de m/z dos espectros MS e MS/MS segundo a massa do íon de referência do lockspray. Conjuntamente, os dados de MS e MS/MS foram submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com). A fim de identificar as proteínas, as buscas foram realizadas utilizando o NCBI (National Center for Biotechnology Information) como banco de dados restringido para Viridiplantae (Green Plants) e, posteriormente, para todas as entradas. Os critérios de busca foram baseados considerando carbamidometilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação das metioninas como modificação variável. Na hidrólise por tripsina, foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos foi de $\pm 0,05$ Da. As proteínas que não foram identificadas pela espectrometria de massas tiveram suas sequências manualmente submetidas ao programa proteinBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), no intuito de compará-las com outras proteínas vegetais.

4.2.7 Ensaios Enzimáticos

4.2.7.1 Atividade Proteolítica Total

Azocaseína foi utilizada como substrato não específico para avaliação da atividade proteolítica total em TpLP ou da peptidase purificada. A reação consistiu na mistura de 20 µL (1 mg/mL em acetato de sódio 50 mM pH 5,0) da amostra (pré-incubada com 40 µL de DTT 3 mM por 10 min a 37 °C), 200 µL de azocaseína 1% e o volume ajustado para 500 µL com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Após 60 min a 37 °C, a reação foi parada com a adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 12%. Os tubos foram centrifugados (5.000 x g por 10 min a 25 °C) e o sobrenadante (400 µL) foi alcalinizado com 400 µL de uma solução de hidróxido de sódio 2 N. O substrato utilizado, ao sofrer degradação por peptidases, libera um composto denominado “azo”, que atua como um cromóforo, sendo detectado através de espectrofotômetro em comprimento de onda 420-440 nm (XAVIER FILHO *et al.*, 1989). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.2.7.2 Ensaio para a Detecção de Peptidases Cisteínicas

O ensaio para detecção de peptidases cisteínicas foi realizado com BANA como substrato. Alíquotas de 20 µL de TpLP ou da peptidase purificada (1 mg/mL em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) foram pré incubadas com 40 µL de uma solução ativadora na presença ou ausência de DTT 3 mM e EDTA 2 mM e o volume ajustado para 500 µL com tampão acetato de sódio 50 mM. Após 10 min a 37 °C, foi adicionado 200 µL de BANA (1 mM em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5). Depois de 30 min a reação foi parada pela adição de 500 µL de ácido clorídrico (HCL) 2% em etanol e 500 µL de 4-dimetil-amino-cinamaldeído. Após 40 min, a cor resultante foi mensurada pela absorbância em 540 nm (ABE *et al.*, 1992). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 540 nm a partir de 0,01. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.2.7.3 Ensaio para a Detecção de Peptidases Serínicas

Os ensaios para detecção de peptidases serínicas foram realizados utilizando o BApNA como substrato. Alíquotas de 20 µL de TpLP ou da peptidase purificada (1 mg/mL em 50 mM de tampão acetato de sódio, pH 5) foram incubados com 480 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) por 10 min a 37 °C, seguido da adição de 200 µL de BApNA 1,25 mM. A cor resultante foi mensurada pela absorbância em 405 nm (GOMES *et al.*, 2005). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.7.4 Avaliação da atividade proteolítica sob diferentes valores de pH e concentrações de DTT.

A atividade proteolítica da fração TpLP ou da peptidase purificada foi monitorada em diferentes valores de pH, usando os seguintes tampões na concentração de 50 mM: glicina-HCl (pH 3,0), acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0) e Tris-HCl (pH 8,0, 9,0 e 10,0). As atividades proteolíticas foram determinadas a 37 °C utilizando os substratos BANA 1mM, BApNa 1,25mM e azocaseína 1%, como descrito acima. O efeito do DTT na atividade proteolítica de TpLP foi averiguado mediante a incubação dessa fração em diferentes concentrações de DTT (0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 25 e 50 mM) por 40 min a 37 °C. A atividade proteolítica foi avaliada usando azocaseína e BANA como substratos, no pH 5,0.

4.2.7.5 Estabilidade térmica e o efeito dos inibidores de peptidases

Para testar a estabilidade térmica, a fração proteica do látex (TpLP) ou da peptidase purificada (1 mg/mL em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) foi submetida a diferentes temperaturas (37, 45, 60, 75 e 90 °C) durante 15 e 30 min, em banho-maria. Em seguida, a atividade proteolítica foi mensurada a 37 °C, utilizando azocaseína como substrato, sob as condições padrões de ensaio proteolítico.

Para identificação dos tipos de proteases na fração proteica do látex de *Thevetia peruviana*, vários inibidores de diferentes tipos de peptidases foram testados. Alíquotas de 15 µL de TpLP (1 mg/mL em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) foram incubadas, separadamente, por 30 min a 25°C com 20 µL dos seguintes

inibidores: PMSF 5 mM, E-64 0,18 mM, IAA 0,1M, EDTA 10 mM e pepstatina 10 μ M. Em seguida, a atividade residual foi mensurada em pH 5,0 a 37 °C, utilizando azocaseína ou BANA como substratos.

4.2.8 Zimograma

Para detectar a atividade proteolítica em gel, a fração TpLP e a proteína purificada foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), contendo gelatina 0,1%, na presença de SDS. Logo após a migração, o gel foi incubado em uma solução de Triton X-100 2,5% a 25 °C sob agitação por 40 min. Em seguida, o gel foi incubado em um tampão de ativação (acetato de sódio pH 5,0, 50 mM, contendo DTT 3 mM). A atividade proteolítica ocorreu durante 60 min a 37 °C e o gel foi corado em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-350 0,2%. A atividade enzimática foi detectada como bandas transparentes nos géis

4.2.9 Cromatografias em DEAE-Sepharose e CM-Sepharose

Técnicas cromatográficas foram utilizadas no intuito de isolar peptidases presentes no látex de *T. peruviana*. Para isto, a fração TpLP foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em uma coluna trocadora de ânions, DEAE-Sepharose fast flow (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Foram aplicados 15 mg de amostra, diluídos em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. As proteínas não-ligantes foram eluídas com a mesma solução de equilíbrio da coluna e, em seguida, esta foi lavada com 0,25, 0,5 e 1 M de NaCl em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, para eluir as moléculas ligantes.

Outra cromatografia de troca iônica foi realizada, utilizando-se a coluna trocadora catiônica, CM-Sepharose fast flow (Amersham Biosciences, Brazil), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Foram aplicados 15 mg de amostra, diluídos em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. As proteínas não-ligantes foram eluídas com a mesma solução de equilíbrio da coluna. NaCl 1 M foi acrescido ao tampão de equilíbrio para a eluição da fração proteica retida na matriz.

4.2.10 Cromatografias de exclusão molecular

A fração proteica TpLP foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl-S100 (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7,5. Foram aplicados 3 mL de amostra (15 mg), em tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7,5. As proteínas foram eluídas com a mesma solução de equilíbrio. O fluxo cromatográfico foi de 0,2 mL/min, sendo coletado 1,5 mL por tubo.

Outra cromatografia de filtração em gel foi realizada mediante a utilização de uma coluna Superdex 75 (10/300) acoplada ao sistema FPLC (AKTA Purifier, GE Healthcare). Foram aplicados 500 µL de amostra (4 mg/mL) a um fluxo de 0,3 mL/min. As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0, coletando-se 0,5 mL por tubo. Os picos proteicos foram monitorados a 280 nm, acumulados, dialisados contra água destilada, liofilizados e analisados por 1D-SDS-PAGE. A proteína purificada foi nomeada como Peruvianina-I.

4.2.11 Análise da sequência de aminoácidos N-terminal

A sequência de aminoácidos NH₂-Terminal da proteína purificada foi determinada através da degradação de Edman, utilizando-se um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-23A). O programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi usado para identificar a proteína purificada através da análise de sua similaridade com outras proteínas vegetais (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

4.2.12 Detecção de Carboidratos

A presença de carboidratos na peruvianina-I foi detectada em gel (1D-SDS-PAGE), usando reagente de Schiff, como descrito por Segrest e Jackson (1972). Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em TCA 10% por 30 min, seguido de uma solução de periodato 1% e ácido acético 3% por 1 h a 25 °C. Os géis ficaram em contato com a solução de Schiff durante 50 min, no escuro, e depois descorados com bissulfito 0,5%. Ribonuclease foi utilizada como glicoproteína padrão.

A quantificação de carboidratos na proteína purificada foi realizada baseando-se no método de Masuko e colaboradores (2005). Para esta reação, foram adicionados 50 μL de amostra (2 mg/mL), 150 μL de ácido sulfúrico concentrado e 30 μL de fenol 5%, seguindo esta ordem. A reação ocorreu em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços. Glicose em diferentes concentrações foi utilizada para a construção da curva padrão. As leituras foram realizadas a 490 nm utilizando um leitor de microplacas automático (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

4.2.13 Avaliação da atividade proteolítica na Peruvianina-I sob diferentes pHs, temperaturas e inibidores de peptidases

A atividade proteolítica foi desenvolvida usando azocaseína, BANA e BApNA como substratos, conforme descrito no tópico 4.2.7. Para cada reação, 100 μL de peruvianina-I (1mg/mL) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, foram incubados com 200 μL da solução de substrato (1% azocaseína; 1 mM BANA; ou 1,25 mM BApNA,) e 250 μL de diferentes tampões (pH 3-10).

A termoestabilidade da proteína purificada foi avaliada através da exposição da enzima a várias temperaturas diferentes (25, 37, 45, 60, 75 and 90 °C) por 15 min. Posteriormente, o ensaio de atividade residual foi realizado com azocaseína, a 37 °C, pH 5,0.

Diferentes inibidores de peptidases foram confrontados com a enzima (peruvianina-I) neste ensaio. A proteína foi pré incubada, separadamente, com PMSF 5mM, E-64 0,18 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM ou pepstatin-A 10 μM , a 25 °C for 30 min. A atividade remanescente foi averiguada perante a digestão do substrato azocaseína, em condições de pH 5,0 a 37 °C.

4.2.14 Parâmetros cinéticos da Peruvianina-I

Azocaseína foi usada para determinar o K_m e V_{max} da peptidase purificada (peruvianina-I). A estimativa destes parâmetros foi alcançada usando-se 20 μg da enzima e uma concentração final de substrato variando de 1 a 200 μM , isto em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6.0), contendo 1 mM DTT a 37 °C. Os valores de K_m , V_{max} e K_{cat} foram determinados a partir do gráfico de duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk.

4.2.15 Detecção em gel da atividade proteolítica da Peruvianina-I

A Atividade proteolítica da enzima, também, foi determinada por zimograma, como descrito no tópico 4.2.8. Depois da eletroforese o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% e incubado em uma solução de tampão acetato de sódio 50 mM contendo 1 mM de DTT, permanecendo assim por 2 h a 37°C. Depois o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-350 0,1%. A atividade enzimática foi detectada a partir da visualização de bandas transparentes no gel azul.

4.2.16 Determinação da massa molecular via filtração em gel e espectrometria de massas

A massa molecular da peptidase purificada, na sua forma nativa, foi determinada através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao FPLC. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0, contendo 0,15 M de NaCl, em fluxo constante de 0,35 mL/min, em um volume de coleta de 0,7 mL por tubo. Azul de dextrana foi utilizado para mensurar o volume morto da coluna. Em sequência, a calibração da coluna foi realizada com os seguintes padrões proteicos: β -Amilase (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), albumina do ovo (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo c (12 kDa). Após a corrida dos padrões moleculares e a construção da curva de calibração, uma amostra da peptidase purificada foi aplicada na coluna sob as mesmas condições. A massa molecular da peptidase foi calculada com base na equação da reta, obtida através da plotagem do logaritmo da massa molecular versus o volume de retenção sobre o volume morto da coluna.

O peso molecular da peruvianina-I também foi determinado através de espectrometria de massas utilizando um espectrômetro Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema de ESI-NanoUPLC, como já descrito no tópico 4.2.5.

4.2.17 Imunoensaios: produção de anticorpos, Dot Blotting e Western Blotting

Anicorpos policlonais contra papaína foram produzidos em coelho macho, da raça Nova Zelândia, de 4 meses de idade, obtido no departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como descrito por Kundu, Sundd e Jagannadhan (2000).

Dot Blotting e Western Blotting foram realizados com o objetivo de avaliar a reatividade cruzada entre anicorpos anti-papaína com a peptidase purificada (peruvianina-I). Foram adicionados 10 µL das Proteínas do latex de *T. peruviana* (TpLP), peruvianina-I, bromelaína e papaina (1 mg/mL em água) na membrana de nitrocellulose (0,45 mm) (Hybond-P, Amersham Life Science), deixadas secar por 5 min a 25 °C e incubadas em PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2,6 mM, NaHPO₄ 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7.4), contendo 5% (w/v) de leite desnatado, por 2 h a 25 °C. Decorrido esse período, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana lavada três vezes consecutivas com PBS contendo 5% de leite desnatado. Os anticorpos policlonais anti-papaína foram adicionados na diluição 1:5.000 v/v na solução bloqueadora e a incubação feita à temperatura ambiente, sob agitação por 2 h. Após três lavagens, com tampão PBS, cada uma por 2 min e sob agitação, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo na diluição de 1:10.000 (v:v, anti-IgG de coelho desenvolvido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina), por 2 h, à 25 °C. Finalmente, após três lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), que constituiu de uma solução de Tris-HCl 20 mM, pH 9,0, NaCl 0,1 M, MgCl 2,5 mM, NBT 10 mg/mL e BCIP 25 mg/mL. As membranas foram deixadas sob agitação com a solução do substrato, até o aparecimento das bandas arroxeadas.

Para o ensaio de Western Blot, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (12,5%) e transferidas para a membrana de nitrocellulose por eletrotransferência sob 100 mA por 1 h a 25 °C, usando uma unidade de transferência

Semi-dry (GE HealthCare). Os seguintes passos da reação foram realizados conforme já descritos no ensaio de Dot Blotting.

4.2.18 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A estrutura tridimensional da proteína purificada (peruvianina-I) foi observada mediante a utilização de um Microscópio de Força Atômica Nanoscope Multimode IIIa (Bruker-CA) do Laboratório de Microscopia Avançada (Departamento de Física - UFC). A proteína foi solubilizada em água ultra pura para uma concentração final de 2 µg/mL e então centrifugada a 13.000 x g por 10 min a 25 °C. Posteriormente, 2 µL da proteína foram depositadas na mica, e deixada secar em uma câmara a vácuo por 10 min. O método utilizado foi o de varredura por contato intermitente (tapping mode), utilizando uma sonda de cantilever retangular (TESP - Bruker) com constante de mola de 42 N/m. As imagens foram adquiridas em taxas de varredura de 0.5 Hz e resolução de 512 x 512 linhas (máximo do equipamento).

4.2.19 Atividade de Oxalato Oxidase

Como a sequência de aminoácidos da porção N-terminal da peruvianina-I foi bastante similar a proteínas do tipo germin e germin-like, ensaios enzimáticos foram realizados no intuito de detectar atividade oxalato oxidase (EC 1.2.3.4). A atividade de oxalato oxidase *in vitro* na fração TpLP (2 mg/mL) e peruvianina-I (1 mg/mL) foi avaliada incubando-se 190 µL da amostra com 2,5 mL do reagente A (40 mM de tampão succinato, 0,79 mM N,N-dimetilanilina e 0,11 mM de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona, pH 4,0), 100 µL de EDTA 100 mM, 200 µL de ácido oxálico 200 mM e 10 µL de peroxidase horseradish 1 mg/mL. Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como controle positivo. Todas as reações foram monitoradas a partir da medição da absorbância a 600 nm (CHEN *et al.*, 2011).

A atividade de oxalato oxidase também foi avaliada mediante a utilização de membrana de nitrocelulose, baseando-se no método de Dumas e colaboradores (1993). Com isso, 10 µL da fração TpLP e peruvianina-I, nas concentrações de 2 mg/mL e 1mg/mL, respectivamente, foram adicionados na membranas, onde foi deixada secar por 5 min. Posteriormente, as mesmas foram incubadas, durante 4 h a 25 °C, em uma solução de ativação (tampão succinato 40 mM, pH 4,0, contendo ácido

oxálico 2,5 mM, 1 unidade/mL de peroxidase horseradish e 4-cloro-1-naftol 0,6 mg/mL). A presença de atividade oxalato oxidase é evidenciada a partir da formação de manchas azul escuro na membrana.

A detecção da atividade oxalato oxidase *in situ* foi avaliada mediante a incubação de folhas de *T. peruviana*, de aproximadamente 8 x 2 cm, em uma solução de ativação (tampão succinato 40 mM, pH 4, contendo 60 % de etanol, ácido oxálico 3 mM, 4-cloro-1-naftol 0,1 mg/mL e EDTA 3 mM), por 60 min a 37 °C. A presença de manchas azuladas no tecido vegetal evidenciam a atividade.

4.2.20 Atividade de Superóxido Dismutase

A atividade superóxido dismutase, *in vitro*, foi determinada baseando-se na capacidade da amostra em inibir a redução fotoquímica do nitroazul de tetrazólio (NBT), como descrito por Giannopolitis e Ries, 1977. Primeiramente, foram adicionados 100 µL da fração TpLP ou peruvianina-I (1mg/mL) em cada tubo, seguido do acréscimo da solução de reação (1,66 mL), que continha tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, 13 mM de metionina, NBT 75 mM e 2 mM de riboflavina. A riboflavina foi adicionado por último. Posteriormente os tubos foram agitados e iluminados sob duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, durante 5 min. Após isso as luzes foram desligadas e os tubos cobertos com papel alumínio. A absorbância da mistura foi medida a 560 nm. Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma redução de 50% na taxa de foto-redução do NBT. Os resultados foram expressos como U/g de massa de seca (MS).

4.2.21 Ensaios biológicos

4.2.21.1 Cultivo dos Fungos

O cultivo dos fungos foi realizado em 25 mL de Sabouraud Dextrose Agar (SDA) estéril, distribuídos em placas de Petri (100 x 15 mm), mantidos em câmara de germinação do tipo B.O.D., a 27 ± 2 °C, umidade de 70% e fotoperíodo de 12 h. O meio de cultura era constituído de 65 g de SDA dissolvido em 1 litro de água destilada e autoclavado por 20 min, a 120 °C, 1,5 kgf. Os fungos eram renovados mensalmente através da transferência de pellets de uma placa contendo os fungos para outra placa contendo apenas meio de cultura SDA. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar contendo chama de fogo.

4.2.21.2 Obtenção da Suspensão de Esporos

A obtenção das suspensões de esporos foi realizada segundo Melo e colaboradores (2005), com algumas modificações. Após os fungos terem tomado todo diâmetro da placa de Petri, cerca de 15 dias após o repique (cultura fresca), essas foram abertas em capela de fluxo laminar e 10 mL de água destilada foram adicionados aos meios de culturas contendo os respectivos fungos. Com auxílio de uma alça de Drigalski (previamente flambada), movimentos suaves na superfície do micélio foram realizados para a liberação dos esporos. As suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis para a retirada das hifas remanescentes. O filtrado resultante foi denominado de suspensão padrão de esporos. Para a realização dos ensaios de inibição de crescimento e da germinação de esporos, as suspensões contendo os esporos foram ajustadas para uma concentração de 2×10^5 esporos/mL. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60).

4.2.21.3 Ensaio de Inibição do Crescimento Fúngico em Meio Líquido

Os ensaios de inibição do crescimento foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert e Terras (1990), com algumas adaptações. Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo

chato (estéreis) de 96 poços. Cada poço continha 10 µL de uma suspensão de esporos (2×10^5 esporos/mL) e 90 µL de meio YPD (Yeast Peptone Dextrose). Após 16 h na ausência de luz, a 27 °C, 100 µL das amostras foram adicionados. Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento foram o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e o peróxido de hidrogênio 50 mM, respectivamente. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm. O crescimento fúngico foi monitorado através de leituras de absorbância a 620 nm, em intervalos de 12 ou 24 h, até um total de 48 ou 72 h, em leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

4.2.21.4 Ensaio de Inibição da Germinação de Esporos

O efeito da fração proteica TpLP e de peruvianina-I sobre a germinação dos esporos foi avaliado de acordo com o método descrito por Ji e Kuć (1996), adaptado para uso de placas de polietileno reticuladas. Uma alíquota de 10 µL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL) foi incubada com 10 µL das amostras em diferentes concentrações. Como controles foram utilizados tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 estéril, BSA 5 mg/mL, peróxido de hidrogênio 50 mM e DTT 3 mM. As placas de germinação foram mantidas a 27°C, por 24 h, na ausência de luz, 80% de umidade. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico (“Olimpus System Microscope BX 60”). Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

5. Resultados

5.1 Análise proteômica

As etapas de fracionamento do látex de *T. peruviana* promoveram o aparecimento de duas fases distintas: o precipitado, que constitui o material contendo borracha e substâncias insolúveis, e o sobrenadante, que representou a fração proteica, sendo denominada TpLP (proteínas do látex de *T. peruviana*). O látex de *T. peruviana* foi constituído, em sua maior parte, por borracha, cuja massa seca foi de aproximadamente 97,3%. Na fração solúvel (2,7%), a concentração de proteínas foi de aproximadamente 380 µg/mL, o que representou, aproximadamente, 10% de massa seca da fração TpLP (Tabela 1). A quantidade de carboidratos da fração TpLP foi estimada em 53,6 %.

Tabela 1 - Rendimento do fracionamento do látex de *Thevetia peruviana*.

	Massa de borracha		Fração solúvel em água (TpPL) ^b		Massa de TpLP (mg/mL)	Teor de proteínas solúveis em TpPL (mg/mL) ^c
	mg	%	mg	%		
Média ^a	2687,45	97,30	72,60	2,70	3,63	0,38
Desvio Padrão	± 238,07	±0,14	±9,06	±0,88	±0,15	±0,08

^aTrês amostras independentes de 20 mL de látex.

^bMassa de TpPL foi considerada como fração livre de borracha e solúvel em água.

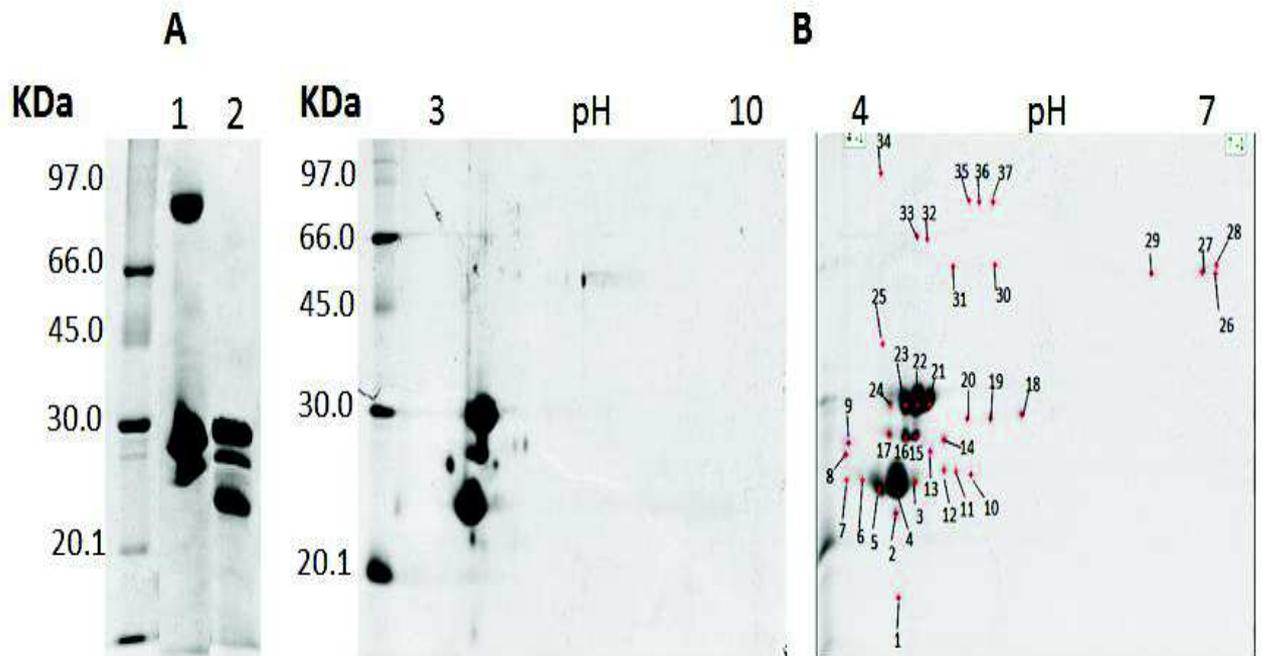
^cEstimado por Bradford (1976).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A eletroforese unidimensional, em condições desnaturantes, proporcionou uma análise inicial do perfil proteico de TpLP (Figura 7 A). É possível observar uma quantidade majoritária de proteínas com massas moleculares próximas a 30 kDa, bem como uma banda proteica, bastante evidente, de massa molecular próximo a 100 kDa. No entanto, quando a amostra foi aquecida e tratada com o agente redutor 2-mercaptoetanol, esta banda de alto peso molecular desapareceu, surgindo uma nova banda proteica de aproximadamente 23 kDa (Figura 7 A, linha 2).

Primeiramente, as proteínas do látex (TpLP) foram separadas por eletroforese bidimensional utilizando uma faixa de pH 3-10, onde 21 spots foram detectados, estando eles distribuídos em pontos isoelétricos entre 3-8 e massas moleculares de 15 a 100 kDa. Como proteínas ácidas ($pI < 5,0$) prevaleceram na fração TpLP, novas eletroforeses bidimensionais com faixas de pH 4-7 foram realizadas para tentar melhorar a resolução da separação. Nestas eletroforeses, foram detectados 37 “spots”, com massas moleculares variando de 15 a 110 kDa e com pI entre 4,0 a 7,0, sendo a maioria de caráter ácido ($pI < 5$) (Figura 7 B). Devido a maior resolução e por representar a maioria das proteínas em TpLP, os “spots” separados na eletroforese proveniente da fita de 4-7 foram retirados, digeridos com tripsina e analisados em um espectrômetro de massas ESI-QUAD-TOF. Os dados obtidos após o processamento de todos os “spots” foram submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com), utilizando o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) como banco de dados, restringido para Viridiplantae (Green Plants).

Figura 7 - Eletroforese unidimensional (12,5%) e bidimensional (15%) em gel de poliacrilamida da fração proteica do látex de *T. peruviana*.



Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Fração proteica do látex de *T. peruviana* na ausência (1) e presença de β -mercaptoetanol (2). Foram aplicados 25 μ g de proteína por poço na eletroforese unidimensional. Na eletroforese bidimensional foram aplicados 300 μ g (géis 3-10) ou 400 μ g (géis 4-7) de proteína (B). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-350. Marcações nos spots do gel 4-7 referem-se a proteínas que foram retiradas, tratadas e digeridas com tripsina para posterior identificação por espectrometria de massa.

Das 37 proteínas visualizadas no gel, 33 delas foram identificadas, o que representa 86 % do total analisado. As proteínas não identificadas diretamente por MS/MS, representadas pelos spots 1, 4, 35 e 37, tiveram suas sequências manualmente submetidas ao programa de busca protein BLAST, no intuito de compará-las com as de outras proteínas vegetais. Entre todas as proteínas identificadas estão: cinco proteínas de reserva, uma fosfotransferase, um inibidor de peptidase serínica, quatro isoformas de peroxidase, uma osmotina e pelo menos vinte isoformas de peptidases cisteínicas, com diferentes pesos moleculares e pI (Tabela 2).

Tabela 2 - Lista de proteínas identificadas no látex de *T. peruviana* por espectrometria de massas a partir dos spots da eletroforese bidimensional

Spot N°	Teórico/Experimental		Protein Score	Íon Parental	Sequência de todos os peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição da proteína
	Massa Molecular (KDa)	pI					
1	70,6/16,9	6,4/4,3	72	1127.6278 1378.7662	IPSGFISYILNR GTGNLELVAVR	gi 1168390	7S Proteína de reserva da semente (<i>Arachis hypogaea</i>)
2	20,3/21,8	4,6/4,3	53	1162.6344	GIGTIISSPYR	gi 3318877	Inibidor de tripsina da soja (<i>Glycine max</i>)
4	50,4/23.8	5,2/4,4	50	1595.7212	NSWGGSWGEGKYIR	gi 514804351	Peptidase cisteínica (<i>Setaria italica</i>)
8	29,7/25.7	5,4/3,8	57	919.4172	IANAFDNR	gi 42561793	Fosfotransferase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
11	33,0/24.6	4,9/4,8	99	1595.7120	NSWGGSWGEGQYIR	gi 357437721	Proteinase cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>)
12	40,3/24.7	5,6/4,7	65	2833.3132	CGVALDHGVVVVGYGTENGVDYWLVR	gi 587864551	Protease cisteínica específica de germinação (<i>Morus notabilis</i>).
12	26,0/24.7	6,1/4,7	62	1110.4532	TNCNFDGAGR	gi 19315	Proteína osmotin-like (<i>Solanum lycopersicum</i>)
13	33,0/25.8	4,9/4,6	93	1595.7186	NSWGGSWGEGQYIR	gi 357437721	Proteinase cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>)
14	22,9/26.9	8,4/4,7	200	1788.8436 2901.1885	NNCPYTVWAAVPGGGR CPDAYSYPKDDQTSTFTCPGGTNYR	gi 88193285	Osmotin-like (<i>Theobroma cacao</i>)
15	25,9/26.9	4,9/4,4	88	1485.6318 1611.7096	NGGIDSEEDYPYK NSWGSSWGEGYIR	gi 42563538	Protease cisteínica like protein (<i>Pelargonium x hortorum</i>)
16 e 17	33,0/26.9	4,9/4,3	80	1595.6818	NSWGGSWGEGQYIR	gi 357437721	Proteinase cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>)

18-20	52,7/28.8	5,2/5,3	54	1525.8248	AVASQPISVAIEAGGR	gi 398330370	Protease cisteínica Papain-like (<i>Fagopyrum esculentum</i>)
21	33,0/30.0	4,9/4,7	93	2429.2165	DYWIVRNSWGGSWGEGGYIR	gi 357437721	Proteinase cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>)
22 e 23	33,0/29.8	4,9	94	1594.7284	NSWGGSWGEGGYIR	gi 357437721	Proteinase cisteínica. (<i>Medicago truncatula</i>)
24	33,0/29.5	4,9/4,2	143	2429.2102	DYWIVRNSWGGSWGEGGYIR	gi 357437721	Proteinase cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>)
25	36,7/42.8	4,8/4,2	83	1595.7168	NSWGGSWGEGGYIR	gi 357437721	Proteinase cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>)
26	39,1/62.8	6,6/6,9	109	1627.8744/ 1071.5194	QVFQNDIGQAAGLLR YYVDLMNR	gi 307949718	Peroxidase (<i>Rubia cordifolia</i>)
27-29	39,5/63.4	5,9/6,8	243	757.4272/1048.5416/ 1087.4724/1813.8535	IIEDLR / RDGLNFATR / YYVDLMNRQ QGLFTSDQDLYTDRR	gi 14031049	Peroxidase (<i>Nicotiana tabacum</i>)
30	61,8/66.3	5,5/5,1	102	2050.0345 1268.7512	RPFYSNAPQEIFIQQGR TANELNLLILR	gi 37789212	Proteína de reserva (<i>Arachis hypogaea</i>)
31	58,5/66.3	5,6/5,1	83	1254.7346	TANDLNLLILR	gi 3703107	Proteína de reserva (<i>Arachis hypogaea</i>).
32	61,8/73.9	5,5/4,5	90	1268.7494	TANELNLLILR	gi 37789212	Proteína de reserva (<i>Arachis hypogaea</i>).
33 e 34	53,4/75.0	5,9/4,4	76	1595.7154	NSWGGSWGEGGYIR	gi 357437715	Protease cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>).
35	58,5/84.3	5,6/4,8	78	1254.7362	TANDLNLLILR	gi 3703107	Proteína de reserva (<i>Arachis hypogaea</i>)
36	53,4/84.3	5,9/5,0	80	1595.7120	NSWGGSWGEGGYIR	gi 357437715	Protease cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>).
37	52,7/83.3	5,2/5,1	53	1525.8242	AVASQPISVAIEAGGR	gi 398330370	Protease cisteínica Papain-like. (<i>Fagopyrum esculentum</i>).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Atividade proteolítica

Como foram identificadas várias peptidases no látex de TpLP, a presença destas enzimas foi avaliada mediante ensaios colorimétricos, utilizando diferentes substratos (azocaseína, BANA e BApNA) condições de pH, concentrações de DTT, temperatura e inibidores de peptidases.

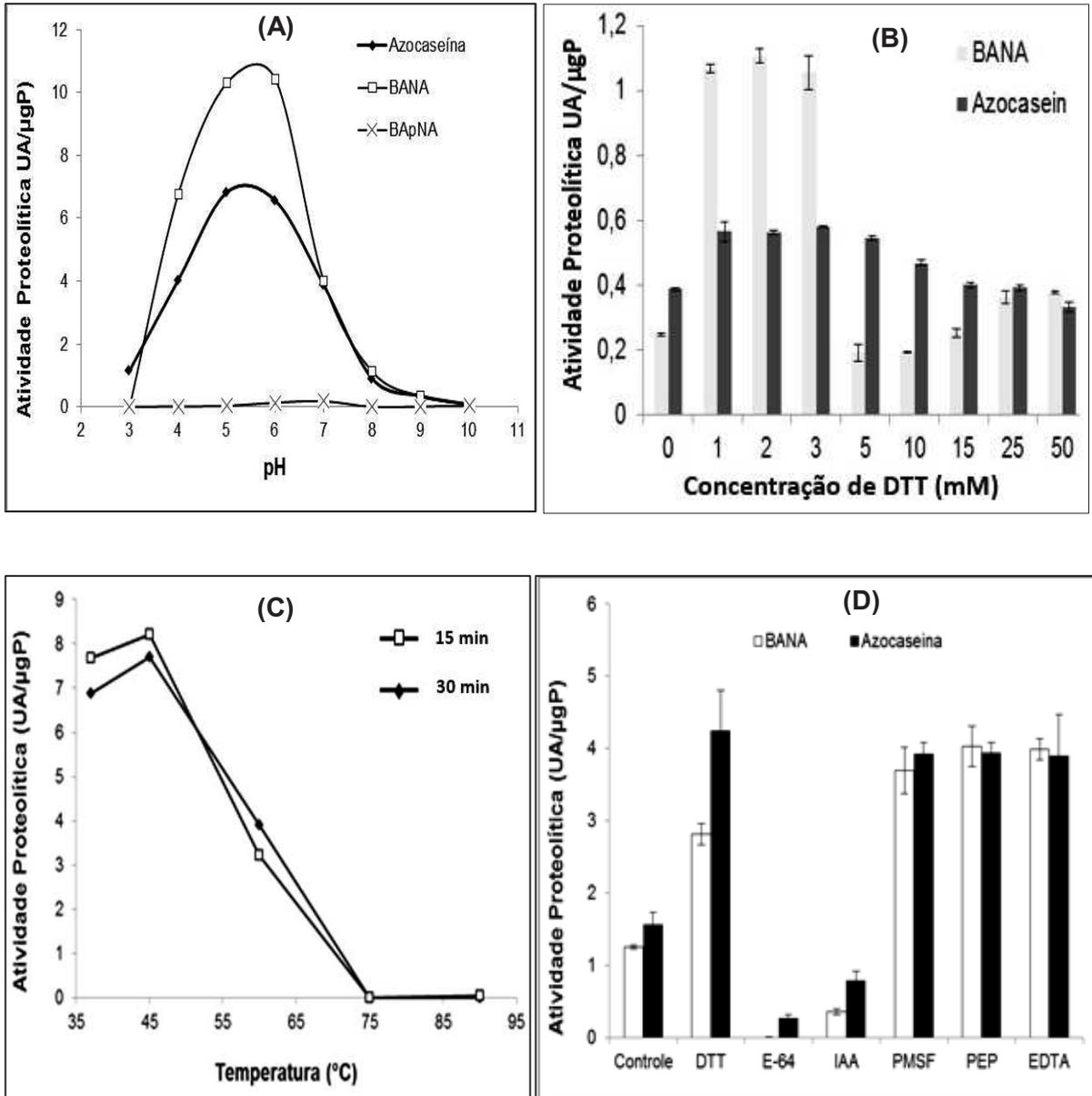
Na presença de azocaseína, um substrato inespecífico, a atividade proteolítica foi máxima em torno do pH 5,0-6,0 (6,55 UA/ μ gP). Peptidases do tipo serínica foram avaliadas mediante a utilização de BApNA como substrato específico. No entanto, as peptidases presentes na fração TpPL não foram capazes de digerir este substrato (Figura 8A). Outro ensaio foi realizado utilizando-se BANA, substrato específico para peptidases do tipo cisteínica. Neste, a atividade enzimática foi máxima no pH 5,0-6,0 (10,7 UA/ μ gP), apresentando uma maior intensidade, quando comparado a máxima alcançada com azocaseína (Figura 8A).

A fração proteica (TpLP), quando exposta a baixas concentrações do agente redutor DTT (1-3 mM), teve a sua atividade proteolítica aumentada. No entanto, em concentrações altas (5-50 mM) de DTT a atividade foi drasticamente diminuída (Figura 8 B).

Outro passo na caracterização das peptidases do látex de *T. peruviana* consistiu em avaliar a estabilidade térmica dessas enzimas. A atividade proteolítica ótima foi alcançada a 45 °C, mantendo-se com 50 % de atividade até 60 °C, por 30 min. Em temperaturas a partir de 75 °C, as enzimas foram totalmente inativadas, mesmo com apenas 15 min de exposição ao calor (Figura 8 C).

Para determinar os tipos de peptidases em TpLP, amostras independentes foram incubadas na presença de diferentes inibidores específicos de peptidases (Figura 8 D). A incubação de TpLP com o DTT, agente redutor e ativador de proteases cisteínicas, proporcionou um aumento na atividade proteolítica, em comparação ao grupo controle, não tratado com o mesmo agente. Este aumento torna-se mais evidente quando utilizado o BANA, substrato específico para estas peptidases.

Figura 8 - Efeito do pH (A), concentração de DTT (B), temperatura (C) e diferentes inibidores de peptidases (D) na atividade proteolítica da fração proteica do látex de *T. Peruviana* (TpLP).

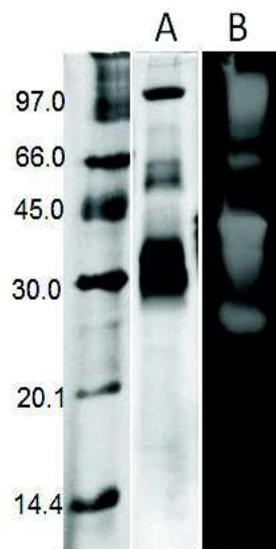


Fonte: Elaborada pelo autor. Cada ponto é referente a média de três experimentos (n=3) com as barras de erros indicando o desvio padrão. Na figura B foi utilizado azocaseína como substrato. Nas figuras B e D tanto o substrato azocaseína como o BANA foram empregados. As amostras foram diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0.

A atividade proteolítica de TpLP, quando incubada com PMSF, pepstatina e EDTA, foi semelhante àquela de TpLP tratadas apenas com DTT, evidenciando que, possivelmente, esta fração proteica não possui peptidases serínicas, aspárticas e metalopeptidases, respectivamente. Por outro lado, quando TpLP foram incubadas com iodoacetamida (IAA) e E-64, ambos inibidores de peptidases cisteínicas, sua atividade foi nitidamente diminuída, utilizando azocaseína e BANA como substratos. Todos esses resultados confirmam a presença de peptidases cisteínicas no látex de *T. peruviana*.

A atividade proteolítica de TpLP também foi avaliada por zimograma contendo gelatina 0,1%, a pH 6,0 e 37 °C (Figura 9). O resultado mostra que a fração TpLP é constituída de várias peptidases, com massas moleculares variando de 100 a 25 kDa. Assim, as várias peptidases cisteínicas identificadas por espectrometria de massas são proteínas diferentes e não isoformas de uma mesma peptidase ou produtos de autodegradação.

Figura 9 - (A) 1D-SDS-PAGE (12,5%) e **(B)** zimograma para detecção de peptidases na fração TpLP



Fonte: Elaborada pelo autor. As proteínas foram visualizadas mediante a coloração com 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R-350. Amostras de 30 µg (A) e 5 µg (B) de proteína, sem aquecimento e mercaptoetanol, foram aplicadas nos poços.

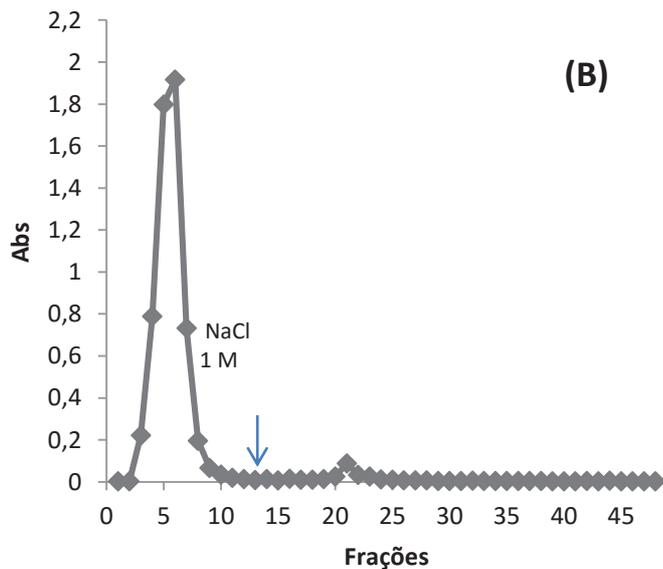
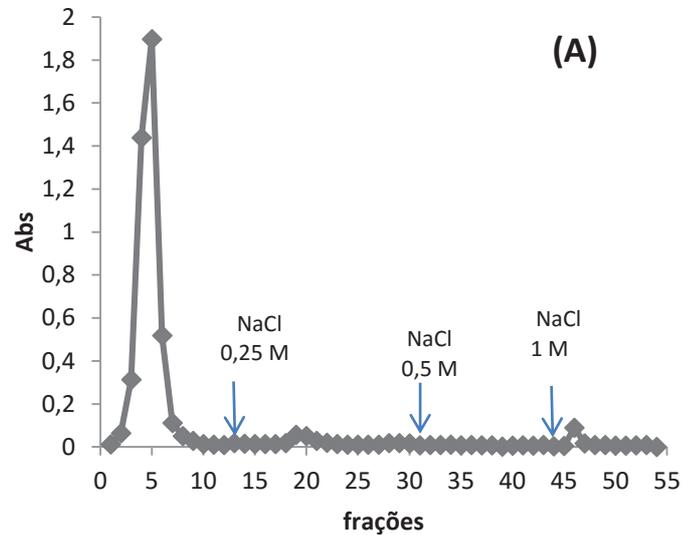
5.3 Purificação de uma peptidase cisteínica (Peruvianina-I)

A partir dos resultados obtidos da análise por espectrometria de massas e zimograma, ficou evidente a presença de inúmeras isoformas de peptidases em TpLP. Assim, diferentes etapas cromatográficas foram realizadas no intuito de purificar uma destas enzimas.

As proteínas do látex de *T. peruviana* (TpLP) foram submetidas, primeiramente, à cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow. Quando utilizado o tampão de eluição acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, a cromatografia reproduziu apenas um pico não retido (Figura 10 A). Similarmente, um único pico foi obtido quando utilizado o tampão de eluição fosfato de sódio pH 6,0, levemente mais básico que o anterior (Figura 10 B)

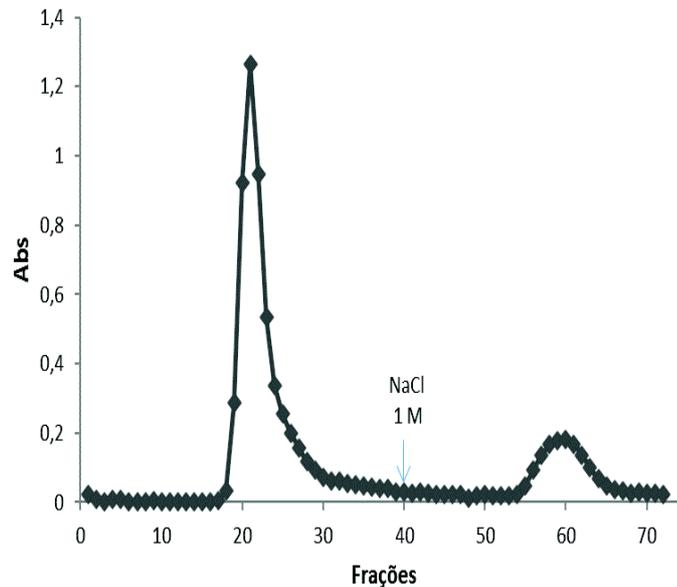
Pelo fato destas colunas mostrarem-se ineficientes no processo de fracionamento, outra matriz, com princípio inverso foi testada: a trocadora de cátions CM-Sepharose, equilibrada a pH 5,0 . Essa etapa de fracionamento mostrou-se mais eficiente que a anterior, onde foi observado um pico retido e outro não retido (Figura 11).

Figura 10 - Perfis cromatográficos das proteínas do látex de *T. peruviana* em matriz de troca iônica DEAE-Sepharose *Fast Flow*.



Fonte: Elaborada pelo autor. **(A)** Coluna equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e eluída com NaCl (0,25-1 M). **(B)** Coluna equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e eluída com NaCl (1 M), adicionado ao tampão de equilíbrio. Foram aplicados 15 mg de TpLP diluídos em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 ou tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0. Fluxo de 1 mL/min e frações de 2 mL.

Figura 11 - Perfil cromatográfico das proteínas do látex de *Thevetia peruviana* em matriz de troca iônica CM-Sepharose *Fast Flow*



Fonte: Elaborada pelo autor. Matriz equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e eluída com NaCl (1 M), adicionado ao tampão de equilíbrio. Foram aplicados 15 mg de TpLP diluído em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0,. Fluxo de 1 mL/min e frações de 2 mL.

Tendo em vista a baixa resolução de fracionamento das matrizes trocadoras de íons, foi realizada uma cromatografia de filtração em gel empregando-se uma coluna Sephacryl-S100. Este procedimento cromatográfico resultou na formação de, pelo menos, três picos distintos (Figura 12 A). No entanto, quando as frações provenientes da cromatografia foram submetidas a eletroforese (Figura 12 B), ficou evidente que não houve uma separação eficiente das proteínas presentes na fração TpLP, o que pode se atribuir a uma baixa resolução da matriz.

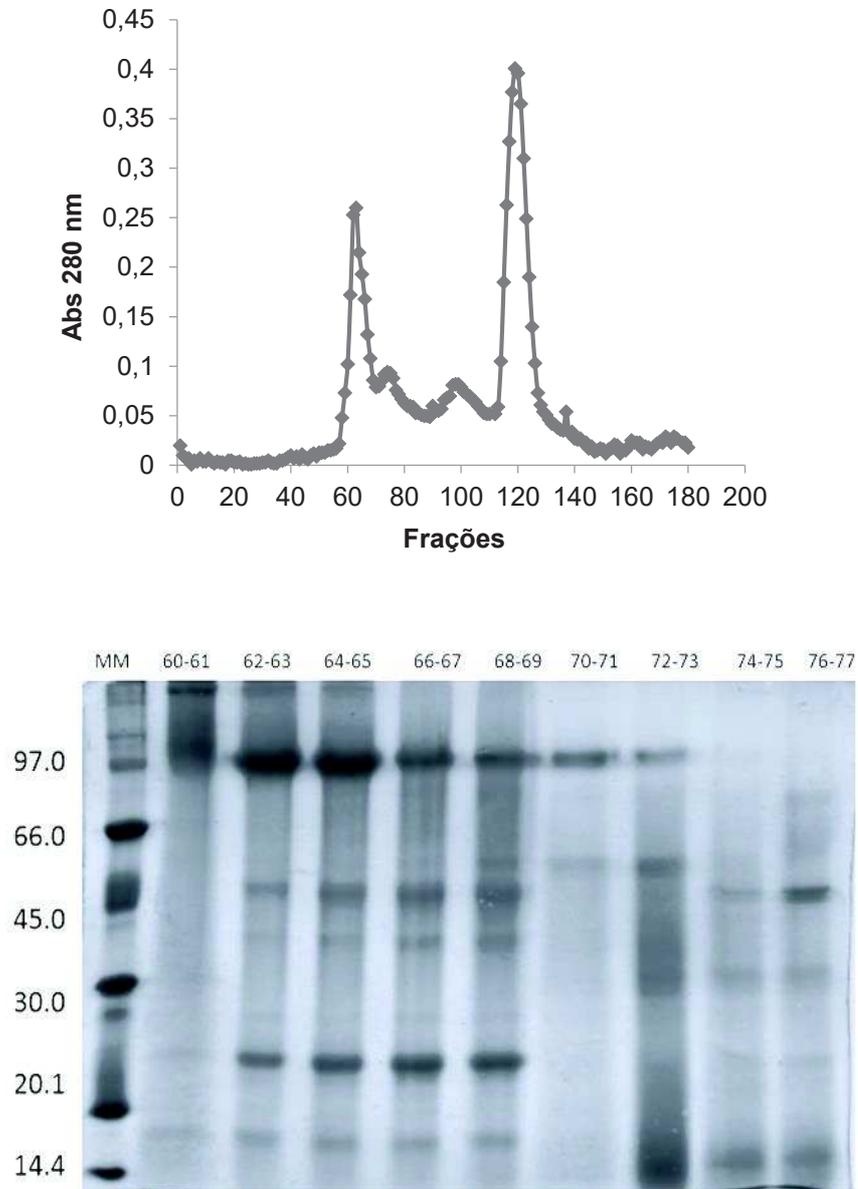
Por outro lado, quatro picos distintos foram obtidos mediante uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex-75 (10/300 GL), acoplada em sistema de alta eficiência AKTA (Figura 13 A). Como observado na figura 13 B, apenas o pico P1 mostrou-se homogêneo na eletroforese (SDS-PAGE).

Posteriormente, a fração (P1) foi submetida à digestão trípica e análises por espectrometria de massas, resultando na identificação de uma peptidase cisteínica (Tabela 3).

O resultado do zimograma confirma a identificação da peptidase feita por espectrometria de massas, uma vez que foi observado atividade proteolítica em gel na banda correspondente ao pico 1 (± 100 kDa) (Figura 14 A).

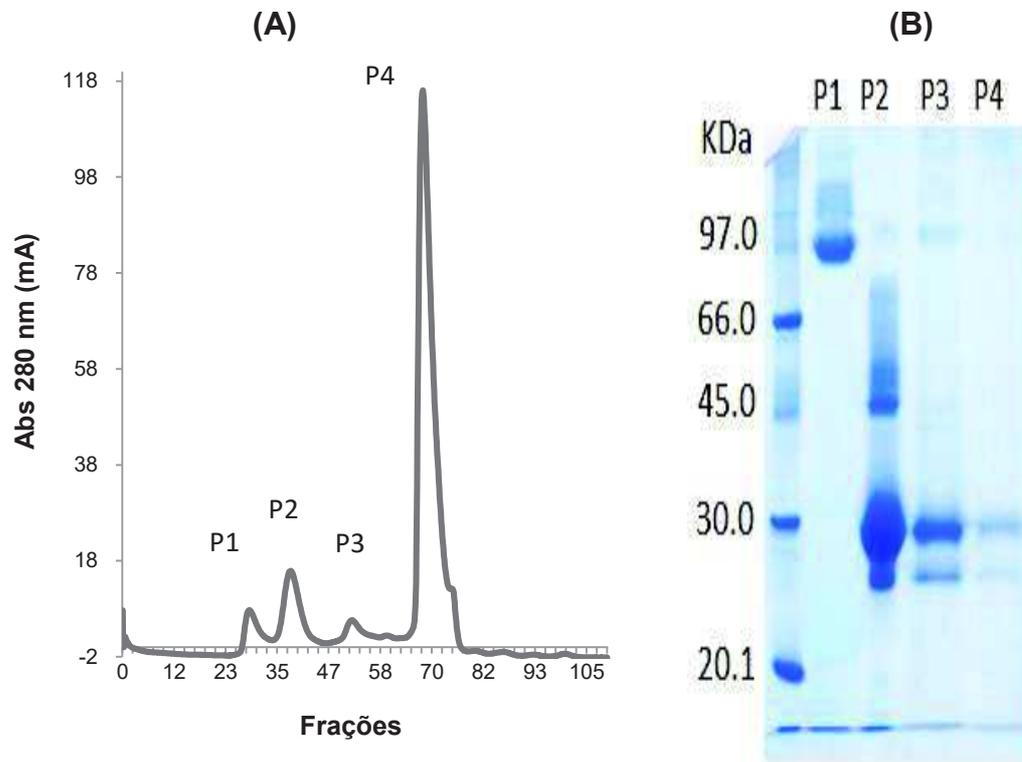
A figura 14 B mostra que a peptidase é uma glicoproteína, através do coramento com reagente de Schiff. Foi mensurado a presença de 22 % (m/m) de açúcar na constituição da peptidase. O rendimento da proteína purificada foi de aproximadamente 12% (m/m), associado a uma atividade específica de 2,7 UA/ μ gP, utilizando azocaseína a pH 6,0. A peptidase purificada foi nomeada peruvianina-I.

Figura 12 - (A) Cromatografia de exclusão molecular da fração proteica do látex de *T. peruviana* na coluna Sephacryl S-100



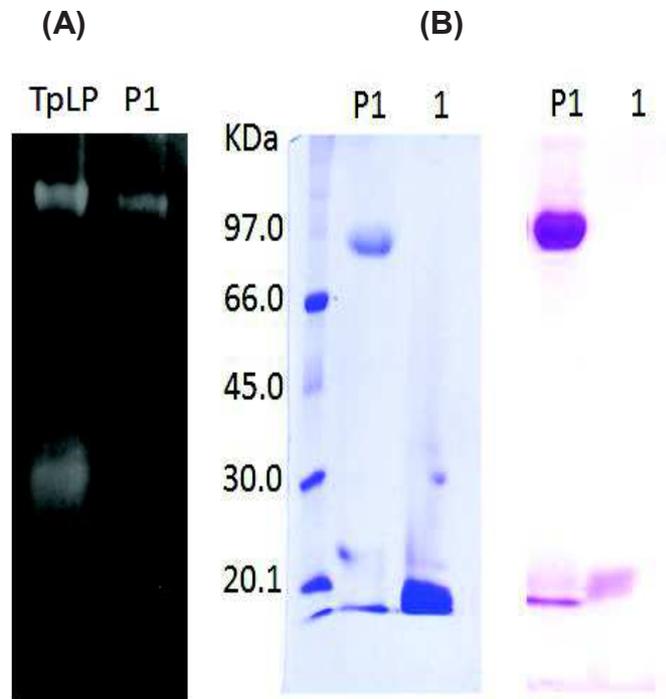
Fonte: Elaborada pelo autor. As proteínas foram eluídas com tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7,5. Foram aplicados 15 mg de TpLP diluídos em 3 mL da mesma solução de eluição. Fluxo 0,2 mL/min e fração de 1,5 mL. **(B)** Eletroforese em gel de poliácridamida (12,5%) das frações cromatográficas. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-350. Foram aplicados 15 µg de proteína em cada poço.

Figura 13 - (A) Cromatografia de filtração em gel correspondente a fração TpLP em uma coluna Superdex-75 e eletroforese (12,5%) dos picos oriundos da cromatografia **(B)**



Fonte: Elaborada pelo autor. As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0. Fluxo 0.3 mL/min; Frações: 0,5 mL.

Figura 14 - (A) Zimograma da fração TpLP e do pico 1 proveniente da cromatografia de filtração em gel em uma coluna Superdex-75. **(B)** Revelação de glicoproteína em gel do pico P1 pelo reagent de Schiff.



Fonte: Elaborada pelo autor. A Ribonuclease B foi usada como uma glicoproteína padrão (1). As Proteínas, sem aquecimento e agente redutor, foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-350 0,1 %. Foram adicionados 20 µg de proteína em cada poço.

Tabela 3 – Identificação por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF) da proteína purificada (P1) obtida através de cromatografia de filtração em gel, (Figura 13 A).

P1	Teórico		Protein score	Íon Parental	Sequências de peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição da Proteína
	MW (KDa)	pI					
1	51,682	5,18	66	1595.7218 2850.3433	NSWGGSWGEQGYIR CGTALDHGVAAVGYGTENGKDYWIVR	gi 357437719	Peptidase cisteínica (<i>Medicago truncatula</i>)

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4 – Tabela de rendimento e índice de purificação de uma peptidase cisteínica (Peruvianina-I) do látex de *Thevetia peruviana*.

Frações	Atividade proteolítica total (UA)	Proteína Total (μg)	Atividade proteolítica específica (AU/μgP)	Rendimento (Massa)	Índice de purificação
TpLP	93000,00	3525,00	26,38	100,0%	1,0
Pico P1 (Peruvianin-I)	1235,80	449,40	2,75	12,7%	0,1

Fonte: Elaborada pelo autor.

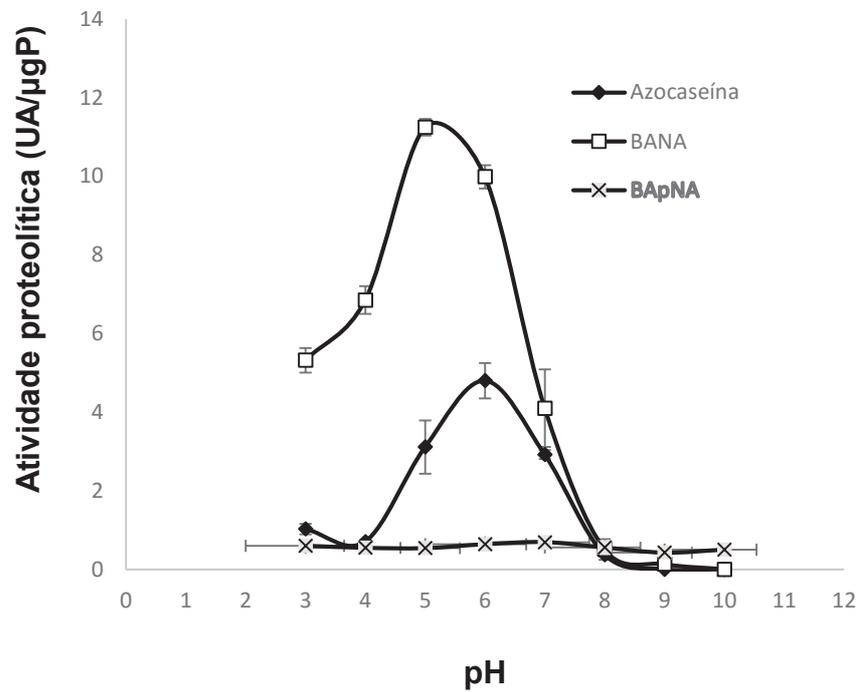
5.4 Caracterização da Atividade proteolítica de peruvianina-I

A peptidase purificada (peruvianina-I) foi capaz de digerir tanto azocaseína quanto BANA, substrato inespecífico e específico para proteases cisteínicas, respectivamente, mas não apresentou capacidade de hidrolisar o BApNa, substrato específico para peptidases serínicas (Figura 15).

A atividade enzimática de peruvianina-I, na hidrólise de azocaseína e BANA, foi máxima em intervalos de pH 5,0-6,0. Esta atividade foi totalmente inibida quando a peptidase foi exposta à faixa de pH 8-10. A atividade proteolítica específica, utilizando BANA como substrato, foi maior, quando comparado à azocaseína, em praticamente todos os pHs testados (Figura 15). Quando exposta a diferentes temperaturas por 15 min, utilizando-se BANA como substrato, a peptidase apresentou uma atividade proteolítica máxima no intervalo de 25 a 45 °C, mantendo, aproximadamente, 50 % dessa atividade a 50 °C, porém, inibida em temperaturas superiores a 60 °C (Figura 16). Apenas E-64 e iodoacetamida (IAA), ambos inibidores de peptidases cisteínicas, foram capazes de inibir ou diminuir a atividade proteolítica da peruvianina-I (Figura 17). Todos esses resultados evidenciam que a Peruvianin-I é uma peptidase cisteínica.

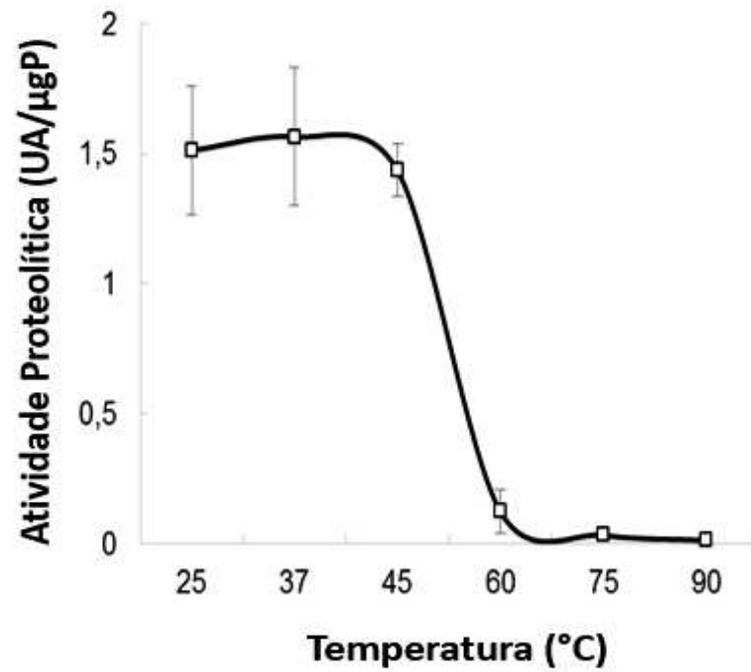
Os parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} e K_{cat}) da peruvianina-I foram determinados para a atividade proteolítica, utilizando azocaseína. O aumento da concentração deste substrato, na velocidade de reação, seguiu a cinética de Michaelis-Menten, alcançando a saturação com 50 μ M, sob condições de pH 6,0 e 37 °C (Figura 18). O valor de K_m foi 17,6 μ M, obtido através da equação de Lineweaver-Burk. Os valores de, V_{max} e K_{cat} da peruvianina-I foram de $4,6 \times 10^{-9}$ M/s e $0,23 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. A Tabela 5 faz uma análise comparativa de algumas características pertencentes a peruvianin-I, como K_m , pH e temperatura ótima de atuação, com outras peptidases cisteínicas de látex.

Figura 15 – Efeito do pH na atividade proteolítica da peruvianina-I.



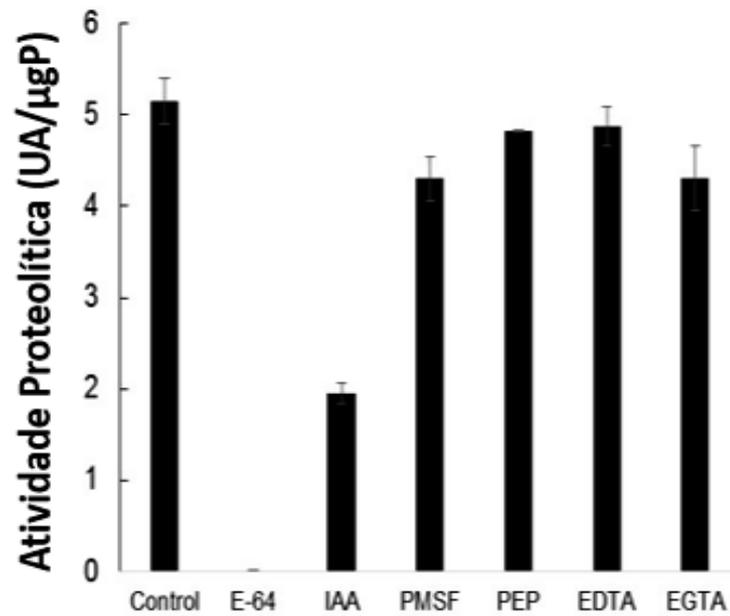
Fonte: Elaborada pelo autor. Cada ponto é referente a média de três experimentos (n=3) com as barras de erros indicando o desvio padrão. O ensaio foi realizado sob uma temperatura de 37 °C.

Figura 16 – Efeito da temperatura na atividade proteolítica da peruvianina-I.



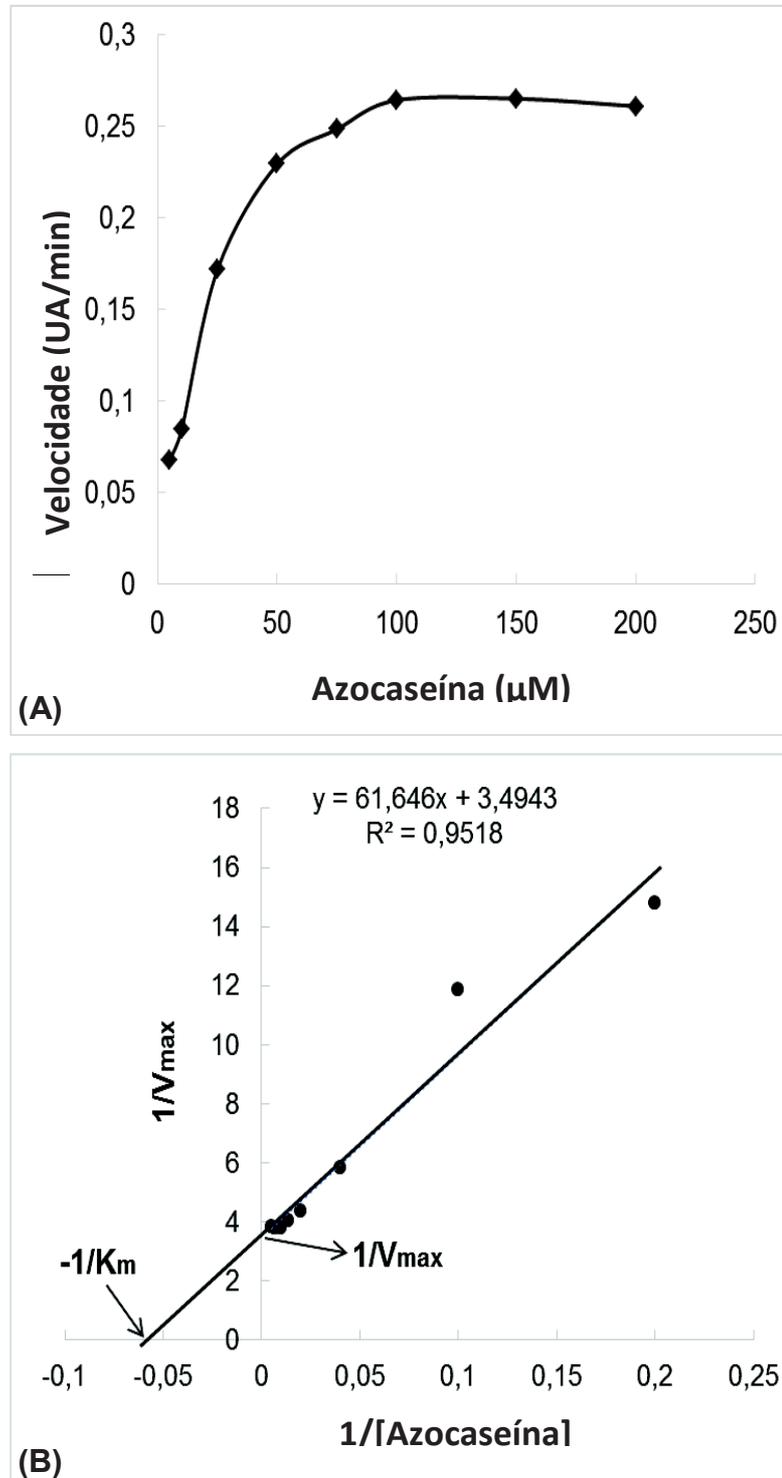
Fonte: Elaborada pelo autor. Cada ponto é referente a média de três experimentos (n=3) com as barras de erros indicando o desvio padrão. O ensaio foi realizado utilizando azocaseína, em pH 6,0.

Figura 17 – Efeito de inibidores específicos na atividade proteolítica da peruvianina-I.



Fonte: Elaborada pelo autor. Cada ponto é referente a média de três experimentos (n=3) com as barras de erros indicando o desvio padrão. O ensaio foi realizado utilizando azocaseína em pH 6,0.

Figura 18 - Cinética enzimática da peruvianina-I sob diferentes concentrações de azocaseína. **(A)** Gráfico de Michaelis-Menten; **(B)** Gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk.



Fonte: Elaborada pelo autor. Os ensaios foram realizados em pH 6,0, a 37 °C.

Tabela 5 – Características da peruvianina-I e outras peptidases cisteínicas de fluidos laticíferos.

Peptidase	Espécie	Peso Molecular (Da)	Ponto Isoelétrico (pI)	pH Ótimo	Temperatura Ótima	K _m (Substrato)	Referência
Peruvianina-I	<i>Thevetia peruviana</i>	20,500 (Monômero)	5,18	5,0-6,0	25-45 °C	17 µM (Azocaseína)	Presente estudo
Ervatamina A	<i>Ervatamia coronaria</i>	27,600 (Monômero)	8,3	8,0-8,5	50-55 °C	11 µM (Azoalbumina)	Nallamsetty <i>et al.</i> , 2003
Ervatamina B	<i>Ervatamia coronaria</i>	26,000 (Monômero)	9,3	6,0-6,5	50-55 °C	25 µM (Azoalbumina)	Kundu <i>et al.</i> , 2000
Ervatamina C	<i>Ervatamia coronaria</i>	23,000 (Monômero)	9,5	7,5-8,0	50 °C	9 µM (Azoalbumina)	Sundd <i>et al.</i> , 1998
Proceraina	<i>Calotropis procera</i>	28,800 (Monômero)	9.3	7,0-9,0	55-60°C	22 µM (azoalbumina)	Dubey and Jagannadham., 2003
Proceraina B	<i>Calotropis procera</i>	25,700 (Monômero)	9.5	6,5-8,5	40-60°C	31µM (azocaseína)	Singh <i>et al.</i> , 2010

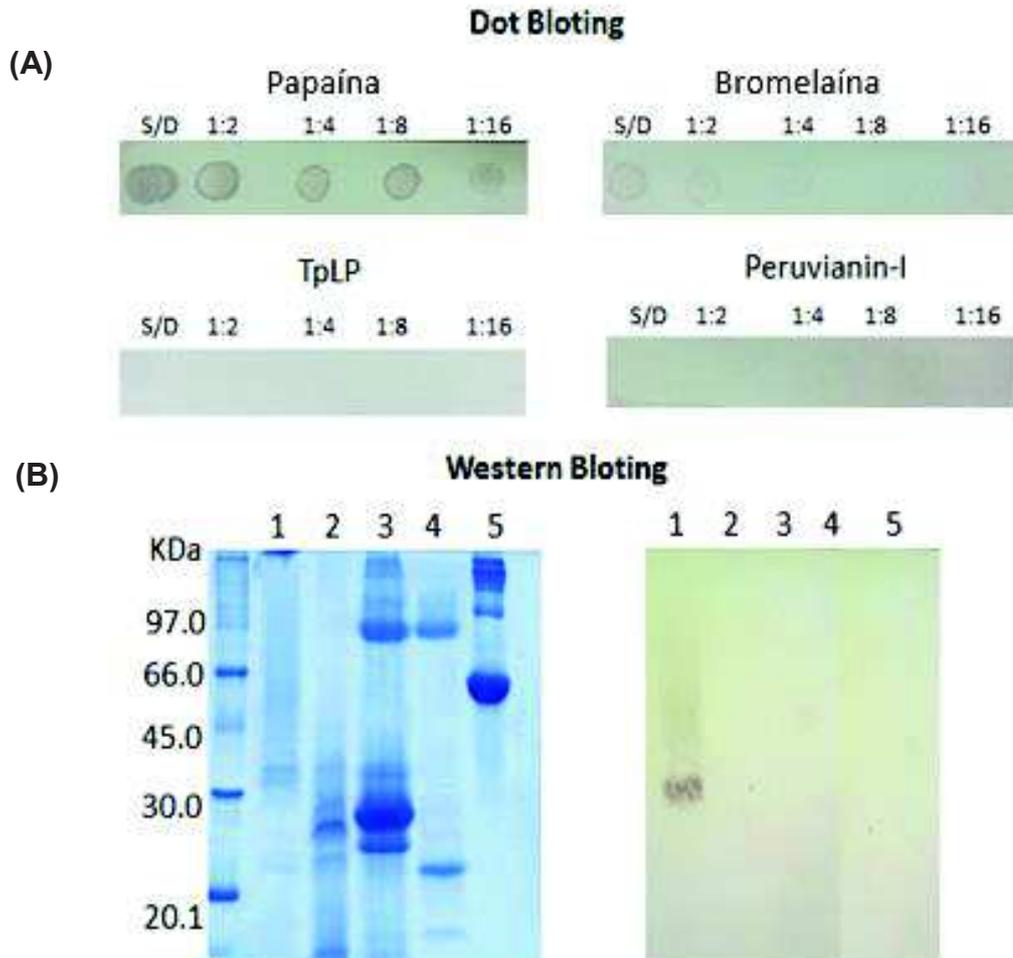
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Análises estruturais da peruvianina-I

Os imunoenaios foram realizados no intuito de verificar a similaridade antigênica entre peruvianina-I e papaína, que representa outra peptidase cisteínica de látex. Como esperado, os anticorpos anti-papaína reconheceram a papaína através de Dot blot. Não houve reação cruzada dos anticorpos anti-papaína com proteínas da fração TpLP, peruvianin-I, nem com a bromelaína, peptidase cisteínica do abacaxi (*Ananas comosus*) (FIGURA 19 A). No ensaio de Western blot, utilizando as mesmas amostras citadas acima, nenhuma banda proteica foi reconhecida pelos anticorpos anti-papaína (FIGURA 19 B).

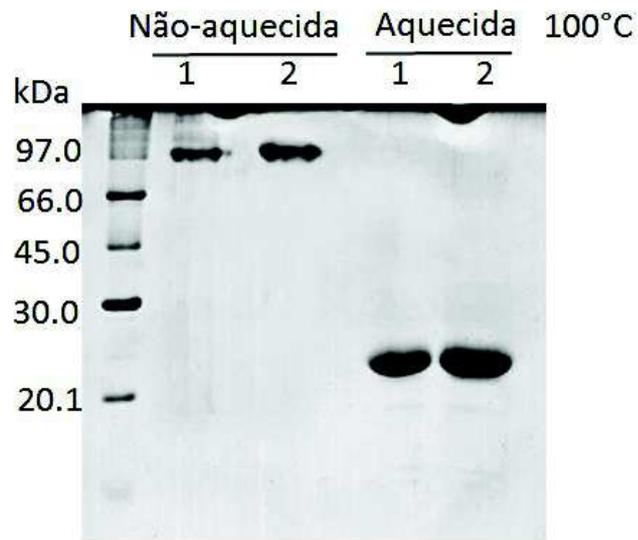
Quando submetida à eletroforese unidimensional, sem aquecimento prévio e na presença de SDS ou de SDS e beta-mercaptoetanol, a peptidase peruvianina-I apresentou apenas uma banda, referente a uma massa molecular estimada em 100 kDa. No entanto, quando foi exposta a 100 °C, durante 10 min, e tratada ou não com o agente redutor beta-mercaptoetanol, a peptidase foi fragmentada em uma única banda em torno de 22 kDa (FIGURA 20). Fato esse confirmado mediante análises por espectrometria de massas, onde foi observado pico com massa molecular de 20.522 Da (FIGURA 21 A).

Figura 19 - Análise de epítomos criogênicos comuns por Dot Blot e Western Blot entre peruvianina-I e papaína, utilizando anticorpos anti-papaína.



Fonte: Elaborada pelo autor. **(A)** No ensaio Dot Blotting foram adicionados 10 μ L das amostras, 1mg/mL, em diferentes diluições. **(B)** Eletroforese unidimensional (12,5%) sem beta-mercaptoetanol e Western Blotting. 1: Papaína; 2: Bromelaína; 3: Proteínas do látex de *T. peruviana* (TpLP); 4: peruvianina-I; 5: BSA. Foram adicionados 40 μ g de proteína. As membranas foram sondadas com anticorpos policlonais anti-papaína, em uma diluição 1: 5.000 e anti IgG de coelho produzido em cabra, marcado com fosfatase alcalina, como anticorpo secundário, diluição 1: 10.000.

Figura 20 - Eletroforese 12,5%. Peruvianina-I previamente aquecida a 100 °C por 10 min na presença de SDS (1) ou (2) SDS e beta-mercaptoetanol.



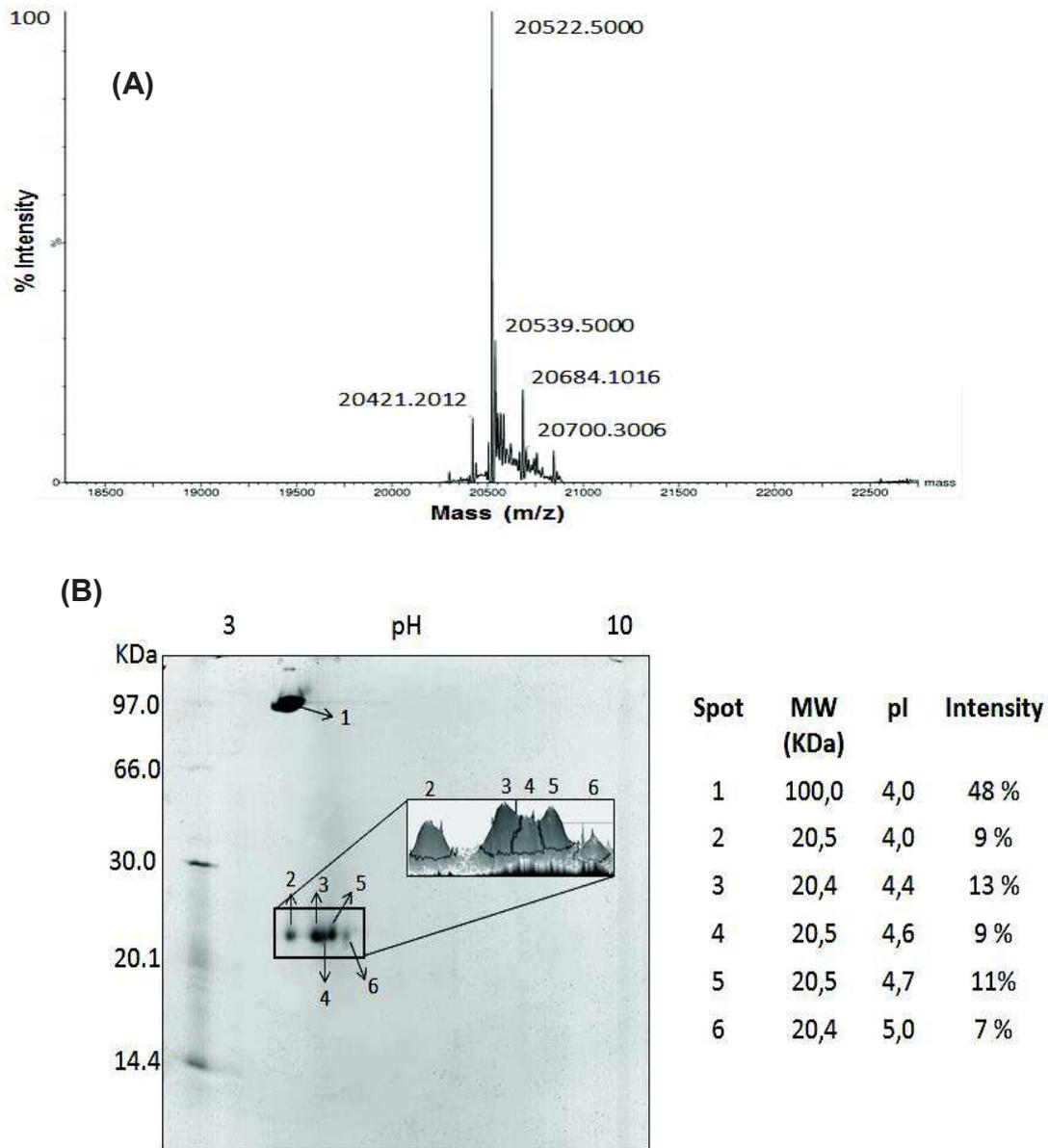
Fonte: Elaborada pelo autor. As proteínas foram visualizadas mediante a coloração com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-350. Foram adicionados 5 µg de proteína em cada poço.

A Figura 21 B mostra uma eletroforese bidimensional, que foi realizada no intuito de buscar características adicionais pertencentes a peptidase purificada, como a presença de isoformas ou subunidades proteicas. Foram visualizados 6 diferentes “spots”: um spot principal representando a peptidase íntegra e cinco spots com massas moleculares muito próximas, em torno de 20 kDa. Diante destes dados, podemos deduzir que a peruvianina-I pode ser representada como uma estrutura homopentamérica. As diferenças em pontos isoelétricos e massas moleculares entre as subunidades podem ser devido a pequenas modificações pós-traducionais, desde que peruvianin-I é uma glicoproteína. Esses resultados também estão de acordo com aqueles de espectrometria de massas, onde cinco picos de massas moleculares muito próximos foram detectados.

A Análise por microscopia de força atômica atômica (AFM) foi realizada no intuito de caracterizar, parcialmente, a estrutura da peruvianina-I em condições nativas. As imagens da AFM provenientes de uma análise topográfica em alta resolução apontaram uma possível organização hexamérica da proteína, disposta como um trímero de dímeros (FIGURA 22).

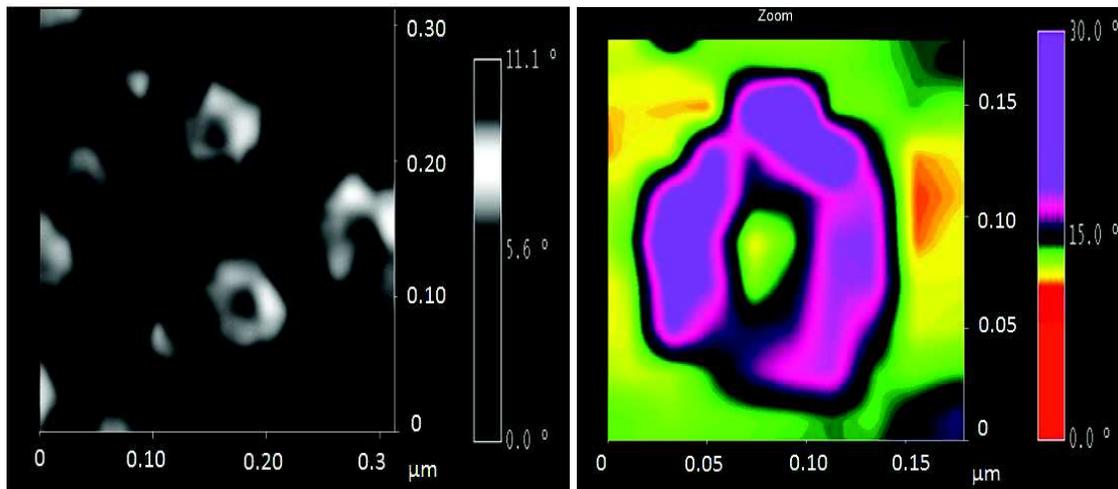
De acordo com os resultados da cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna de Superose 12 HR, a massa molecular da peruvianin-I, em condições nativas, foi estimada em 116 kDa (FIGURA 23).

Figura 21 – (A) Espectro de massas por ESI-QUAD-TOF da peruvianin-I sem agente redutor. **(B)** 2D-SDS-PAGE (12.5%) da peruvianina-I, evidenciando a visão tridimensional dos spots 2-6.



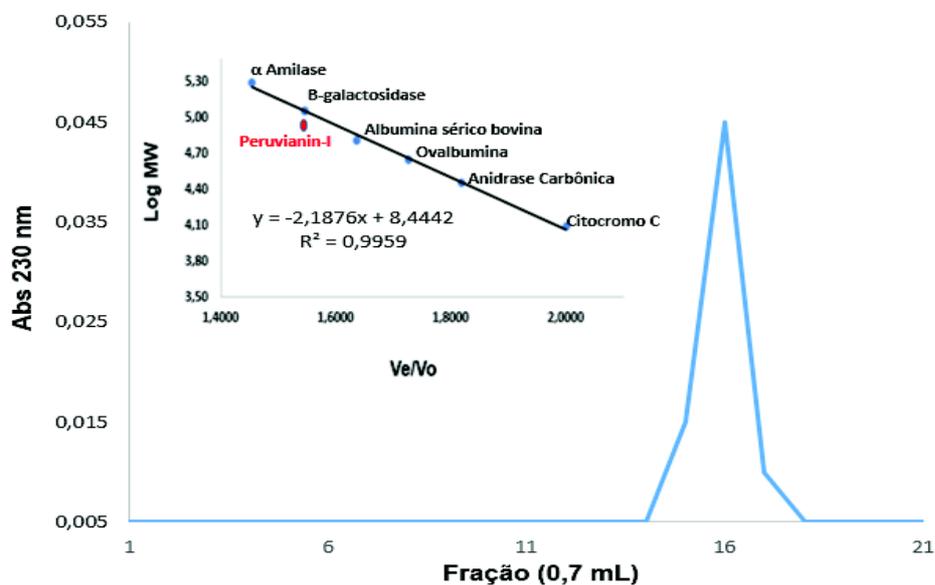
Fonte: Elaborada pelo autor. As massas moleculares (MW), pontos isoelétricos (pI) e a intensidade dos spots 1-6 foram estimados usando o Software Image Master 2D Platinum 6.0 (Amersham Biosciences). As proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-350 0,1 %. 100 µg de proteína foram aplicados na fita (pH 3-10).

Figura 22 – Análise estrutural da peruvianina-I por microscopia de força atômica (AFM) em duas escalas diferentes



Fonte: Elaborada pelo autor. A organização estrutural da proteína forma um trímero de dímeros.

Figura 23 – Determinação da massa molecular da peruvianin-I por filtração em gel em coluna de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC



Fonte: Elaborada pelo autor. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0, contendo NaCl 0,15M. Fluxo: 0,35 mL/min; Frações: 0,7 mL/tubo. A coluna foi calibrada com os seguintes marcadores moleculares: β -Amilase (200 kDa), β -Galactosidase (116 kDa); albumina sérica bovina (66 kDa); ovalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (29 kDa); citocromo C (12 kDa).

5.6 Características de proteínas do tipo germina (GLPs) presentes na peruvianina-I

Conforme mostra a Tabela 5, a sequência N-terminal da peruvianina-I, quando submetida a um alinhamento comparativo entre sequências de aminoácidos de outras proteínas vegetais, exibiu alta identidade (66 %) com proteínas similares à germina (GLPs). Outras características compartilhadas entre a peruvianina-I e GLPs são descritas na tabela 6.

As “germinas verdadeiras” destacam-se por apresentar atividades enzimáticas do tipo oxalato oxidase (OxO). Desta forma, esta atividade foi investigada em folhas de *T. peruviana* (*in situ*), na fração TpLP e peruvianin-I. No ensaio *in situ*, não foi observado atividade de oxalato oxidase, tendo em vista que as manchas azuis que indicam a formação de peróxido de hidrogênio só estiveram presentes na folha de arroz, que são reconhecidas por conter germinas (FIGURA 24). A fração TpLP e peruvianin-I também não exibiram atividade de OxO tanto em membranas de nitrocelulose, quanto nos ensaios *in vitro*.

Proteínas similares a germinas (GLPs) geralmente não apresentam atividade oxalato oxidase. Contudo, elas podem apresentar outros tipos de atividades enzimáticas, tais como superóxido dismutase (SOD). Em vista disto, ensaios colorimétricos foram realizados para avaliar a atividade superóxido dismutase na fração TpLP e na proteína purificada peruvianina-I. Apenas a fração TpLP exibiu atividade *in vitro* (0,045 UA/mgProteína), que foi considerada fraca quando comparada com as frações proteicas dos látices de *C. grandiflora* (1,1 UA/mgProteína) e *Plumeria rubra* (10,7 UA/mgProteína).

Tabela 6 – Sequência de aminoácidos N-terminal da peruvianina-I, do látex de *T. peruviana*, comparada com sequências de proteínas de outras plantas.

Identificação	Espécie	Sequência	Acesso (NCBI)	Identidade %	E-Value
Peptidase (Peruvianin-I)	<i>Thevetia peruviana</i>	1-ADPGPLQDFCLADLNSPLFINGYPCRNPALAISDDF-36	-	-	-
Germin-like protein	<i>Oryza sativa</i>	25-SDPSPLQDFCVADLNSPVRVNGFVCKNPMNASADDF-60	ABS44860.1	64%	5e ⁻⁰⁸
Germin-like protein	<i>Aegilops tauschii</i>	24-SDPSPLQDFCVADMNSPVRVNGFVCKNPMNEVNADDF-59	EMT00501.1	58%	9e ⁻⁰⁸
Germin-like protein	<i>Triticum urartu</i>	23-SDPGPLQDFCVADMQSPVRVNGFVCKNPMNEVNADDF-58	EMS56245.1	58%	2e ⁻⁰⁷
Germin-like protein	<i>Theobroma cacao</i>	24--DPDPLQDFCVADAKSPFFLNGAPCLNPSLALSSHFF-58	XP_007044465.1	66%	2e ⁻⁰⁷
Germin-like protein	<i>Triticum aestivum</i>	24-SDPSPLQDFCVADMNSPVRVNGFVCKNPMNEVNADDF-59	CAB55559.1	58%	3e ⁻⁰⁷

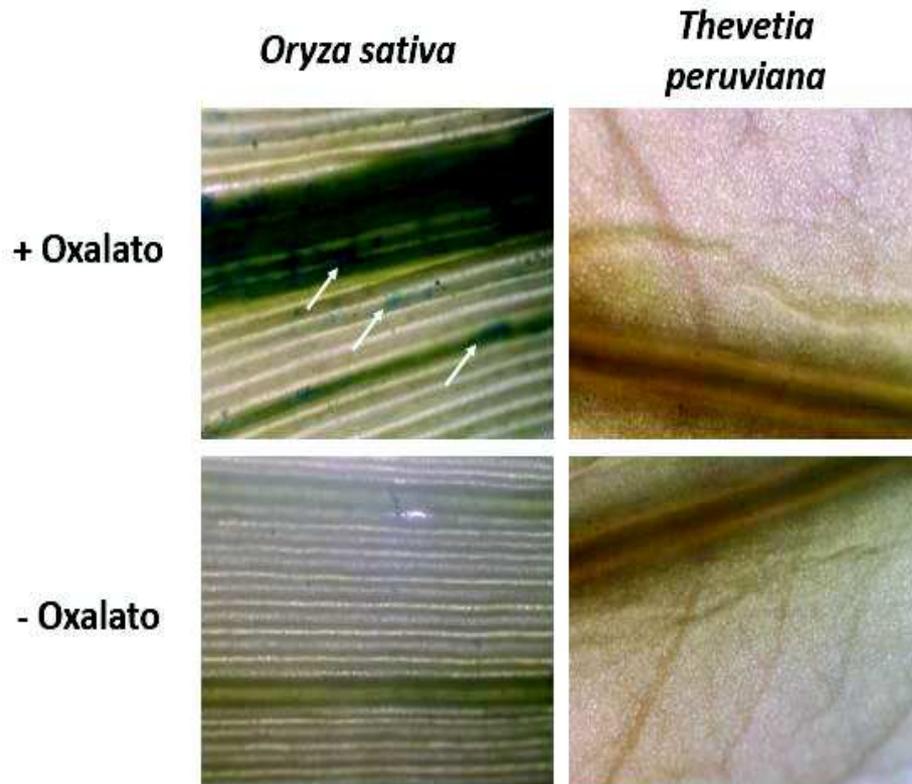
Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 7 – Características predominantes de algumas Germinas e proteínas similares a germina (GLPs)

Proteína (ID)	Espécie	Estrutura	Unidades (kDa)	Ponto isoelétrico(pI)	Glicosilação	Tecido	Atividade de oxalato oxidase	Referências
Peruvianina-I	<i>Thevetia peruviana</i>	Hexâmero	20,500	4,0	Sim	Látex	Não	Presente estudo
Proteína germin-like (P92996)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hexâmero	23,925	6,5	Sim	Caules e embriões em desenvolvimento	Não	Membre <i>et al.</i> , 1997
Proteína germin-like (P45853)	<i>Ipomoea nil</i>	Hexâmero	22,608	7,6	?	Cotilédones e folhas	?	Ono <i>et al.</i> , 1996
Germina (P45850)	<i>Hordeum vulgare</i>	Hexâmero	21,203	5,5	Sim	Raíz de mudas	Sim	Lane <i>et al.</i> , 1993
Germina (P45851)	<i>Hordeum vulgare</i>	Hexâmero	23,479	6,0	Sim	Raíz	Sim	Hurkman <i>et al.</i> , 1994

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 - Localização in situ da atividade oxalato oxidase em folhas de *Thevetia peruviana*.



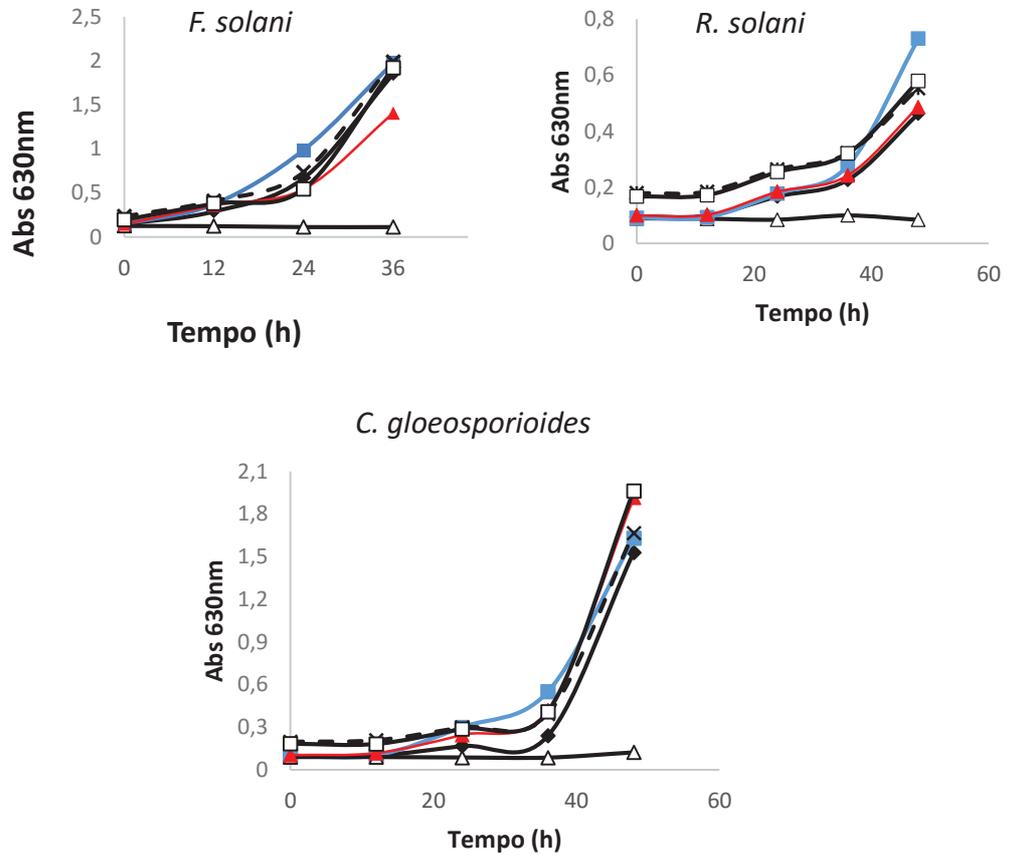
Fonte: Elaborada pelo autor. Presença (+) e ausência (-) de oxalato. As folhas foram incubadas por 2 h na solução de ativação. Os pontos azuis, indicados pelas setas, evidenciam a presença da atividade. Folhas de *Oryza sativa* foram utilizadas como controle positivo. As análises foram realizadas em um microscópio de luz (aumento 40x).

5.7 Ensaio Biológicos

As frações provenientes da folha com látex e folha sem látex de *T. peruviana* e TpLP não foram capazes de inibir o crescimento das espécies *C. gloeosporioides*, *R. solani* e *F. solani*, em quaisquer das concentrações testadas (FIGURA 25).

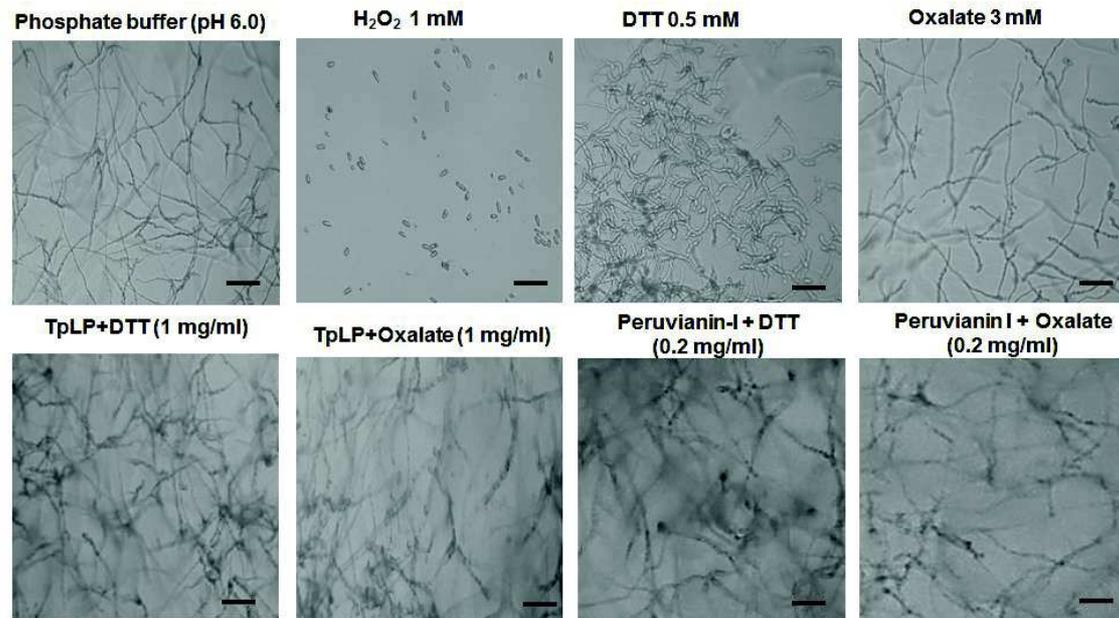
Assim como TpLP e peruvianina-I não inibiu a germinação dos esporos de *F. solani*, mesmo com a presença de DTT, um ativador de proteases cisteínicas (FIGURA 26). Do mesmo modo, a atividade antifúngica de TpLP e peruvianina-I foi avaliada, adicionando-se oxalato, substrato utilizado por oxalato oxidases, ou germinas, na produção de peróxido de hidrogênio. Todavia, nenhuma atividade inibitória sobre a germinação dos esporos fúngicos foi detectada (FIGURA 26).

Figura 25 – Efeito inibitório de frações proteicas da espécie *Thevetia peruviana* sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos.



Fonte: Elaborada pelo autor. (▲) Proteínas do látex (TpLP); (■) BSA; (×) Folha com látex; (□) Folha sem látex; (♦) Controle (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0); (Δ) Peróxido de hidrogênio (200 mM). As amostras foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), em uma concentração de 5 mg/mL.

Figura 26 - Efeito de TpLP e peruvianina-I na germinação dos esporos de *F. solani*



Fonte: Elaborada pelo autor. As amostras foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 6,0), contendo DTT 0,5 mM ou oxalato 3 mM. Depois de 24 horas a 27 °C os resultados foram investigados a partir da utilização de um microscópio óptico. Barras: 50 µm.

6 DISCUSSÃO

O látex vegetal tem sido amplamente estudado nos últimos anos. Diversos trabalhos evidenciam a variedade de compostos químicos presente neste fluido, bem como caracterizam aspectos ecológicos, morfológicos, fisiológicos e evolutivos de plantas detentoras de laticíferos (AGRAWAL; KONNO, 2009; DOMSALLA; MELZIG, 2008). Outros estudos destacam-se pela abordagem das propriedades alergênicas do látex e suas manifestações clínicas (HAMILTON, 2002; SUSSMAN *et al.*, 2002). De certa forma, a possibilidade de aplicação industrial dos compostos derivados do látex, como a borracha, potencializou a prospecção de suas biomoléculas (PALOSUO, 2014).

O estudo de biomoléculas isoladas provenientes de látex vem ganhando destaque, principalmente tratando-se do papel defensivo destas contra invasores e predadores (KONNO, 2011). Alguns trabalhos já evidenciam a presença de enzimas proteolíticas em látex, assim como seus efeitos sobre o desenvolvimento de insetos (FREITAS *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2007). Recentemente, Ramos e colaboradores (2014) isolaram uma peptidase do tipo cisteínica, denominada Cg24-I, da espécie *Cryptostegia grandiflora*, que atua na inibição de esporos fúngicos. Apesar do grande número de PR-proteínas descritas, a presença de enzimas germina ou germin-like, PR-15 e PR-16, respectivamente, ainda não foi relatada em fluidos laticíferos.

Algumas espécies, como *C. procera*, *C. grandiflora*, *P. rubra* e *E. tirucalli* foram reportadas na literatura acerca do perfil proteico de seus látices (FREITAS *et al.*, 2010, 2007b). No entanto, pouco já se foi exposto sobre o látex da espécie *T. peruviana*. O que está descrito na literatura, referente a esta espécie, restringe-se principalmente aos aspectos toxicológicos provindos de sua folha e fruto. Em vista disso, o presente trabalho teve como foco avaliar aspectos bioquímicos da fração proteica do látex de *T. peruviana*.

Baseado no método de fracionamento proposto por Freitas e colaboradores (2007), o látex de *T. peruviana* foi separado, de forma eficiente, em um fração solúvel e outra insolúvel em água. Esta última correspondeu a borracha, a fração de maior quantidade, representando cerca de 97 % da massa seca do látex. Resultados similares, em termos de porcentagem de borracha, foram encontrados em fluidos laticíferos de outras espécies, tais como *C. procera* (82 %), *C. grandiflora* (96 %) e *P. rubra* (82 %) (FREITAS *et al.*, 2010, 2007).

Mais de 2.500 espécies de plantas são reconhecidamente produtoras de látex. Dentre estas, a espécie *Hevea brasiliensis* é a mais estudada, uma vez que sua borracha é amplamente utilizada na elaboração de diversos produtos (CORNISH, 2001). Alguns trabalhos associam o envolvimento da borracha na defesa vegetal, posto que, após sofrer injúrias mecânicas, o látex é exudado e em contato com o ar forma um coágulo que pode aprisionar pequenos insetos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). Além de exibir proteção contra danos mecânicos, a borracha pode repelir insetos e apresentar efeito tóxico sobre mamíferos (RAMOS *et al.*, 2011).

O teor de proteínas solúveis presente no látex de *Thevetia peruviana* foi estimado em 380 µg/mL. O teor de proteínas é bastante diversificado em fluidos laticíferos. Em alguns látices, como de *E. tirucalli*, não foram detectadas proteína (FREITAS *et al.*, 2007). Por outro lado, estas moléculas podem estar presentes em menores quantidades, como no caso de *C. grandiflora* (260 µg/mL) e *P. rubra* (330 µg/mL), ou em altas concentrações, tais como *C. procera* (8,5 mg/mL) e *Hevea brasiliensis* (7,0 mg/mL) (FREITAS *et al.*, 2010, 2007; WANG *et al.*, 2010).

O látex de *T. peruviana* contém, principalmente, proteínas com massas moleculares em torno de 28 a 100 kDa. No entanto, uma nova banda proteica, de 23 kDa, aparece quando a amostra é aquecida e tratada com o agente redutor beta-mercaptoetanol. Este resultado sugere que a proteína de 100 kDa é um pentâmero. A eletroforese bidimensional exibiu 37 spots de proteínas com massas moleculares entre 20 a 100 kDa e valores de pI < 5,0. O perfil proteico entre os fluídos laticíferos é bastante diversificado. Em termos comparativos, 212 proteínas foram identificadas no látex de *Calotropis procera*, com massas moleculares de 10 a 113 kDa, e pI variando de 3 a 10; em *P. rubra* foram identificadas 118 proteínas (12 a 117 kDa, pI < 6,5); *C. grandiflora* 196 proteínas (10 a 75 kDa, pI 3-10); *Hevea brasiliensis* 1358 proteínas (10 a 94 kDa, pI 4-7); *Papaver somniferum* 300 proteínas (10 a 100 kDa, pI 4-7); *Taraxacum brevicorniculatum* 582 proteínas (10 a 150 kDa, pI 4-7) (DECKER *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2010, 2007; WAHLER *et al.*, 2012).

Um total de 33 proteínas foram identificadas por espectrometria de massas. Dentre as proteínas detectadas, podemos citar inibidores de peptidases (1), peptidases cisteínicas (20), osmotinas (1), peroxidases (4), fosfotransferases (1) e proteínas de reserva (5). Vale salientar que, 86 % das proteínas analisadas foram identificadas, fato este interessante, uma vez que o conhecimento proteômico sobre a espécie *T. peruviana* é bastante escasso. Apenas nove sequências de proteínas

desta planta são disponibilizadas na literatura, até então. Através de uma pesquisa no banco de dados do NCBI ou UniProt foi constatado que estas proteínas estão envolvidas no metabolismo primário da planta, tendo como exemplos a RuBisCO (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase e NADH desidrogenase. Nenhuma informação sobre ESTs, genes ou genoma foi encontrada no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) relacionados à espécie *T. peruviana*. No nosso trabalho, as identificações proteicas foram alcançadas porque os espectros de massas experimentais, obtidos pela fragmentação dos peptídios trípticos, apresentaram alta similaridade com os espectros teóricos gerados a partir de sequências proteicas de plantas do NCBI.

Embora outros trabalhos relacionados a proteômica de látex destaquem a grande quantidade de proteínas identificadas, como nas espécies *Taraxacum brevicorniculatum* (278 proteínas) e *Lactuca sativa* (587 proteínas), a quase totalidade destas proteínas estão envolvidas em processos metabólicos primários, incluindo a biossíntese de borracha, glicólise, assimilação de nitrogênio, síntese de ácidos graxos e proteólise mediada por ubiquitina. Desta forma, essas proteínas laticíferas forneceram pouca evidência direta sobre o seu envolvimento na defesa contra insetos ou microorganismos (CHO *et al.*, 2009; WAHLER *et al.*, 2012b).

No presente estudo, a maioria das proteínas que identificadas (27 proteínas) pertence ao grupo das PR-proteínas (proteínas relacionadas à patogênese). Estas proteínas estão atualmente distribuídas em 17 famílias, dentre as quais podemos citar a PR-5, que inclui as osmotinas ou “*thaumatin-like proteins*”; PR-6, inibidores de peptidase; PR-7, peptidases e PR-9, peroxidases (van LOON *et al.*, 2006). Estas proteínas têm sido encontradas em vários fluidos laticíferos (AGRAWAL; KONNO, 2009). Assim, os nossos resultados corroboram com a hipótese de que látices estão envolvidos na defesa vegetal. Interessante foi a identificação de cinco proteínas de armazenamento no látex de *T. peruviana*, uma vez que os fluidos laticíferos têm sido retratados na defesa e não como um meio de estocagem proteica. Neste contexto, já se foi relatado que o látex de *H. brasiliensis* é relativamente rico em sacarose (1-50 mM), assim como amiloplastos foram encontrados em algumas espécies do gênero *Euphorbia* (KEKWICK, 2001). Diante desses resultados, uma nova discussão pode ser proposta acerca do papel de armazenamento proteico ou glicídico, que os laticíferos pode desempenhar. É importante salientar que alguns trabalhos retratam a atuação destas proteínas de armazenamento “*storage proteins*”

como moléculas detentoras de uma promissora atividade anti-microbiana frente a diversos agentes patogênicos. Uma vez que se acumulam na célula, em vacúolos de armazenamento, estas proteínas, em resposta a determinados sinais, podem ser utilizadas por diferentes tecidos da planta, como reflexo ao ataque de patógenos (CÂNDIDO *et al.*, 2011; YOULE; HUANG, 1981).

Várias isoformas de peptidases cisteínicas, com diversificadas massas moleculares e valores de pI, foram identificadas no látex de *T. peruviana*. Mais de 100 diferentes fluidos laticíferos são reconhecidos por conter pelo menos uma peptidase em sua composição, e essas biomoléculas constituem as principais enzimas endógenas presentes nesses fluidos (DOMSALLA; MELZIG, 2008). Destas proteínas, a papaína, protease cisteínica do látex de *Carica papaya*, é a mais conhecida e profundamente estudada. Além da papaína, outras três peptidases cisteínas estão presentes no látex de *C. papaya* (CHO *et al.*, 2009). Similarmente, espécies como *C. candamarcensis*, *C. procera*, *C. grandiflora* e *Ficus carica* exibem múltiplas peptidases cisteínicas em seus látices (RAMOS *et al.*, 2014, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2008; ZARE *et al.*, 2013). Em *F. carica*, 90 % de todas as proteínas do látex são peptidases cisteínicas. Toda esta variedade de peptidases em látex não está relacionada com processos de auto-hidrólise de uma ou mais peptidases ou de modificações pós-traducionais, uma vez que estas exibem grandes diferenças em suas estruturas (massas moleculares e pontos isoelétricos), assim como especificidades a diferentes substratos e distintas condições de pH e temperatura ótima de atuação (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

Os resultados obtidos a partir dos ensaios proteolíticos evidenciam a riqueza de peptidases no látex de *T. Peruviana* (TpLP). A proteólise na presença de azocaseína foi mais intensa entre pH 5,0-6,0. No entanto, quando a fração TpLP foi incubada com o agente redutor DTT, em baixas concentrações, houve um aumento considerável de sua atividade. De forma contrária, esta atividade foi diminuída, quando as proteínas foram submetidas a altas concentrações de DTT, o que pode estar relacionado a uma desnaturação proteica, devido ao rompimento de pontes dissulfeto intramoleculares. A ativação através de agentes redutores, como DTT, L-cisteína, glutatona reduzida e 2-mercaptoetanol, indicam que as enzimas afetadas pertencem a classe de peptidases cisteínicas (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003). A partir desses resultados, foi realizado um ensaio proteolítico, específico para essa classe de peptidases, utilizando BANA como substrato, o qual mostrou um aumento

da atividade específica. Nos ensaios de inibição, apenas E-64 e iodoacetamida, ambos inibidores de peptidases cisteínicas, foram capazes de inibir a atividade proteolítica. Todos estes resultados apontam para a presença de peptidases cisteínicas no látex de *T. peruviana*. A ausência de inibição da proteólise por pepstatina e EDTA indicam a ausência de peptidases aspárticas e metalopeptidase, respectivamente, em TpLP. Essas duas classes de peptidases raramente são encontradas em fluidos laticíferos. Apenas uma metalopeptidase, purificada do látex de *Euphorbia cotinifolia*, denominada cotinifolin, foi descrita na literatura (KUMAR *et al.*, 2011). Da mesma forma, uma única peptidase aspártica foi descrita ocorrendo no látex de *Ficus racemos* (DEVARAJ *et al.*, 2008).

As peptidases do látex de *T. peruviana* mostraram-se relativamente resistentes frente a diferentes temperaturas. A atividade proteolítica máxima foi alcançada a 45 °C, caindo progressivamente até 60 °C, onde cerca de 50 % da atividade total ainda foi mantida. A maioria das proteases cisteínicas presentes em fluidos laticíferos apresenta temperaturas ótimas de atividade em torno de 60 a 85 °C. Porém, peptidases cisteínicas como a ervatamina-A desempenham uma melhor atividade a 40 °C. (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

A proteína purificada através da cromatografia em filtração em gel foi denominada peruvianina-I. Esta foi caracterizada bioquimicamente mediante a realização de diferentes ensaios. A análise proteolítica da peruvianina-I mostrou que a mesma tem a capacidade de hidrolisar azocaseína e BANA, mas não o substrato BApNA. Azocaseína é um substrato inespecífico, por tanto todas as peptidases têm a capacidade de clivar esta molécula, no entanto, BANA e BApNA são usados como substratos específicos para proteases cisteínicas e serínicas, respectivamente (FREITAS *et al.*, 2010, 2007b). No entanto, alguns trabalhos reportam que peptidases cisteínicas também podem hidrolizar o BApNA (RAMOS *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2008). A faixa ótima de pH para a hidrólise de azocaseína e BANA, pela peruvianina-I, foi de 5,0-6,0. Apenas E-64 e IAA, ambos inibidores específicos de peptidases cisteínicas, foram capazes de inibir a atividade proteolítica, o que evidencia que a peruvianina-I é uma peptidase do tipo cisteínica.

Os imunoenaios realizados evidenciaram que não houve reação cruzada dos anticorpos antiperuvianina com a peruvianina-I. Alguns estudos têm demonstrado que os anticorpos anti-peptidases cisteínicas do látex são extremamente específicos, não desenvolvendo reações cruzadas até mesmo com peptidases do próprio látex. Por

exemplo, o anti-soro contra ervatamin-A não reconheceu ervatamina-B e ervatamina-C, que são outras duas peptidases cisteínicas pertencentes ao látex de *Ervatamia coronaria* (KUNDU *et al.*, 2000). Resultados similares foram encontrados para proceraina e proceraina-B, duas peptidases cisteínicas do látex de *C. procera* (SINGH *et al.*, 2010).

A partir de uma eletroforese unidimensional foi estimado que a peruvianina-I apresenta uma massa molecular de 100 kDa. No entanto, esta banda proteica, de alta massa molecular, se fragmenta em bandas de 22 kDa quando é aquecida na presença de SDS, independente da presença de agente redutor. Resultado que evidencia que peruvianina-I é uma proteína homopentamérica. A maioria das peptidases cisteínicas de látex é monomérica e apresenta massa molecular em torno de 20 a 30 kDa. Porém, quando se trata de peptidases serínicas, as massas moleculares podem variar de 30 a 117 kDa (DOMSALLA; MELZIG, 2008). Assim, o nosso trabalho é o primeiro a relatar uma peptidase cisteínica oligomérica, de alta massa molecular, em fluidos laticíferos.

Analisando a eletroforese bidimensional da peruvianina-I, foi possível observar a presença de pelo menos cinco spots proteicos com massas moleculares e pI bastante similares. Estes resultados inferem que a peruvianina-I apresenta uma estrutura pentamérica, formada a partir da associação de cinco monômeros com massas moleculares equivalentes. Estas pequenas diferenças nos valores de massa molecular e pI dos monômeros devem estar relacionadas com a quantidade de carboidratos presente em cada um destes, uma vez que a peruvianina-I é uma glicoproteína.

A maioria das estruturas proteicas reportadas no PDB (Protein Data Bank - <http://www.rcsb.org/pdb/home>) foi determinada por métodos cristalográficos. No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, como o fato de trabalhar, necessariamente, com sistemas cristalinos, o que restringe, principalmente, a análise de proteínas oligoméricas ou glicoproteínas (DAVIS; CRISPIN, 2011). Por outro lado, a microscopia de força atômica (AFM) é uma poderosa técnica com escala de resolução nanométrica que permite a análise estrutural de moléculas em solução e condições nativas (MÜLLER *et al.*, 2002). Hoje, a técnica de AFM é rotineiramente utilizada com uma nano ferramenta para inúmeras análises, tais como a localização de moléculas específicas, visualização de proteínas de membrana na bicamada lipídica e determinação de estruturas proteicas (PILLET *et al.*, 2014; RICO *et al.*,

2013). As imagens provenientes desta técnica mostraram uma possível formação estrutural hexamérica da peruvianina-I, estando ela organizada como um trímero de dímeros formando um canal central. Análises estruturais por cristalografia de raios-X demonstraram que as germinas do trigo e cevada são homohexâmeros, organizados como um trímero de dímeros formando um canal central, o que é bastante semelhante à estrutura relatada para a peruvianina-I. As interações entre estes dímeros são principalmente hidrofóbicas, envolvendo aminoácidos alifáticos de superfície, os quais são responsáveis pela alta estabilidade da germina (WOO *et al.*, 2000). Outra característica compartilhada entre peruvianin-I e as germinas e GLPs é o fato de serem glicoproteínas ácidas (pI 4,0).

Considerando os resultados obtidos pela eletroforese bidimensional, a peruvianina-I mostrou ser uma proteína pentamérica. Para tanto, a cromatografia de filtração em gel em matriz Superose 12 HR 10/30 revelou que a mesma apresenta um massa molecular de 116 kDa. Diante desta informação e das análises provenientes da microscopia de força atômica é cabível afirmar que a peruvianina-I é uma proteína homohexamérica formada pela união de seis monômeros com massas individuais de 20 kDa. Estes resultados estão coerentes com alguns já obtidos para o grupo das GLPs, onde as massas moleculares encontram-se em uma faixa de 100-120 kDa para as proteínas intactas e 20-22 kDa para os monômeros (CHENG *et al.*, 2014; JAIKARAN *et al.*, 1990).

A sequência de aminoácidos N-terminal de peruvianina-I mostrou alta similaridade às GLPs. Germinas são glicoproteínas que foram, inicialmente, detectadas durante a germinação de embriões do trigo (GRZELCZAK; LANE, 1984). Genes que codificam esta proteína têm sido identificados em vários tecidos vegetais, incluindo folhas, flores, sementes e raiz, porém, nenhum destes foi relatado em látices (BERNIER; BERNA, 2001; DAVIDSON *et al.*, 2009). As germinas “verdadeiras” são conhecidas por apresentarem atividade enzimática oxalato oxidase, que catalisa a formação de 1 mol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 2 moles de gás carbônico (CO₂), a partir de 1 mol de oxalato e oxigênio (O₂) (BERNIER; BERNA, 2001). Embora o oxalato possa estar presente em pequenas quantidades nas plantas, ele pode ser formado a partir do ácido-L-ascórbico, que é encontrado em altas concentrações (KEATES *et al.*, 2000). O processo de fortalecimento da parede celular e algumas reações de defesa vegetal são dependentes de enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SCHELER *et al.*, 2013). Diante destes fatores, as germinas ou

GLPs foram classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteins), pertencentes às famílias PR-15 e PR-16, respectivamente. Curiosamente, alguns fungos fitopatogênicos podem secretar quantidades elevadas de oxalato, constituindo um determinante crucial de patogenicidade. Assim, plantas capazes de degradar oxalato podem ser consideradas resistentes a esses patógenos (DONALDSON *et al.*, 2001).

As germinas “verdadeiras” fazem parte de um grupo bastante homogêneo, sendo encontradas apenas em cereais, apresentando, quase sempre, atividade oxalato oxidase (OxO). As GLPs, apesar de exibirem uma maior distribuição dentre as espécies, estão relacionadas à presença de atividade superóxido dismutase (SOD) (BERNIER; BERNA, 2001; DUNWELL *et al.*, 2008). Então, na tentativa de correlacionar peruvianina-I a estas proteínas, diferentes ensaios foram realizados no intuito de observar tais atividades enzimáticas (OxO e SOD) na peptidase purificada. Tanto a fração proteica do látex (TpLP) como peruvianin-I não apresentaram atividade oxalato oxidase. Resultados similares foram obtidos para três GLPs (germin-like proteins) de *Arabidopsis thaliana* (MEMBRÉ *et al.*, 2000). Da mesma forma, TpLP e peruvianina-I não exibiram atividade superóxido dismutase. Com isso, podemos inferir que a peruvianin-I não é uma germina com atividade proteolítica, mas sim uma peptidase cisteínica com características estruturais similares às germinas ou GLPs.

A atividade antifúngica de proteínas laticíferas tem sido constantemente relatada, o que reforça o papel dos látices na defesa vegetal (DOMSALLA; MELZIG, 2008). Essa atividade foi associada principalmente às peptidases cisteínicas (SOUZA *et al.*, 2011). No entanto, outras proteínas, como quitinases e osmotinas também apresentaram atividade antifúngica (FREITAS *et al.*, 2011; TAIRA *et al.*, 2005). As proteínas do látex de *T. peruviana* (TpLP) e peruvianin-I não apresentaram efeitos antifúngicos contra a espécie *Fusarium solani*, *Rhizoctania solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Outras peptidases, como tripsina, quimotripsina e peptidases do látex de *Plumeria rubra*, também não apresentaram atividade antifúngica (SOUZA *et al.*, 2011). A atividade de TpLP e peruvianina-I contra fungos foi também testada na presença de oxalato, porém, nenhuma ação antifúngica foi constatada, reforçando dessa forma a ausência de atividade oxalato oxidase nas amostras, uma vez que estas enzimas são capazes de produzir peróxido de hidrogênio, que por si só é um composto antifúngico.

Apesar dos ensaios mostrarem a ausência de atividade antifúngica de TpLP e peruvina-I, não se pode descartar a possibilidade destas atuarem sobre outras espécies fúngicas, visto que pode existir uma certa especificidade entre estas proteínas e os microrganismos que elas atuam. Isso pode ser exemplificado pelas proteínas do látex de *C. procera*, que apresentaram distintos valores de IC 50 para diferentes fungos (SOUSA *et al.*, 2011). Similarmente, a fração proteica de *C. grandiflora* apresentou diferentes graus de atividade sobre diferentes patógenos (RAMOS *et al.*, 2014). Em concordância com estes estudos, é importante salientar que as peptidases cisteínicas do tipo papaína têm sido reportadas quanto a sua atuação específica sobre extratos intestinais de insetos e nematóides (PECHAN *et al.*, 2000; SHINDO; VAN der HOORN, 2008).

Novos ensaios, utilizando outros agentes patogênicos, assim como diferentes insetos devem ser realizados a fim de avaliar a atuação das proteínas do látex de *T. peruviana* como moléculas de defesa. Peptidases laticíferas das espécies *Carica papaya* e *Ficus carica* foram reportadas como proteínas inseticidas (KONNO *et al.*, 2004). Similarmente, alguns trabalhos associaram GLPs à resistência vegetal frente a diferentes insetos (ARMSTRONG *et al.*, 2013; LOU; BALDWIN, 2006).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o látex de *T. peruviana* é constituído de várias proteínas de defesa, tais como peptidases, osmotinas, inibidores de peptidases e peroxidases. Além de PR-proteínas, cinco proteínas de reserva foram identificadas, retratando uma possível função de reserva proteica ao látex. As peptidases detectadas em TpLP são cisteínicas, com atividade ótima entre pH 5,0-6,0 e a 45 °C. Apesar de ser uma fração rica em peptidases e outras proteínas de defesa, a mesma não apresentou atividade antifúngica.

Peruvianina-I é uma peptidase cisteínica homohexamérica, glicosilada e com similaridades estruturais às germinas ou “germin-like proteins”. A presença de peptidases cisteínicas oligoméricas de alta massa molecular é atípica em fluidos laticíferos, por tanto a realização de novos ensaios biológicos é imprescindível para esclarecer o papel fisiológico destas na defesa contra insetos ou outros patógenos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p.933-937, 1992.

AGRAWAL, A. A.; HASTINGS, A. P.; PATRICK, E. T.; KNIGHT, A. C. Specificity of herbivore-induced hormonal signaling and defensive traits in five closely related milkweeds (*Asclepias* spp.). **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 7, p. 717–29, 2014.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 311-31, 2009.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALBUQUERQUE, T. M.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J. G.; TEIXEIRA, C. M.; FLAVIO, S.; SECCO, D. D.; ARAUJO, E. S.; LEAO, C. A. A. M.; RAMOS, M. V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, p. 15–23, 2009.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, n. 215, p. 403–410, 1990.

ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 43, n. 7, p. 637–50, 2005

ARMSTRONG, J. S.; ABDEL-MAGEED, H.; FOKAR, M.; ALLEN, R.; ADAMCZYK, J. J. Dietary Effects of Cotton Tissue Expressing Germin Like Protein on Beet Armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) Growth, Survival and Pupation. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 3, p. 693–700, 2013.

AZARKAN, M.; DIBIANI, R.; GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable beta-sheet glycoprotein. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1764, n. 6, p. 1063–72, 2006.

BAH, S.; PAULSEN, B. S.; DIALLO, D.; JOHANSEN, H. T. Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 189–98, 2006.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Identification and characterization of *Euphorbia nivulia* latex proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 193–201, 2014a.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex. **International journal of biological macromolecules**, v. 0, p. 391–8, 2014b.

BADGUJAR, S. B.; PATEL, V. V.; BANDIVDEKAR, A. H.; MAHAJAN, R. T. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: a review. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 11, p. 1487–503, 2014.

BANDARA, V.; WEINSTEIN, S. A.; WHITE, J.; EDDLESTON, M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 273–81, 2010.

BARRETT, A. J.; FRED WOESSNER, J. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Elsevier, 2013.

BAUER, G.; GORB, S. N.; KLEIN, M.-C.; et al. Comparative study on plant latex particles and latex coagulation in *Ficus benjamina*, *Campanula glomerata* and three *Euphorbia* species. **PLoS one**, v. 9, n. 11, p. e113336, 2014.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–87, 1971.

BERNIER, F.; BERNA, A. Germins and germin-like proteins : Plant do-all proteins. But What do they do exactly?. **Plant Physiology and Biochemistry** , v. 39, p. 545–554, 2001.

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

BROEKAERT, W.; TERRAS, F. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology ...**, v. 69, 1990.

CALLAHAN, D. L.; ROESSNER, U.; DUMONTET, V.; et al. LC-MS and GC-MS metabolite profiling of nickel(II) complexes in the latex of the nickel-hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* and identification of methylated aldaric acid as a new nickel(II) ligand. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 240–51, 2008.

CÂNDIDO, E. D. S.; PINTO, M. F. S.; PELEGRINI, P. B.; et al. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 10, p. 3290–305, 2011.

CARTER, C.; THORNBURG, R. W. Tobacco nectarin I. Purification and characterization as a germin-like, manganese superoxide dismutase implicated in the defense of floral reproductive tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36726–33, 2000.

CHARNOCK, S. .; MCCLEARY, B. . Enzymes: Industrial and Analytical Applications. **Tecchnique**, 1998.

CHEN, X.; WANG, M. L.; HOLBROOK, C. Identification and Characterization of a Multigene Family Encoding Germin-Like Proteins in Cultivated Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Mol Biol Rep**, v. 29, p. 389–403, 2011.

CHENG, X.; HUANG, X.; LIU, S.; et al. Characterization of germin-like protein with polyphenol oxidase activity from *Satsuma mandarine*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 449, n. 3, p. 313–8, 2014.

CHO, W. K.; CHEN, X. Y.; UDDIN, N. M.; et al. Comprehensive proteome analysis of lettuce latex using multidimensional protein-identification technology. **Phytochemistry**, v. 70, p. 570–578, 2009.

CHURNGCHOW, N.; SUNTARO, A.; WITTSUWANNNAKUL, R. β -1,3-glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 505–509, 1995.

CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry**, 2001.

DAVIDSON, R. M.; REEVES, P. A.; MANOSALVA, P. M.; LEACH, J. E. Germins: A diverse protein family important for crop improvement. **Plant Science**, v. 177, n. 6, p. 499–510, 2009.

DAVIS, J. D.; CRISPIN, M. Solutions to the Glycosylation Problem for Low- and High-Throughput Structural Glycoproteomics. In: R. Owens; J. Nettleship (Eds.); **Functional and Structural Proteomics of Glycoproteins**. p.127–158, 2011.

DECKER, G.; WANNER, G.; ZENK, M. H.; LOTTSPEICH, F. Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. **Electrophoresis**, v. 21, n. 16, p. 3500–16, 2000.

DEVARAJ, K. B.; GOWDA, L. R.; PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 647–55, 2008.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta medica**, v. 74, n. 7, p. 699–711, 2008.

DONALDSON, P. A.; ANDERSON, T.; LANE, B. G.; DAVIDSON, A. L.; SIMMONDS, D. H. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the

wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 297–307, 2001.

DUMAS, B.; SAILLAND, A.; CHEVIET, J. P.; FREYSSINET, G.; PALLETT, K. Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein. **Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie**, v. 316, n. 8, p. 793–798, 1993.

DUNWELL, J. M.; GIBBINGS, J. G.; MAHMOOD, T.; NAQVI, S. M. S. Germin and germin-like proteins: Evolution, structure, and function. **University of Reading**, 2008. Doi: 10.1080/07352680802333938.

EBRAHIM, S.; USHA, K.; SINGH, B. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism Age-Related Pathogen Resistance. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. p.1043–1054, 2011.

EVERT, R. F. Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development, 3rd Edition **John Wiley & Sons, Inc., 2006**.

FARIAS, L. R.; COSTA, F. T.; SOUZA, L. A.; et al. Isolation of a novel *Carica papaya* α -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 3, p. 255–260, 2007.

FAYE, L.; CHRISPEELS, M. J. Common antigenic determinants in the glycoproteins of plants, molluscs and insects. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 3, p. 245–256, 1988.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1066–1088, 2010.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. . An Overview of Plant Defenses. **The Plant Health Instructor**, DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.

FREITAS, C. D. .; ARAÚJO, E. S.; CAVALHEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L. S.; RAMOS, M. V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora* , *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Society of Plant Physiology** , v. 22, n. 1, p. 11–22, 2010.

FREITAS, C. D. T. DE; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; et al. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 49, n. 7, p. 738–43, 2011.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R. A.; et al. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 10-11, p. 781–9, 2007.

FREITAS, C. D. T. DE; LOPES, J. L. D. S.; BELTRAMINI, L. M.; et al. Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1808, n. 10, p. 2501–7, 2011.

GAMBÔA, A. G. **Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenantha pavonina* L. na purificação de proteases cisteínicas**, p. 62, 2010.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–14, 1977.

GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, L. L. P.; et al. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 43, n. 12, p. 1095–102, 2005.

GODFREY, D.; ABLE, A. J.; DRY, I. B. Induction of a grapevine germin-like protein (VvGLP3) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: a possible role in defense? **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 20, n. 9, p. 1112–25, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17849714>>. Acesso em: 16/1/2015.

GRUDKOWSKA, M.; ZAGDAŃSKA, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 3, p. 609–624, 2004.

GRZELCZAK, Z. F.; LANE, B. G. Signal resistance of a soluble protein to enzymic proteolysis. An unorthodox approach to the isolation and purification of germin, a rare growth-related protein. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 62, n. 12, p. 1351–1353, 1984.

GUEVARA-OLVERA, L.; RUÍZ-NITO, M. L.; RANGEL-CANO, R. M.; et al. Expression of a germin-like protein gene (CchGLP) from a geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 45–50, 2012.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51–65, 2012.

HALE, L. P.; GREER, P. K.; TRINH, C. T.; GOTTFRIED, M. R. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 116, n. 2, p. 135–42, 2005.

HAMILTON, R. G. Diagnosis of natural rubber latex allergy. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 27, n. 1, p. 22–31, 2002.

HELLMAN, U.; WENSTEDT, C.; GÓÑEZ, J.; HELDIN, C. H. Improvement of an "In-Gel" Digestion Procedure for The Micropreparation of Internal Protein Fragments for Amino Acid Sequencing. **Ludwig Institute for Cancer Research**, p. 451–455, 1994.

HO, C. C. Chapter 4 - The Production of Natural Rubber from *Hevea brasiliensis* Latex: Colloidal Properties, Preservation, Purification and Processing. **Cambridge: Royal Society of Chemistry**, 2014.

HÖRDEGEN, P.; HERTZBERG, H.; HEILMANN, J.; LANGHANS, W.; MAURER, V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. **Veterinary parasitology**, v. 117, n. 1-2, p. 51–60, 2003.

JAIKARAN, A. S. I.; KENNEDY, T. D.; DRATEWKA-KOS, E.; LANE, B. G.; GLCNAC-FUC, X. G. Covalently Bonded and Adventitious Glycans in Germin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12503–12512, 1990.

JI, C.; KUĆ, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, n. 4, p. 257–265, 1996.

JOSEPH, B.; RAJ, S. J. Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn – An overview. **Internacional Journal of PharmaTech Research**, v. 3, n. 1, p. 8–12, 2011.

KACHROO, A.; ROBIN, G. P. Systemic signaling during plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 527–533, 2013.

KARDOS, J.; BÓDI, A.; ZÁVODSZKY, P.; VENEKEI, I.; GRÁF, L. Disulfide-linked propeptides stabilize the structure of zymogen and mature pancreatic serine proteases. **Biochemistry**, v. 38, n. 38, p. 12248–57, 1999.

KEATES, S. E.; TARLYN, N. M.; LOEWUS, F. A.; FRANCESCHI, V. R. L-ascorbic acid and L-galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 433–440, 2000.

KEKWICK, R. Latex and laticifers. **Encyclopedia of Life Science**, p. 1–6, 2001.

KUMAR DUBEY, V.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1057–1071, 2003.

KUMAR, R.; SINGH, K. A.; TOMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical and spectroscopic characterization of a novel metalloprotease, cotinifolin from an antiviral plant shrub: *Euphorbia cotinifolia*. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 49, n. 7, p. 721–8, 2011.

- KUNAKBAEVA, Z.; CARRASCO, R.; ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cystein proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 626, n. 1-3, p. 209–216, 2003.
- KUNDU, S.; SUNDD, M.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and characterization of a stable cysteine protease Ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 171–179, 2000.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LANE, B. G. Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat : germins. **Biochemical Society** , v. 321, p. 309–321, 2000.
- LANE, B. G. Oxalate , Germins , and Higher-Plant Pathogens. **IUBMB Life**, v. 53, p. 67–75, 2002.
- LANE, B. G.; BERNIERP, F.; DRATEWKA-KOS, E.; et al. Homologies between Members of the Germin Gene Family in Hexaploid Wheat and Similarities between These Wheat Germins and Certain. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 16, p. 10461–10469, 1991.
- LANGFORD, S. D.; BOOR, P. J. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. **Toxicology**, v. 109, n. 1, p. 1–13, 1996.
- LEWINSOHN, T. M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology**, v.2, p. 64-68, 1991.
- LIMA, R. C. DE S.; SILVA, M. C. C.; AGUIAR, C. C. T.; et al. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 23, n. 2, p. 123–6, 2012.
- LOON, L. C. VAN; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual review of phytopathology**, v. 44, p. 135–162, 2006.
- LOU, Y.; BALDWIN, I. T. Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuata* improves performance of native herbivores. **Plant physiology**, v. 140, n. 3, p. 1126–36, 2006.
- MAHAJAN, R. T.; BADGUJAR, S. B. Biological aspects of proteolytic enzymes : A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 94, p. 2048–2068, 2010.
- MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 2005.

MANSUR, F.; LUOGA, W.; BUTTLE, D. J.; et al. The anthelmintic efficacy of natural plant cysteine proteinases against two rodent cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Hymenolepis microstoma* in vitro. **Veterinary parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 48–58, 2014.

MARTINS, A.; LIMA, O.; MACHADO, T. Defesa de plantas : Sinalização química e espécies reativas de oxigênio Plant Defense : chemical signaling and reactive oxygen species. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9, 2007.

MATHIEU, M.; LELU-WALTER, M. A.; BLERVACQ, A. S.; et al. Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. **Plant Molecular Biology**, v. 61, n. 4-5, p. 615–27, 2006.

MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; et al. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* ce. **Plant Science**, v. 169, n. 3, p. 629–639, 2005.

MEMBRÉ, N.; BERNIER, F.; STAIGER, D.; BERNA, A. Arabidopsis thaliana germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. **Planta**, v. 211, n. 3, p. 345–54, 2000.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 431–50, 2012.

MONTI, R.; BASILIO, C. A.; TREVISAN, H. C.; CONTIERO, J. Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biologie and Technology**, v. 43, n. 5, p. 501–507, 2000.

MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funarium clausum* latex. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 480–93, 2004.

MÜLLER, D. J.; JANOVJAK, H.; LEHTO, T.; KUERSCHNER, L.; ANDERSON, K. Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2002.

MURA, A.; PINTUS, F.; FAIS, A.; et al. Tyramine oxidation by copper/TPQ amine oxidase and peroxidase from *Euphorbia characias* latex. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 475, n. 1, p. 18–24, 2008. 18/1/2015.

NEILSON, E. H.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; MØLLER, B. L. Plant chemical defense: at what cost? **Trends in plant science**, v. 18, n. 5, p. 250–8, 2013.

OBASI, N. B.; IGBOECHI, A. C. Seed-oil distillates of *Thevetia peruviana* (syn. *T. neerifolia*): analysis and antibacterial activity. **Fitoterapia LXII**, v. 2, p. 159-162, 1991.

OJI, O.; OKAFOR, Q. E. Toxicological Studies on Stem Bark , Leaf and Seed Kernel of Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*). **Phytotherapy Research** , v. 14, p. 133–135, 2000.

OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 1, p. 133–172, 1997.

PALOSUO, T. **Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber**. p. 452-482, 2014.

PANIS, C.; PIZZATTI, L.; HERRERA, A. C.; CECCHINI, R.; ABDELHAY, E. Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. **Cancer Letters**, v. 330, n. 1, p. 57–66, 2013.

PARK, C.-J.; AN, J.-M.; SHIN, Y.-C.; et al. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. **Planta**, v. 219, n. 5, p. 797–806, 2004.

PATEL, B. K.; JAGANNADHAM, M. V. A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6326–34, 2003.

PECHAN, T.; YE, L.; CHANG, Y.; et al. A Unique 33-kD Cysteine Proteinase Accumulates in Response to Larval Feeding in Maize Genotypes Resistant to Fall Armyworm and Other Lepidoptera. **The Plant Cell** , v. 12, n. July, p. 1031–1040, 2000.

PILLET, F.; CHOPINET, L.; FORMOSA, C.; DAGUE, É. Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2014.

RAJAVEL, M.; KULKARNI, N. N.; GOPAL, B. Conformational Studies Suggest That the Double Stranded Helix Scaf- fold Provides an Optimal Balance Between Protein Stability and Function. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, p. 244–249, 2008.

RAMOS, M.; ARAÚJO, E. Latex fluids are endowed with insect repellent activity not specifically related to their proteins or volatile substances. **Brazilian Journal of ...**, v. 23, n. 1, p. 57–66, 2011.

RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; GOMES, M. T. R.; et al. A phytopathogenic cysteine peptidase from latex of wild rubber vine *Cryptostegia grandiflora*. **The protein journal**, v. 33, n. 2, p. 199–209, 2014.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; et al. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 211–9, 2013.

RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; STANISÇUASKI, F.; et al. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: Role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, v. 173, n. 3, p. 349–357, 2007.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic acids research**, v. 38, p. 227–33, 2010.

RICO, F.; RIGATO, A.; PICAS, L.; SCHEURING, S. Mechanics of proteins with a focus on atomic force microscopy. **Journal of nanobiotechnology**, v. 11 Suppl 1, p. S3, 2013.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.; BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; ZANDUETA-CRIADO, A.; et al. Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein. **FEBS letters**, v. 490, n. 1-2, p. 44–8, 2001.

SALAS, C. E.; GOMES, M. T. R.; HERNANDEZ, M.; LOPES, M. T. P. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2263–9, 2008.

SAVATIN, D. V.; GRAMEGNA, G.; MODESTI, V.; CERVONE, F. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. September, p. 470, 2014.

SCHELER, C.; DURNER, J.; ASTIER, J. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, 2013.

SHINDO, T.; HOORN, R. A L. VAN DER. Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. **Molecular plant pathology**, v. 9, n. 1, p. 119–25, 2008.

SCHLESIER, B.; BERNA, A.; BERNIER, F.; MOCK, H.-P. Proteome analysis differentiates between two highly homologous germin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Ws-2. **Phytochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1565–74, 2004.

SCHWEIZER, P.; CHRISTOFFEL, A.; DUDLER, R. Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. **The Plant journal**, v. 20, n. 5, p. 541–52, 1999.

SEGREST, J. P.; JACKSON, R. L. Complex Carbohydrates Part B. **Methods in Enzymology**, Methods in Enzymology. v. 28, p.54–63, 1972.

SETHI, A.; MCAUSLANE, H. J.; RATHINASABAPATHI, B.; NUCESSLY, G. S.; NAGATA, R. T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. **Journal of chemical ecology**, v. 35, n. 2, p. 190–200, 2009.

SHEPHERD, R. C. H. Pretty but poisonous : plants poisonous to people : an illustrated guide for Australia. **R.G. and F.J. Richardson**, 2004.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SHIVAPRASAD, H. V; RIYAZ, M.; VENKATESH KUMAR, R.; et al. Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 28, n. 3, p. 304–8, 2009.

SILVA, L. G.; GARCIA, O.; LOPES, M. T.; SALAS, C. E. Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 30, n. 5, p. 615–9, 1997.

SIMS, A. H.; DUNN-COLEMAN, N. S.; ROBSON, G. D.; OLIVER, S. G. Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 1, p. 95–101, 2004.

SINGH, A. N.; SHUKLA, A. K.; JAGANNADHAM, M. V.; DUBEY, V. K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 399–406, 2010.

SLUSARENKO, A. .; FRASER, R. S. .; LOON, L. . VAN. **Mechanisms of Resistance to Plant Diseases**. 2001.

SOUZA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; PEREIRA, D. A; et al. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta**, v. 234, n. 1, p. 183–93, 2011.

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLD, D. H.; KURUP, V. P. Allergens and natural rubber proteins. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 110, n. 2 Suppl, p. S33–9, 2002.

SWIEZEWSKA, E.; DANIKIEWICZ, W. Polyisoprenoids: structure, biosynthesis and function. **Progress in lipid research**, v. 44, n. 4, p. 235–58, 2005.

TAIRA, T.; OHDOMARI, A.; NAKAMA, N.; SHIMOJI, M.; ISHIHARA, M. Characterization and antifungal activity of gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases: both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinase are reinforced with increasing ionic strength. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 811–8, 2005.

TEIXEIRA, R. D.; RIBEIRO, H. A L.; GOMES, M.-T. R.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 46, n. 11, p. 956–61, 2008.

THOMAS, M. P.; TOPHAM, C. M.; KOWLESSUR, D.; et al. Structure of chymopapain M the late-eluted chymopapain deduced by comparative modelling techniques and active-centre characteristics determined by pH-dependent kinetics of catalysis and reactions with time-dependent inhibitors: the Cys-25/His-159 ion-pair. **The Biochemical journal**, v. 300, p. 805–20, 1994.

THOMPSON, E. W.; LANE, B. G. Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translational capacities of bulk mRNA from dry and imbibing embryos. **The Journal of Biological chemistry**, v. 255, n. 12, p. 5965–70, 1980.

THOMSON, A. B.; KEELAN, M.; THIESEN, A.; et al. Small bowel review: normal physiology part 1. **Digestive diseases and sciences**, v. 46, n. 12, p. 2567–87, 2001.

TORRES, M. J.; TREJO, S. A.; OBREGÓN, W. D.; et al. Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* latex. **Planta**, v. 236, n. 5, p. 1471–84, 2012.

VASCONCELOS, É. A. R.; NOGUEIRA, F. C. S.; ABREU, E. F. M.; et al. Protein Extraction From Cowpea Tissues for 2-D Gel Electrophoresis and MS Analysis. **Chromatographia**, v. 62, n. 7-8, p. 447–450, 2005.

VESELOVA, S. V.; NUZHAYAYA, T. V.; MAKSIMOV, I. V. The effect of 1-methylcyclopropene on the components of pro- and antioxidant systems of wheat and the development of defense reactions in fungal pathogenesis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 516–523, 2014.

VIANA, C. A.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T.; et al. Thrombin and plasmin-like activities in the latices of *Cryptostegia grandiflora* and *Plumeria rubra*. **Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis**, v. 24, n. 4, p. 386–92, 2013.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VIERSTRA, R. D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, v. 32, n. 1-2, p. 275–302, 1996.

WAHLER, D.; COLBY, T.; KOWALSKI, N. A.; et al. Proteomic analysis of latex from the rubber-producing plant *Taraxacum brevicorniculatum*. **Proteomics**, v. 12, p. 901–905, 2012.

WANG, X.; SHI, M.; LU, X.; et al. A method for protein extraction from different subcellular fractions of laticifer latex in *Hevea brasiliensis* compatible with 2-DE and MS. **Proteome science**, v. 8, p. 35, 2010.

WATANABE, N.; LAM, E. Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14691–9, 2005.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochem. J**, v. 322, n. 61-704, p. 681–692, 1997.

WOO, E.; DUNWELL, J. M.; GOODENOUGH, P. W.; MARVIER, A. C.; PICKERSGILL, R. W. letters Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 11, 2000.

WOO, E.-J.; DUNWELL, J. M.; GOODENOUGH, P. W.; PICKERSGILL, R. W. Barley oxalate oxidase is a hexameric protein related to seed storage proteins: evidence from X-ray crystallography. **FEBS Letters**, v. 437, n. 1-2, p. 87–90, 1998.

WU, S.; SHAN, L.; HE, P. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 228, p. 118–26, 2014.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P.; ARY, M. B.; et al. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 1139–1143, 1989. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00088a071>>. .

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. . Occurrence of Low Molecular Weight and High Cysteine Containing Albumin Storage Proteins in Oilseeds of Diverse Species. **American Journal of Botany**, v. 68, n. 1, p. 44–48, 1981.

ZARE, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; SALAMI, M.; et al. Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. **Phytochemistry**, v. 87, p. 16–22, 2013.

ZHU-SALZMAN, K.; LUTHE, D. S.; FELTON, G. W. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 852–8, 2008.

ZIMMERMANN, G.; BÄUMLEIN, H.; MOCK, H.-P.; HIMMELBACH, A.; SCHWEIZER, P. The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in Basal host resistance. **Plant Physiology**, v. 142, n. 1, p. 181–92, 2006.