



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

**HELEN PAULA SILVA DA COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CINÉTICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA  
DE UMA ALBUMINA 2S COM ATIVIDADE INIBITÓRIA DE TRIPSINA  
PURIFICADA DA TORTA DE *Jatropha curcas* L.**

**FORTALEZA  
2016**

HELEN PAULA SILVA DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CINÉTICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA DE  
UMA ALBUMINA 2S COM ATIVIDADE INIBITÓRIA DE TRIPSINA PURIFICADA DA  
TORTA DE *Jatropha curcas* L.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Bioquímica do Departamento de Bioquímica e  
Biologia Molecular da Universidade Federal  
do Ceará, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em Bioquímica.  
Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria  
Vasconcelos

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniele de  
Oliveira Bezerra de Sousa

FORTALEZA  
2016

HELEN PAULA SILVA DA COSTA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira  
Universidade de Fortaleza (Unifor)

---

Dr. Gilvan Pessoa Furtado  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

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

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

---

C872c Costa, Helen Paula Silva da.  
Caracterização estrutural e cinética e ação antimicrobiana de uma albumina 2S com atividade inibitória de tripsina purificada da torta de *Jatropha curcas* L. / Helen Paula Silva da Costa. – 2016.  
146 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

Coorientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

1. Torta de pinhão-manso. 2. JcTI-I. 3. Proteína de reserva. 4. Inibidor de tripsina. 5. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDD 572

---

**Aos Meus Pais**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família que sempre esteve ao meu lado, pronta para me ajudar e aconselhar. Agradeço ao meu companheiro, Paulo, por me dar forças e quase que me obrigar a lutar pelos meus sonhos. Vocês são minha vida!

Agradeço a minha orientadora, Profa. Ilka Maria Vasconcelos, que me aceitou, apoiou e lutou para que eu chegasse a esse momento com êxito e conquistasse esse título. Também agradeço à minha coorientadora, Profa. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, pela colaboração e incentivo durante toda essa minha trajetória.

Obrigada também ao Prof. Thalles Barbosa Grangeiro, pela colaboração e ensinamentos; ao Prof. Christian Betzel, pelo acolhimento, disponibilidade e treinamento; Ao Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira que colaborou na realização desse trabalho. Agradeço também a todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Dr. Gilvan Pessoa Furtado, Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, Membros da Banca Examinadora dessa tese, pela disponibilidade e valiosas sugestões e comentários que, certamente, me farão uma profissional melhor.

Obrigada aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Toxinas Vegetais, integrantes da “Família Labtox”, aqui representados por Bella Giselle, João Xavier, Mariana Reis, Marina Gabrielle, Nadine Araújo, Lucas Dias, Paulo Carvalho, Tarcymara Garcia e Tiago Lopes. Em especial, agradeço à Ana Paula Queiroz pela ajuda e paciência ao longo de todos esses anos. Obrigada, também, à Janne Keila, Mirella Leite e Raquel Rocha, pessoas que tenho como amigas, apesar de não usufruirmos do convívio diário. Agradeço, ainda, a todos os amigos que fiz no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, ao longo dessa jornada, desde o período de minha Iniciação Científica até hoje.

Agradeço a minha amiga e colaboradora Alexandra Soares, por toda ajuda e colaboração.

Obrigada aos integrantes do grupo de pesquisa do Prof. Christian Betzel, em especial a Aline Melro, Haifa Kilani, Teresa Nuguid, Rana Hussein, Rutineia Ferraz-Jansen, Sabine Botha e Svetlana Kapis, amigas e parceiras de bancada.

Agradeço aos meus amigos Aline Gonzaga, Daniel Farias, Gabriela de Almeida, Glairta, Glauber Pacelli, Michelle Andrade e Paulo André, amigos conquistados ainda na época da graduação e que, ainda hoje, são companheiros de ótimas conversas e diversão.

Obrigada a Deus por todos estes amigos, verdadeiros presentes de valor inestimável e que nunca quero perdê-los.

## AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi realizado com apoio das seguintes Instituições:

Universidade Federal do Ceará - Laboratório de Toxinas Vegetais (LabTox), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

Universidade de Fortaleza – Laboratório de Produtos Naturais Aplicados à Saúde, sob coordenação da Profa. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira e do Prof. Renato de Azevedo Moreira.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, sob a coordenação do Dr. Edésio José Tenório de Melo.

Universidade de Hamburgo e Desy (“*Deutsches Elektronen-Synchrotron*”) – Instituto de Bioquímica e Biologia Molecular e Laboratório de Biologia Estrutural da Infecção e Inflamação, sob a coordenação da Prof. Dr. Christian Betzel.

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) – através de concessão de bolsa de doutorado e doutorado sanduíche à autora do trabalho e, também, auxílio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) e Finep – pela concessão de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.



**“Vitória sem luta é triunfo sem glória”**

(Provérbio chinês)

## RESUMO

O número de doenças causadas por bactérias resistentes a antibióticos tem aumentado, dentre elas aquelas ocasionadas por *Staphylococcus aureus*. Além das infecções bacterianas, há aquelas oriundas da ação de protozoários, como a toxoplasmose, causada pelo *Toxoplasma gondii*. Tais fatos justificam a busca de novos agentes ativos contra patógenos causadores de infecções. Da torta de *Jatropha curcas* (Pinhão-manso), uma glicoproteína com atividade inibitória de tripsina e ação contra bactérias patogênicas ao homem, denominada JcTI-I, foi previamente isolada por nosso grupo de pesquisa. Os objetivos desse trabalho foram prosseguir com a caracterização estrutural e cinética do JcTI-I e avaliar sua atividade contra patógenos causadores de infecção no homem, com ênfase no modo de ação antibacteriana e atividade contra *T. gondii*. Espectrometria de massas revelou que JcTI-I é uma proteína de 10,252 kDa, formada por duas cadeias polipeptídicas de 7,133 e 3,124 kDa, unidas por ligações dissulfeto. Dados da sequência primária gerados por degradação de Edman e espectrometria de massas permitiram a classificação do JcTI-I como uma albumina 2S. Análises *in silico* possibilitaram a identificação de genes codificadores do precursor (Jcr4S00619.70) do JcTI-I no genoma de *J. curcas*. O precursor (pró-albumina) contém um peptídeo sinal de 39 resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminal, oito cisteínas conservadas, vários sítios de glicosilação e um sítio de fosforilação. JcTI-I é composto principalmente por  $\alpha$ -hélices (70%), estabilizadas por quatro ligações dissulfeto, e estruturas não ordenadas. Modelagem *in silico* e análise por SAXS sugerem uma estrutura estendida, com longa cauda e região globular, para o JcTI-I. Essa proteína possui alta afinidade pela tripsina ( $K_i = 2 \times 10^{-11}M$ ), inibindo sua ação proteolítica por mecanismo do tipo não competitivo, o qual é mantida, parcialmente, mesmo na presença do ditiotreitol (0,1 M, 60 minutos). Além disso, JcTI-I inibiu o crescimento das bactérias *S. aureus* e *Salmonella enterica* (MIC de 5  $\mu g$  proteína/mL), provavelmente em decorrência de sua ligação à célula bacteriana, causando aumento da permeabilidade da superfície celular. Isso deve ter possibilitado o acesso do JcTI-I para o meio intracelular e a consequente inativação das proteases e ligação ao DNA bacterianos. É possível que JcTI-I tenha acarretado degradação do DNA bacteriano, dada à sua atividade desoxirribonucleásica detectada *in vitro*. JcTI-I também teve ação deletéria sobre *T. gondii*, causando redução nos números de células Vero infectadas com o parasita e de taquizoítos intracelulares. Adicionalmente, JcTI-I promoveu alterações nas membranas pelicular interna e plasmática do protozoário, além da formação de vesículas no seu citoplasma. Digno de nota nesse contexto, é que o JcTI-I não causou citotoxicidade para célula Vero, lise de hemácias humanas e toxicidade aguda (letalidade) em camundongos. Os dados demonstram o potencial de uso do JcTI-I como um novo agente antimicrobiano, agregando valor à torta de *J. curcas*.

**Palavras-chave:** Torta de pinhão manso. JcTI-I. proteína de reserva. inibidor de tripsina. *Staphylococcus aureus*. *Toxoplasma gondii*.

## ABSTRACT

The number of diseases caused by antibiotic-resistant bacteria has increased, amongst them those occasioned by *Staphylococcus aureus*. In addition to bacterial infections, there are parasitic diseases, such as toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii*. Such scenarios support the search for new agents that are active against most pathogens. Recently a glycoprotein with trypsin inhibitory activity and action against human bacterial pathogens, named *JcTI-I*, was previously purified to homogeneity by our research group from *Jatropha curcas* cake. The goals of this present study were to proceed with the structural and kinetic characterization of *JcTI-I* and to assess its potential activity against human pathogenic bacteria, with emphasis on the mode of antibacterial action and activity against *T. gondii*. Mass spectrometry analysis showed that *JcTI-I* is a protein of 10,252 kDa composed of two polypeptide chains of 7,133 and 3,124 kDa, linked by disulfide bonds. Primary sequence data obtained by Edman degradation and mass spectrometry allowed to classify *JcTI-I* as a 2S albumin. *In silico* analysis permitted to identify the *JcTI-I* precursor-coding genes (Jcr4S00619.70) in the genome of *J. curcas*. The precursor (pro-albumin) contains a signal peptide of 39 amino acid residues at the N-terminus, eight conserved cysteine residues, multiple sites of glycosylation and one phosphorylation site. *JcTI-I* is mainly composed of  $\alpha$ -helices (70%) stabilized by four disulfide bonds and disordered structures. *In silico* modelling and SAXS analysis suggest an extended structure with long tail and globular region for *JcTI-I*. Moreover, *JcTI-I* has high affinity for trypsin ( $K_i = 2 \times 10^{-11}$  M), which is inhibited by a non-competitive mechanism, and maintained, at least partially, in the presence of dithiothreitol (0.1 M, 60 minutes). *JcTI-I* inhibited *S. aureus* and *S. choleraesuis* growth (MIC of 5  $\mu$ g protein/mL), probably due to its physical interaction with the bacteria, which might have increased the cell surface permeability to this protein that, after internalization to intracellular environment, inactivated proteases and bound to DNA. It is possible that *JcTI-I* has caused bacterial DNA degradation due to its desoxyribonucleasica activity detected *in vitro*. Furthermore, *JcTI-I* was also toxic to *T. gondii* decreasing the numbers of infected Vero cells and intracellular tachyzoites. In addition, *T. gondii* treated with *JcTI-I* presented changes in their internal pelicular and cellular membranes and increased formation of cytoplasm vesicles. Importantly, *JcTI-I* did not show cytotoxicity to Vero cells, lysis of human red blood cells, and acute toxicity (lethality) to mice. The data demonstrate that *JcTI-I* has potential to be used as a new antimicrobial agent, adding value to *J. curcas* cake.

**Keywords:** *Jatropha curcas* seed cake. *JcTI-I*. storage protein. trypsin inhibitor. *Staphylococcus aureus*. *Toxoplasma gondii*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Indicação global das melhores condições climáticas para o crescimento de <i>J. curcas</i> (30° N e 35° S).....	23
Figura 2	-	<i>J. curcas</i> L. (Pinhão manso) .....	24
Figura 3	-	Evolução dos membros da superfamília das prolamínas.....	29
Figura 4	-	Esqueleto representando os resíduos de cisteína conservados na superfamília das prolamínas.....	30
Figura 5	-	Linha do tempo de resistência para os principais antibióticos.....	32
Figura 6	-	Principais vias de transferência de genes de resistência em humanos, animais, alimentos e ambiente.....	34
Figura 7	-	Estruturas químicas dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos, benzilpenicilina e metecilina.....	36
Figura 8	-	Ciclo de vida do protozoário <i>T. gondii</i> .....	39
Figura 9	-	Esquema de extração e purificação do <i>JcTI-I</i> .....	45
Figura 10	-	Cromatografia de afinidade em coluna de tripsina-Sepharose 4B.....	61
Figura 11	-	Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-200.....	62
Figura 12	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), em presença de SDS, do <i>JcTI-I</i> .....	63
Figura 13	-	Espectros de massas deconvoluído do <i>JcTI-I</i> nativo ou após tratamento com agente redutor, usando fonte de ionização nanoeletrospray.....	64
Figura 14	-	Alinhamento das sequências dos peptídeos gerados após digestão trípica do <i>JcTI-I</i> , utilizando dados de MS/MS, com a sequência da proteína predita Jcr4S00619.70, deduzida a partir do genoma de <i>J. curcas</i> .....	68
Figura 15	-	Sequência do precursor do <i>JcTI-I</i> com indicações de possíveis pontos de mudanças pós-traducionais.....	69
Figura 16	-	Diagrama do potencial de glicosilação no <i>JcTI-I</i> .....	70
Figura 17	-	Alinhamento da sequência do precursor do <i>JcTI-I</i> (Jcr4S00619.70) com outras sequências de proteínas depositadas no NCBI.....	71
Figura 18	-	Espectro de dicroísmo circular do <i>JcTI-I</i> .....	74
Figura 19	-	Avaliação da estabilidade estrutural do <i>JcTI-I</i> frente a diferentes temperaturas, por monitoramento através de dicroísmo circular.....	75
Figura 20	-	Modelos estruturais preditos para o <i>JcTI-I</i> .....	76
Figura 21	-	Teste de homogeneidade do <i>JcTI-I</i> .....	77
Figura 22	-	Teste de estabilidade do <i>JcTI-I</i> .....	78
Figura 23	-	Teste de estabilidade do <i>JcTI-I</i> conjugado à tripsina.....	79

Figura 24	-	Teste de estabilidade da tripsina.....	80
Figura 25	-	Formação de nucleação e microcristais do <i>JcTI-I</i> .....	82
Figura 26	-	Análises de SAXS do <i>JcTI-I</i> .....	83
Figura 27	-	Modelo <i>ab initio</i> do <i>JcTI-I</i> construído a partir dos dados de SAXS....	84
Figura 28	-	Modelo final proposto para o <i>JcTI-I</i> .....	85
Figura 29	-	Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina pelo <i>JcTI-I</i> , em conjunção com o gráfico de Dixon (inserto).....	87
Figura 30	-	Atividade inibitória de tripsina do <i>JcTI-I</i> após tratamento com o agente redutor DTT.....	88
Figura 31	-	Curva de crescimento bacteriano na presença do <i>JcTI-I</i> .....	90
Figura 32	-	Efeito do <i>JcTI-I</i> para bactérias a diferentes concentrações sobre o crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>S. choleraesius</i> .....	91
Figura 33	-	Efeito inibitório do <i>JcTI-I</i> sobre proteases extraídas de <i>S. aureus</i> e <i>S.</i> <i>choelerasius</i> .....	92
Figura 34	-	Microscopia óptica e de fluorescência de células de <i>S. aureus</i> tratadas com <i>JcTI-I</i> acoplado ao FITC.....	93
Figura 35	-	Microscopia óptica e de fluorescência de células de <i>S. aureus</i> tratadas previamente com <i>JcTI-I</i> e posteriormente incubadas com iodeto de propídio.....	94
Figura 36	-	Gel de agarose (0,8%) de DNA genômico de <i>C. violaceum</i> incubado com <i>JcTI-I</i> .....	95
Figura 37	-	Microscopia óptica de células Vero infectadas com <i>T. gondii</i> tratadas ou não com <i>JcTI-I</i> em diferentes concentrações.....	99
Figura 38	-	Microscopia óptica de células Vero infectadas com taquizoítos de <i>T.</i> <i>gondii</i> pré-tratados com <i>JcTI-I</i> .....	102
Figura 39	-	Microscopia eletrônica de taquizoítos extracelulares de <i>T. gondii</i> pré- tratados com <i>JcTI-I</i> .....	103
Figura 40	-	Avaliação da ação citotóxica de <i>JcTI-I</i> usando hemácias humanas.....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Componentes antinutricionais e/ou tóxicos presentes na torta de <i>J. curcas</i> .....	27
Tabela 2	- Sequências das proteínas preditas baseadas no genoma de <i>J. curcas</i> apresentando alta similaridade ( $\geq 80\%$ ) com o N-terminal do <i>JcTI-I</i> .	66
Tabela 3	- Sequências de peptídeos gerados após digestão trípica do <i>JcTI-I</i> , utilizando dados de MS/MS.....	67
Tabela 4	- Citotoxicidade do <i>JcTI-I</i> para células Vero.....	97
Tabela 5	- Efeito do <i>JcTI-I</i> sobre os números de células Vero infectadas com <i>T. gondii</i> e de taquizoítos intracelulares.....	98
Tabela 6	- Efeito do pré-tratamento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> com <i>JcTI-I</i> e posterior infecção de células Vero.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEBSF	4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil fluoreto
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	Coleção de Microrganismo Norte Americana ( <i>American Type Culture Collection</i> )
BAPNA	<i>N</i> - $\alpha$ -benzoil-DL-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
BLAST	Ferramenta on-line de alinhamento de sequências ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
BSA	Albumina sérica bovina
DC	Dicroísmo circular
3,4-DCI	3,4-dicloroisocumarina
DDA	Aquisição dependente de dados ( <i>Data Dependent Acquisition</i> )
DLS	Espalhamento de luz dinâmico ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por electrospray
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
JcTI-I	Inibidor de tripsina de <i>Jatropha curcas</i> - I
K <sub>i</sub>	Constante de inibição
LC	Cromatografia líquida
m/z	Relação massa/carga
CIM	Concentração inibitória mínima

MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica ( <i>National Center of Biotechnology Information</i> )
NsLTP	Proteínas transferidoras de lipídios não específicas
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio
PBP	Proteínas ligantes à penicilina
PCT	Teste de pré-cristalização ( <i>Pre-Crystallization Test</i> )
PDB	Banco de dados de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
PEG	Poli(etil)enoglicol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RF	Mobilidade relativa
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
SAXS	Análise por espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TCA	Ácido tricloroacético
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UA	Unidades de atividade
UFC	Unidade formadora de colônia
UH	Unidade de hemaglutinação
UI	Unidade de inibição



## SUMÁRIO

1	CARACTERIZAÇÃO DOS PROBLEMA .....	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	22
2.1	<i>Jatropha curcas</i> L. (PINHÃO MANSO) .....	22
2.1.1	Aspectos biológicos e importância econômica.....	22
2.1.2	Torta -Definição, composição e propriedades.....	25
2.2	Albuminas 2S – uma classe de proteínas abundante nos vegetais .....	28
2.3	Antibióticos - Propriedades e desafios.....	31
2.4	Exemplos de patógenos causadores de infecções ao homem .....	33
2.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
2.4.2	<i>Salmonella enterica</i> .....	37
2.4.3	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	38
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivos gerais.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	Materiais.....	42
4.1.1	Torta de <i>J. curcas</i> .....	42
4.1.2	Bactérias .....	42
4.1.3	Células hospedeiras e parasitas .....	42
4.1.4	Reagentes químicos.....	42
4.2	Métodos.....	43
4.2.1	Processamento da torta de <i>J. curcas</i> .....	43
4.2.2	Extração e purificação do JcTI-I.....	43
4.2.3	Dosagem de proteínas solúveis.....	44
4.2.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	44
4.2.5	Espectrometria de massas.....	46
4.2.6	Determinação da sequência primária e de parâmetros relacionados.....	47
4.2.7	Determinação da estrutura secundária.....	48
4.2.8	Determinação da estrutura terciária.....	48
4.2.8.1	Modelagem <i>in silico</i> .....	48
4.2.8.2	Testes de pré-cristalização.....	48
4.2.8.3	Espalhamento de luz dinâmico (DLS – <u>D</u> ynamic <u>L</u> ight <u>S</u> cattering).....	49
4.2.8.4	Testes de cristalização.....	50

4.2.8.5	<i>Semeadura</i> .....	51
4.2.8.6	<i>Counter diffusion GAME (Gel Acupuncture Method)</i> .....	51
4.2.8.7	<i>Difusão de vapor sob óleo (Microbatch)</i> .....	51
4.2.8.8	<i>Análise por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)</i> .....	52
4.2.9	<i>Determinação da atividade inibitória de tripsina</i> .....	52
4.2.10	<i>Determinação da constante de inibição (<math>K_i</math>)</i> .....	53
4.2.11	<i>Avaliação da atividade antibacteriana do JcTI-I</i> .....	53
4.2.11.1	<i>Teste de atividade antibacteriana in vitro</i> .....	53
4.2.11.2	<i>Avaliação da inibição das proteases bacterianas pelo JcTI-I</i> .....	53
4.2.11.3	<i>Avaliação da inibição das proteases bacterianas pelo JcTI-I</i> .....	54
4.2.11.4	<i>Avaliação da integridade da superfície celular de S. aureus após contato com JcTI-I</i> .....	55
4.2.11.5	<i>Avaliação de atividade desoxirribonucleásica do JcTI-I</i> .....	55
4.2.12	<i>Avaliação da atividade do JcTI-I contra o parasita T. gondii</i> .....	55
4.2.12.1	<i>Manutenção das células hospedeiras (células Vero) e obtenção do parasita T. gondii</i> .....	55
4.2.12.2	<i>Interação T. gondii e célula Vero</i> .....	56
4.2.12.3	<i>Avaliação da citotoxicidade do JcTI-I para células Vero</i> .....	56
4.2.12.4	<i>Avaliação da atividade anti-toxoplasma do JcTI-I</i> .....	57
4.2.12.5	<i>Análise estrutural e ultraestrutural</i> .....	58
4.2.13	<i>Avaliação de risco de lesão celular e de toxicidade aguda do JcTI-I para animais superiores</i> .....	58
4.2.13.1	<i>Teste de atividade hemolítica</i> .....	58
4.2.13.2	<i>Teste de toxicidade aguda</i> .....	59
4.3	<i>Análise estatística</i> .....	59
5	<b>RESULTADOS</b> .....	60
5.1	<i>Purificação do JcTI-I</i> .....	60
5.2	<i>Caracterização quanto à massa molecular e número de cadeias polipeptídicas do JcTI-I</i> .....	60
5.3	<i>Estrutura primária do JcTI-I</i> .....	65
5.4	<i>Estrutura secundária do JcTI-I</i> .....	72
5.5	<i>Estrutura terciária do JcTI-I</i> .....	72
5.6	<i>Cinética de inibição do JcTI-I</i> .....	86

5.7	Efeito do agente redutor DTT sobre a atividade inibitória de tripsina do <i>JcTI-I</i> .....	86
5.8	Atividade antibacteriana do <i>JcTI-I</i> .....	86
5.9	Modo de ação antibacteriana do <i>JcTI-I</i> .....	89
5.10	Atividade anti-toxoplasma do <i>JcTI-I</i> .....	89
5.11	Perspectivas de uso seguro do <i>JcTI-I</i> para animais superiores.....	100
6	DISCUSSÃO.....	105
7	CONCLUSÕES.....	116
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
	REFERÊNCIAS .....	118

## 1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

*J. curcas* (pinhão-manso) é uma planta rica em óleo e, por isso, uma fonte desse recurso para a produção de biodiesel (RASHID *et al.*, 2010). Do processo de extração do óleo a partir das sementes, um resíduo é obtido, a chamada torta. Essa torta é extremamente tóxica devido à presença de vários compostos, dentre eles os ésteres de forbol e a curcina, uma RIP tipo I (GOEL *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2012). Além desses compostos, a torta possui inibidores de tripsina e de papaína, lectina e fitato (SAETA; SUTORNSUK, 2011; COSTA *et al.*, 2014).

A toxicidade da torta é um impedimento para seu uso como fertilizante (JONGSCHAAP *et al.*, 2007; PATOLIA *et al.*, 2007) ou na alimentação animal (MAKKAR; BECKER, 1999). Entretanto, alguns desses compostos tóxicos e/ou antinutricionais quando isolados e bem caracterizados podem ser explorados quanto às suas aplicações médicas (SUNDARI; SELVARAJ, 2011). Partes da planta de *J. curcas*, por exemplo, folhas, frutos e látex têm sido usadas na medicina popular (JONGSCHAAP *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a humanidade tem passado por sérios problemas com casos de resistência bacteriana (HUTTNER *et al.*, 2013). O uso excessivo de antibióticos presentes no mercado tem selecionado organismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis (STAPLETON; TAULOR, 2002; TURNIDGE *et al.*, 2009; WHO, 2014). A resistência de microrganismos a medicamentos representa um grande problema mundial que leva a consequências, como a elevação dos custos para o tratamento de infecções, além do crescimento do número de óbitos em decorrência das dificuldades de controle dessas infecções (HUTTNER *et al.*, 2013; AMR, 2015). A situação se agrava quando é somada à carência de novos agentes ou moléculas antimicrobianos (COSTELLOE *et al.*, 2010; COUTER *et al.*, 2015).

Alguns dos principais agentes infecciosos presentes em ambiente hospitalar são as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (sigla em inglês, MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa *Salmonella enterica* resistente à multidrogas (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina, dentre outras), responsáveis pelos principais casos de infecção no ambiente hospitalar ou não, levando a altos custos anuais com a saúde e estresses psicológicos associados a estigmas sociais (AMR, 2014; CHIU; SU; CHIU, 2004, COSGROVE *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2003; STAPLETON; TAYLOR, 2002). A resistência aos antimicrobianos existentes somada à carência de novos agentes ativos contra patógenos

causadores de infecção têm levado a uma realidade extremamente preocupante no que se refere ao aumento de óbitos em decorrência de infecções (OVERDEVEST *et al.*, 2011). Além disso, muitas classes de antibióticos apresentam modo de ação semelhante, atuando principalmente sobre a síntese da parede celular (LECLERCQ; COURVALIN, 1991). Assim, a descoberta de novos agentes que sejam capazes de atuar sobre outros alvos celulares torna-se imperativa.

Outro patógeno de ampla distribuição mundial é o protozoário *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose. Estima-se que esse microrganismo esteja presente em cerca de 1/3 da população mundial (LAMBERT; BARRAGAN, 2010). A toxoplasmose é uma doença sem muitas complicações quando no estágio crônico, mas quando transmitida via placenta pode causar muitos problemas congênitos (DOWSE *et al.*, 2005; LAMBERT; BARRAGAN, 2010) e, também, se tornar uma infecção grave em indivíduos com sistema imune comprometido (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). O tratamento da toxoplasmose é feito através da combinação de várias drogas que apresentam uma diversidade de efeitos adversos e casos de resistência do parasita (PFERFFEKORN; PFERFFEKORN, 1979; HOLMES *et al.*, 2011).

A partir da torta de *J. curcas*, foi isolada, por nosso grupo de pesquisa, uma proteína com atividade antimicrobiana, denominada *JcTI-I* (Inibidor de tripsina purificado da torta de *J. curcas*; o I está relacionado ao fato de ter sido o primeiro inibidor de tripsina purificado da torta dessa espécie). *JcTI-I* mostrou atividade contra fungos fitopatogênicos de importância agrícola (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani*) e bactérias patogênicas ao homem [*Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar *choleraesuis* (*S. choleraesuis*) e *S. aureus*] (COSTA, 2012). *JcTI-I* caracteriza-se por possuir massa molecular de 10 kDa e tratar-se de uma glicoproteína com 6,4% de carboidrato, pI de 6,6, apresentando uma sequência N-terminal (VRDICKKEAERQDLSSCENYITQRRGY) com cerca de 60% de identidade com albuminas 2S. *JcTI-I* se mostrou altamente estável ao calor, mantendo sua atividade inibitória de tripsina quase inalterada após tratamento térmico (90°C) por 2 horas e reduzindo a atividade em cerca de 8%. *JcTI-I* também apresentou estabilidade frente a diferentes concentrações de NaCl (0-3%) e pH (2,2-10), e não foi capaz de inibir quimotripsina, papaína ou  $\alpha$ -amilase (COSTA, 2012, COSTA *et al.*, 2014).

As propriedades do *JcTI-I* citadas acima suscitam seu potencial para aplicação como um provável agente antimicrobiano. Entretanto, mais estudos, particularmente com foco na sua caracterização bioquímica, são necessários para subsidiar sua utilização contra agentes

infecciosos. Assim, o presente trabalho dá ênfase à caracterização bioquímica e biológica do JcTI-I, tendo como foco principal as seguintes perguntas:

- ❖ *Que parâmetros estruturais o JcTI-I apresenta, os quais seriam capazes de colaborar para seu enquadramento em uma determinada classe de proteínas?*
- ❖ *Que propriedades cinéticas o JcTI-I possui, que sejam essenciais à definição do seu mecanismo de inibição da tripsina?*
- ❖ *Quais propriedades estruturais e cinéticas do JcTI-I poderiam corroborar com sua utilização como agente antimicrobiano?*
- ❖ *Qual seria o modo de ação do JcTI-I frente a bactérias de interesse clínico?*
- ❖ *A ação deletéria do JcTI-I é seletiva para bactérias ou essa proteína teria atividade contra outro patógeno causador de infecção no homem, como é o caso do T. gondii?*
- ❖ *O JcTI-I teria algum risco potencial de toxicidade aguda para animais superiores?*

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Jatropha curcas* L. (Pinhão-manso)

#### 2.1.1 Aspectos biológicos e importância econômica

*J. curcas* é uma planta arbustiva pertencente à família Euphorbiaceae, popularmente conhecida como pinhão manso. Essa espécie ainda pode ser conhecida por várias outras denominações, compreendendo pinhão-do-Paraguai, purgueira, pinha-de-purga, grão-de-maluco, pinhão-de-cerca, pinhão-bravo, dentre outras. É uma planta nativa da América tropical, podendo ser encontrada desde o México até a Argentina, e nas Antilhas (ARRUDA *et al.*, 2004; SATURNINO *et al.*, 2005; DRUMOND *et al.*, 2007;). A espécie também pode ser encontrada abundantemente em várias regiões tropicais e subtropicais da África e Ásia (SCHMOOK; SERRALTA-PERAZA, 1997) (FIGURA 1).

Quanto às características fenotípicas (FIGURA 2), o pinhão manso atinge entre dois e três metros de altura, seu caule, possui coloração variando de esverdeado a cinzento-castanho, é liso e macio, de lenho mole e medula desenvolvida, porém, pouco resistente. O floema apresenta longos canais, nos quais circula látex, e as raízes são curtas e pouco ramificadas. As folhas são verdes, largas e alternas, em forma de palma com 3 a 5 lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior. Trata-se de uma espécie monódica, ou seja, apresenta na mesma planta flores masculinas (em maior número) e femininas (nas extremidades das ramificações), com coloração amarelo-esverdeada (CORTESÃO, 1956). Seus frutos caracterizam-se como cápsulas ovoides, com extremidades achatadas de 2,7 cm de comprimento e 2,0 cm de largura, em média. Já a semente, é ovalada, com amêndoa rija revestida por uma película branca rica em óleo, mede entre 1,5 e 2 cm de comprimento e de 1,0 a 1,3 cm de largura e pesa entre 0,551 e 0,797 g, dependendo da variedade, dos tratos culturais etc. (PEIXOTO, 1973).

Em relação à constituição da semente, cerca de 33 a 45% corresponde à casca, o restante, entre 55 e 66%, representa a amêndoa. Cada semente contém entre 33 e 39% de um óleo incolor, inodoro e muito fluido (GINWAL *et al.*, 2004). Esse óleo pode ser usado para lustrar móveis, na produção de sabão, em indústrias de tintas ou, ainda, na produção de biodiesel (LAVIOLA; DIAS, 2008).

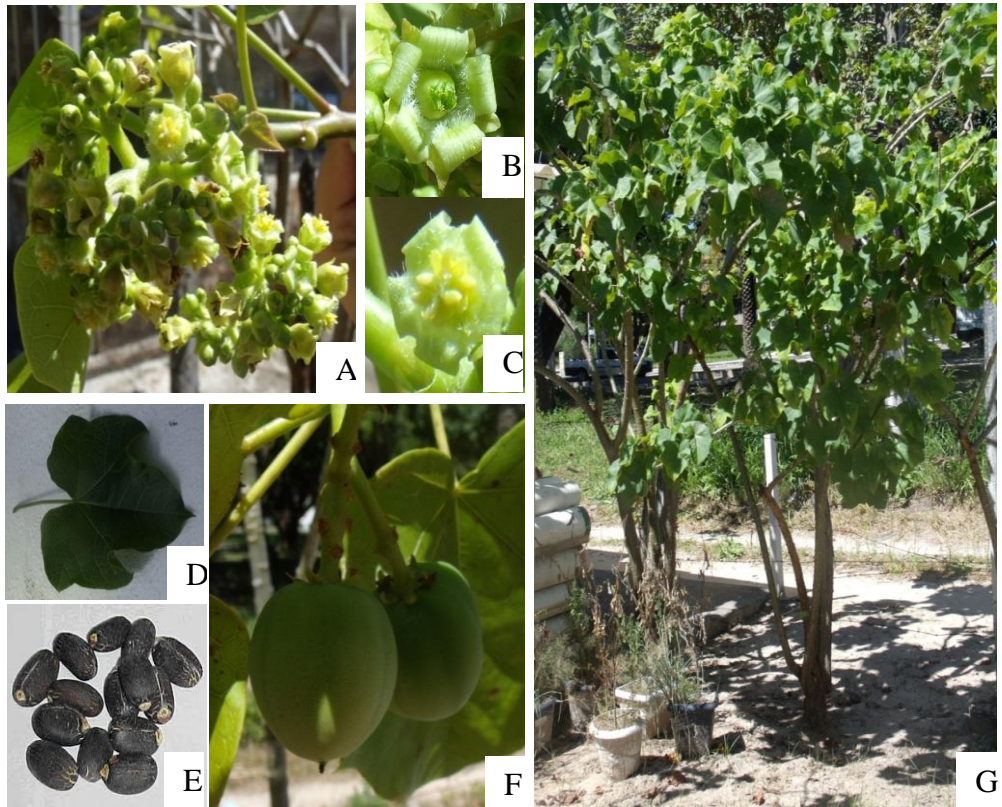
Figura 1 - Indicação global das melhores condições climáticas para o crescimento de *J. curcas* (30° N e 35° S)



Fonte: Jongschaap *et al.* (2007).



Figura 2 - *J. curcas* L. (Pinhão manso)



Fonte: Costa (2012).

Inflorescência (A), detalhes das flores feminina (B) e masculina (C), folha (D), sementes (E), frutos (F) e planta adulta de pinhão manso.

O pinhão manso também é usado como cerca viva e na recuperação de áreas degradadas, no controle da erosão e na contenção de encostas e dunas (SATURNINO *et al.*, 2005). Além disso, o pinhão manso tem se mostrado capaz de adaptar-se e sobreviver em solos contaminados por metais pesados, atuando como um fitoextrator (CHAVES *et al.*, 2010; CAMARGO *et al.*, 2013). Essa oleaginosa também se caracteriza por ser uma planta perene e altamente adaptável a condições adversas sendo, inclusive, resistente a muitas pragas e patógenos (OPENSHAW, 2000; DIAS *et al.*, 2007; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010a). É uma planta que se desenvolve bem em quase todos os tipos de solo e requer pouca irrigação, por isso, apropriada ao cultivo no semiárido (SATURNINO *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2011). Isso se deve, em parte, ao fato de suas folhas adultas suportarem altas intensidades de radiações (BAUMGART, 2007).

Levando em consideração todas as características do pinhão manso, seu cultivo visa, principalmente, a extração de óleo para a produção de biodiesel (TEIXEIRA, 1987; MAKKAR *et al.*, 1997). O pinhão manso contém vários componentes tóxicos, o que impede a sua utilização na alimentação. Assim, nos últimos anos, o pinhão manso tem recebido a atenção de organizações de pesquisa, governantes, agências de desenvolvimento internacional e indústrias localizadas nas regiões tropicais e subtropicais devido à possibilidade do uso de seu óleo na produção de biodiesel e no controle de erosão (HERRERA *et al.*, 2010).

### *2.1.2 Torta – Definição, composição e propriedades*

A torta de pinhão manso é originada da prensa das amêndoas de suas sementes sem tegumento para extração do óleo. Essa torta contém, em média, 24% de proteínas (MAKKAR; FRANCIS; BECKER, 2008), um teor proteico elevado, muito embora não tão alto como aqueles detectados em tortas de outras culturas, incluindo algodão (49,5%), soja (44%) e girassol (35%) (FRIESECKE, 1970; UZUN; PÜTÜN; PÜTÜN, 2006; GENEAU-SBARTAÏ *et al.*, 2008). Em adição, a torta de pinhão manso contém altos teores de aminoácidos essenciais, com exceção da lisina, superiores aos valores de referência para crianças de 3 a 5 anos (FAO/WHO/UNU, 2007). Essas características são um indicativo para sua utilização na dieta animal. Entretanto, as tentativas voltadas para esse fim não foram satisfatórias, dada a ocorrência de sintomatologias adversas, ocorrendo, em alguns casos, morte (GOONASEKERA *et al.*, 1995; MAKKAR; BECKER, 1999; RAKSHIT *et al.*, 2008;

ANNONGU; BELEWU; JOSEPH, 2010; BELEWU; AKANDE, 2010; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010b).

Os efeitos adversos oriundos do consumo da torta de pinhão manso são oriundos da presença de componentes tóxicos e/ou antinutricionais, incluindo ésteres de forbol, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos, inibidores de proteases, dentre outros (GOEL *et al.*, 2007; SUTORNSUK; SAETAE, 2011; ZHAO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2014). A Tabela 1 mostra alguns dos componentes tóxicos e/ou antinutricionais detectados na torta de pinhão manso. É importante salientar, entretanto, a existência de acessos de pinhão manso não tóxicos ou de baixa toxicidade. Esses acessos são minoria, alguns deles encontrados no México (MARTÍNEZ HERRERA *et al.*, 2006). Nesse caso, a torta pode ser utilizada na alimentação animal e/ou como fertilizante (JONGSCHAAP *et al.*, 2007). Além de sua utilização, a toxicidade da torta de pinhão manso dificulta seu descarte. Várias metodologias já foram testadas na tentativa de eliminar a toxicidade e, assim, agregar valor à torta. Essas tentativas incluíram meios físicos e químicos (SAETAE; SUTORNSUK, 2010; PHENGNUAM; SUTORNSUK, 2012; GUEDES *et al.*, 2014).

Os ésteres de forbol são considerados as substâncias mais tóxicas presentes no pinhão manso. Essas moléculas são indutoras da formação de tumores e estão envolvidas na resposta inflamatória (GOEL *et al.*, 2007). Os ésteres de forbol são lipossolúveis e, embora grande parte seja extraída juntamente com o óleo, vestígios de tais componentes podem estar presentes na torta (GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Assim, tem sido atribuída a denominação de “comestíveis” ou “não tóxicos” aos genótipos que apresentam baixos níveis de ésteres de forbol e de “não comestíveis” ou “tóxicos” àqueles que contêm altos teores desses compostos (HE *et al.*, 2011). Vale ressaltar que os ésteres de forbol, diferentemente de outros compostos, não são inativados por processos de detoxificação convencionais, tais como o tratamento térmico (MAKKAR; FRANCIS; BECKER, 2008).

Dentre as proteínas bioativas presentes na torta de pinhão manso, um destaque tem sido dado à curcina, uma proteína inativadora de ribossomos (RIP tipo I), apresentando massa molecular de 28,2 kDa. Essa RIP também tem sido apontada como um dos componentes responsáveis pelos efeitos tóxicos da torta de pinhão manso (LI *et al.*, 2010). A curcina foi, inclusive, utilizada em estudos contra o câncer na forma de imunoc conjugado (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010a).

Tabela 1 - Componentes antinutricionais e/ou tóxicos presentes na torta de *J. curcas*

Componente	Fonte		
	Makkar; Aderibgibe; Becker (1998)	Suntornsuk; Saetae (2011)	Costa (2012)
Lectina (UH/mg proteína) <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	13,15	3,51
Inibidor de protease cisteínica (UI/mg proteína) <sup>c</sup>	-	-	27,16
Inibidor de tripsina (UI/mg proteína) <sup>d</sup>	18,4-21,3	-	24,92
Protease (UA/mg proteína) <sup>e</sup>	-	-	0,03
Quitinase	-	-	ND <sup>f</sup>
Toxina	-	-	ND
Urease	-	-	ND
Saponina (µg de equivalentes de diosgenina/g de massa seca)	2,0-3,4	2,04	-
Fitato (% p/p)	7,2-10,1	8,55	-
Éster de forbol (mg/g de massa seca)	0,11-2,79	0,73	-

<sup>a</sup>Uma unidade de hemaglutinação (UH) correspondente ao valor recíproco da maior diluição na qual ainda se visualiza aglutinação de eritrócitos. O resultado expresso foi obtido com eritrócitos de coelho tratados com tripsina.

<sup>b</sup>Não determinado.

<sup>c</sup>Uma unidade de atividade antipapainásica (UI) corresponde à quantidade de inibidor que diminui a atividade da papaína em 0,01 da absorbância a 540 nm.

<sup>d</sup>Uma unidade de inibição de atividade tripsínica (UI) corresponde à quantidade de inibidor que reduz a atividade da tripsina em 0,01 da absorbância a 410 nm.

<sup>e</sup>Uma unidade de atividade proteolítica (UA) equivale à quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a pH 5,6.

<sup>f</sup>Não detectado.

Na torta de pinhão manso também foi observada atividade hemaglutinante, passível de inativação pelo tratamento térmico, atribuída à presença de lectina (CANO-ASSELEIH; PLUMBLEY; HYLANDS, 1989; MARTÍNEZ-HERRERA *et al.*, 2006). Adicionalmente, atividade inibitória de tripsina foi encontrada (GOONASEKERA *et al.*, 1995; MAKKAR; BECKER, 1999; MARTÍNEZ-HERRERA *et al.*, 2006; MAKKAR; FRANCIS; BECKER, 2008; RAKSHIT *et al.*, 2008; ANNONGU; BELEWU; JOSEPH, 2010; BELEWU; AKANDE, 2010; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010b). Essas biomoléculas também são apontadas como importantes fatores antinutricionais.

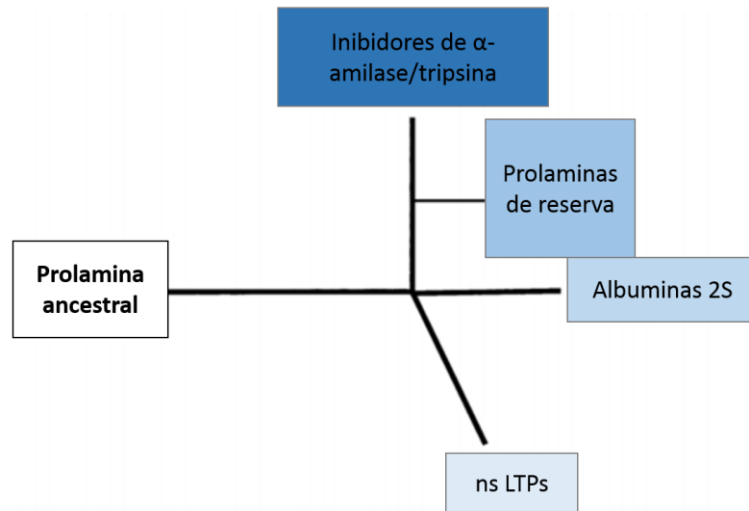
Embora a torta de pinhão manso, em geral, tenha se mostrado inadequada para o consumo animal, esse resíduo pode representar uma fonte de moléculas bioativas, com potencial de aplicação particularmente na saúde (SUNDARI; SELVARAJ, 2011; COSTA *et al.*, 2014, SOARES *et al.*, 2015). Exemplos desses compostos compreendem peptídeos cíclicos com potencial uso farmacêutico, tais como jatroidina (atividade antifúngica) e curcacidiclina (atividade antimalárica) (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010a).

## **2.2 Albuminas 2S – Uma classe de proteínas abundante nos vegetais**

Albuminas 2S são proteínas de reserva encontradas em sementes de dicotiledôneas, pertencentes à superfamília das prolaminas (FIGURA 3), grupo ao qual também pertencem os inibidores de  $\alpha$ -amilase/tripsina, as prolaminas e proteínas transferidoras de lipídios não específicas (ns LTPs) (KREIS *et al.*, 1985). Essas proteínas foram inicialmente definidas com base no seu coeficiente de sedimentação, de aproximadamente 2, o que deu origem ao nome do grupo (YOULE; HUANG, 1981).

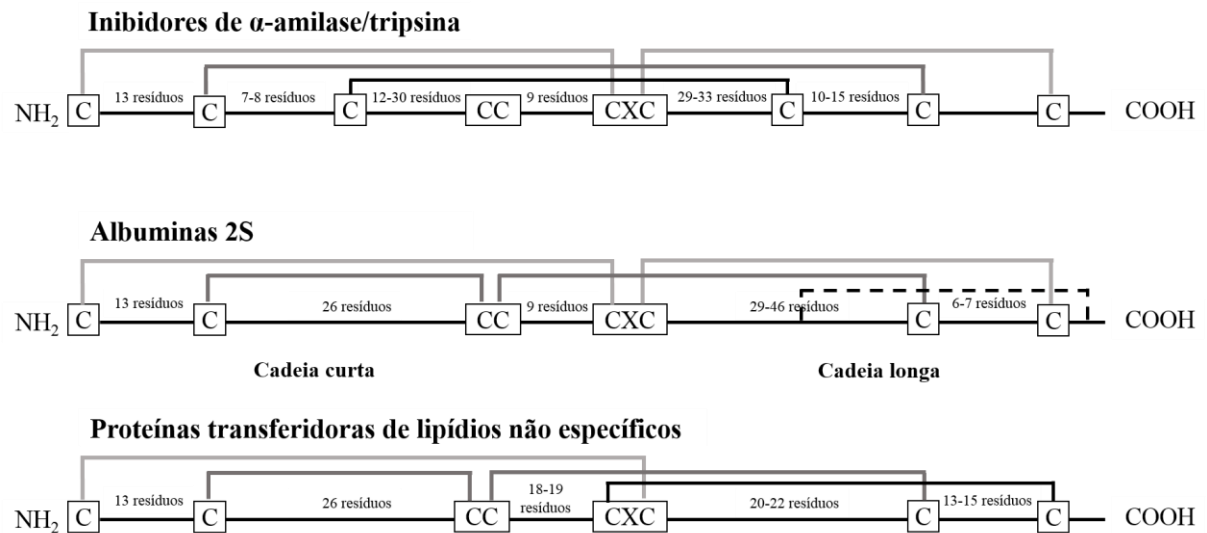
As albuminas 2S são consideradas proteínas estruturalmente homólogas, tipicamente heterodiméricas (compostas por subunidades de aproximadamente 3 kDa e 9 kDa) e globulares. Apresentam um esqueleto composto por resíduos de cisteína conservados, típicos dos membros da superfamília das prolaminas, os quais formam quatro pontes dissulfeto intermoleculares, mantendo as duas subunidades unidas e contribuindo para a estabilidade e compacidade da molécula (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995; MILLS *et al.*, 2004). Nas albuminas 2S, três regiões (A, B e C) são conservadas. A região A está presente na subunidade menor, enquanto as regiões B e C ocorrem na subunidade maior (SHEWRY; TATHAM, 1990). Nessas regiões, são encontrados os motivos Cys-Cys e Cys-X-

Figura 3 - Evolução dos membros da superfamília das prolaminas



Adaptado de: Mills *et al.* (2004).

Figura 4 - Esqueleto representando os resíduos de cisteína conservados na estrutura primária de proteínas da superfamília das prolaminas



Fonte: Adaptado de Mills *et al.* (2004).

Representação diagramática das pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de cisteína. Linha pontilhada indica uma ponte dissulfeto putativa.

Cys, os quais estão envolvidos na formação das pontes dissulfeto, onde X representa qualquer qualquer outro resíduo de aminoácido (FIGURA 4). As albuminas 2S apresentam dobramento incluindo, pelo menos, quatro  $\alpha$ -hélices, estabilizadas por pontes dissulfeto (MURZIN, 1998).

Em relação à síntese das albuminas 2S, a maioria delas é sintetizada como uma única cadeia polipeptídica de 10 a 15 kDa que, posteriormente, sofre mudanças pós-traducionais, com conseqüente formação das duas subunidades (maior e menor). A proteína precursora apresenta um peptídeo sinal, além de seqüências que serão perdidas durante o processo pós-traducional. Entretanto, os resíduos de cisteína são conservados (MILLS *et al.*, 2004). Outra característica importante dessas proteínas é a presença de vários resíduos de metionina fazendo parte de sua composição (NORDLEE *et al.*, 1996).

As albuminas 2S exibem diversas atividades biológicas, dentre elas estão a inibição de proteinases (tripsina, quimotripsina e subtilisina) (SVENDSEN *et al.*, 1989, 1994; GENOV *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2014), antibacteriana (COSTA *et al.*, 2014), antifúngica (FREIRE *et al.*, 2015), DNásica (TOMAR *et al.*, 2014a,b), ribonucleásica (FANG *et al.*, 2010; TOMAR *et al.*, 2014a) e alergênica (PASTORELLO *et al.*, 1998; MILLS *et al.*, 2003).

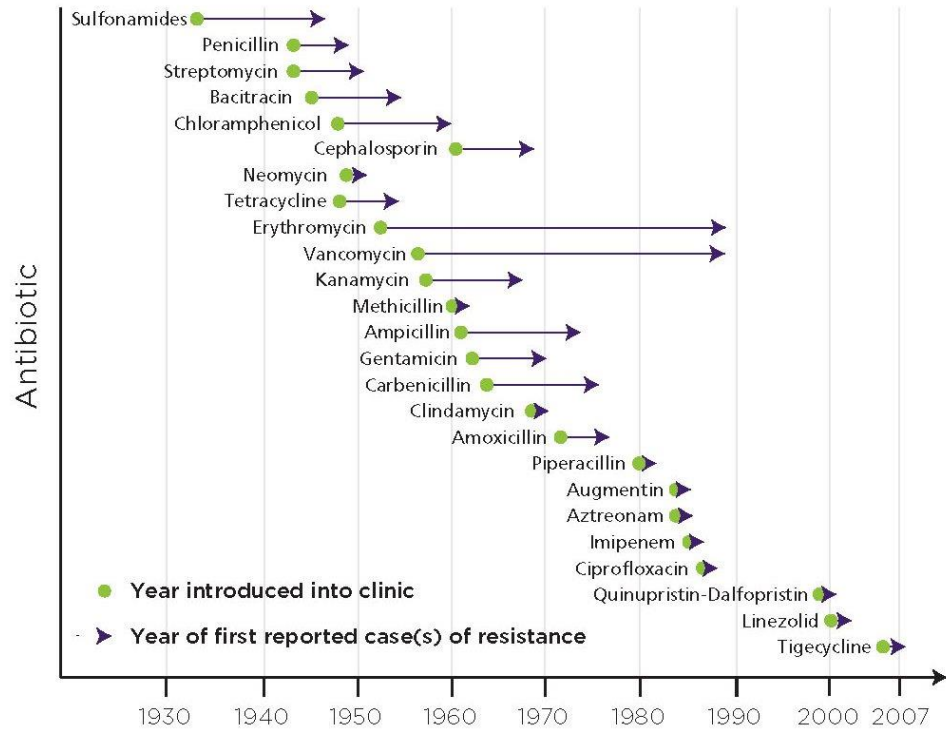
### 2.3 Antibióticos - Propriedades e desafios

Agentes antimicrobianos são usados no tratamento e prevenção de infecções (WHO, 2014), entretanto, bactérias e outros patógenos podem resistir a essas drogas usadas no seu combate (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA *et al.*, 2011). Isso tem se tornado um problema crescente, pois a descoberta de novas drogas diminuiu drasticamente, enquanto o surgimento de organismos resistentes aumentou vertiginosamente (FIGURA 5). Dentre os microrganismos preocupantes quanto à resistência, destacam-se as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BOUCHER *et al.*, 2013; AMR REVIEW PAPER, 2015; HUTTNER *et al.*, 2015).

A resistência a antibióticos é um problema mundial (WHO, 2014). Fleming, o descobridor da penicilina, já alertava para a possibilidade de surgimento de bactérias resistentes a esse antibiótico, mesmo em laboratório, caso a exposição ocorresse em concentrações não suficientes para matar tais agentes (FLEMING, 1945). Nos últimos anos, cerca de 2 milhões de pessoas foram infectadas por bactérias resistentes a antibióticos e, pelo menos, 25.000 morreram por ano resultante dessas infecções. Além disso, a resistência a antibióticos tem elevado os custos com a saúde (SMITH; COAST, 2013). Esse cenário tem



Figura 5 - Linha do tempo de resistência para os principais antibióticos



*Note: Some of the dates are estimates only.*

Fonte: Pray (2008).

levado ao receio de um futuro “pré era dos antibióticos”, onde uma simples infecção poderá ser fatal (DAVIES, 2013; CARS; NATHAN, 2014).

O surgimento de linhagens resistentes é devido, em parte, ao uso inadequado de antibióticos (ARIAS; MURRAY, 2009; PHARMD, 2015) (FIGURA 6). Na medicina humana, os antibióticos são utilizados indiscriminadamente no tratamento de infecções; por exemplo, 80-90% das infecções respiratórias na Europa são tratados com prescrição de antibióticos (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL; CENTER FOR DISEASE CONTROL RESISTANCE, 2014). Além disso, há a automedicação, que se caracteriza pelo mau uso ou uso exagerado de antibióticos (ARIAS; MURRAY, 2009).

Outro fator importante para o surgimento de bactérias resistentes é a utilização de antibióticos na produção de alimentos. Sua utilização em baixos níveis tem como finalidade promover o crescimento rápido dos animais e em altas concentrações é usado na “metafilaxia”, uma forma de tratamento que permite tratar os que estão doentes e prevenir as doenças nos animais sadios que tiveram contato com aqueles já clinicamente doentes (MATHEW *et al.*, 2007; HUTTNER *et al.*, 2013).

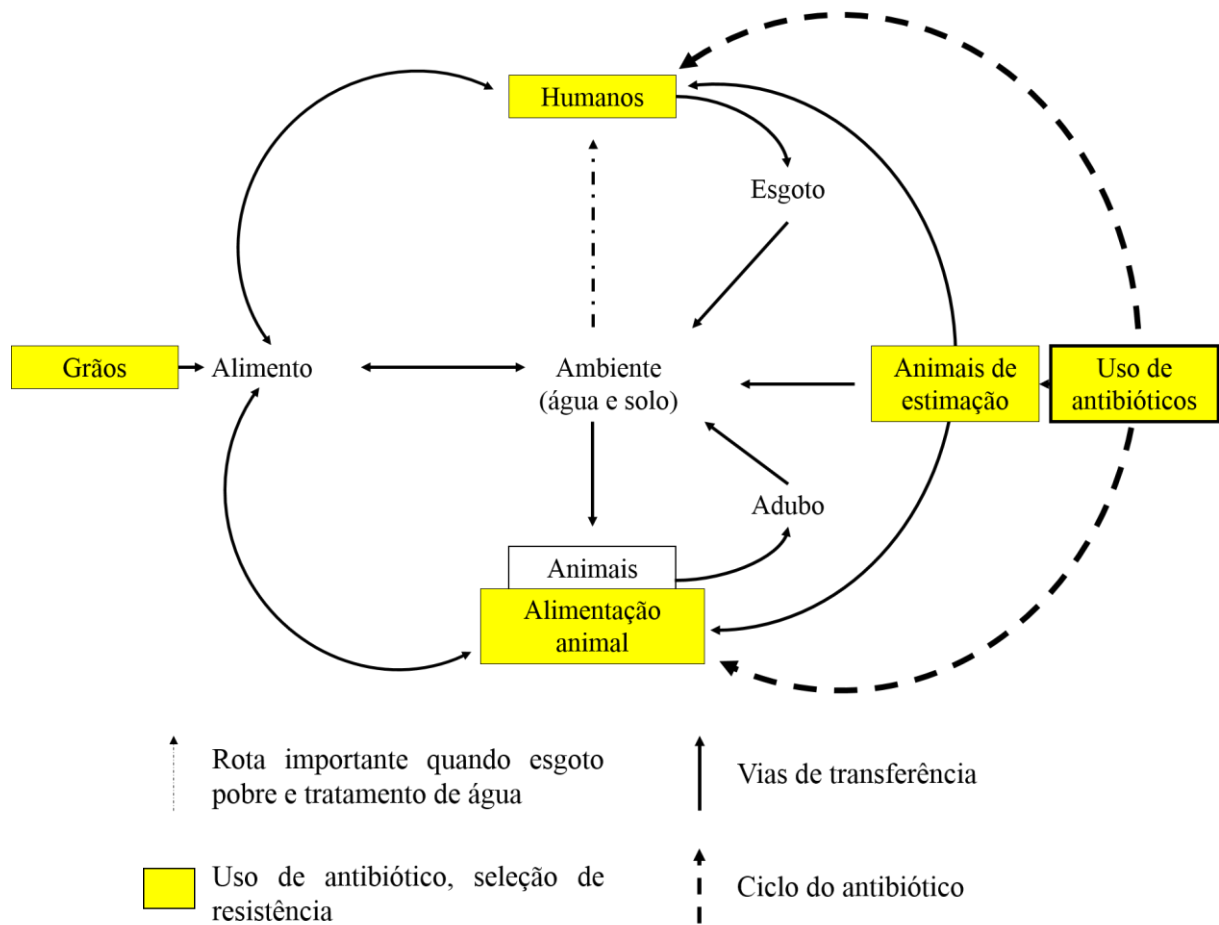
A resistência microbiana causa um atraso na administração do tratamento adequado, além de limitar a viabilidade da terapia (COSGROVE; CARMELI, 2003). Nesse contexto, busca-se além do controle de uso de antibióticos em humanos e animais, a descoberta de novos agentes antimicrobianos como novas alternativas no tratamento de infecções e na aquisição de antibióticos de segunda linha (COSTELLOE *et al.*, 2010).

## **2.4 Exemplos de patógenos causadores de infecções no homem**

### *2.4.1 Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é uma bactéria Gram positiva na forma cocos, suas células podem ocorrer sozinhas ou, quando em divisão, como células não separadas aos pares, tétrades ou na forma de “cachos de uva”. Essa bactéria coloniza naturalmente o homem, podendo ser encontrada na pele e no trato respiratório superior, particularmente nas passagens nasais, correspondendo a um dos mais importantes patógenos do homem (STAPLETON; TAYLOR, 2002; WHO, 2014). Algumas linhagens de *E. coli* são capazes, ainda, de produzir fatores tóxicos, causadores de sintomas específicos, incluindo a síndrome do choque tóxico (WHO,

Figura 6 - Principais vias de transferência de genes de resistência em humanos, animais, alimentos e ambiente



Fonte: Adaptado de Hawkey (2015).

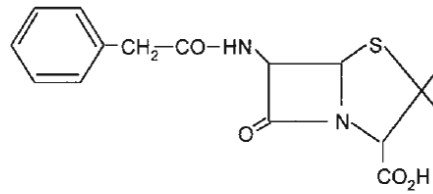
2014). Outras infecções graves também causadas por *S. aureus* incluem a pneumonia, sepse e endocardite infecciosa (SALGADO-PABÓN; SCHLIEVERT, 2014).

O tratamento de infecções causadas por *S. aureus* era feito, primeiramente, com o uso da penicilina (benzilpenicilina), um antibiótico  $\beta$ -lactâmico. Porém, nas décadas de 40-50, casos de resistência a esse antibiótico foram registrados. A resistência decorre da produção de enzimas, chamadas  $\beta$ -lactamases, pela bactéria, capazes de inativar o antibiótico. Isso levou à síntese de derivados da penicilina resistentes à hidrólise por  $\beta$ -lactamases. Um desses derivados, é a meticilina, uma molécula que contém o grupo fenol, também presente na benzilpenicilina, porém com grupos metoxi ligados a ele (FIGURA 7). Esses grupos metoxi diminuem a interação com as  $\beta$ -lactamases (STAPLETON; TAYLOR, 2002). Entretanto, logo depois da introdução da meticilina no tratamento de infecções por *S. aureus*, linhagens resistentes (MRSA) já foram identificadas (BARBER, 1961; JEVONS, 1961; ROLINSON, 1961).

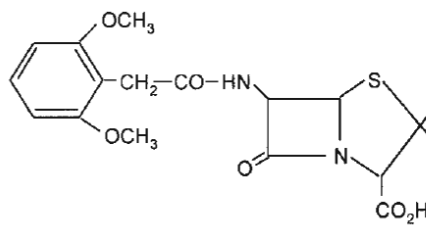
Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos agem sobre a parede celular bacteriana, interferindo em sua biossíntese e estrutura. Seu efeito bacteriostático resulta de interações e concomitantes inibições de enzimas (transpeptidases e carboxipeptidases) envolvidas nos estágios finais da biossíntese dos peptidoglicanos. O efeito bactericida é devido a um segundo passo seguindo a inibição da divisão celular e do crescimento, no qual há a ativação de um sistema autolítico que leva à morte celular (LECLERCQ; COURVALIN, 1991; WILLIAMSON; COLLATZ; GUTMAN, 1986). As linhagens de MRSA não dependem da síntese das  $\beta$ -lactamases e sim da expressão das proteínas ligantes à penicilina (PBP), que induzem à resistência ao antibiótico (SELIGMAN, 1966). As PBP evoluíram de proteases serínicas e sua atividade é mecanisticamente semelhante à dessas proteases (PAUL *et al.*, 2010; ROUZIC *et al.*, 2010).

MRSA são os patógenos mais comuns em infecções humanas e estão amplamente espalhados no mundo (TURNIDGE *et al.*, 2009). O tratamento de infecções por MRSA é feito, principalmente, com vancomicina. No entanto, esse antibiótico apresenta limitações, incluindo uma pouca penetração no tecido, lento efeito bactericida e emergência de resistência durante terapia. Outros aspectos importantes são o fato do tratamento com vancomicina prolongar a estadia no hospital e expor o paciente a complicações associadas à toxicidade renal (CEPEDA *et al.*, 2004; SCHRENZEL *et al.*, 2004). As consequências da monoterapia com vancomicina são altas taxas de hospitalização (CHAN *et al.*, 2012), falhas no tratamento (CHANG *et al.*, 2003) e mortalidade (KHATIB *et al.*, 2006; SCHWEIZER *et al.*, 2011). Por isso, um segundo agente é utilizado, a fim de suprir as deficiências da vancomicina. Entre

Figura 7 - Estruturas químicas dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, benzilpenicilina e meticilina



**Benzilpenicilina**



**Meticilina**

Fonte: Stapleton; Taylor (2002).

esses agentes, podem ser citados a daptomicina e linezolida (DAVIS; VAN HAL; TONG, 2015; WHO, 2014). Em casos mais graves, é feita a combinação da vancomicina com um antibiótico  $\beta$ -lactâmico, como nafcilina e cefazolina (CALFEE *et al.*, 2014; DAVIS; VAN HAL, TONG, 2015). As terapias citadas não são totalmente eficazes e, assim, ainda se busca novas alternativas para a prevenção e tratamento de infecções por MRSA, incluindo novas drogas e produção de uma vacina (SALGADO-PABÓN; SCHLIEVERT, 2014).

#### 2.4.2 *Salmonella enterica*

*Salmonella* são bactérias Gram-negativas, móveis, anaeróbias facultativas, bacilo intracelular. Infecções por *Salmonella* ssp. são um dos principais problemas de saúde em humanos e outros animais.. As principais manifestações clínicas de infecções causadas por bactérias do gênero são: enterocolitis, bacteremia, febre entérica, e, em alguns casos, um estado assintomático. Caracterizadas por uma diarreia e inflamação gastrointestinal até uma infecção sistêmica com altas taxas de letalidade (PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2010). A *Salmonella* após ser ingerida através de alimentos contaminados passa do estômago para o intestino, se ligando à sua parede. O mecanismo de patogênese da bactéria é bem similar ao do *Vibrio cholerae*, causando diarreia secretória devido a indução de secreção de cloreto (GIANELLA *et al.*, 1975).

O número de infecções por bactérias do gênero tem sido crescente nos últimos anos. No final dos anos 90, cerca de 2 a 3 milhões de pessoas foram infectadas, causando entre 500 e 2000 mortes, só nos Estados Unidos. Em 2010, o número de pessoas infectadas atingiu cerca de 10 milhões de pessoas no mundo (MAJOWICZ *et al.*, 2010) e 378 mortes anuais nos Estados Unidos (SCALLAN *et al.*, 2011).

*Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo *choleraesius* é um sorotipo altamente invasivo entre os de *Salmonella* não-tifóide, geralmente causador de sepse ou infecções extra-intestinais focais em humanos (CHIU *et al.*, 2005). Suas infecções têm se tornado particularmente difíceis de tratar devido ao aparecimento de cepas resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos (CHIU *et al.*, 2005, 2004, 2002). O genoma da bactéria foi sequenciado, a fim de se identificar e investigar os fatores de virulência, especificidade ao hospedeiro e mecanismo de resistência antimicrobiana, o qual envolve deleção de genes e alternâncias de sequências (CHIU *et al.*, 2005).

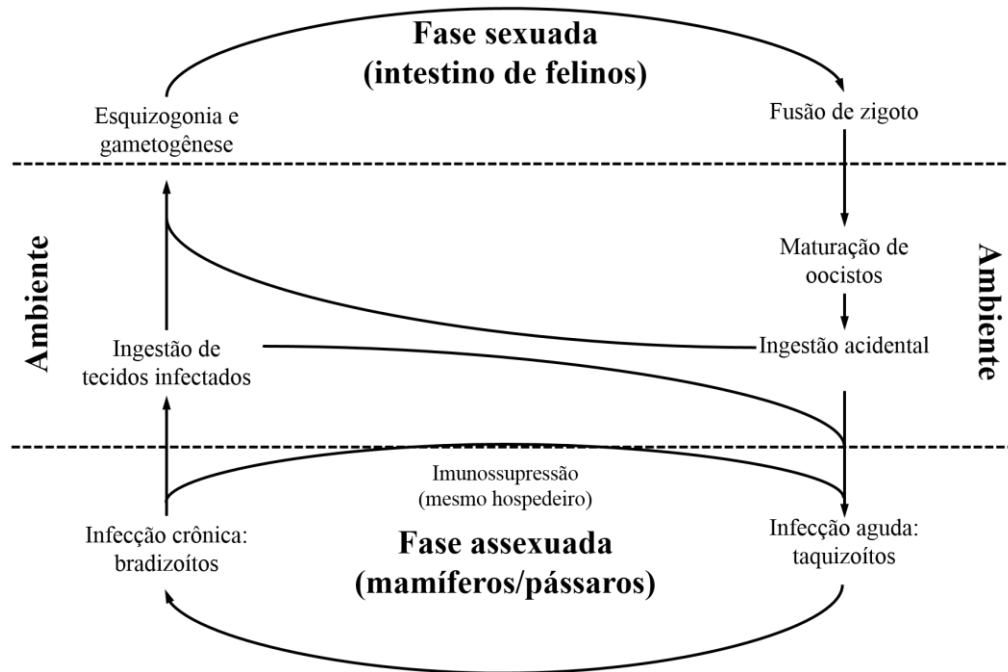
### 2.4.3 *Toxoplasma gondii*

Parasitas são organismos encontrados em praticamente todos os nichos, incluindo uma sobrevivência intracelular, como é o caso dos protozoários. O *T. gondii* é um protozoário capaz de infectar muitos mamíferos e aves em todo o mundo, acometendo cronicamente 1/3 da população mundial (DUBEY, 2010; LAMBERT; BARRAGAN, 2010). Esse parasita intracelular obrigatório foi isolado primeiramente do roedor *Ctenodactylus gundi*, encontrado na Tunísia, Norte da África (NICOLLE; MANCEAUX, 1908). Esse roedor deu origem ao nome da espécie; o gênero é derivado do grego *toxon* (arco) e *plasma* (molde) devido ao seu formato encurvado e crescente (SOUZA *et al.*, 2010). No Brasil, ele foi encontrado originalmente em coelho (SPLENDORE, 1908).

O ciclo de vida do *T. gondii* apresenta uma fase assexuada (presente na maioria dos animais, incluindo o homem) e outra, sexuada (apenas em felídeos) (FIGURA 8). Dentro desse ciclo, o protozoário apresenta três formas infectivas: taquizoítos, bradizoíto e esporozoíto (oocistos) (DUBEY; LYNDSEY; SPEER, 1998; BLADER; SAEIJ, 2009). Taquizoítos apresentam alta taxa de proliferação, levando à resposta inflamatória no hospedeiro. Essa forma também é responsável pela transmissão via placenta (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Bradizoítos são resultantes de diferenciações de taquizoítos sob pressão do sistema imunológico. Essa forma infectiva apresenta multiplicação lenta e metabolismo baixo e é capaz de formar cistos teciduais ou tissulares (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Esses cistos podem ser encontrados no sistema nervoso central e tecidos musculares esquelético e cardíaco, podendo permanecer toda a vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória. Os cistos também são fonte de contaminação do homem quando ingeridos na carne malcozida de animais contaminados, pois são resistentes às enzimas presentes no suco gástrico (DUBEY; FRENKEL, 1976).

A fase sexuada ocorre apenas em felídeos; o gato doméstico é o hospedeiro mais provável. O ciclo tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivorismo. Após a ingestão dos cistos, ocorrem vários ciclos sucessivos, bastante complexos, que resultam na geração de micro e macrogomantes, cuja fusão resulta os oocistos, eliminados nas fezes e disseminados no ambiente, capazes de infectar mamíferos e aves (BOYER; McLEOD, 2007).

Figura 8 - Ciclo de vida do protozoário *T. gondii*



Fonte: Adaptado de Black; Boothroyd (2000).



Estes esporozoítos, no aparelho digestivo, dá origem aos taquizoítos na fase aguda da infecção (SOUZA *et al.*, 2010). A infecção por *T. gondii* raramente leva a complicações da saúde, mas em indivíduos com imunidade comprometida (AIDS, neoplasias, transplantados), o parasita pode causar doenças e mesmo a morte (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Além disso, a infecção por *T. gondii* pode causar defeitos congênitos graves (DOWSE *et al.*, 2005).

A invasão do hospedeiro pelo protozoário ocorre de forma ativa e rápida. Durante sua internalização, o protozoário passa por uma constrição na membrana plasmática do hospedeiro (HIRAI; HIRATO; YANAGAWA, 1966). Essa invasão é iniciada pela adesão do parasita, através de sua região apical, seguida por invaginação da membrana celular do hospedeiro, formando um vacúolo que o circunda, chamado de vacúolo parasitóforo (JONES; YEH; HIRSCH, 1972; NICHOLS; O'CONNOR, 1981). O parasita modifica o vacúolo parasitóforo secretando proteínas no interior do espaço vacuolar, tornando-o metabolicamente ativo para o crescimento do parasita. Isso o protege da acidificação e da fusão de lisossomos (JONES; HIRSCH, 1972; SIBLEY; WEIDNER; KRAHENBUHL, 1985).

O tratamento da toxoplasmose se dá durante a fase aguda, combinando peritramicina e sulfadiazina ou clindomicina. Essas drogas também são usadas no tratamento de infecções causadas por outros protozoários, porém apresentam diversos efeitos colaterais (HOLMES *et al.*, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

- ❖ Proceder com a caracterização estrutural e cinética da proteína com atividade inibitória de tripsina purificada da torta de *J. curcas* (*JcTI-I*);
- ❖ Conhecer o potencial de uso do *JcTI-I* contra patógenos causadores de infecções no homem, dando ênfase à investigação do seu modo de ação antibacteriana e avaliação de sua atividade contra o protozoário *T. gondii*, agente causador da toxoplasmose.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar o efeito de agente redutor sobre a estrutura do *JcTI-I*;
- ❖ Identificar possíveis sítios funcionais do *JcTI-I*;
- ❖ Determinar a estrutura secundária do *JcTI-I*;
- ❖ Propor um modelo representativo da estrutura do *JcTI-I*;
- ❖ Propor o mecanismo de inibição do *JcTI-I*;
- ❖ Realizar testes de atividade do *JcTI-I* contra as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Salmonella enterica*, visando à constatação de sua atividade antibacteriana após o processo de purificação e determinação da concentração inibitória mínima (CIM);
- ❖ Identificar o modo de ação antibacteriana do *JcTI-I*, usando como modelo *S. aureus* e *Salmonella enterica*;
- ❖ Avaliar a ação do *JcTI-I* sobre o ciclo de vida do protozoário *T. gondii*;
- ❖ Avaliar o risco do uso do *JcTI-I* para animais superiores.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 *Torta de J. curcas*

A torta oriunda da prensa das sementes de *J. curcas*, no processo de extração do óleo à temperatura ambiente, foi fornecida pelo Instituto Fazenda Tamanduá, localizado no município de São João do Bonfim, Paraíba.

#### 4.1.2 *Bactérias*

As bactérias patogênicas Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25923) e Gram-negativa (*Salmonella enterica* subespécie *entérica* serovar *choleraesuis* - ATCC 14028) foram fornecidas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia do Departamento de Biologia da UFC, mantidas em meios de cultura estéreis (ágar nutriente). As bactérias foram crescidas por 24 horas em estufa a 37 °C e acondicionadas em geladeira a 4 °C, no Laboratório de Toxinas Vegetais.

#### 4.1.3 *Célula hospedeira e parasita*

As células Vero e o parasita *Toxoplasma gondii* foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.

#### 4.1.4 *Reagentes químicos*

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido tricloroacético (TCA), albumina sérica bovina (BSA), *Coomassie Brilliant Blue* G-250, acetonitrila, *N-α*-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA), azocaseína, inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (tipo I-S), papaína, trizma-base, ditioneitol (DTT) e iodoacetamida (IAA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (USA).

Os marcadores de massa molecular e matrizes cromatográficas foram obtidos da GE Healthcare Life Science (USA).

Kits e placas de cristalização foram adquiridos da Hampton Research (USA).

Meio DMEM 1152 (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), tripsina, soro fetal bovino (FBS), estreptomicina, tripsina, azocaseína, fosfato de sódio, formaldeído, tris hidroximetil aminometano, triton X-100, isotiocianato de fluoresceína (FITC), carbonato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), albumina sérica bovina (BSA), inibidor de tripsina de soja (SBTI), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e iodeto de propídio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA).

Matrizes cromatográficas foram obtidas da GE Healthcare Life Science (Reino Unido).

Os meios de cultura ágar nutriente, ágar Mueller Hinton e caldo Mueller Hinton foram adquiridos da Himedia (Índia).

DNase I recombinante, livre de RNase foi adquirida da Roche (Alemanha).

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## **4.2 Métodos**

### ***4.2.1 Processamento da torta de *J. curcas****

A torta de *J. curcas* (200 g) foi inicialmente macerada utilizando-se cadinho de porcelana e, posteriormente, triturada em moinho de café, para obtenção de uma farinha fina a fim de possibilitar a extração de proteínas. Posteriormente, a delipidação da farinha foi realizada utilizando *n*-hexano, na proporção de 1:3 (m/v), até remoção total dos lipídios. Em seguida, o solvente foi evaporado em capela de exaustão à temperatura ambiente. A farinha delipidada foi acondicionada em recipientes plásticos hermeticamente fechados a 4 °C.

### ***4.2.2 Extração e purificação do *JcTI-I****

*JcTI-I* foi purificado a partir da torta de *J. curcas*, seguindo a metodologia descrita por Costa *et al.* (2014) (FIGURA 9). A farinha delipidada da torta de *J. curcas* foi posta em contato com tampão borato de sódio 0,1 M, pH 10,0 na proporção de 1:10. A mistura foi agitada por 4 horas a 4 °C e, posteriormente, filtrada em pano de trama fina. O filtrado foi

centrifugado a 10.000 x g, 4 °C, por 30 minutos, e o sobrenadante dialisado (*cut off* de 12 kDa) contra tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 e submetido à precipitação proteica com ácido tricloroacético (TCA) 2,5%. O material foi, então, deixado em repouso por 30 minutos a 4 °C e, em seguida, centrifugado a 10.000 x g, 30 minutos, 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise contra água destilada, por 14 horas. O sobrenadante dialisado foi liofilizado, ressuspendido (30 mg) em 6 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,2 M e aplicado na matriz de tripsina-Sepharose 4B, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após percolação da coluna com o próprio tampão de equilíbrio para remoção das proteínas não retidas, foi aplicada uma solução tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6. A fração retida na cromatografia de afinidade foi dialisada contra água destilada e liofilizada. Esse material foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,2 M, e submetido à cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephacryl S-200 acoplada ao ÄKTA Prime, previamente equilibrada com esse mesmo tampão.

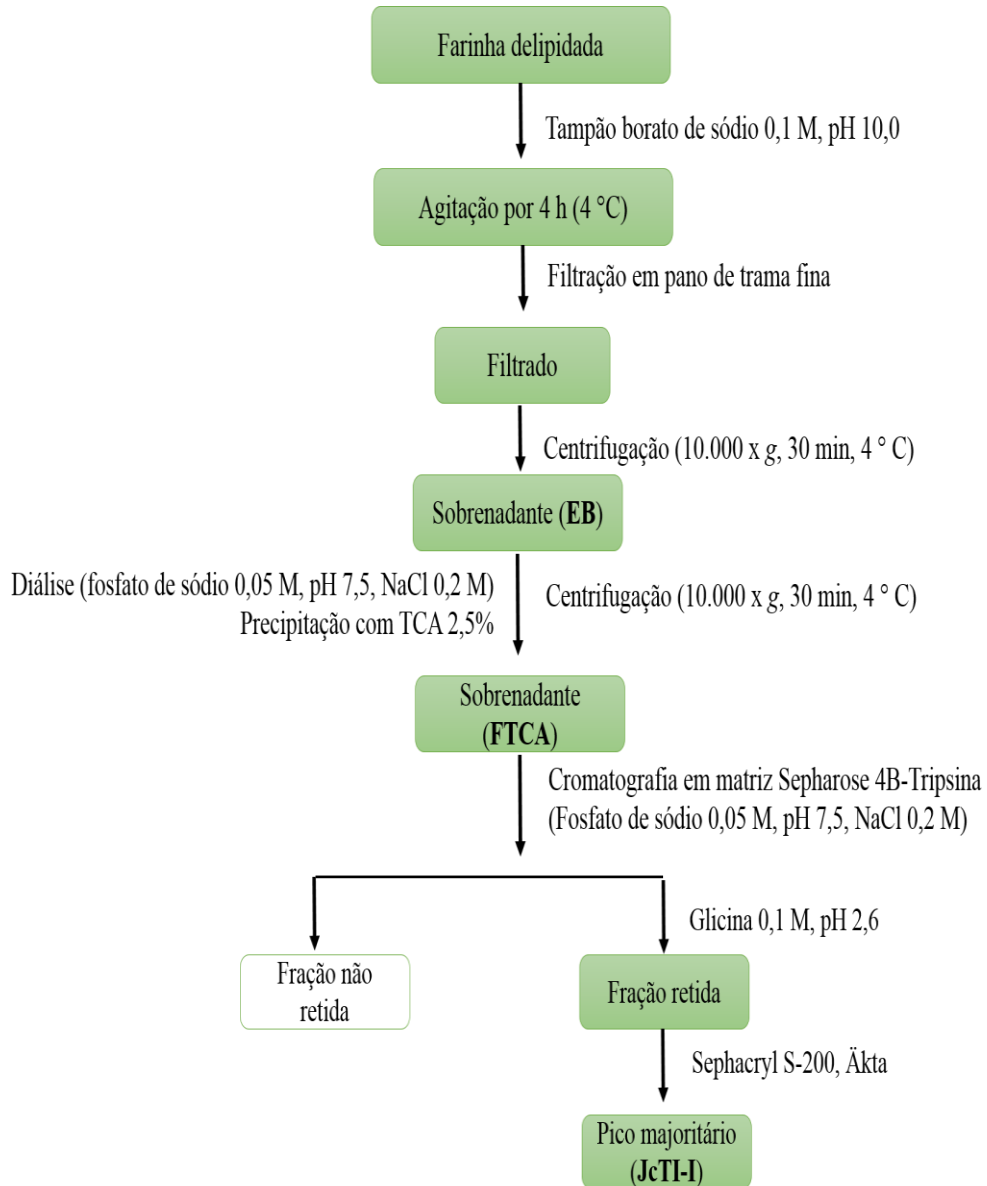
#### ***4.2.3 Dosagem de proteínas solúveis***

A dosagem de proteínas solúveis foi feita pelo método de Bradford (1976). A uma alíquota de 100 µL da amostra teste, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi levemente agitada e após 10 minutos foram realizadas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteína foi estimada em relação a uma curva padrão obtida utilizando diferentes concentrações de BSA.

#### ***4.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida***

Eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada ao uso de placas. Para a montagem das placas, foram usados gel de aplicação, encerrando 3,5% de acrilamida e 1% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e gel de separação contendo 12,5% de acrilamida e 1% de SDS em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 1% de SDS, 20% de glicerol e traços de azul de bromofenol) e acrescidas ou não de β-mercaptoetanol 1%. Em seguida, as mesmas foram aquecidas a 100 °C, durante 10 minutos, e centrifugadas a 10.000 x g, por 5

Figura 9 - Esquema de extração e purificação do JcTI-I



minutos, à temperatura ambiente. Alíquotas de cada amostra foram aplicadas em poços e a corrida foi conduzida a uma corrente de 20 mA, por aproximadamente 2 horas. A coloração das bandas proteicas foi feita utilizando Coomassie G-250 (*Blue Silver*) (CANDIANO *et al.*, 2004). Já o descoramento do gel foi feito com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v).

(BLUM *et al.*, 1987). Como padrões de massa molecular foram usados fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e 2-lactoalbumina (14,4 kDa). A massa molecular aparente das amostras foi estimada a partir de uma curva padrão construída com os Rfs dos marcadores de massa molecular utilizados.

#### **4.2.5 Espectrometria de massas**

*JcTI-I-I* (0,1 mg/mL) foi dissolvido em solução de água/acetonitrila (1:1, v/v). *JcTI-I-I* foi analisado tanto em sua forma íntegra como reduzida. Para redução, 50 µL da solução de *JcTI-I-I* foram aquecidos por 15 minutos a 80 °C. Após isso, foram adicionados 2,5 µL de DTT 0,1 M, seguido do aquecimento a 60 °C, por 20 minutos, e posterior adição de 2,5 µL de iodoacetamida 0,3 M, protegendo da luz. Os espectros de massa do *JcTI-I* foram adquiridos pelo instrumento Synapt G1 HDMS Acquity UPLC (Waters Co., Milford, MA, EUA). O deslocamento RF (MS perfil) do quadrupolo foi ajustado para que os dados de CL/MS fossem efetivamente adquiridos, de relação m/z de 400 a 3000, assegurando a obtenção de íons com múltiplas cargas. As análises foram feitas utilizando NanoLockSpray como fonte de ionização, operando no modo de íon positivo (ESI). Para todas as análises, o espectrômetro de massas foi operado no modo "V" com poder de resolução de, no mínimo, 1000. Na deconvolução do espectro, foi utilizado o princípio de otimização de entropia máxima (MaxEnt).

*JcTI-I* reduzido (0,1 mg/mL) foi submetido à digestão com 20 µL de uma solução de tripsina (Promega) em bicarbonato de amônio (Sigma), na proporção 1:100 (enzima:proteína), por 14 horas, a 37 °C. Ao final desse processo, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g, por 30 minutos, a 6 °C e o sobrenadante coletado para ser analisado por cromatografia líquida capilar/espectrometria de massas em tandem, ionização do tipo nanoeletrospray (ESI-LC-MS/MS), usando o mesmo equipamento descrito acima. A separação da amostra foi realizada em coluna C18 (75 µm x 10 cm), sob um fluxo de 0,35

$\mu\text{L}/\text{minuto}$ . Os três picos principais foram submetidos a MSMS e os espectros de massa foram obtidos utilizando a função DDA (*Data Dependent Acquisition*). As fases móveis A e B consistiram em ácido fórmico 0,1% em água e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila, respectivamente. A coluna foi previamente equilibrada com 3% da solução A e as condições de gradiente usadas foram as seguintes: 2-40% da solução B por 20 minutos, 40-70% de B por 40 minutos, 70% de B até 50 minutos e 70-3% de B por 10 minutos. Os espectros de íons resultantes foram coletados, processados e analisados utilizando o programa *Protein Lynx Global Server* (Waters Co., Milford, MA, USA) e as buscas foram realizadas assumindo o máximo de uma perda pela clivagem com tripsina, que os peptídeos eram monoisotópicos e os resíduos de metionina estavam parcialmente oxidados e os de cisteína completamente carboximetilados.

#### **4.2.6 Determinação da sequência primária e de parâmetros relacionados**

A estrutura primária do *JcTI-I* foi estabelecida através da sobreposição das sequências de peptídeos obtidas por espectrometria de massas, e da sequência N-terminal determinada anteriormente (COSTA *et al.*, 2014), com sequências de proteínas preditas constantes no genoma da espécie *J. curcas* (SATO *et al.*, 2011). As sequências genômicas estão disponíveis em <http://www.kazuza.org.jp/jatropa/>.

Uma vez obtida a sequência primária da proteína, esta foi submetida à busca de similaridade com sequências de aminoácidos depositadas no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). A sequência primária do *JcTI-I* foi submetida ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALSTCHUL *et al.*, 1997) e as proteínas com maior escore e identidade acima de 40% foram selecionadas para alinhamento de sequências, com auxílio da ferramenta Clustal ômega (SIEVERS *et al.*, 2011) e ESPrpt 2.2 (GOUET; ROBERT; COUCELLE, 2003). As informações teóricas do ponto isoelétrico (pI) e da massa molecular média da proteína foram obtidas usando a ferramenta PeptideMass ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)) e ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (WILKINS *et al.*, 1997; GASTEIGER *et al.*, 2005). A presença de sítios de *N*-glicosilação foi avaliada usando as ferramentas NetGlycate (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate-1.0/output.php>) (JOHANSEN; KIEMER; BRUNAK, 2006) e YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) (GUPTA; BRUNAK, 2002). Também foi



avaliada a presença de peptídeo sinal com a ferramenta SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN *et al.*, 2011).

#### **4.2.7 Determinação da estrutura secundária**

Para verificar a estrutura secundária do *JcTI-I* nas condições a serem utilizadas nos testes de cristalização, foi utilizada a técnica de dicroísmo circular (DC), usando espectropolarímetro JASCO 815 (JASCO International Co. Ltda). A análise foi feita com solução de *JcTI-I* (1 mg/mL), em tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, pH 7,5. O caminho óptico usado foi de 1 mm e os espectros foram coletados entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm, em intervalos de 0,5 nm, fazendo o uso de quatro leituras acumuladas para obtenção da média. As análises dos resultados de DC foram feitas pelo programa *CD spectra deconvolution* - CDNN (BÖHN; MURH; JAENICKE, 1992). Análises de CD foram também realizadas submetendo *JcTI-I* a temperaturas variando de 20 a 90 °C, em intervalos de 10 minutos. Os resultados obtidos com *JcTI-I* foram, também, comparados com estruturas secundárias de albuminas 2S com estruturas resolvidas por difração de raios-X ou NMR e depositados no PDB, incluindo 2DS2 - mabinlin II (LI *et al.*, 2006), 30B4 (LEHMANN *et al.*, 2006), 1PSY (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2003), 2LVF - Albumina 2S da castanha do Pará Ber e 1 (RUNDQVIST *et al.*, 2012) e 1MS7 - rproBnIb, albumina 2S de colza (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2004).

#### **4.2.8 Determinação da estrutura terciária**

##### **4.2.8.1 Modelagem *in silico***

A sequência do *JcTI-I* foi submetida à modelagem *in silico*, utilizando softwares disponíveis no portal *Expasy (The protein model portal)*, usando os métodos Mod web, M4T, Swiss-Model, HHPred, Phyre 2, IntFOLD2 e Raptor X. Os modelos foram comparados com as estruturas de proteínas semelhantes ao *JcTI-I*.

##### **4.2.8.2 Testes de pré-cristalização**

Para determinação da concentração ótima de JcTI-I a ser usada no *screening* de cristalização, foi realizado um teste de pré-cristalização (PCT – *Pre-Crystallization Test*, Hampton Research), seguindo as orientações do fabricante. Nesse kit, constavam as seguintes soluções:

- Solução A1: Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo sulfato de amônio 2,0 M;
- Solução B1: Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo sulfato de amônio 1,0 M;
- Solução A2: Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo cloreto de magnésio hexahidratado 2,0 M;
- Solução B2: Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo cloreto de magnésio hexahidratado 2,0 M, polietilenoglicol 4.000 15% (m/v).

Esse teste teve como objetivo minimizar ou prevenir a formação de precipitados amórficos ou gotas claras e foi realizado com a proteína solúvel em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, acrescido de NaCl 0,2 M, na concentração de 5 mg/mL.

#### 4.2.8.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS – *Dynamic Light Scattering*)

O DLS é um método indicado para determinar o tamanho de moléculas pequenas na faixa de submícron. Essas partículas quando em suspensão ou emulsão seguem o movimento browniano. O coeficiente de difusão **D** é calculado através da fórmula:

$$D = \frac{k \times T}{3 \times \pi \times \eta \times r_h}$$

Onde: k = constante de Boltzman; T = Temperatura;  $\eta$  = viscosidade e  $r_h$  = raio hidrodinâmico das partículas.

Soluções de JcTI-I em várias concentrações e condições foram mantidas em gelo até a realização do experimento. Todas as amostras foram filtradas em microfiltro (membranas de 0,02  $\mu$ m) e centrifugadas por 1 hora em rotação máxima (centrífuga 5417R, Eppendorf). As soluções (20  $\mu$ L) foram colocadas em cubetas e postas na câmara para avaliação da homogeneidade da proteína, sendo realizadas 10 leituras de 15 segundos por amostra.

Determinada a condição na qual a proteína se apresentava monodispersa, foi realizado um teste de estabilidade. Nesse teste, a proteína (1 mg/mL), sozinha ou na presença de tripsina (proporção 2:1, JcTI-I:enzima), foi acondicionada por 5 dias nas temperaturas 4 °C

e 25 °C, tendo sido feito leituras nos dias 0, 3 e 5 de modo a avaliar a homogeneidade da amostra no período de incubação.

#### 4.2.8.4 Testes de cristalização

*JcTI-I* (5 mg/mL e/ou 10 mg/mL, em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M) foi submetido à cristalização, utilizando o robô Honeybee 963<sup>TM</sup> (Genomic Solutions, USA). Amostras contendo tripsina também foram testadas nas mesmas concentrações descritas acima. Os kits utilizados foram PACT Premier<sup>TM</sup>, Morpheus<sup>®</sup> HT-96, JCSG-plus<sup>TM</sup> HT-96, Stura Footprint Screen, Classic, AmSO<sub>4</sub> suite (Molecular Dimension, UK), onde as variáveis foram pH, presença de sal e precipitantes. O método utilizado foi o de difusão de vapor em placas MRC para cristalização de proteínas (Hampton Research, US), gota de 0,2 µL contendo a solução da proteína e solução precipitante (1:1). 100 µL da solução precipitante foram utilizados no reservatório.

Outras condições baseadas em pesquisa no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank – PDB*) foram realizadas manualmente em placas MRC-Maxi (Hampton Research, US). Nessas condições, *JcTI-I* (10 mg/mL, em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M) foi usado e como soluções precipitantes foram testadas: acetato de sódio trihidratado 0,1 M, pH 4,6, contendo malonato de sódio 1,4 M; acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6, contendo sulfato de amônio 2,3 M; citrato de sódio 0,1 M, pH 6,5, contendo sulfato de amônio 1,8 M; HEPES 0,1 M, pH 8,4, contendo citrato trissódico 1,2 M e Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 0,2 M e PEG 400 40% (m/v).

Depois de preparadas, as placas foram acondicionadas a 25 °C e deixadas em repouso por, pelo menos três dias, para evitar qualquer perturbação no meio que pudesse interferir na formação dos cristais. O acompanhamento do desenvolvimento de cristais foi realizado após três dias da preparação das placas. Quando do surgimento de cristais, as gotas eram previamente observadas sob luz UV (XtalLigth 100C – Xtal Concepts, Germany), para avaliar se os cristais eram de sal ou proteína; cristais de proteína fluorescem sob a luz ultravioleta. As condições nas quais houve formação de núcleos de cristalização ou estruturas cristalinas positivas na presença de luz ultravioleta foram submetidas a modificações variando as concentrações de sais e dos agentes precipitantes, de modo a identificar as melhores

condições de cristalização do JcTI-I. Outras técnicas também foram utilizadas com essa finalidade, estando descritas a seguir.

#### 4.2.8.5 Semeadura

Gotas nas quais se observou nucleação ou formação de pequenos cristais, positivos para UV, foram utilizadas no processo de semeadura (*seeding process*). À gota, foi adicionado um volume do reservatório completando ao final 10  $\mu\text{L}$ . Após a adição da solução, os cristais em formação foram macerados e todo o material foi coletado em tubo Eppendorf, sendo, posteriormente, o volume completado para 50  $\mu\text{L}$ . Depois, o tubo foi agitado em agitador de tubos tipo vórtex, por 3 minutos. Novas gotas para teste de cristalização foram formadas contendo a solução de proteína na mesma concentração do teste anterior, solução precipitante e solução diluída do macerado, na proporção de 1:1:1. A gota ao final teve 3  $\mu\text{L}$  e o reservatório consistiu em 300  $\mu\text{L}$  da solução precipitante. Nos testes foram usadas alíquotas da suspensão obtida, diluídas 10, 100 e 1000 vezes. O restante da suspensão final (*seeding stock*) foi reservada e armazenada em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

#### 4.2.8.6 Counter diffusion GAME (Gel Acupuncture Method)

As condições onde foram observadas nucleações e formação de pequenos cristais também foram testadas no método *counter diffusion*, no qual a solução de proteína, nas condições citadas acima, foi coletada em capilares de 0,1 mm e estes capilares mergulhados em tubos contendo a solução precipitante, sendo fixados por uma camada de gelatina 1%. A solução precipitante foi entrando aos poucos nos capilares, gerando um gradiente de concentração.

#### 4.2.8.7 Difusão de vapor sob óleo (*Microbatch*)

Em testes de otimização das condições de cristalização, também foi utilizado o método *microbatch*, onde placas Greiner (Hampton Research) foram previamente revestidas com óleo de parafina e nos poços foram aplicadas soluções de proteína, nas condições descritas anteriormente, e solução precipitante na proporção 1:1. O volume final da gota foi 4  $\mu\text{L}$ .

#### 4.2.8.8 Análise por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

*JcTI-I* (2, 4, 8 e 16 mg/mL, em tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M) foi previamente avaliado por DLS, para confirmação de sua homogeneidade e, posteriormente, analisado por SAXS. As medições por SAXS (MERTENS; SVERGUN, 2010) foram feitas no *beamline* X33 (HASYLAB/EMBL). Os resultados foram analisados usando os softwares GNOM (SVERGUN, 1992), ATSAS e o servidor online ATSAS (ATSAS, 2015). Para modelagem foi usado o programa DAMMIF (SVERGUN, 1999). O modelo obtido a partir dos dados de SAXS foi comparado às estruturas resultantes pela modelagem *in silico* (item 3.2.8.1).

#### 4.2.9 Determinação da atividade inibitória de tripsina

A atividade inibitória de tripsina foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Erlanger; Kolowsky; Cohen (1961), com modificações. Primeiramente, foi realizada uma curva padrão utilizando alíquotas de 10 a 30 µL de tripsina (0,3 mg/mL). Depois, foi adicionado o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,02 M até o volume de 800 µL. Os tubos foram, então, incubados a 37 °C, em banho-maria, por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da solução de BApNA 1,25 x 10<sup>-3</sup> M (substrato). Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37 °C, por 15 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução de parada, 120 µL de ácido acético 30%. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 410 nm.

No ensaio de determinação da atividade inibitória de tripsina, foi utilizado o volume de tripsina determinado pela curva, 100 µL da amostra e tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, de modo a alcançar o volume de 800 µL, e seguido o procedimento acima descrito. A atividade inibitória de tripsina foi expressa em unidades de inibição, que representa a diminuição de 0,01 da absorvância da atividade da enzima.

A atividade inibitória de tripsina também foi realizada após tratamento da amostra com o agente redutor DTT nas concentrações 0,001, 0,01 e 0,1 M, pelos tempos de 15, 30 e 60 minutos a 60 °C. Nesse caso, a amostra estava a 0,035 mg/mL, uma concentração capaz de inibir a atividade da tripsina entre 50-70%, nas condições do ensaio.

#### 4.2.10 Determinação da constante de inibição ( $K_i$ )

A constante de inibição ( $K_i$ ) foi determinada através do ensaio de inibição de tripsina, realizado conforme metodologia descrita no item anterior. Várias concentrações ( $0,63 \times 10^{-3}$  M;  $0,83 \times 10^{-3}$  M;  $1,0 \times 10^{-3}$  M e  $1,25 \times 10^{-3}$  M) do substrato BApNA foram utilizadas. A concentração da tripsina foi mantida constante. Concentrações diferentes do JcTI-I ( $0,5 \times 10^{-6}$  M e  $1 \times 10^{-6}$  M) foram utilizadas. O inibidor foi incubado com 10  $\mu$ L de uma solução de tripsina 8,0  $\mu$ M, em tampão Tris-HCl 0,05 M contendo  $\text{CaCl}_2$  0,02 M, pH 7,5. A reação foi iniciada com a adição de 500  $\mu$ L de BApNA nas diferentes concentrações mencionadas anteriormente. Após 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 120  $\mu$ L de solução de ácido acético 30%. O ensaio foi realizado em banho-maria a 37 °C e leituras de absorbância a 410 nm foram realizadas em espectrofotômetro. Com os resultados obtidos, foi feito o gráfico de Lineweaver-Burk,  $1/v$  versus  $1/[S]$ , a fim de avaliar o mecanismo de inibição. Posteriormente, o valor de  $K_i$  foi determinado de acordo com Dixon *et al.* (1979). Para tanto, foi realizado um segundo gráfico,  $1/v$  versus concentração de inibidor ( $\mu$ M) em estudo. A interseção no eixo x indica o valor de  $K_i$  (CORNISH-BOWDEN, 1995).

#### 4.2.11 Avaliação da atividade antibacteriana do JcTI-I

##### 4.2.11.1 Teste de atividade antibacteriana *in vitro*

A atividade antibacteriana do JcTI-I foi avaliada segundo metodologia descrita por Hancock (1999). As bactérias patogênicas *S. aureus* e *S. choleraesuis* previamente repicadas em meio de cultura ágar nutriente, foram transferidas para caldo Mueller-Hinton (5 mL) e incubadas em estufa a 37 °C, por 12-16 horas. Suspensão de células ( $\text{D.O.}_{600 \text{ nm}} = 0,08$  a 0,1) encerrando  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL foram utilizadas no ensaio. O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços, através da adição de 100  $\mu$ L da suspensão de células e 100  $\mu$ L de JcTI-I, encerrando concentrações finais de 5, 50, 150 e 500  $\mu$ g/mL, visando à determinação da MIC. Como controles negativo e positivo, foram utilizados tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, e formaldeído 0,4% (v/v), respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

##### 4.2.11.2 Avaliação da inibição das proteases bacterianas pelo JcTI-I

A atividade inibitória do *JcTI-I* sobre as proteases das bactérias *S. aureus* e *S. choleraesuis* foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Lima *et al.* (2011), com modificações. Primeiramente, células de *S. aureus* e *S. choleraesuis* foram cultivadas em 5 mL de caldo Mueller-Hinton, por 12 horas, a 37 ° C. Após esse período, as bactérias foram sub-cultivadas (37 °C, 240 rpm) em 300 mL de caldo Mueller-Hinton até a fase log. O crescimento bacteriano foi medido a 620 nm. As células bacterianas foram coletadas ao fim da fase de crescimento exponencial por meio de centrifugação a 4000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. O sedimento foi ressuscitado na solução extratora de proteases (Tris 0,005 M, contendo HCl 0,1%, CaCl<sub>2</sub> 0,005 M e Triton X-100 0,1%, pH 7,5) e incubado em gelo durante 15 minutos. Posteriormente, seguiu-se um ciclo de congelamento e descongelamento da suspensão, o qual foi repetido por três vezes, procedido por centrifugação a 4000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. Depois disso, o sobrenadante coletado foi considerado ser a fonte de proteases bacterianas. O ensaio de inibição das proteases foi realizado de acordo com a metodologia descrita no Capítulo II (item 3.2.9), utilizando azocaseína como substrato. Como controle positivo, o inibidor de proteases séricas PMSF 0,001 M foi usado.

#### 4.2.11.3 Avaliação da interação do *JcTI-I* conjugado ao FITC com células de *S. aureus*

Primeiramente, uma solução (2 mg/mL) de *JcTI-I* foi preparada em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,0 e o FITC solubilizado em DMSO anidro (1 mg/mL). A 4 mL da solução de *JcTI-I*, 0,2 mL da solução de FITC foi adicionado e a mistura incubada a 4 °C, por 14 horas. Posteriormente, foi adicionado cloreto de amônio para uma concentração final de 0,05 M e a mistura incubada a 4 °C, por 2 horas. Passado esse tempo, a proteína conjugada ao FITC foi separada por meio de cromatografia de filtração em gel, em coluna HiTrap<sup>TM</sup> Desalting (SephadexG-25), e armazenada a 4 °C, sob proteção da luz para evitar a degradação do fluoróforo.

Uma suspensão (5 mL) de células de *S. aureus* (D.O. 620 nm = 0,1) foi centrifugada a 2.000 x g, 4 °C, por 2 minutos, tendo sido o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em 1 mL de água grau Milli Q estéril. Esse processo (centrifugação e ressuspensão) foi repetido mais duas vezes e a D.O. 620 nm ajustada para 0,4. A suspensão de células (100 µL) foi incubada com o mesmo volume do *JcTI-I*-FITC nas concentrações de 5, 50 ou 500 µg/mL, 37 °C, 14 horas. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, foi utilizado

como controle negativo. A interação ou não da proteína conjugada com *S. aureus* foi observada em microscópio de fluorescência.

#### 4.2.11.4 Avaliação da integridade da superfície celular de *S. aureus* após contato com JcTI-I

O processo para obtenção da suspensão (D.O. 620 nm = 0,4) de células de *S. aureus* foi semelhante ao descrito no item anterior. A suspensão (100 µL) foi incubada com solução do JcTI-I (5, 50 ou 500 µg/mL) ou tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 (controle negativo), a 37 °C, por 14 horas. Após o período de incubação, 0,4 µL de uma solução de iodeto de propídio 0,001 M foi adicionado. A mistura ficou em contato, sob agitação branda, por 1 hora, a 37 °C. Após esse período, lâminas foram preparadas e visualizadas em microscópio de fluorescência.

#### 4.2.11.5 Avaliação de atividade desoxirribonucleásica do JcTI-I

A avaliação da atividade desoxirribonucleásica foi conduzida segundo metodologia descrita por Tomar *et al.* (2014). DNA genômico (1 µg) de *Chomobacterium violaceum* foi incubado com JcTI-I (1 µg), ambos na presença do tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, 37 °C, por 30 minutos e, em seguida, submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 100 V, com gel de agarose 0,8% submerso em tampão de corrida TAE (Tris-acetato 0,04 M, pH 8,0, contendo EDTA 0,001 M), em cuba horizontal. Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 e as proteínas BSA e SBTI, nas mesmas quantidades utilizadas do JcTI-I, foram utilizados como controles negativos. Como controle positivo, 0,5 µL de DNase I recombinante, livre de RNase (aproximadamente 5 unidades da enzima) foi utilizado.

#### 4.2.12 Avaliação da atividade do JcTI-I contra o parasita *T. gondii*

##### 4.2.12.1 Manutenção das células hospedeiras (células Vero) e obtenção do parasita *T. gondii*

A cultura de células Vero (fibroblastos de rim de macaco de floresta africana) foi mantida em meio de cultura DMEM 1152, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e estreptomicina (1 µg/mL), em garrafas plásticas estéreis de 25 cm<sup>2</sup>. As garrafas



permaneceram em estufa a 37 °C e atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%, tendo sido o meio de cultivo trocado a cada 48 horas. A cultura celular em monocamada foi lavada com 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M (três vezes) e, em seguida, tratada com tripsina. A partir das células tratadas, novas culturas foram constituídas.

Taquizoítos de *T. gondii* (da linhagem virulenta RH) foram mantidos em cultura de células Vero (relação parasito/hospedeiro 10:1) até o estágio de semi-confluência ser atingido, ou seja, até a cultura ocupar cerca de 50% do substrato disponível. As garrafas plásticas de cultura infectadas permaneceram em estufa a 37 °C, por 48 horas, tempo necessário para a lise das células e liberação dos parasitas no meio. O meio foi centrifugado a 1000 x g, 20 °C, por 10 minutos, e o sedimento suspenso em 1 mL de meio. Alíquotas de 0,01 mL do meio contendo parasitas foram retiradas para contagem em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico (Zeiss Axioinvert 135, equipado com objetiva de 20X). Os parasitas obtidos foram transferidos para uma cultura nova de células Vero. Essas células permitem a obtenção do parasita viável, em alta porcentagem e baixa contaminação (SAADATNIA *et al.*, 2010).

#### 4.2.12.2 Interação *T. gondii* e célula Vero

A cultura de células Vero, em semi-confluência, foi tratada com tripsina (0,5 mg/L) e colocada em placas de 24 poços contendo lamínulas estéreis (3 x 10<sup>4</sup> células por poço). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas, antes da interação com os parasitas. Posteriormente, os parasitas recém-liberados, conforme descrito no item 3.2.2.1, foram colocados em contato com as células Vero, na proporção de 5:1 (parasita/hospedeiro). Após 2 horas de contato, nas condições de temperatura e CO<sub>2</sub> citadas, as células foram lavadas duas vezes com meio DMEM 1152 para remoção de taquizoítos extracelulares. As placas contendo células infectadas foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas, para posterior uso no ensaio com *JcTI-I* (CARVALHO *et al.*, 2010).

#### 4.2.12.3 Avaliação da citotoxicidade do *JcTI-I* para células Vero

Antes do ensaio de avaliação da atividade anti-toxoplasma do *JcTI-I*, a sua citotoxicidade para células Vero foi avaliada. Inicialmente, células Vero recém-liberadas, isto é,

logo após tratamento com tripsina, foram colocadas em placas de 24 poços (2 x 10<sup>4</sup> células por poço) e incubadas a 37 °C, por 48 horas. Após esse tempo, *JcTI-I* em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M) foi incubado com as células Vero a 37 °C e atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas. Como controle negativo, tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M foi utilizado.

#### 4.2.12.4 Avaliação da atividade anti-toxoplasma do *JcTI-I*

*JcTI-I* em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL) foi solubilizado em DMSO (1% v/v) e diluído em meio DMEM 1152 suplementado com soro fetal bovino. Após diluição, o meio contendo a amostra foi filtrado (Millipore 0,22 µm) e incubado com (1) células Vero infectadas com *T. gondii* ou (2) taquizoítos livres.

Para o ensaio com células Vero infectadas, a infecção pelo *T. gondii* foi realizada como descrito anteriormente no item 3.2.2.2, seguida com a incubação do *JcTI-I*, preparado como descrito anteriormente. Já para o teste com taquizoítos livres, esses parasitas tão logo liberados das células hospedeiras foram coletados, centrifugados e suspensos no meio contendo *JcTI-I* por 30 minutos. Em seguida, foram lavados com meio DMEM 1152 e postos em contato com células Vero em placas. Ambos os tratamentos foram incubados em estufa a 37 °C e atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas. Como controle, taquizoítos ou células Vero infectadas foram incubados apenas com o meio DMEM 1152 suplementado com soro fetal bovino.

Decorrido o tempo de incubação, as células Vero foram lavadas com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M (três vezes) e fixadas em solução de Bouin (ácido pícrico/ácido acético, 19:1, v/v) por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M (quatro vezes). Depois as células foram coradas com solução Giemsa (10%, v/v) à temperatura ambiente, por 6 horas, e desidratadas com soluções decrescentes de acetona-xileno, montadas em lâminas histológicas e incubadas por 48 horas para secagem. As preparações foram examinadas em microscópio óptico (Zeiss Axioinvert 135, equipado com lente objetiva de 40X). As imagens foram obtidas usando o software analySIS (Soft Imaging System) (MELO; MAYERHOFFER; SOUZA, 2000). Para cultura de células Vero não infectadas com *T. gondii*, porém tratadas com *JcTI-I*, foi avaliado o número de células morfológicamente viáveis. Com relação à

cultura infectada e tratada com *JcTI-I*, os seguintes parâmetros foram avaliados: número de células infectadas, número de células não infectadas e número de parasitas intracelulares com morfologia característica de meia-lua. Pelo menos 400 células na mesma amostra foram contadas, a partir de 3 campos aleatórios de 4 lamínulas, a um aumento de 400X. Resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas entre as médias foram examinadas com auxílio do GraphPad Prism 5.0 (*two-way analysis variance* – ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

#### *4.2.12.5 Análise estrutural e ultraestrutural*

Taquizoítos livres e células Vero infectadas foram tratados com *JcTI-I* 0,06 mg/mL ( $DL_{50}$ ), conforme descrito no *item 3.2.2.4*. Após 24 horas, as culturas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M a 37 °C e fixadas à temperatura ambiente em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, contendo glutaraldeído 1%, paraformaldeído 4%,  $CaCl_2$  0,005 M e sacarose 5%. As células foram pós-fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio 2% e ferrocianeto de potássio 0,8% por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato, pH 7,2, desidratadas em acetona, embebidas em PolyBed812 (Polyscience Inc., Alemanha) e polimerizadas a 60 °C por 2 dias. Seções ultrafinas obtidas com ultramicrotomo Leica (Nussloch, Alemanha) foram coradas com acetato de uranila e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 a uma aceleração de 80 kV (CARVALHO *et al.*, 2014).

#### *4.2.13 Avaliação de risco de lesão celular e de toxicidade aguda do JcTI-I para animais superiores*

##### *4.2.13.1 Teste de atividade hemolítica*

O ensaio hemolítico foi conduzido utilizando hemácias humanas seguindo a metodologia descrita por Kim *et al.* (2006), com pequenas modificações. O sangue foi coletado na presença de heparina e centrifugado a 2000 x g, 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as hemácias foram lavadas três vezes com solução salina (NaCl 0,15 M) tamponada com tampão fosfato 0,035 M, pH 7,0, e suspensas no mesmo tampão. A atividade hemolítica de *JcTI-I*, nas concentrações variando de 5 a 500  $\mu$ g/mL, foi avaliada

através da liberação de hemoglobina. Alíquotas (25  $\mu$ L) de uma suspensão de hemácias (2,5%) foram transferidas para placas de 96 poços e incubadas com 25  $\mu$ L da solução de JcTI-I, preparada no mesmo tampão acima, a 37 °C, por 30 minutos, seguida da centrifugação a 5000 x g, 5 minutos, à temperatura ambiente. O percentual de hemólise foi determinado por medição da densidade óptica do sobrenadante a 540 nm. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M foi utilizado como controle negativo (sem hemólise, 0%); Triton X-100 0,2% foi usado como controle positivo (hemólise completa, 100%). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.2.13.2 Teste de toxicidade aguda

Na avaliação da toxicidade aguda do JcTI-I para camundongos, foi seguida a metodologia descrita por Aune *et al.* (2006), com modificações. JcTI-I foi administrado por via intraperitoneal em camundongos (n = 5), na dose de 5 mg/kg de massa corpórea que, por sua vez, é 100 vezes maior que a MIC estabelecida para as bactérias *S. choelerasius* e *S. aureus*. Após administração da proteína, os animais foram monitorados durante as primeiras 24 horas para avaliação dos seguintes parâmetros: sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais) e mortalidade.

### 4.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e a significância das diferenças entre as médias, determinada por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), através do *software Graphpad Prism*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Purificação do *JcTI-I*

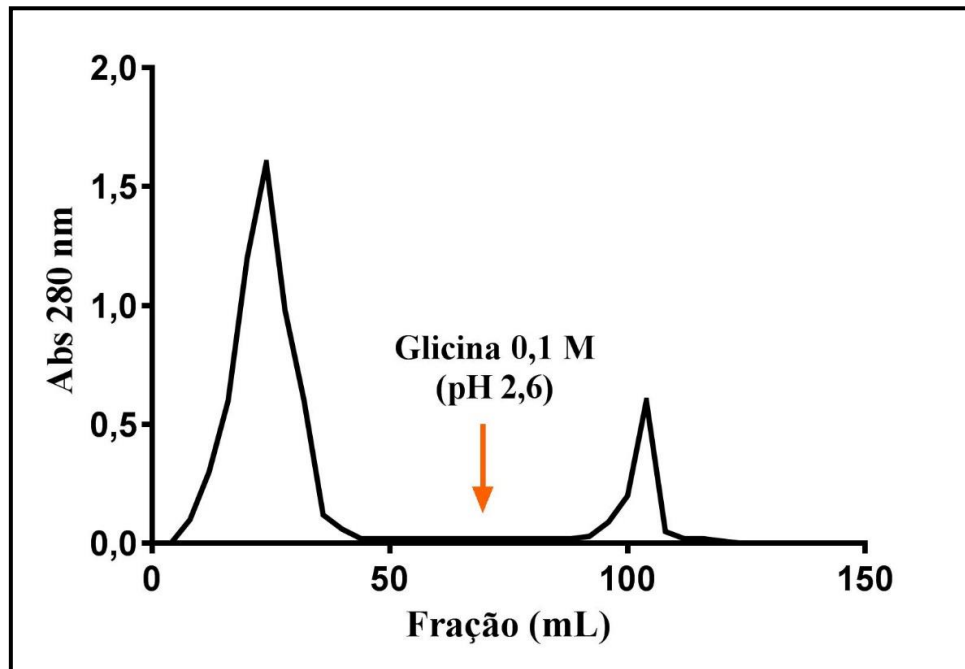
Para purificação do *JcTI-I*, a farinha da torta de *J. curcas* foi previamente delipidada, uma vez que encerrava um teor de óleo residual de cerca de 20% (COSTA, 2012). A purificação do *JcTI-I* ocorreu a partir da precipitação do extrato proteico da torta com TCA 2,5% (v/v), seguida por dois passos cromatográficos. O extrato proteico apresentou uma atividade inibitória de tripsina de 24,92 UI/mg de proteína que, após precipitação com TCA 2,5%, aumentou para 584,13 UI/mg de proteína. A fração obtida após precipitação com TCA quando aplicada na matriz de tripsina-Sepharose 4B rendeu um material não retido, composto por um único pico, o qual foi obtido com o tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,2 M), e um material retido, eluído com tampão glicina 0,1 M, pH 2,6, concentrando uma atividade inibitória de tripsina de 6.644,4 UI/mg proteína (FIGURA 10). Essa fração com atividade inibitória de tripsina após cromatografia de filtração em gel em matriz de Sephacryl S-200 apresentou um pico majoritário (FIGURA 11), com atividade inibitória de tripsina de 28.366,67 UI/mg proteína e rendimento proteico de 2 mg, correspondendo a 1,2% do total de proteína extraída da torta de *J. curcas*.

### 5.2 Caracterização quanto à massa molecular e número de cadeias polipeptídicas do *JcTI-I*

Por PAGE-SDS, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, *JcTI-I* apresentou uma banda difusa de massa molecular aparente de 10 kDa (FIGURA 12, Raia 3). Todavia, na ausência desse agente redutor, uma banda em torno de 20 kDa foi observada (FIGURA 12, Raia 2).

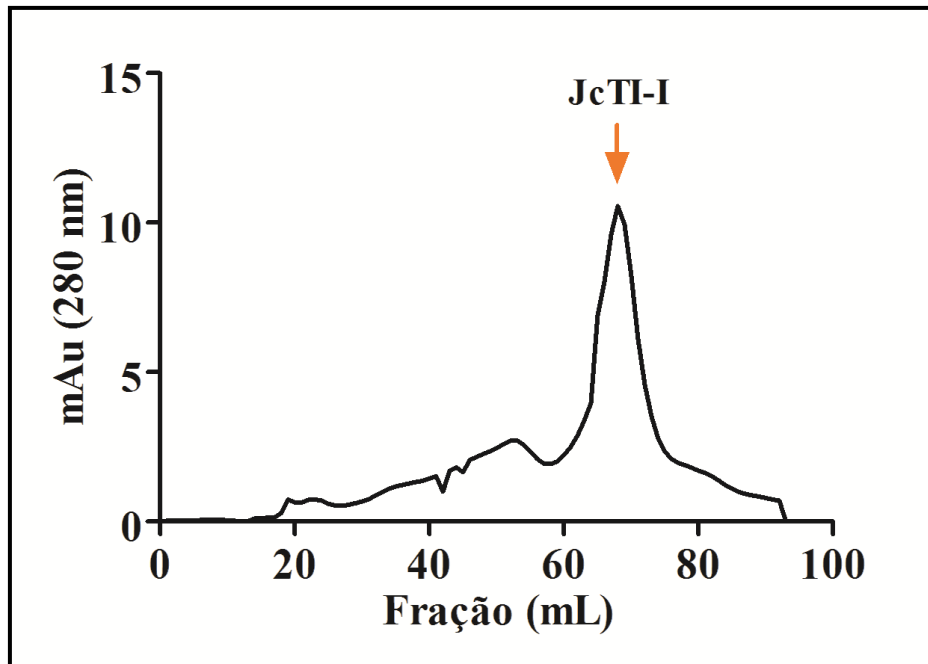
Espectrometria de massas do *JcTI-I*, em condições nativas, revelou uma massa de 10,252 kDa (FIGURA 13A). Quando reduzido (DTT 0,1 M) e alquilado (IAA 0,3 M), *JcTI-I* gerou dois picos principais com massas de 7,133 e 3,124 kDa (FIGURA 13B e 12C), correspondendo às cadeias polipeptídicas maior e menor, respectivamente.

Figura 10 - Cromatografia de afinidade em coluna de tripsina-Sepharose 4B



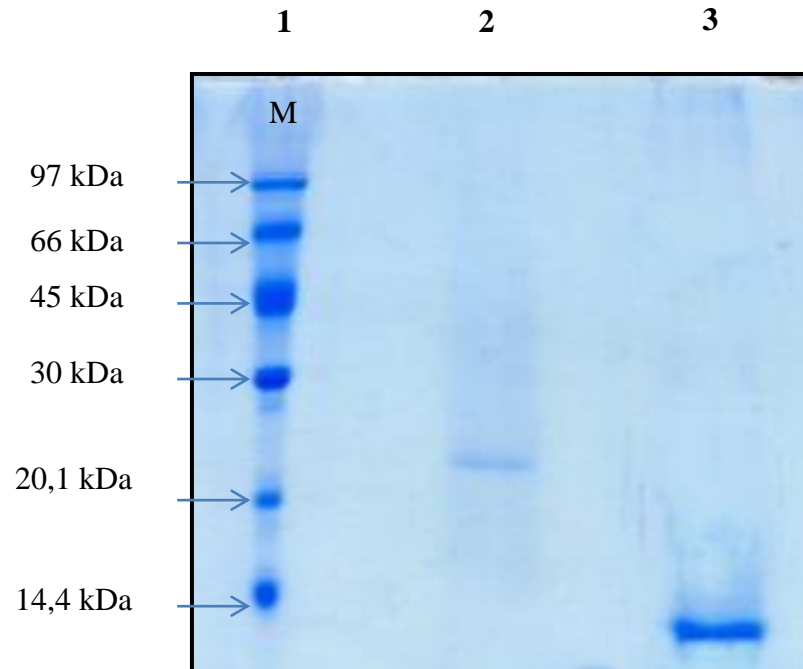
Fração 2,5% (30 mg), sobrenadante obtido após fracionamento do extrato bruto com ácido tricloroacético (2,5%), foi aplicada em coluna (2,2 x 11,5 cm) de tripsina-Sepharose 4B, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 contendo NaCl 0,2 M. As proteínas retidas foram eluídas com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6. Fluxo: 60 mL/hora; Fração: 4 mL.

Figura 11 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-200



Fração retida em coluna de tripsina-Sepharose 4B (2 mg) foi aplicada em coluna de Sephacryl S-200, acoplada ao sistema Äktaprime Plus, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,2 M. Fluxo: 0,5 mL/minuto; Fração: 1 mL.

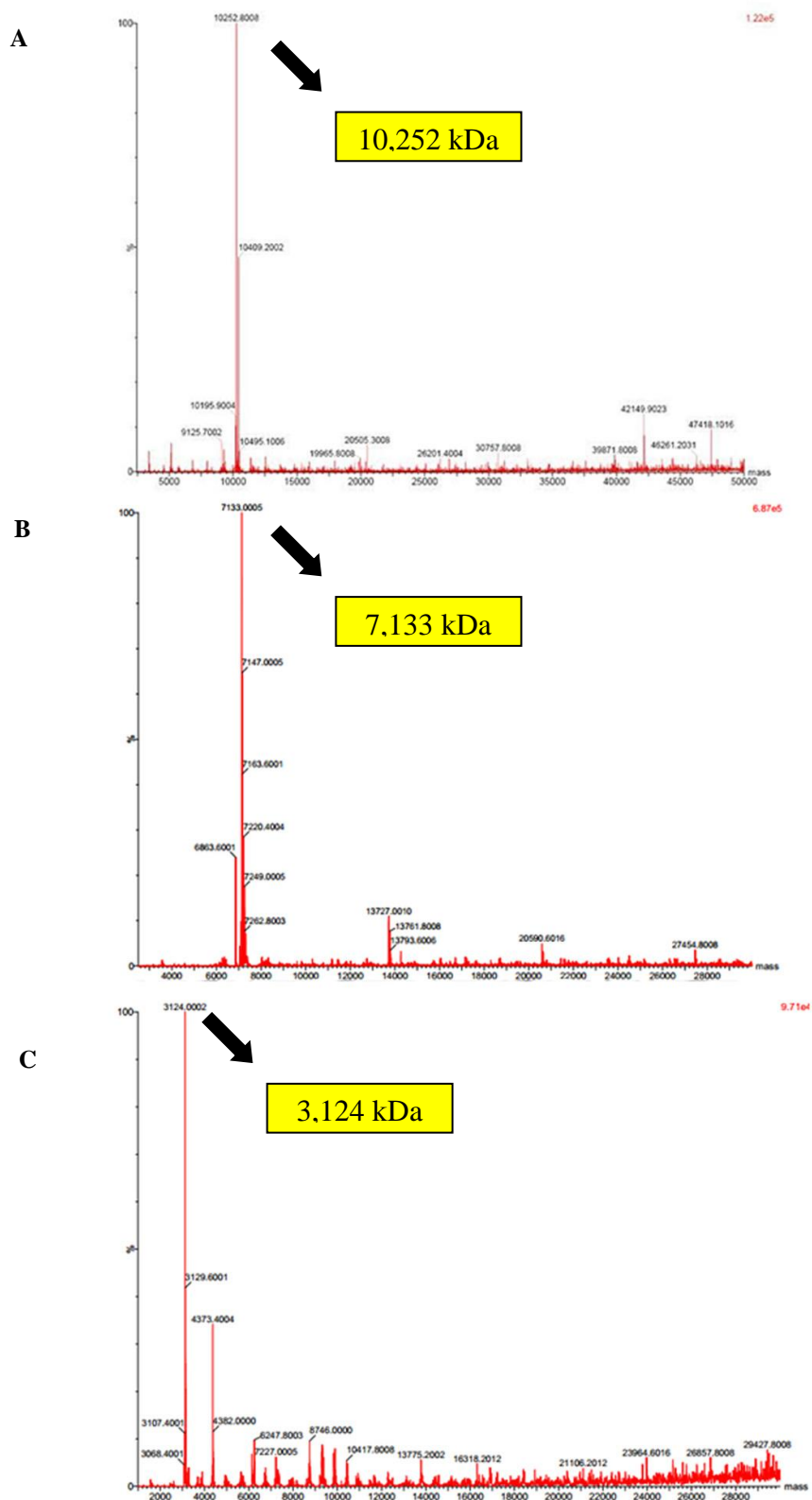
Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), em presença de SDS, do *JcTI-I*



Foram aplicados 5  $\mu$ g de proteína por raia. Raia 1: Marcadores de massa molecular; Raia 2: *JcTI-I*; Raia 3: *JcTI-I* tratado com  $\beta$ -mercaptoetanol 1%. A coloração das bandas proteicas foi feita utilizando Coomassie G-250 (*Blue Silver*) (CANDIANO *et al.*, 2004).



Figura 13 - Espectros de massas deconvolvido do *Jc*TI-I nativo ou após tratamento com agente redutor, usando fonte de ionização nanoeletrospray



A: *Jc*TI-I nativo; B e C: *Jc*TI-I após redução com DTT 0,1 M e alquilação com IAA 0,3 M, representando a cadeia polipeptídica maior e menor, respectivamente.

### 5.3 Estrutura primária do *JcTI-I*

A estrutura primária do *JcTI-I* foi determinada através da sobreposição de sua sequência N-terminal e dos peptídeos obtidos por digestão trípica e submetidos à análise por espectrometria de massas (MS/MS) com sequências de proteínas preditas deduzidas a partir do genoma da espécie *J. curcas*.

A sequência N-terminal do *JcTI*, determinada por degradação de Edman, foi VRDICKKEAERRDLSSCENYITQRRGY. Essa sequência foi submetida à análise comparativa usando o programa BLAST na base de dados do genoma de *J. curcas*. As sequências de aminoácidos apresentando similaridade foram submetidas ao programa de alinhamento múltiplo de sequências ClustalX. Foram identificadas oito proteínas com alta similaridade, isto é, igual ou superior a 80% (TABELA 2).

As sequências dos peptídeos gerados a partir dados de MS/MS estão mostradas na Tabela 3. Quando tais sequências foram comparadas com sequências deduzidas a partir do genoma de *J. curcas*, chegou-se à sequência identificada como Jcr4S00619.70 (FIGURA 14), cuja descrição se refere a uma proteína com função ainda desconhecida, mas que, com base na sua sequência, poderia estar presente no grupo das prolamínas, com possibilidade de ser um inibidor bifuncional (tripsina/ $\alpha$ -amilase). Logo é muito provável que a sequência identificada como Jcr4S00619.70 corresponda à proteína *JcTI-I*. Diante desse pressuposto, Jcr4S00619.70 é o precursor de *JcTI-I*, com 140 resíduos de aminoácidos e um pI teórico de 6,75. Essa pró-proteína contém um peptídeo sinal de 39 aminoácidos (FIGURA 15).

Análises *in silico* da sequência da pró-proteína revelaram possíveis pontos de glicosilação. Pontos de glicosilação foram observados nas posições 45, 46 e 127, em resíduos de lisina (FIGURA 15 e FIGURA 16A). Adicionalmente, foram identificados pontos de O-glicosilação com *N*-acetil-D-glucosamina (O-GlcNAc) envolvendo os resíduos de aminoácidos nas posições 7, 23, 30 e 37 (FIGURA 15 e FIGURA 16B). O resíduo de aminoácido 30 (treonina), além de glicosilação pode sofrer fosforilação (FIGURA 16B).

A comparação da sequência aminoacídica completa do *JcTI-I* com outras sequências depositadas no banco de dados não redundantes de proteínas do NCBI não mostrou similaridade com membros da família dos inibidores de tripsina e sim com albuminas 2S (FIGURA 17).

Tabela 2 - Sequências das proteínas preditas baseadas no genoma de *J. curcas* apresentando alta similaridade ( $\geq 80\%$ ) com o N-terminal do *JcTI-I*

Identificação	Sequência	Similaridade <sup>1</sup> (%)	Identidade <sup>2</sup> (%)
<i>JcTI-I</i> (N-terminal) <sup>3</sup>	VRDICKKEAERRDLSSCENYITQRRGY		
Jcr4S00619.70	MANLITSTALLCVLLVIIANAVTGYRTIITTTVEVDDSSNVRDICKKEAERRDLSSCENYITQR RGRSEMLAMPGIENPRQQVPRQCCNQAKELSAICRCESIHYLEKQLEEGEVGSEDEARR RTKNIIDVCFGSICPR	100	96
Jcr4U31701.10	MAKLITSTPLICILLVIASAVPGYTTTTTTATDGKDHFSFYVREICKEEANRKDLSSCENYIIG QSRRISEDMSAKRGIKNRHHVPRCCNQAMKSASHPCGLTRNFWRSRSDHMQISTMVSST KNGDDELVPFCVAAILMNRHKIIKETRSIDDMIKAGALILSTSILAKS	95	80
Jcr4S00619.30	MAKLITSTPLICILLVIASAVPGYTTTTTTATDGKDHFSFYVREICKEEANRKDLSSCENYIIG QSRRISEDMSAKRGIKNRHHVPRCCNQASKLWAICRCESIMYLLEKQGHIGSQDFDEGKR RIKNIIDVCFSSVCPY	95	76
Jcr4S00619.40	MAKLAISTSLICVLLAIANAVSGYLTATAITVEMEDAYRVQGICKKEAEKKDLSSCENYVVR LSRTRSEETPAIRRIGNRQQQVPGQCCNQAWKLSGFCRCQSIRYLPEKQGYVGSQEYDEAM RRADDIISVCFDNICPR	84	68
Jcr4S00619.50	MAKLMTSTALICILLVIITNAFSGYITAATISLEKEEDA YEVREICKWEARRKDLSSCESYVR QSRTRSEETSAKQRIGNRHHVPTQCCDQAWKLHPVCQCEAIMYLAQKQGHIGSQEYDEAE RRAFNIIDVCFGSVCPR	84	68
Jcr4S00619.80	MAKLITLTALLCILLVIIANAVSGYRTLSTTVETDSSSNVRKICKWEAERKDLSSFCENYIRQS GRRSEAMLAMRGIENPKQQVPRQCCNQAEKLGPLCQCESIEYLLEKQVEEGQIGSQEYDEA KRRTNNIIDVCFDSICPR	82	78
Jcr4S00619.60	MAKLITSTALICILLVIIANAVSGHMTTTTTTTTTVEMDDAYEVREMCKREAERTNLSSCERY IRQSRTRSEALLAMKGIENRHHNVPRQCCDQARKLRAICRESILYLPEKQGFVGSSEYEEA ESRSYNIIDVCFGSACPR	84	68
Jcr4S00619.90	MCRLGINVEIRDAAAMGKCVLFCQGYEYKFNINLLSHPYKKLALHIANAVSGYVTTTTTTTV EIDDDSSNTSQRKCRREAERADLSSCESYMRSSRRPSEEMLALRGIENQQQRDLRQCCNEL RQLSHDCPCEGIKYVLEQQLEQQQERLEAVRRARSIPSACGLRTSCDIRS	80	61

Fonte: <http://www.kazuza.org.jp/jatropha/>.

<sup>1</sup> Porcentagem calculada a partir do pareamento idêntico entre as sequências alinhadas.

<sup>2</sup> Porcentagem de resíduos com propriedades químicas semelhantes.

<sup>3</sup> O N-terminal do *JcTI-I* foi determinado por degradação de Edman.

Tabela 3 - Sequências de peptídeos gerados após digestão trípica do *JcTI-I*, utilizando dados de MS/MS

<i>m/z</i>	Carga	Delta (ppm)	Sequência	Modificações
821.13901	2	4.091931	(R)RDLSSCENYITQR(R)	Carbamidometil C (6)
743.3438	2	10.359877	(R)DLSSCENYITQR(R)	Carbamidometil C (5)
424.7177	2	-2.8809798	(K)ELSAICR(C)	Carbamidometil C (6)
646.3268	2	7.850316	(R)CESIHYLLEK(Q)	Carbamidometil C (1)
774.3472	2	2.6834285	(K)QLEEGEVGSEDEAR(R)	

Figura 14 - Alinhamento das sequências dos peptídeos gerados após digestão trípica do *JcTI-I*, utilizando dados de MS/MS, com a sequência da proteína predita Jcr4S00619.70, deduzida a partir do genoma de *J. curcas*

PEP5	-----
PEP4	-----
PEP3	-----
Jcr4S00619.70	MANLITSTALLCVLLVLIANAVTGYRTIITTTVEVDDSSNVRDICKKEAER <b>RDLSSCENYI</b>
PEP1	----- <b>RDLSSCENYI</b>
PEP2	----- <b>DLSSCENYI</b>
PEP5	----- <b>QLEEGEVGSED</b>
PEP4	----- <b>CESIHYLLEK</b>
PEP3	----- <b>ELSAICR</b>
Jcr4S00619.70	<b>TQR</b> RGRSEDMLAMPGIENPRQQVPRQCCNQA <b>ELSAICRCESIHYLLEKQLEEGEVGSED</b>
PEP1	<b>TQR</b> -----
PEP2	<b>TQR</b> -----
PEP5	<b>EAR</b> -----
PEP4	-----
PEP3	-----
Jcr4S00619.70	<b>EAR</b> RRTKNIIDVCFGSICPR
PEP1	-----
PEP2	-----

PEP1-PEP5: Peptídeos identificados a partir dos dados de MS/MM.

O alinhamento das sequências foi feito com auxílio da ferramenta Clustal ômega. Regiões idênticas na proteína predita Jcr4S00619.70 e nos peptídeos do *JcTI-I* estão demarcadas em amarelo.

Figura 15 - Sequência do precursor do *JcTI-I* com indicações de possíveis pontos de mudanças pós-traducionais

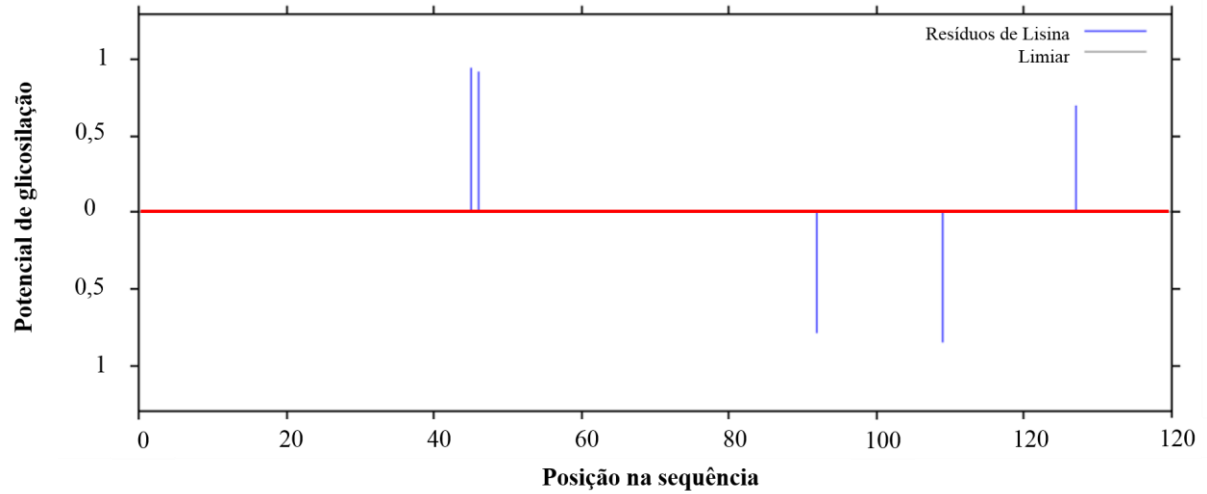
```

>Jcr4S00619.70
MANLITSTALLCVLLVIANAVTGYRTIITVEVDDSSNVRDI
KKEAERRDLSSENYITQRRGRSEDMLAMPGIENPROQVP
RQCCNQAKELSAICRCESIHYLLEKQLEEGEVGSSEDEARRRT
KNIIDVFGSICPR
  
```

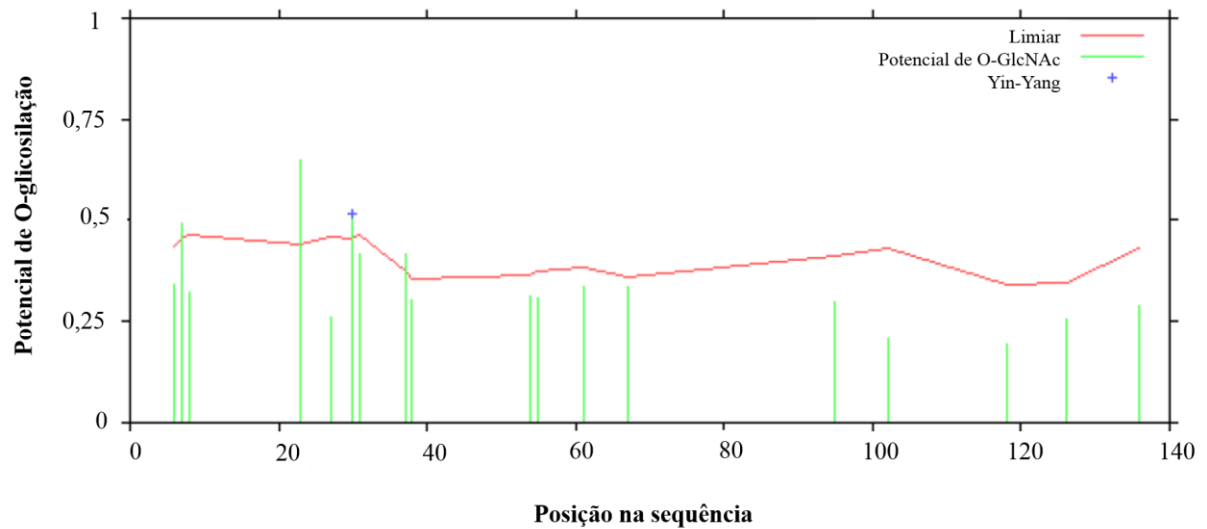
- Peptídeo sinal determinado com base na localização da sequência N-terminal do *JcTI-I*.
- Peptídeo sinal predito pelo programa SignalP 1.4.
- Ponto de glicosilação identificando resíduos de lisina glicosilados.
- Predição de sítios de *O*-glicosilação com *N*-acetil-D-glucosamina.
- \_\_\_ Regiões presentes no precursor Jcr4S00619.70, porém não cobertas pelas sequências determinadas da região N-terminal e dos peptídeos obtidos por MS/MS do *JcTI-I*.
- Resíduos de cisteína conservados no precursor Jcr4S00619.70, identificados com base no alinhamento de sua sequência com sequências de proteínas não redundantes.

Figura 16 - Diagrama do potencial de glicosilação no *JcTI-I*

A



B



Pontos que estão acima do limiar, identificado pela linha vermelha horizontal, correspondem aos prováveis pontos de glicosilação. A: Pontos de glicosilação em resíduos de lisina, situados nas posições 45, 46 e 127. B: Pontos de *O*-glicosilação com *N*-acetil-D-glucosamina (O-GlcNAc) envolvendo os resíduos de aminoácidos nas posições 7, 23, 30 e 37. \*: Resíduo de treonina (posição 30) que, além de glicosilação, pode sofrer fosforilação.

Figura 17 - Alinhamento da sequência do precursor do *JcTI-I* (Jcr4S00619.70) com outras sequências de proteínas depositadas no NCBI

```

XP_012070746 1  MANLITSTALLCVLLVLIANAVTGYRTIITTVVDDSSNVRD-----ICKKEAERRDLSSCENYITQ---RRGRSEDLA 72
1PSY_A 1  -----AEFMESKGEREGSSSQCCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSRRSTGEEVLR 49
1707274A 1  MAKLIPTIALVSVFLFIANASFAYRTTITTIIEIDESKGEREGSSSQCCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSRRSTGEEVLR 80
XP_002522854 1  MAKLIPTIALVSVLLFIANASFAYRTTITTIIEIDESKGEREGSSSQCCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSRRSPGEEVLR 80
XP_002522852 1  MAKLIPTVTLISVLLVLIANASFAYGTI---EIDDTKAGGEGSRSQCHQEFQRKDLSSCEQYIRQSSRRSPGEEELLR 77

XP_012070746 73  MPGIENPRQ--QVPRQCCNQAKELSAICRCESIHYLLEKQLEEVEGSEDEAR--RRTKNIIDVCFGSICPR----- 140
1PSY_A 50  MPGDENQQQESQQLQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQGQLHGEESEVAQRAGEIVSSC-GVRCMRQTRTN--- 125
1707274A 81  MPGDENQQQESQQLQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQGQLHGEESEVAQRAGEIVSSC-GVRCMRQTRTNPSQ 159
XP_002522854 81  MPGDENQQQESQQLQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQGQLHGEESEVAQRAGEIVSSC-GVRCMRQTRTNPSQ 159
XP_002522852 78  MPRAEDQQQETQQLQCCNQVEQLRHDCQCEAIKSAEYQIQGHLQGEESERVGQRASDIVSSC-GLRCLRQIQKNPNQ 156

XP_012070746 -----
1PSY_A -----
1707274A 160  QGCRGQIQEQQLRQCQEYIKQVSGQGPRRSD-NQERSLRGCCDHLKQMQ---SQCRCEGLRQAIEQQQSQGQLQGQDV 235
XP_002522854 160  QGCRGQIQEQQLRQCQEYIKQVSGQGPRRSD-NQERSLRGCCDHLKQMQ---SQCRCEGLRQAIEQQQSQGQLQGQDV 235
XP_002522852 157  EGCRQHIIIGQQKLRQCQEYITQQYGVQRSRRSDsNQQSLRCCDQIKQMYpetTQCRCEALYYAVEEKYLQGQVEEY 236

XP_012070746 -----
1PSY_A -----
1707274A 236  FEAFRTAANLPSMCGVSPTECRF 258
XP_002522854 236  FEAFRTAANLPSMCGVSPTECRF 258
XP_002522852 237  FDAFKTARYLPLQCGVEPRECQ- 258

```



#### 5.4 Estrutura secundária do *JcTI-I*

O espectro de dicroísmo circular UV-distante (190-260 nm) mostrou que *JcTI-I* é constituído principalmente por  $\alpha$ -hélices (70%), não havendo a presença de estruturas em folhas- $\beta$ . O espectro de dicroísmo circular de *JcTI-I* apresentou absorvâncias mínimas à 208 nm e 222 nm e uma absorvância máxima a 190 nm, espectro característico de estrutura em  $\alpha$ -hélices. Os 30% restantes da proteína são representados por estruturas não ordenadas (FIGURA 18).

O aquecimento do *JcTI-I* a diferentes temperaturas (20 a 90 °C), por 10 minutos em cada temperatura, resultou em apenas pequenas deformações no espectro da proteína nativa, evidenciando sua estabilidade estrutural (FIGURA 19).

#### 5.5 Estrutura terciária do *JcTI-I*

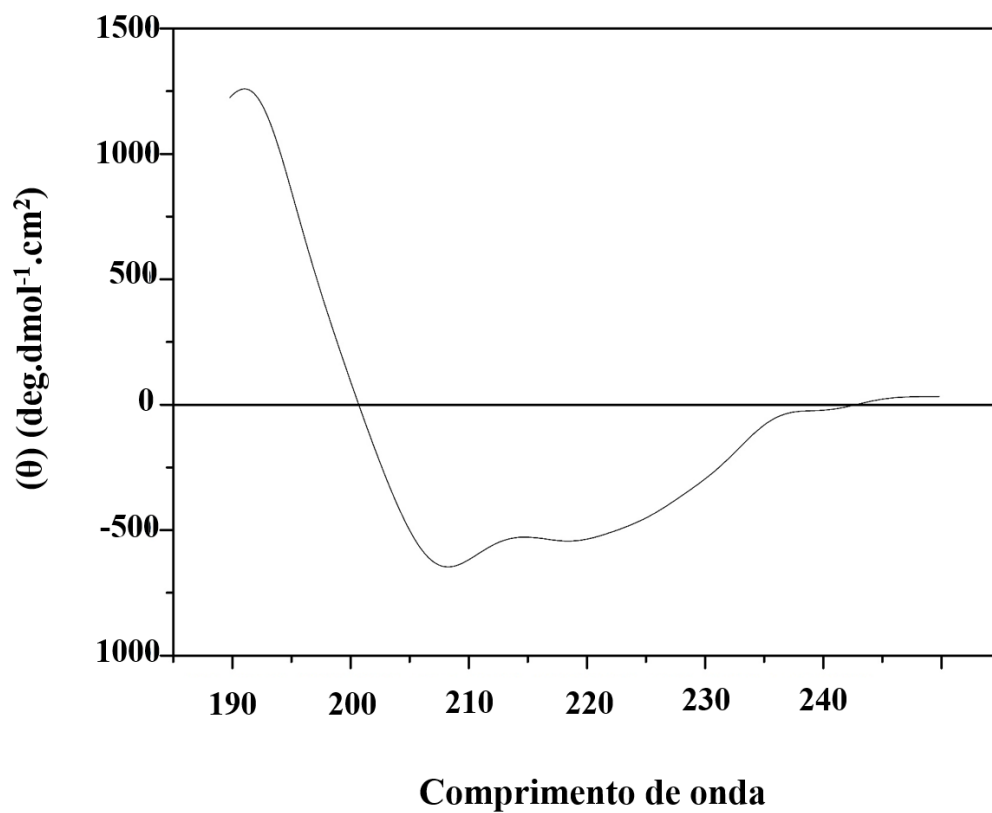
As estruturas do *JcTI-I* preditas pelos diversos servidores tiveram como base estruturas de outras albuminas 2S. Essas estruturas apesar de terem se mostrado diversificadas, elas apresentaram algumas características comuns, compreendendo a presença de várias  $\alpha$ -hélices e segmentos de estruturas não ordenadas (FIGURA 20).

Dentre as condições testadas, o tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M foi o que se mostrou mais adequado para manter o *JcTI-I* em solução, encontrando-se a proteína nesta condição na forma homogênea (FIGURA 21).

Quando testada a estabilidade do *JcTI-I*, foi observado que a proteína sozinha formava agregados ao longo do tempo, caracterizados pelo surgimento de focos na distribuição radial, cuja ocorrência se deu nas duas temperaturas testadas, 4 °C e 25 °C, e ao longo de todo período experimental (5 dias) (FIGURA 22). Porém, quando o *JcTI-I* foi analisado na presença de tripsina, a 25 °C, a distribuição radial da proteína se concentrou em um único ponto, mostrando-se monodispersa, ao longo dos 5 dias do teste. Esse mesmo resultado não foi observado a 4 °C (FIGURA 23). Já a tripsina sozinha em solução, nas mesmas condições usadas com o *JcTI-I*, não se mostrou estável, ou seja, monodispersa (FIGURA 24). A partir desse experimento, a temperatura de 25 °C foi usada nos experimentos de cristalização.

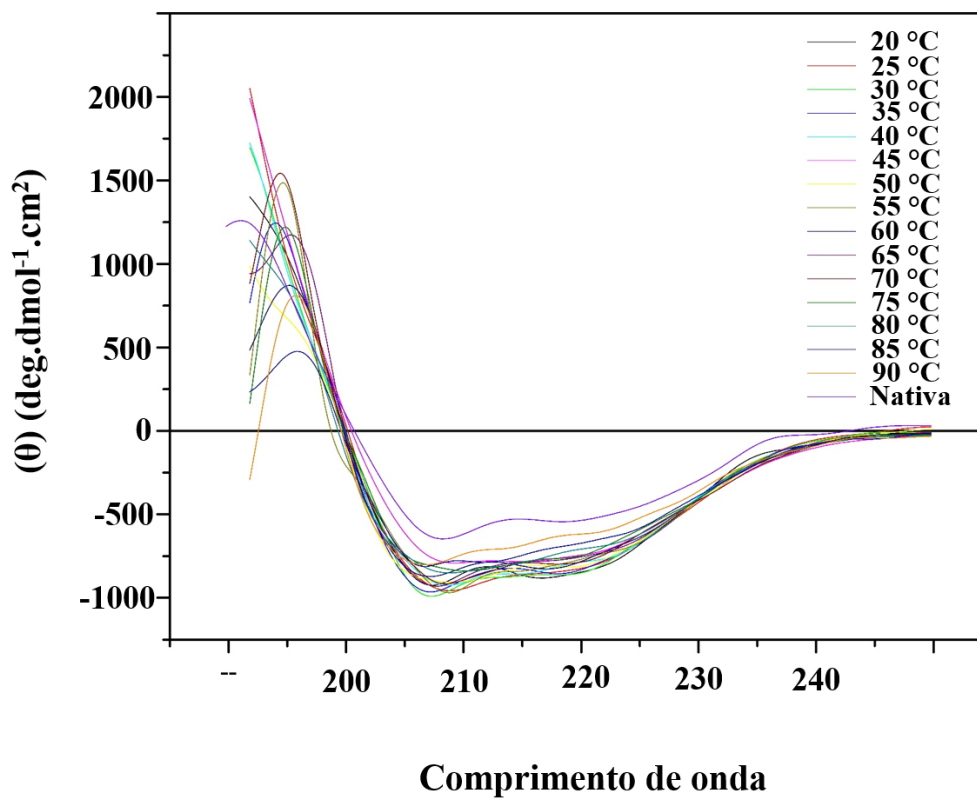
Os testes de pré-cristalização indicaram uma concentração mínima da solução de *JcTI-I* de 5 mg/mL para ser usada nos experimentos de cristalização. Quando testados os kits

PACT Premier™, Morpheus® HT-96, JCSG-plus™ HT-96, Stura Footprint Screen, Classic, AmSO<sub>4</sub> suite, cristais de proteína não foram observados, mesmo após seis meses. Todos os

Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular do *JcTI-I*

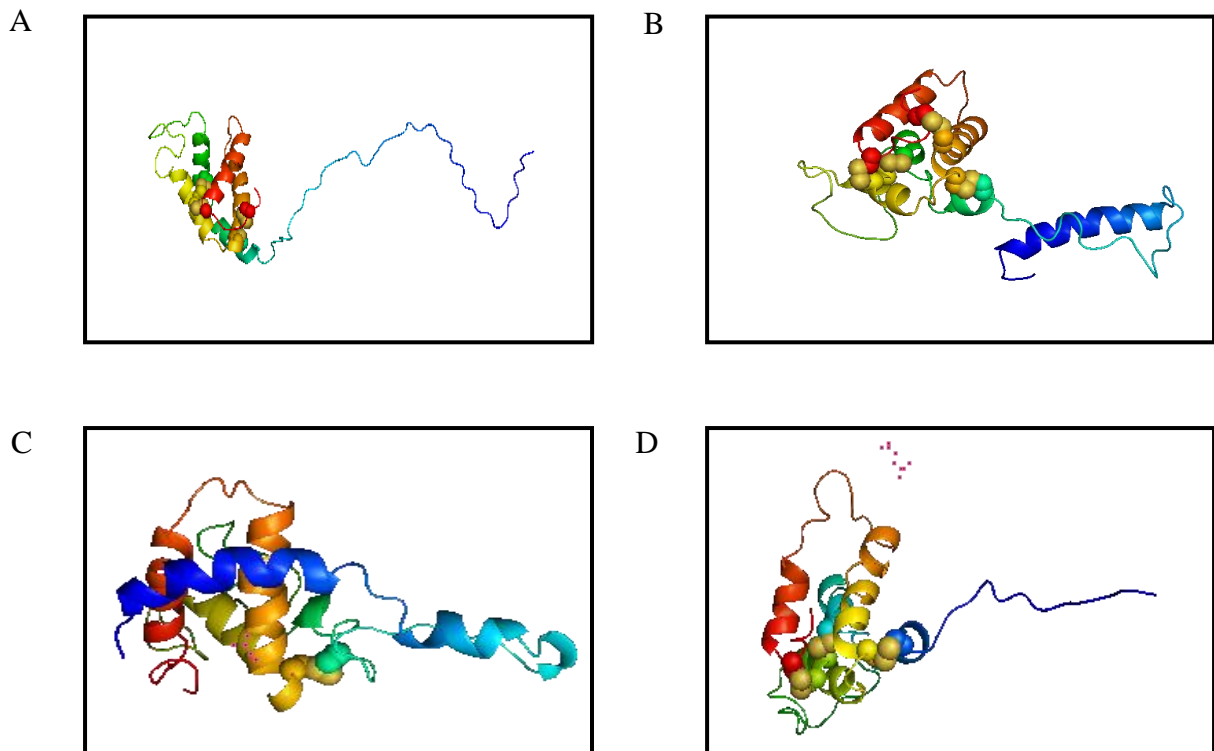
*JcTI-I* (1 mg/mL) foi solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, pH 7,5. O espectro foi registrado entre 190 e 260 nm. A: proteína nativa; B: proteína submetida ao tratamento em diferentes temperaturas (°C), conforme mostrado no eixo z, com variação a cada 10 minutos.

Figura 19 - Avaliação da estabilidade estrutural do *JcTI-I* frente a diferentes temperaturas, por monitoramento através de dicroísmo circular



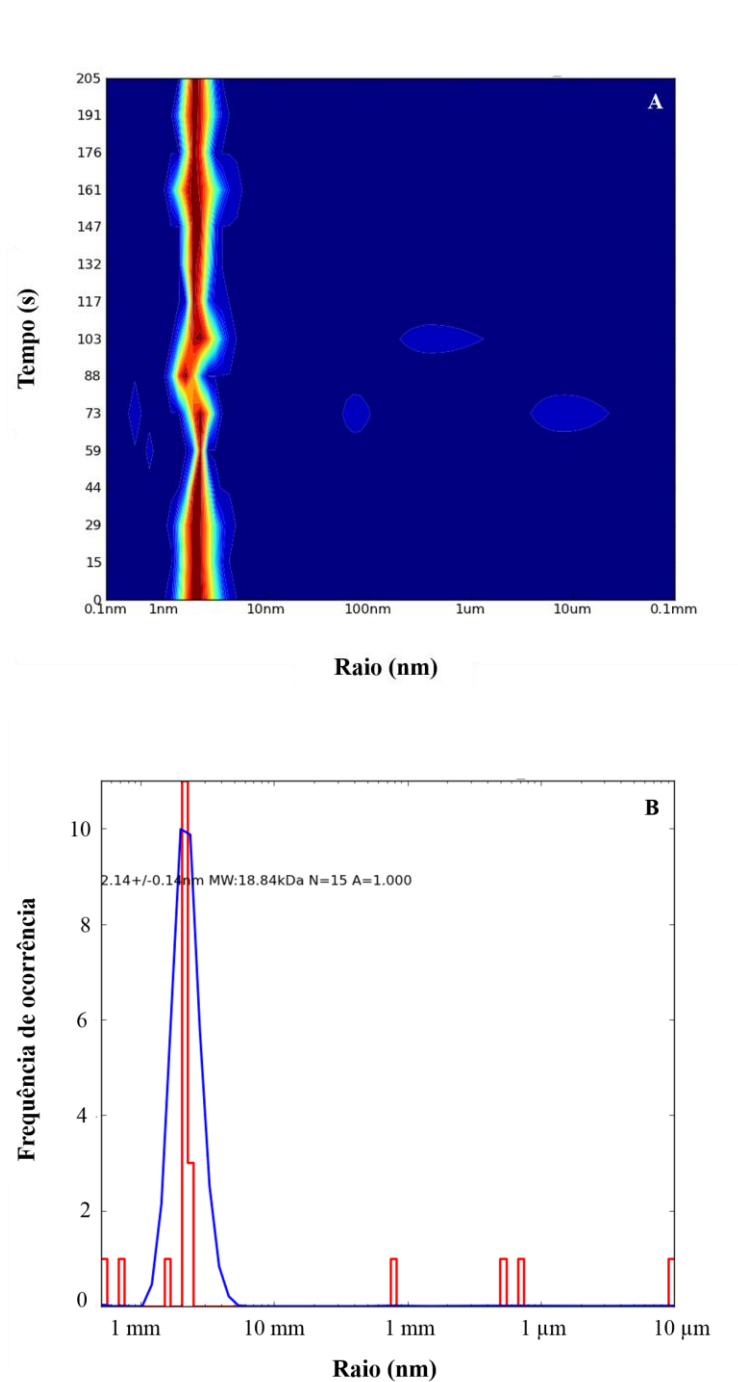
*JcTI-I* (1 mg/mL) foi solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, pH 7,5, e incubado previamente em temperaturas variando de 20 °C a 90 °C, por 10 minutos. O espectro foi registrado entre 190 e 260 nm.

Figura 20 - Modelos estruturais preditos para o *Jc*TI-I

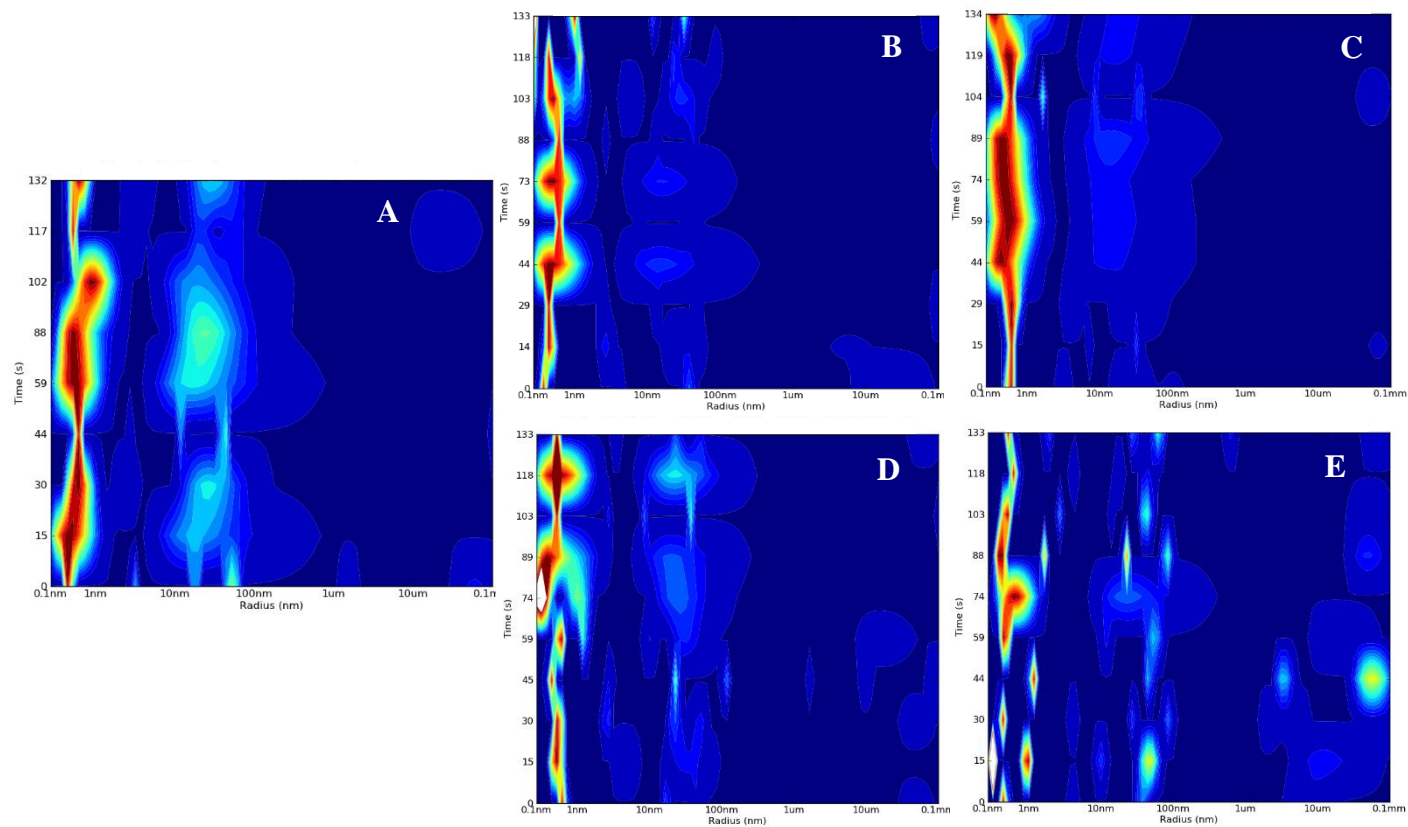


Os modelos estruturais foram gerados a partir da análise *in silico* utilizando diferentes servidores. A: IntFOLD; B: M4T Server; C: Phyre2 e D: Swiss-Model.

Figura 21 - Teste de homogeneidade do *Jc*TI-I

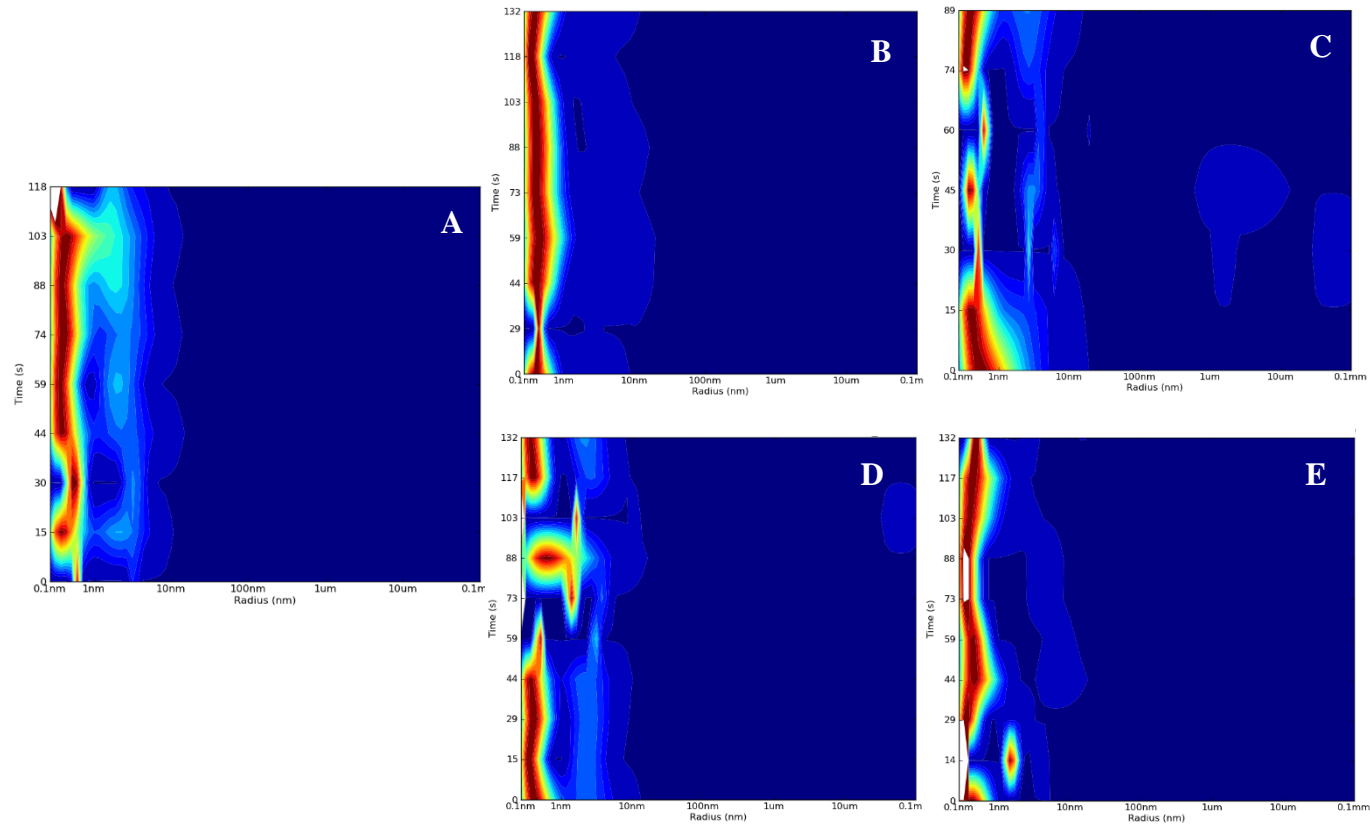


*Jc*TI-I (1 mg/mL) foi solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M. A: Gráfico bidimensional de DLS mostrando a distribuição radial do *Jc*TI-I em função do tempo. A abundância relativa de cada fração radial está representada em escala de cor (vermelho: maior; azul: menor). B: Histograma de distribuição do tamanho do *Jc*TI-I em solução.

Figura 22 - Teste de estabilidade do *Jc*TI-I

*Jc*TI-I (1 mg/mL), solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, foi acondicionado por 5 dias, a 4 °C e 25 °C, e medições feitas por DLS em diferentes dias. As medições foram realizadas nos dias 0 (A), 3 (B, D) e 5 (C, E) a 4 °C e 25 °C, respectivamente.

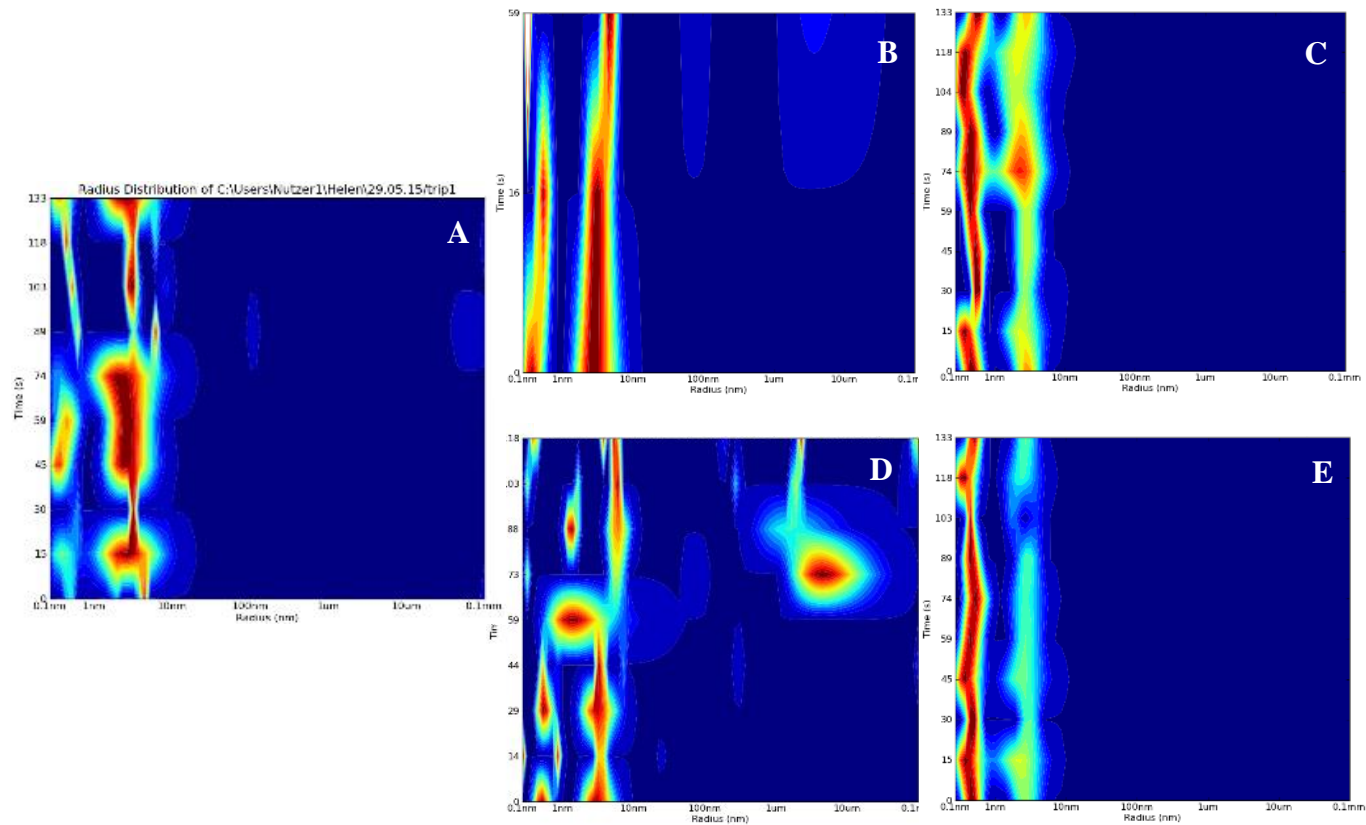
Figura 23 - Teste de estabilidade do *Jc*TI-I conjugado à tripsina



*Jc*TI-I (1 mg/mL), solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M e conjugado à tripsina (proporção 2:1, *Jc*TI-I:enzima), foi acondicionado por 5 dias, a 4 °C e 25 °C, e medições feitas por DLS em diferentes dias. As medições foram realizadas nos dias 0 (A), 3 (B, D) e 5 (C, E) a 4 °C e 25 °C, respectivamente.



Figura 24 - Teste de estabilidade da tripsina



Tripsina solubilizada em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e  $\text{CaCl}_2$  0,02 M foi acondicionada por 5 dias, a 4 °C e 25 °C, e medições feitas por DLS em diferentes dias. As medições foram realizadas nos dias 0 (A), 3 (B, D) e 5 (C, E) a 4 °C e 25 °C, respectivamente.

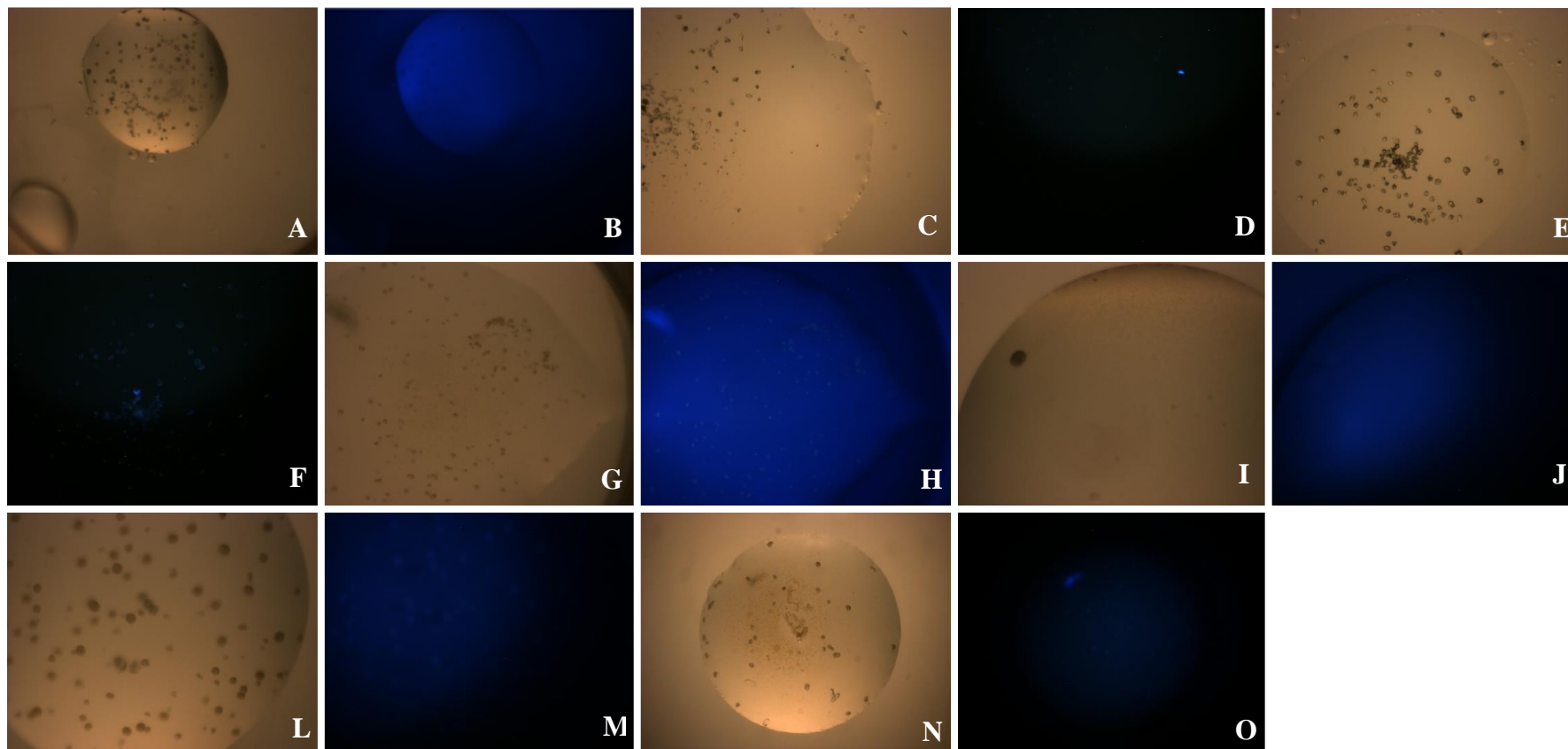
cristais avaliados em anodo rotativo por difração de raios-X foram salinos.

Uma nova tentativa foi feita usando uma solução de *JcTI-I* 10 mg/mL, no mesmo tampão e condições já citados. Dessa vez, foram observados pequenos cristais ou formação de núcleos de cristalização em algumas condições testadas. Os pequenos cristais não foram viáveis para análise em anodo rotativo, mas foi detectada fluorescência dessas formas na presença de luz ultravioleta, sugerindo a probabilidade de serem proteicos (FIGURA 25). Diante desse fato, novas condições foram testadas variando as concentrações de agentes precipitantes e técnicas de cristalização, conforme descritas na seção Métodos. Porém, por um período de observação de três meses, não foi verificada a formação de cristais nas condições testadas. Em adição, foi observado que, quando a proteína era usada em concentrações mais elevadas ( $\geq 13$  mg/mL), havia precipitação.

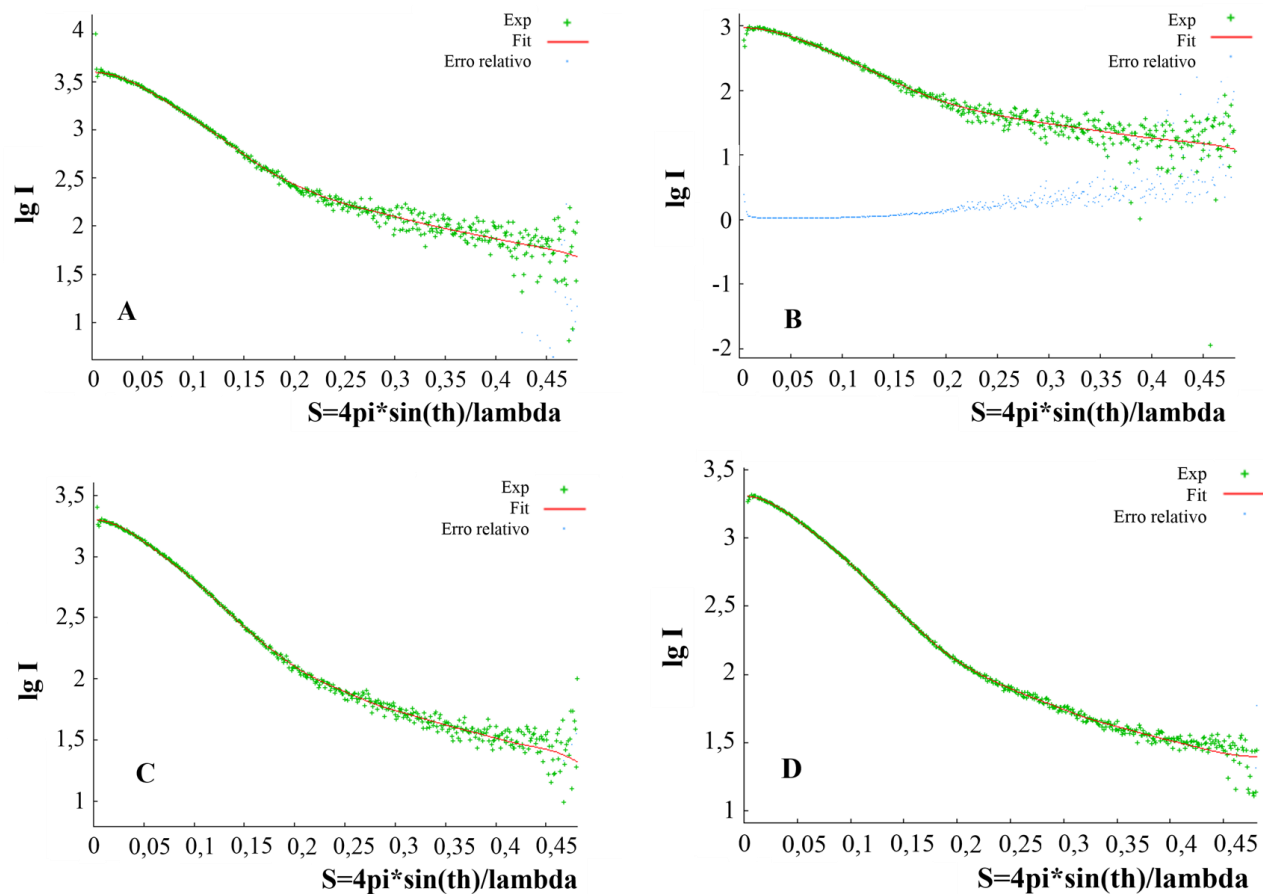
A análise do estado oligomérico do *JcTI-I* por SAXS revelou que, nas concentrações testadas (2, 4, 8 e 16 mg/mL em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo NaCl 0,15 e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M), a proteína mostrou padrão similar, apresentando-se monodispersa (FIGURA 26). Através do uso do programa GNOM, foi observado que *JcTI-I* em solução é monomodal, isto é, a proteína apresenta uma única distribuição em solução, conforme demonstrado na Figura 21B. Os valores calculados do raio de giro (Rg) e da massa molecular aparente foram 2,0 e 10 kDa, respectivamente, indicando que *JcTI-I* em solução apresenta-se como um monômero. Estas informações foram usadas na modelagem *ab initio* para determinação da estrutura de baixa resolução do *JcTI-I*. A aplicação dos programas ATSAS e DAMMIF nos dados de SAXS processados pelo GNOM mostrou que *JcTI-I* em solução se apresenta na forma alongada (FIGURA 27).

Através da comparação do modelo *ab initio* construído a partir dos dados de SAXS (FIGURA 27) com os modelos preditos *in silico* (FIGURA 20), foi predito um modelo para o *JcTI-I*, possivelmente bastante próximo à sua estrutura real. O encaixe do modelo *in silico* com o modelo *ab initio* está mostrado na Figura 28. O modelo final proposto para o *JcTI-I* também levou em consideração dados de proteínas contendo estruturas secundárias semelhantes, incluindo a albumina alérgica de *Bertholletia excelsa* (código de acesso do PDB: 2LVF), proteína recombinante pró-napina (código de acesso do PDB: 1SM7) e a cadeia D da *sweet*-proteína mabinlina-2 (código de acesso do PDB: 2DS2).

Figura 25 - Formação de nucleação e microcristais do *JcTI-I*

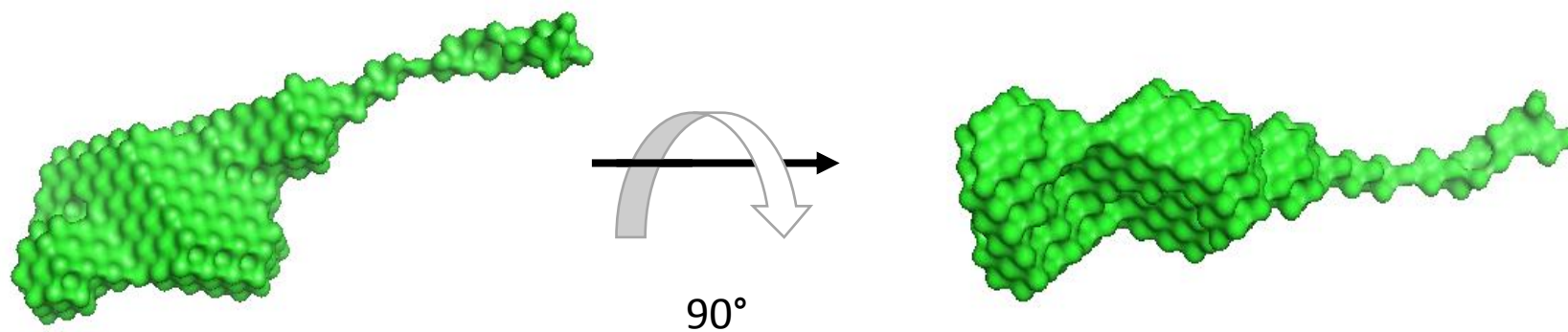


*JcTI-I* (10 mg/mL) solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, foi submetido a diferentes condições de cristalização. A-B-C-D: Acetato de sódio 0,1 M, pH 4,76, contendo fosfato de amônio 0,2 M e PEG 600 60% (PACT Premier™); E-F: Bis-Tris propano 0,1 M, pH 8,5, contendo formato de sódio 0,2 M e PEG 3350 20% (m/v) (PACT Premier™); G-H: Bis-Tris propano 0,1 M, pH 8,5, contendo sulfato de sódio 0,2 M e PEG 3350 20% (m/v) (PACT Premier™); I-J: Citrato de sódio 0,1 M, pH 6,5, contendo sulfato de amônio 1,8 M; L-M: HEPES 0,1 M, pH 8,2, contendo PEG 550 MME 15-50% (m/v) (Stura Footprint Screen); N-O Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 contendo MgCl<sub>2</sub> 0,2 M e PEG 4000 20% (m/v).

Figura 26 - Análises de SAXS do *JcTI-I*

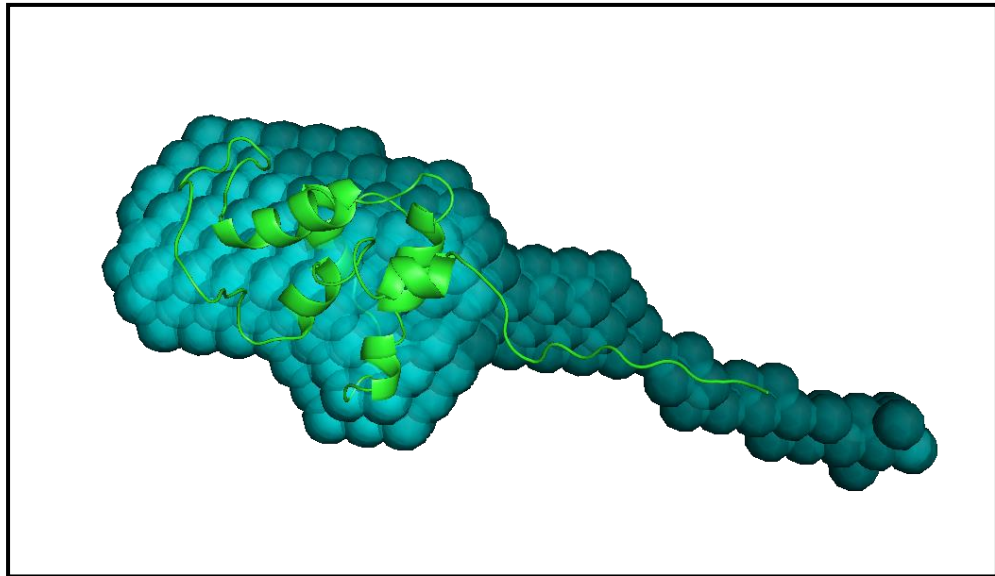
Curvas de espalhamento experimental do *JcTI-I* em diferentes concentrações. *JcTI-I* foi solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, encerrando as seguintes concentrações: 2 mg/mL (A); 4 mg/mL (B); 8 mg/mL (C) e 16 mg/mL (D).

Figura 27 - Modelo *ab initio* do JcTI-I construído a partir dos dados de SAXS



O ajuste do modelo *ab initio* foi calculado pelo programa DAMMIF.

Figura 28 - Modelo final proposto para o *JcTI-I*



Na definição do modelo acima foi considerado o encaixe do modelo obtido através de análises *in silico* (estrutura em verde) com o modelo *ab initio* construído a partir dos dados de SAXS (esferas em azul). Foi também levado em consideração dados de albuminas 2S contendo estruturas secundárias semelhantes.

## 5.6 Cinética de inibição do *JcTI-I*

Os dados da cinética de inibição da tripsina pelo *JcTI-I* estão mostrados na Figura 29. Para obtenção dos dados, uma concentração fixa de tripsina ( $8 \times 10^{-6}$  M) foi incubada na presença ( $0,5-1,0 \times 10^{-6}$  M) e ausência do *JcTI-I*. O gráfico  $1/V$  versus  $1/[S]$  mostra que, na presença do *JcTI-I*, o  $K_m$  não foi alterado, porém a  $V_{max}$  sofreu redução. Tais informações indicam que o mecanismo de inibição da tripsina pelo *JcTI-I* é do tipo não competitivo.

A constante de inibição ( $K_i$ ) calculada para o *JcTI-I* foi cerca de  $2,4 \times 10^{-7}$  M, levando à conclusão de que a inibição da tripsina por essa proteína se dá em baixa concentração.

## 5.7 Efeito do agente redutor DTT sobre a atividade inibitória de tripsina do *JcTI-I*

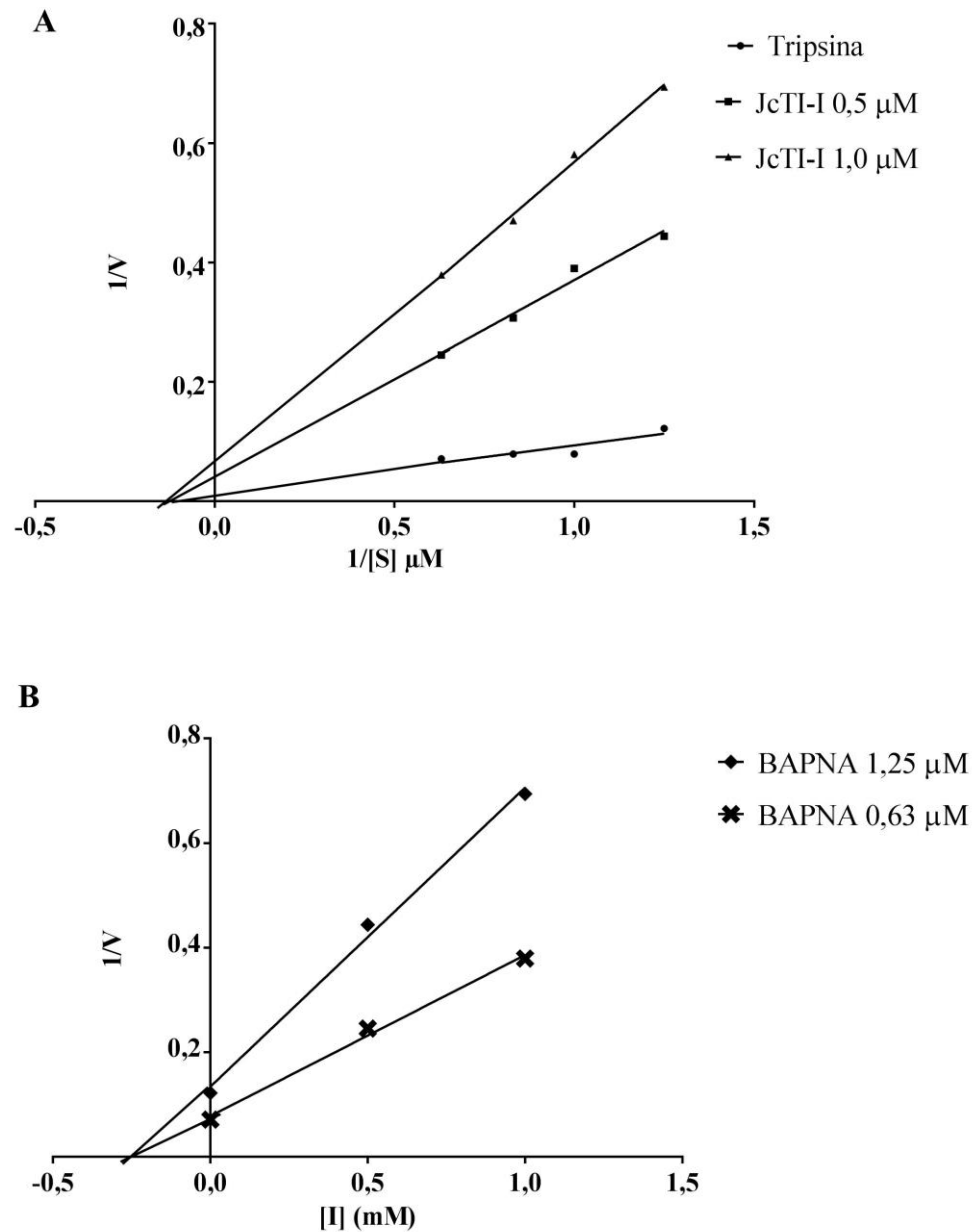
O tratamento do *JcTI-I* com DTT em todas as concentrações e tempos testados resultou na redução de sua atividade inibitória frente à tripsina. Já na menor concentração de DTT e tempo testados (0,001 M, 15 minutos), a interferência desse agente redutor sobre a atividade inibitória do *JcTI-I* foi notável. Nessa condição, a atividade residual da tripsina passou de 18% (sem tratamento com DTT) para 54%. Quando a concentração de DTT foi aumentada para 0,1 M, considerando os mesmos 15 minutos, a atividade residual da tripsina subiu para 73%.

## 5.8 Atividade antibacteriana do *JcTI-I*

Ensaio para avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do *JcTI-I* foram realizados periodicamente, após cada processo de purificação, a fim de verificar se a proteína pura estava realmente ativa. A proteína pura sempre se mostrou capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *S. choleraesuis* (FIGURA 31)

Na determinação da MIC do *JcTI* frente a essas duas bactérias, foram utilizadas concentrações desse inibidor que variaram de 5 a 500  $\mu\text{g/mL}$  (FIGURA 32). De um modo geral, em todas as concentrações testadas, o *JcTI* apresentou efeito deletério sobre as bactérias ensaiadas, sendo a inibição do crescimento bacteriano mais visível à medida que a concentração do inibidor aumentava. Aparentemente, a espécie *S. aureus* foi a menos suscetível aos efeitos inibitórios do *JcTI*, tendo mostrado retardo no crescimento em todas as

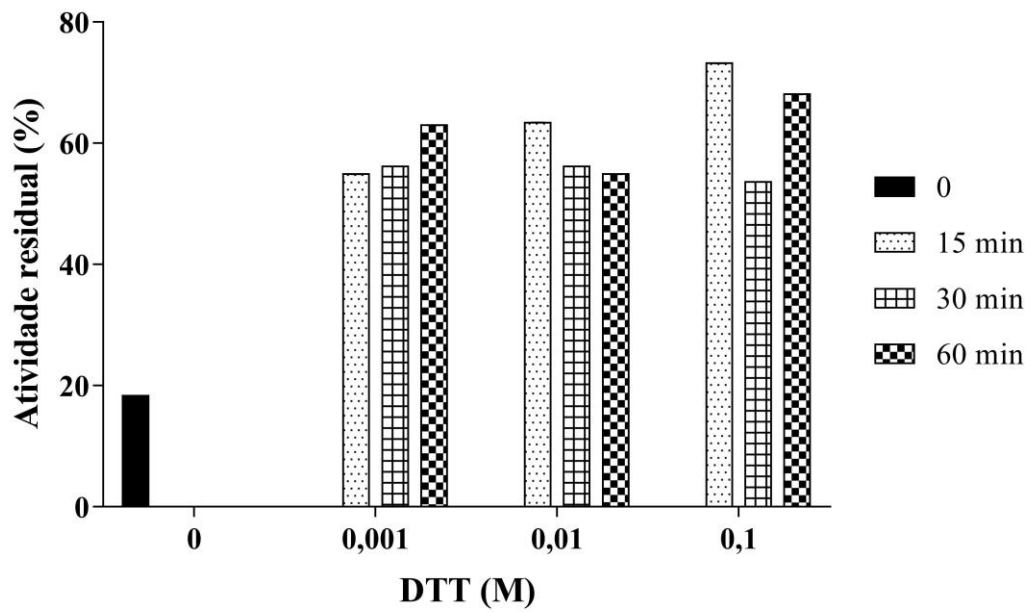
Figura 29 – Cinética da inibição de tripsina pelo *JcTI-I*



(A) Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina pelo *JcTI-I*. O mecanismo de inibição do *JcTI-I* sobre a tripsina é do tipo não competitivo ( $K_m = K_m'$ ;  $V_{m\acute{a}x} > V_{m\acute{a}x}'$ ). (B) Gráfico de Dixon. O  $K_i$  determinado foi de  $2,4 \times 10^{-7}$  M.



Figura 30 - Atividade inibitória de tripsina do *JcTI-I* após tratamento com o agente redutor DTT



*JcTI-I* foi usado a 0,035 mg/mL, uma concentração capaz de inibir a atividade da tripsina entre 50-70%, nas condições do ensaio. A atividade inibitória de tripsina foi avaliada após incubação do *JcTI-I* com DTT 0,001, 0,01 ou 0,1 M por 15, 30 ou 60 minutos a 60 °C.

concentrações utilizadas. Contrariamente, *S. choleraesuis* se mostrou bastante vulnerável aos efeitos desse inibidor, sendo completamente inibida em quase todas as concentrações usadas.

### 5.9 Modo de ação antibacteriana do *JcTI-I*

Quando avaliada a ação do *JcTI-I* 0,001 M sobre as proteases bacterianas, essa proteína se mostrou capaz de inibir em torno de 84,6% e 100% as atividades das enzimas proteolíticas de *S. aureus* e *S. choelerasius*, respectivamente (FIGURA 33). Esses valores foram semelhantes aos encontrados para o PSMF (0,001 M), um inibidor de proteases serínicas utilizado como controle positivo.

O efeito antibacteriano do *JcTI-I* provavelmente resulta de sua interação prévia com a célula bacteriana, dada à constatação de sua presença em células de *S. aureus*, observada através do acoplamento da proteína ao composto fluorescente FITC (FIGURA 34).

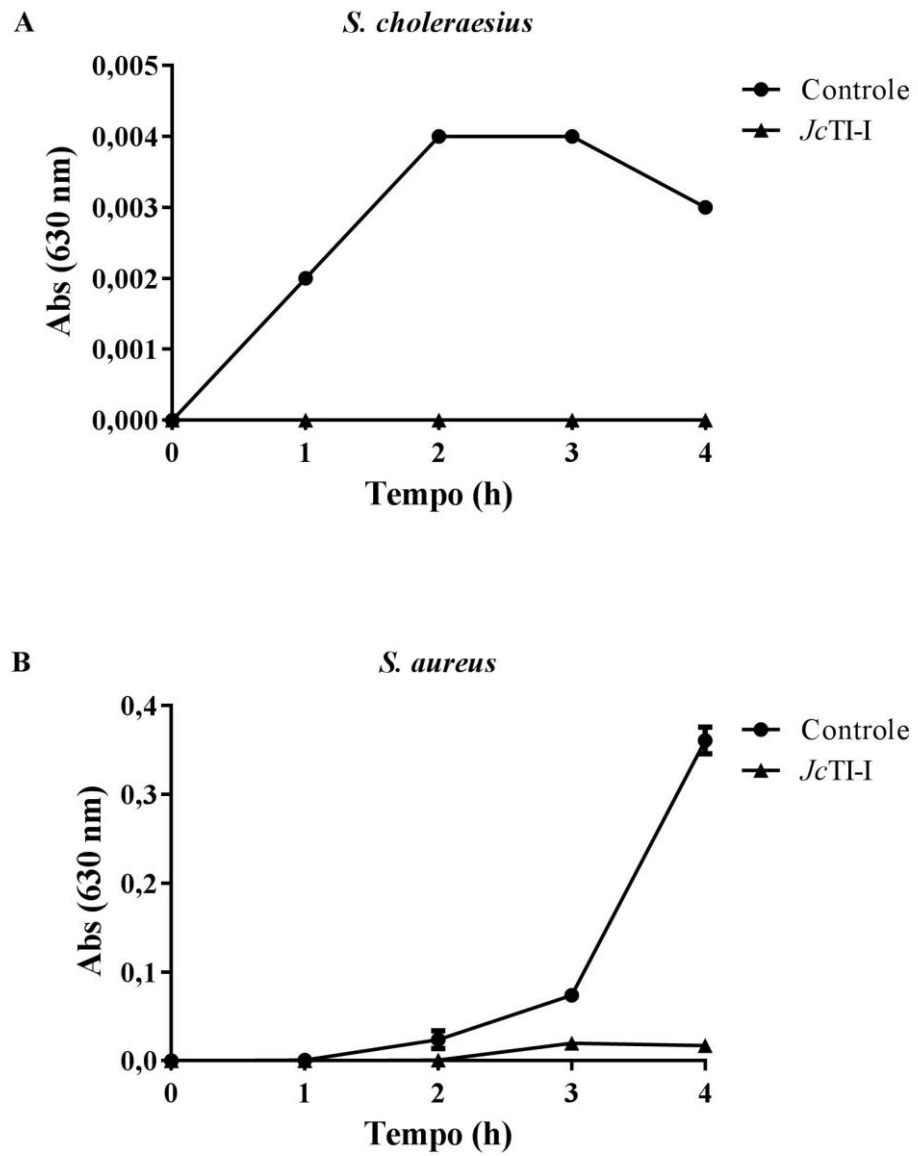
O tratamento de células de *S. aureus* com *JcTI-I* (5 µg/mL) causou aumento na permeabilidade da superfície da bactéria, permitindo a entrada do composto iodeto de propídio e sua posterior reação com moléculas de ácidos nucleicos, havendo emissão de fluorescência (FIGURA 35B). Contrariamente, células de *S. aureus* incubadas com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 não mostraram fluorescência no seu interior (FIGURA 35A).

O teste para verificação da atividade DNásica do *JcTI-I* foi positivo, ou seja, a proteína foi capaz de degradar o DNA da bactéria *C. violaceum* (FIGURA 36, Raia 3).

### 5.10. Atividade anti-toxoplasma do *JcTI-I*

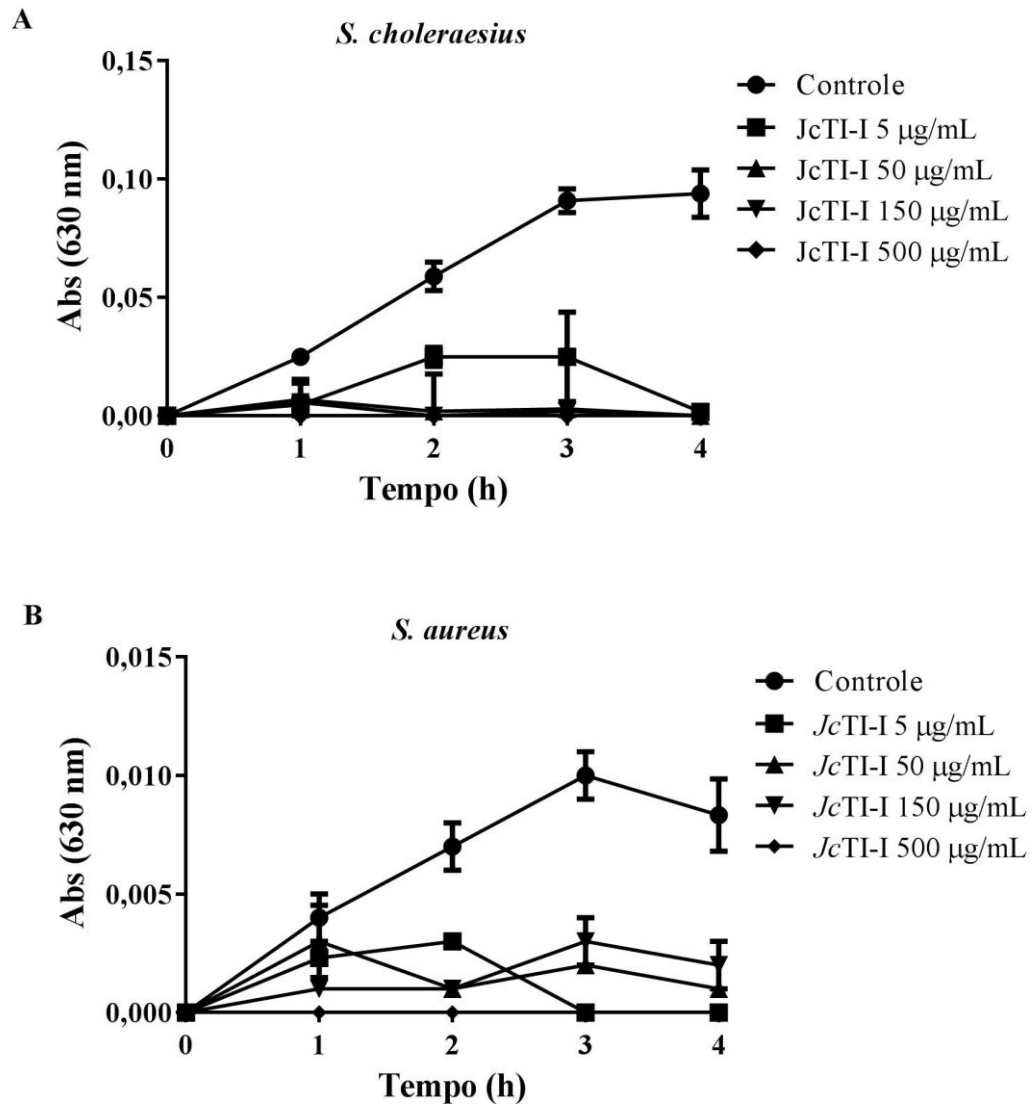
*JcTI-I*, nas quatro concentrações testadas, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL, não se mostrou citotóxico para células Vero, usadas como células hospedeiras do parasita *T. gondii*. Esses resultados mostram que qualquer uma dessas concentrações poderia ser usada nos ensaios de atividade anti-parasita (TABELA 4).

Culturas de células Vero previamente infectadas com *T. gondii* mostraram taquizoítos em estágio proliferativo, com aumento do número de parasitas dentro do vacúolo parasotóforo, confirmando a progressão da infecção. Uma vez constatada a infecção, as culturas de células Vero foram tratadas com *JcTI-I* nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL por 24 horas. Após esse tempo, foi observado que no grupo controle (não tratado com *JcTI-I*) o número de células infectadas com o parasita era  $60,5 \pm 5$ , enquanto nas culturas de células tratadas com *JcTI-I* esse número se apresentava menor, exceto quando usado a

Figura 31 - Curva de crescimento bacteriano na presença do *JcTI-I*

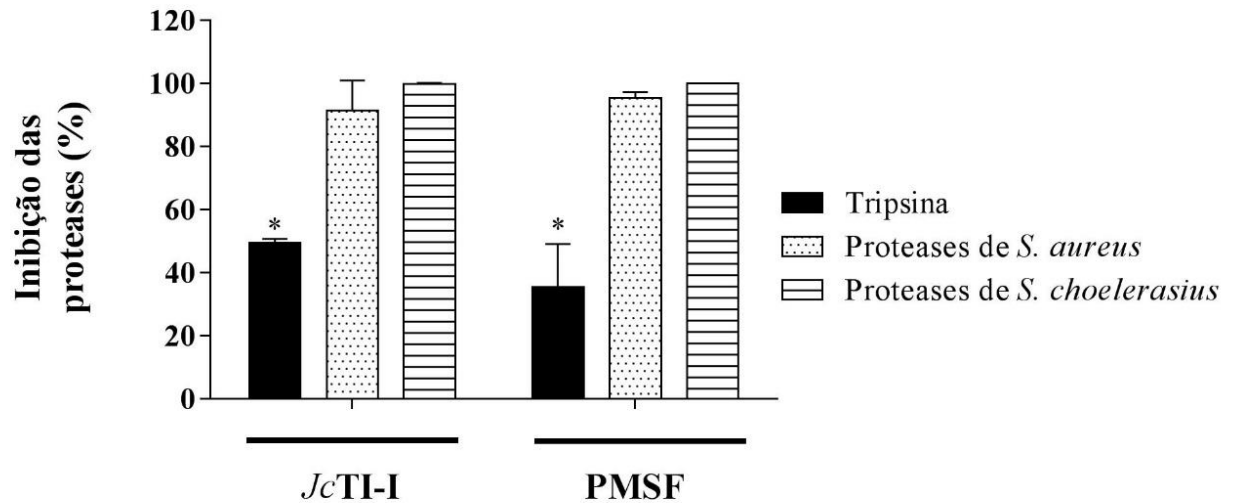
As bactérias *S. choleraesuis* (A) e *S. aureus* (B) foram postas em contato com *JcTI-I* (500  $\mu\text{gP/mL}$ ). Controle: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5.

Figura 32 - Efeito do *JcTI-I* para bactérias a diferentes concentrações sobre o crescimento de *S. aureus* e *S. choleraesuis*



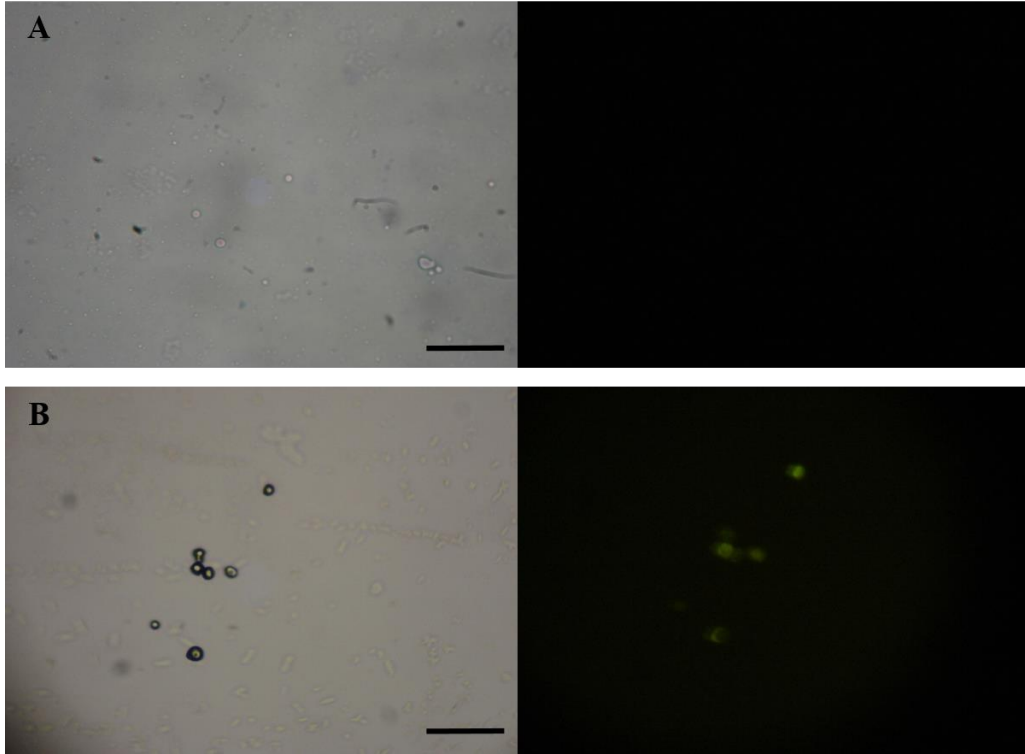
A concentração inibitória mínima (MIC) do *JcTI-I* foi estimada com base em suas diferentes concentrações (5 - 500 µg/mL) testadas frente à avaliação do crescimento das bactérias *S. choleraesuis* (A) e *S. aureus* (B). Controle: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração do *JcTI-I*. O desvio padrão foi menor do que 10%.

Figura 33 - Efeito inibitório do *JcTI-I* sobre proteases extraídas de *S. aureus* e *S. choelerasius*



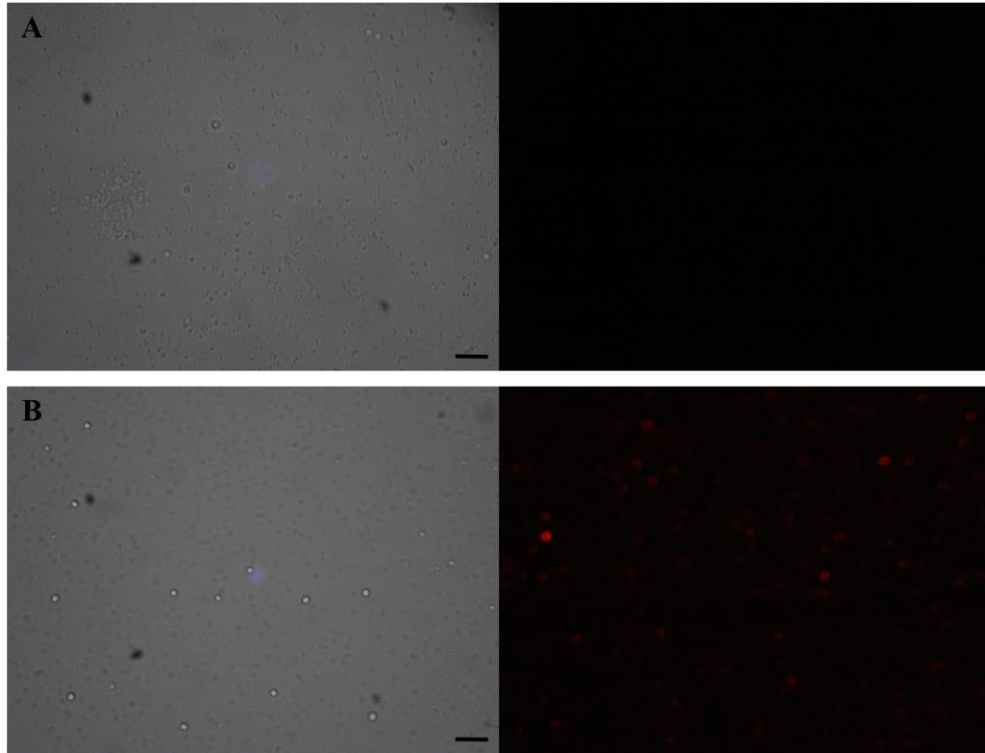
O efeito do *JcTI-I* 0,001 M sobre proteases de *S. aureus* e *S. choelerasius* foi avaliado. Tripsina bovina (0,3 mg/mL) foi utilizada como padrão de protease serínica. PMSF 0,001 M, um inibidor de protease serínica, foi utilizado como controle positivo. Asterisco representa diferença significativa ( $P < 0.05$ ) em comparação ao tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 (controle). O ensaio foi realizado em triplicata e cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão.

Figura 34 - Microscopia óptica e de fluorescência de células de *S. aureus* tratadas com *JcTI-I* acoplado ao FITC



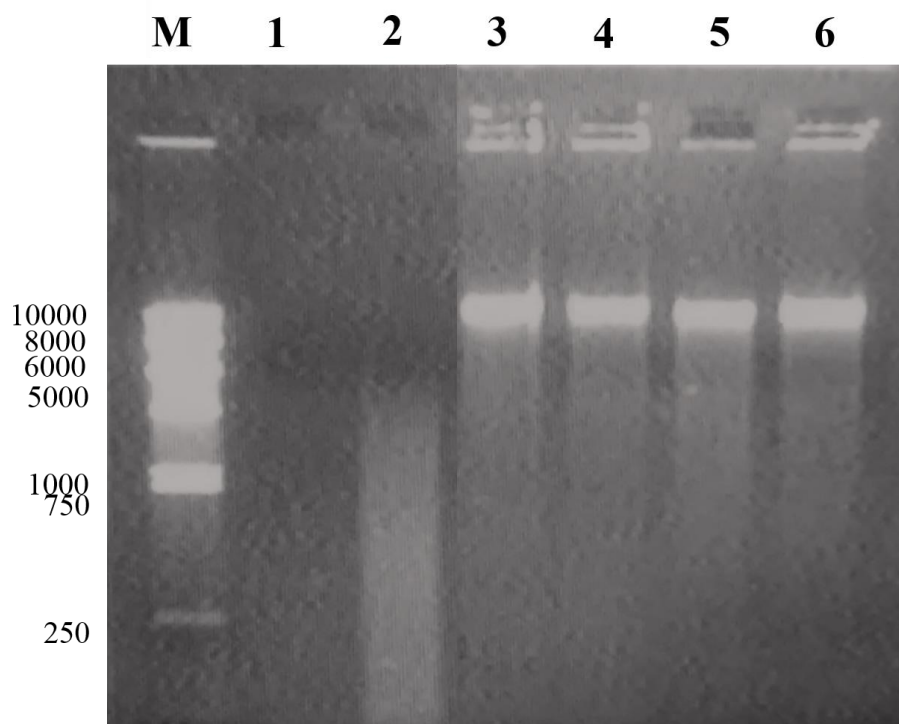
Células de *S. aureus* (D.O. 620 nm = 0,4) foram tratadas com (A) tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 ou (B) *JcTI-I* (5 µg/mL) acoplado ao FITC. Células tratadas com *JcTI-I* acoplado ao FITC emitiram fluorescência, indicando ligação da proteína à bactéria. Barra: 10 µm.

Figura 35 - Microscopia óptica e de fluorescência de células de *S. aureus* tratadas previamente com *JcTI-I* e posteriormente incubadas com iodeto de propídio



Células de *S. aureus* (D.O. 620 nm = 0,4) foram previamente tratadas com (A) tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 ou (B) *JcTI-I* (5 µg/mL), a 37 °C, por 14 horas. Após o período de incubação, 0,4 µL de uma solução de iodeto de propídio 0,001 M foi adicionado, ficando em contato por 1 hora, a 37 °C. A presença de pontos de fluorescência em células de *S. aureus* indica a entrada do iodeto de propídio decorrente do aumento da permeabilidade da membrana celular da bactéria causado pelo *JcTI-I*. Barra: 10 µm.

Figura 36 - Gel de agarose (0,8%) de DNA genômico de *C. violaceum* incubado com *JcTI-I*



A eletroforese demonstra a atividade DNásica do *JcTI-I*. Nas raias, foi aplicado 1  $\mu$ g de cada uma das proteínas testadas e 1  $\mu$ g do DNA. M: marcador; Raia 1: Controle positivo (Dnase I recombinante, livre de RNase, 5 unidades; Raia 2: *JcTI-I*; Raia 3: DNA genômico; Raias 4, 5 e 6: Controles negativos, representados por BSA, SBTI e Tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, respectivamente.



proteína na concentração de 0,05 mg/mL. *JcTI-I* a 0,1 mg/mL causou 33% de redução no número de células infectadas. Essa redução foi mais acentuada (67%) quando a concentração testada foi 1 mg/mL (TABELA 5).

Com relação ao número de taquizoítos intracelulares, o tratamento das células hospedeiras com *JcTI-I* na menor concentração testada (0,05 mg/mL) já reduziu em cerca de 50% o número desse parasita dentro das células. Essa taxa de redução subiu progressivamente com o aumento da concentração da proteína no meio. Na maior concentração de proteína testada (1 mg/mL), foi observada uma redução próxima a 90% no número de taquizoítos intracelulares (TABELA 5).

Células Vero infectadas com o parasita na ausência (controle) do *JcTI-I* preservaram suas características morfológicas, tendo sido observado propagação, citoplasma não vacuolizado e vacúolos parasitóforos contendo taquizoítos proliferativos (FIGURA 37A). Já as células infectadas e incubada com *JcTI-I* por um período de 24 horas, apesar de apresentarem características morfológicas semelhantes ao controle, exibiram diferenças expressivas em relação aos parasitas, uma vez que estes foram progressivamente destruídos ou totalmente eliminados na medida em que a concentração da proteína foi aumentando (FIGURA 37B-E).

Para verificar se *JcTI-I* estaria agindo sobre organelas ou proteínas envolvidas no processo ativo da invasão e formação do vacúolo parasitóforo, parasitas recém liberados das células hospedeiras foram tratados por 30 minutos com *JcTI-I* nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL, lavados e, posteriormente, incubados com novas células hospedeiras. Após 24

Tabela 4 - Citotoxicidade do *JcTI-I* para células Vero

<b><i>JcTI-I</i></b> <b>(mg/mL)</b>	<b>Número de células Vero</b>
0 (controle)	214,0 ± 17,4 <sup>a</sup>
0,05	226,7 ± 31,2 <sup>a</sup>
0,1	198,1 ± 14,4 <sup>a</sup>
0,5	227,8 ± 20,0 <sup>a</sup>
1,0	220,5 ± 13,1 <sup>a</sup>

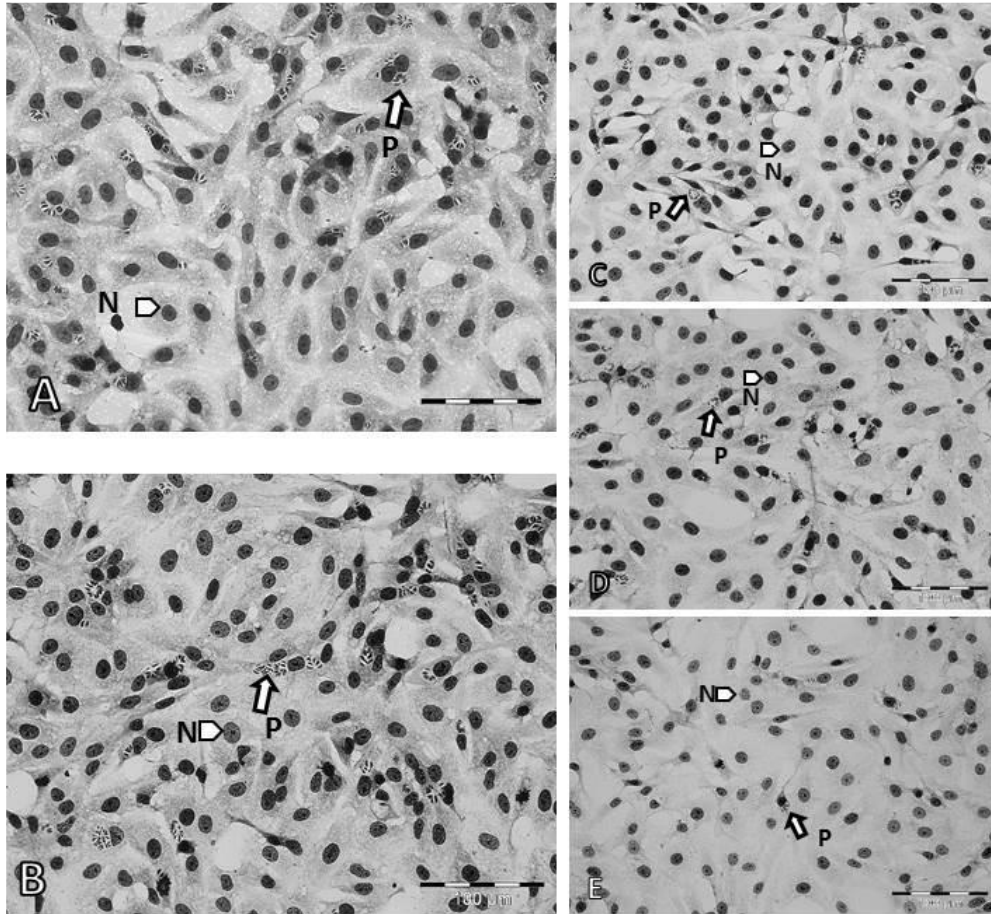
Células Vero foram usadas como hospedeiras do parasita *T. gondii*. Células Vero foram colocadas em placas de 24 poços (2 x 10<sup>4</sup> células por poço) e incubadas a 37 °C, por 48 horas. Após esse tempo, *JcTI-I* em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M) foi incubado com as células Vero a 37 °C e atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% por 24 horas. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M foi utilizado como controle negativo.

Tabela 5 - Efeito do *JcTI-I* sobre os números de células Vero infectadas com *T. gondii* e de taquizoítos intracelulares

<b><i>JcTI-I</i> (mg/mL)</b>	<b>Número de células infectadas</b>	<b>Número de parasitas intracelulares</b>
0 (controle)	60,5 ± 5,0 <sup>a</sup>	504,0 ± 29,0 <sup>a</sup>
0,05	60,1 ± 13,0 <sup>a</sup>	275,7 ± 29,0 <sup>b</sup>
0,1	40,5 ± 2,0 <sup>b</sup>	186,5 ± 4,0 <sup>c</sup>
0,5	27,8 ± 2,0 <sup>c</sup>	113,8 ± 10,0 <sup>d</sup>
1,0	20,0 ± 3,0 <sup>d</sup>	58,0 ± 7,0 <sup>e</sup>

*JcTI-I* em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL) foi solubilizado em DMSO (1% v/v) e diluído em meio DMEM 1152 suplementado com soro fetal bovino. Na contagem, apenas taquizoítos com morfologia característica em meia-lua foram considerados viáveis. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M foi utilizado como controle negativo.

Figura 37 - Microscopia óptica de células Vero infectadas com *T. gondii* tratadas ou não com *JcTI-I* em diferentes concentrações



Cultura controle (A) e células Vero infectadas e tratadas com *JcTI-I* nas concentrações de 0,05 mg/mL (B), 0,1 mg/mL (C), 0,5 mg/mL (D) e 1 mg/mL (E), por um período de 24 horas. Setas: N – núcleo de células Vero, P – vacúolo parasitóforo.

horas de incubação, nenhuma diferença foi observada no número de células infectadas nem no número de parasitas intracelulares, mesmo quando *JcTI-I* foi utilizado na concentração de 1 mg/mL (TABELA 6). Em ambos os casos, os vacúolos parasitóforos apresentaram taquizoítos replicativos (FIGURA 38). Entretanto, a análise da ultraestrutura dos parasitas tratados com *JcTI-I* mostrou desorganização e descaracterização do complexo interior pelicular e da membrana plasmática, além da múltipla formação de bolhas no citoplasma (FIGURA 39).

### **5.11 Perspectivas de uso seguro do *JcTI-I* para animais superiores**

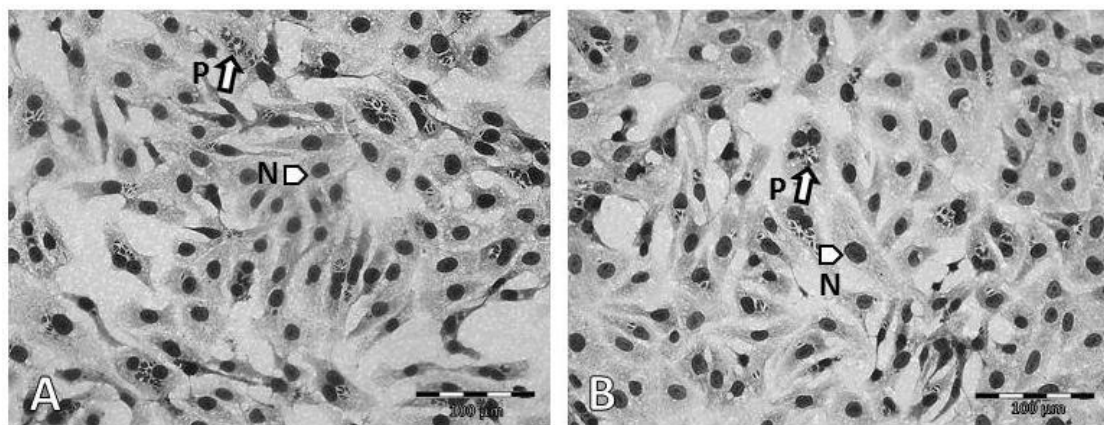
Para avaliar se *JcTI-I* teria ação citotóxica ou mesmo seria causaria toxicidade aguda, foram realizados dois ensaios: um *in vitro* e outro *in vivo*; em ambos os testes foram usadas concentrações bem mais elevadas do que aquelas usadas nos testes de atividades antibacteriana e anti-toxoplasma no presente trabalho, nos quais a proteína se mostrou ativa. *JcTI-I* (500 µg/mL) não causou lise de hemácias humanas, diferindo dos resultados observados com Triton X-100 0,1% (FIGURA 40). Adicionalmente, *JcTI-I* (5 mg/mL) não causou alterações comportamentais visíveis e letalidade em camundongos.

Tabela 6 - Efeito do pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com *JcTI-I* e posterior infecção de células Vero

<b><i>JcTI-I</i> (mg/mL)</b>	<b>Número de células infectadas</b>	<b>Número de parasitas intracelulares</b>
0 (controle)	121,0 ± 3,0 <sup>a</sup>	389,0 ± 31,0 <sup>a</sup>
1,0	117,5 ± 5,0 <sup>a</sup>	387,0 ± 3,0 <sup>a</sup>

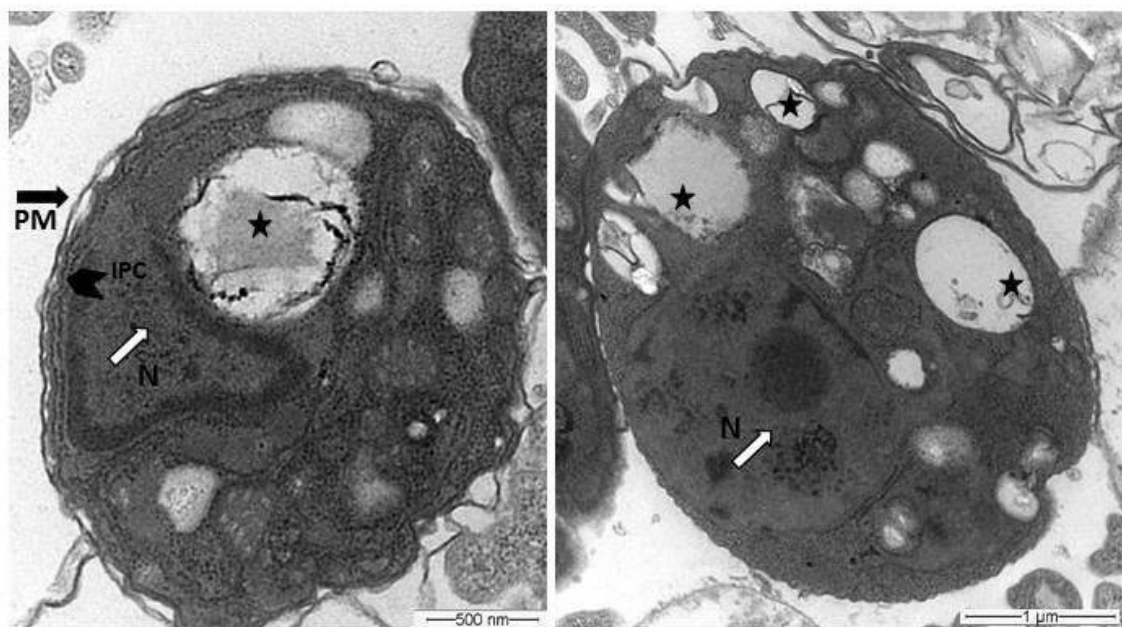
Parasitas recém liberados das células hospedeiras foram pré-tratados por 30 minutos com *JcTI-I* a 1 mg/mL, lavados e, posteriormente, incubados por 24 horas com novas células Vero. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,1, contendo NaCl 0,15 M foi utilizado como controle negativo.

Figura 38 - Microscopia óptica de células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados com *JcTI-I*



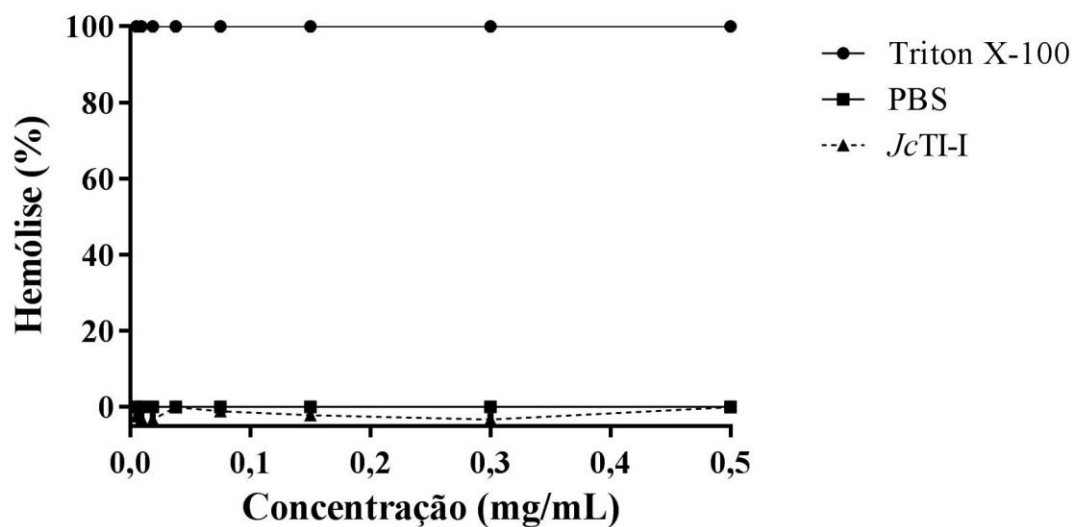
Parasitas recém liberados das células hospedeiras foram pré-tratados por 30 minutos com *JcTI-I* a 1 mg/mL, lavados e, posteriormente, incubados por 24 horas com novas células hospedeiras. Células Vero infectadas com taquizoítos incubados previamente em meio de cultura DMEM 1152 suplementado com 5% de soro fetal bovino (A) ou pré-tratados com *JcTI-I* (B). Setas: N – núcleo de células Vero, P – vacúolo parasitóforo.

Figura 39 - Microscopia eletrônica de taquizoítos extracelulares de *T. gondii* pré-tratados com *JcTI-I*



Taquizoítos foram previamente tratados com *JcTI-I* 1 mg/mL, por 30 minutos, antes da infecção das células Vero. A prévia incubação levou à desorganização da membrana pelicular interna, membrana plasmática e a formação várias vesículas no citoplasma. Seta branca: núcleo do parasita (N). Seta preta: membrana plasmática (PM). Ponta de flecha preta: membrana pelicular interna (IPC). Estrelas: vesículas.



Figura 40 - Avaliação da ação citotóxica de *JcTI-I* usando hemácias humanas

Lise de hemácias humanas foi avaliada na presença de *JcTI-I* (500  $\mu\text{g/mL}$ ). Controle positivo: Triton X-100 0,1%. Controle negativo: tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M (PBS). Os valores de D.O. 540 nm foram normalizados contra 100% de hemácias lisadas com Triton X-100 0,1%. Cada ponto representa a média de três experimentos. O desvio padrão foi menor do que 10%.

## 6 DISCUSSÃO

Para o alcance dos objetivos pretendidos no presente trabalho, com ênfase na caracterização estrutural e cinética do *JcTI-I*, o ponto de partida foi a elucidação de sua massa molecular. À princípio, foi pensado que *JcTI-I* seria uma proteína de 20 kDa. Essa previsão resultou da análise prévia do *JcTI-I* por eletroforese (PAGE-SDS) em condições não redutoras, na qual mostrou essa proteína como uma banda de massa molecular aparente de 20 kDa. O seu tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, resultou em uma massa molecular aparente de 10 kDa, observada, também, através da análise por PAGE-SDS. Para uma determinação mais precisa da massa molecular, o *JcTI-I* foi submetido à análise por espectrometria de massas, tendo a proteína intacta apresentado massa molecular de 10,252 kDa. Através dessa mesma técnica, foi analisada a proteína tratada previamente com DTT 0,1 M e IAA 0,3 M, tendo sido verificadas massas moleculares de 7,133 e 3,124 kDa. Através dos dados obtidos, foi concluído que *JcTI-I* é uma proteína de 10,252 kDa, formada por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto. É possível que, nas condições brandas em que *JcTI-I* é purificado, essa proteína sofra agregação, o que justificaria a massa molecular aparente de 20 kDa, observada por PAGE-SDS na ausência do agente redutor. Além disso, o tratamento empregado na redução do *JcTI-I* para análise por espectrometria de massas foi bem mais drástico do que aquele utilizado na avaliação por PAGE-SDS, o que também poderia contribuir para a não formação de agregados.

Para obtenção de dados da estrutura primária do *JcTI-I*, buscou-se, inicialmente, a determinação de sua sequência N-terminal. A sequência N-terminal do *JcTI-I*, constituída por 27 aminoácidos, VRDICKKEAERQDLSSCENYITQRRGY, mostrou similaridade com as de outras proteínas, em particular com albuminas 2S (COSTA *et al.*, 2014). Essa semelhança corrobora com os dados de massa molecular do *JcTI-I*, pois assim como verificado para esta proteína, várias albuminas 2S são constituídas por cadeias polipeptídicas, uma maior e outra menor, com massas moleculares bem próximas as encontradas no presente trabalho. Algumas dessas albuminas estão presentes em sementes de *Sesamum indicum* (MORENO *et al.*, 2005), *Brassica napus* L. (MONSALVE *et al.*, 1991), *B. juncea* (MANDAL *et al.*, 2002), *Ricinus communis* (IRWIN *et al.*, 1990; DA SILVA *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* (D'HONDT *et al.*, 1993) e *Glicine max* (LIN *et al.*, 2004).

De posse da sequência N-terminal do *JcTI-I*, também foi possível seu alinhamento com várias outras sequências de proteínas preditas a partir dos dados do genoma de *J. curcas*. No alinhamento realizado, oito proteínas foram identificadas como prováveis candidatas a

serem o *JcTI-I*. Posteriormente, com os dados adicionais acerca da sequência primária do *JcTI-I* gerados por espectrometria de massas, foi possível o reconhecimento da proteína predita identificada como Jcr4S009.70 como sendo o *JcTI-I*.

A proteína Jcr4S009.70 trata-se de uma pró-albumina, contendo um peptídeo sinal de 24 resíduos de aminoácidos, predito pelo programa SignalP. No entanto, com base na sequência N-terminal do *JcTI-I*, determinada por degradação de Edman, o peptídeo sinal teria 39 resíduos de aminoácidos. Em geral, as proteínas de reserva, como albuminas 2S, são sintetizadas com um peptídeo sinal. O peptídeo sinal é importante para a identificação e endereçamento da pró-albumina ao retículo endoplasmático e vacúolo de armazenamento, favorecendo a ocorrência das mudanças pós-traducionais necessárias (VON HEIJNE, 1990; KOO *et al.*, 1998; JOLLIFFE *et al.*, 2004; VITALE; HINZ, 2005). É também no retículo endoplasmático que a proteína é enovelada e as pontes dissulfeto são formadas (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995). Assim, a diferença entre o tamanho do segmento do peptídeo sinal predito pelo programa SignalP e o observado experimentalmente pode ser justificada por mudanças pós-traducionais ocorridas no retículo endoplasmático e vacúolo de armazenamento, de forma semelhante ao verificado com a albumina 2S da castanha do Pará. Essa albumina 2S sofre uma primeira clivagem na extremidade N-terminal, onde está localizado o peptídeo sinal, tão logo alcança o retículo endoplasmático. Posteriormente, ao chegar no vacúolo de armazenamento, essa albumina 2S sofre uma segunda clivagem na porção N-terminal, causando a remoção de 14 resíduos de aminoácidos (SAALBACH; ROSSO; SHUMANN, 1996).

Na verdade, o peptídeo sinal presente nas albuminas 2S normalmente apresenta 3 domínios: um N-terminal, um central e um C-terminal (VON HEIJNE, 1990). Os dados encontrados para o *JcTI-I* condizem com essa informação. Além do peptídeo sinal presente no domínio N-terminal, é provável que o *JcTI-I* apresente regiões localizadas nos domínios central e C-terminal, as quais são removidas por mudanças pós-traducionais, uma vez que tais segmentos não foram cobertos pela sequência N-terminal e sequências dos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Esse tipo de processamento é observado para a albumina 2S da castanha do Pará que, após chegada ao vacúolo de armazenamento, além de sofrer a remoção de resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal, sofre a clivagem de um segmento constituído por 5 resíduos de aminoácidos situados na região central e de um outro com 4 resíduos de aminoácidos localizado no domínio C-terminal (SAALBACH; ROSSO; SHUMANN, 1996). Um peptídeo sinal interno também foi identificado na pró-albumina de *R. communis* (JOLLIFFE *et al.*, 2004).

O alinhamento da sequência do *JcTI-I* maduro, portanto sem o peptídeo sinal, apresentou similaridade com albuminas 2S ou seus precursores, mostrando a presença de oito resíduos de cisteína conservados, seguindo o padrão ----C----C-----CC----CXC----C----C----. Tais resíduos de cisteína estão envolvidos na formação de quatro pontes dissulfeto, duas intercadeias e duas na cadeia maior (MORENO; CLEMENTE, 2008). A rigor, as albuminas 2S são geralmente sintetizadas como uma cadeia polipeptídica de 10 a 15 kDa que, posteriormente, passa por mudanças pós-traducionais, levando à formação das duas cadeias (uma maior e outra menor). Além disso, essa classe proteica apresenta grande variação de aminoácidos e mesmo sequências divergentes, o que justificaria a similaridade apenas em torno de 40% observada entre o *JcTI-I* e albuminas 2S já sequenciadas. No entanto, apesar da divergência na sequência de aminoácidos, o padrão de posicionamento dos resíduos de cisteína é conservado (HSIAO *et al.*, 2006). Assim, considerando os dados de sequência de aminoácidos determinados para o *JcTI-I*, sua semelhança com outras albuminas 2S e o padrão de conservação dos resíduos de cisteína, a predição é que as pontes dissulfeto na proteína em estudo envolva as cisteínas nas posições 5-59, 17-87, 88-94 e 61-99. Essas pontes dissulfeto conferem estabilidade à molécula proteica, que podem favorecer a manutenção das estruturas em  $\alpha$ -hélices (CHHABRA; DIXIT, 2013).

A possibilidade de ocorrência de sítios de glicosilação no *JcTI-I* também foi investigada através de análises *in silico*. Vários dos sítios de glicosilação preditos se mostraram presentes no peptídeo sinal. Possíveis sítios de glicosilação também foram previstos na proteína madura, corroborando com os achados prévios de Costa *et al.* (2014) de que *JcTI-I* é uma glicoproteína, contendo 6,4% de carboidratos. Outras albuminas 2S também são glicosiladas, como as proteínas ligantes à quitina de *Moringa oleifera*, denominadas *Mo-CBP<sub>3</sub>* (GIFONI *et al.*, 2012) e *Mo-CBP<sub>4</sub>* (PEREIRA *et al.*, 2011). Adicionalmente, o programa YinOYang, usado na identificação de sítios de glicosilação, também identificou um possível ponto de fosforilação no resíduo 30, que se trata de uma tirosina, fazendo parte do peptídeo sinal. É possível que tais sítios de modificação pós-traducionais no peptídeo sinal contribuam para identificação e endereçamento do *JcTI-I* na célula vegetal.

Quanto à estrutura secundária do *JcTI-I*, dados de dicroísmo circular mostraram que essa proteína é formada, principalmente, por estruturas em  $\alpha$ -hélices e não ordenadas. Esses dados corroboram para classificação do *JcTI-I* como uma albumina 2S. Essas proteínas, em geral, são formadas por 4-5  $\alpha$ -hélices, posicionadas entre voltas e estruturas não

ordenadas. Tais estruturas em  $\alpha$ -hélices são estabilizadas e mantidas por ligações dissulfeto (MILLS *et al.*, 2004; CHHABRA; DIXIT, 2013).

De posse da sequência da pró-proteína do *JcTI-I*, foram conduzidas análises *in silico* voltadas à determinação de sua estrutura tridimensional, utilizando servidores presentes no Portal Model. As estruturas obtidas mostraram diferenças entre si, o que pode ser devido à similaridade apenas em torno de 40% entre a proteína em estudo e as sequências das proteínas depositadas no PDB, conforme já mencionado. As regiões mais conservadas foram aquelas onde se encontravam os resíduos de cisteína. Apesar das divergências, foi observado que todos os modelos continham, pelo menos, quatro  $\alpha$ -hélices, estabilizadas por pontes dissulfeto, uma característica bastante comum para a classe das albuminas 2S (MURZIN *et al.*, 1995). Essa predominância de  $\alpha$ -hélices no *JcTI-I*, observada através de análises *in silico*, se mostrou condizente com os dados experimentais obtidos por dicroísmo circular.

Os experimentos de cristalização foram iniciados com avaliação da homogeneidade do *JcTI-I* em solução por DLS, visto se tratar de uma condição essencial para obtenção do cristal. Essa homogeneidade é observada por meio da natureza monodispersa da proteína em solução (DEV; SUROLIA, 2006). Após determinada a solução em que a proteína se apresentava monodispersa (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e CaCl<sub>2</sub> 0,02 M), prosseguiu-se com os testes de estabilidade, tendo sido observado que a temperatura ambiente (25 °C) era a mais indicada para os testes de cristalização. Além disso, foi verificado que a proteína incubada com tripsina, na proporção de 1:2, se apresentava mais estável. De fato, alguns inibidores são mais facilmente cristalizados quando complexados com a enzima alvo (SWEET *et al.*, 1974; BODE *et al.*, 1989; ZHOU *et al.*, 2013). Além da tripsina, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M foi também incluído na solução de incubação do *JcTI-I*, conforme mencionado. Cátions divalentes são capazes de aumentar a atividade enzimática da tripsina, por alterarem sua conformação, resultando na melhor interação entre o inibidor e a protease (GREEN; NEURATH, 1953).

Apesar do estabelecimento de condições favoráveis da solução de *JcTI-I* à obtenção de cristais, isso não foi possível! Não obstante, o crescimento de cristais proteicos de tamanho suficientemente adequado para realização do experimento, é o passo mais difícil da cristalografia. A rigor, o processo de cristalização é caracterizado por dois passos: nucleação e crescimento do cristal, requerendo a formação de uma solução supersaturada de proteína precipitante; entretanto, é necessário um nível maior de supersaturação para a nucleação do que para o crescimento do cristal, o que dificulta o controle individual desses parâmetros (MCPHERSON; MALKIN; KUZNETSOV, 1995; MCPHERSON, 2004). No

caso específico do *JcTI-I*, testes adicionais variando a concentração da proteína entre 5 e 10 mg/mL e incluindo pequenas modificações das soluções precipitantes nas quais foram observadas nucleação devem ser conduzidos.

Quando a amostra foi submetida à análise por SAXS, foi obtida uma estrutura *ab initio* de baixa resolução, correspondente à superfície proteica. Essa técnica é muito utilizada para refinamento de estruturas obtidas por difração de raios-X (SKOU; GILLILAN; ANDO, 2014). No presente trabalho, a análise por SAXS foi realizada com finalidade de contribuir na avaliação de qual modelo gerado *in silico* para o *JcTI-I* seria o mais próximo do real. Com base na comparação entre os modelos e a estrutura obtida, chegou-se a uma estrutura baseada na proteína 1PSY (RicC3, albumina 2S de *R. communis*) deposita no PDB (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2003). Essa proteína é uma albumina 2S isolada de sementes de *R. communis* e caracteriza-se por apresentar quatro  $\alpha$ -hélices, estabilizadas por pontes dissulfeto entre regiões de *loops*. Trata-se de uma estrutura estendida, com uma longa cauda e uma região globular.

Uma das características do *JcTI-I* é sua capacidade de inibir tripsina. Inclusive, essa é a razão pela qual foi dado o nome *JcTI-I* à proteína em estudo, já que essa propriedade foi uma das primeiras observadas. Inibidores de  $\alpha$ -amilase/tripsina e albuminas 2S, juntamente com as nsLTPs constituem o grupo das prolaminas. Essas classes proteicas provêm de um ancestral comum, o que justificaria a similaridade entre elas e ocorrência de albuminas 2S com atividade inibitória de tripsina (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995; MILLS *et al.*, 2004). Inibidores exibindo sequências de aminoácidos similares as de albuminas 2S podem ser exemplificados através dos inibidores de tripsina purificados de sementes de *Brassica juncea* (TERRAS *et al.*, 1993; MANDAL *et al.*, 2002).

A avaliação da cinética de inibição do *JcTI-I* mostrou que essa proteína é capaz de inibir a tripsina por um mecanismo do tipo não-competitivo, a exemplo do observado com as proteínas denominadas AETI, APTI e TTI, purificadas de sementes de *Archidendron ellipticum* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006), *Adenanthera pavonina* (MACEDO *et al.*, 2004) e *Tamarindus indica* (ARAÚJO *et al.*, 2005), respectivamente. *JcTI-I* interagiu com a tripsina numa razão molar de 1:1,7, indicando uma estequiometria de 1:2, com dois sítios de ligação equivalentes. Nesse tipo de inibição, o inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, logo a constante de Michaelis-Menten permanece constante; o inibidor de liga em outro local da enzima, provocando alteração conformacional, que resulta na diminuição de sua velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Resultado semelhante foi observado para um inibidor de tripsina isolado de folhas de *M. oleifera* (BIJINA *et al.*, 2011).

*JcTI-I* apresentou uma constante de inibição ( $K_i$ ) de  $2 \times 10^{-11}$  M, indicando alta afinidade pela tripsina. Essa  $K_i$  é menor do que aquelas calculadas para os inibidores CBTI-2, de *Caesalpinia banduc* (BATTACHARYYA *et al.*, 2007), e AETI (BATTACHARYYA *et al.*, 2006), cujos valores de são  $2,4 \times 10^{-10}$  M e  $2,7 \times 10^{-10}$  M, respectivamente, demonstrando uma menor afinidade destes inibidores pela tripsina, em comparação à proteína em estudo no presente trabalho.

Tendo em vista a observação da presença de pontes dissulfeto no *JcTI-I*, a influência do DTT na atividade inibitória de tripsina foi avaliada. A incubação do *JcTI-I* com DTT na menor concentração e tempo (0,001 M, 15 minutos) testados já foi capaz de reduzir sua atividade inibitória. Essa perda de atividade certamente resultou da quebra de pontes dissulfeto e, conseqüentemente, da alteração da conformação nativa do *JcTI-I*. Todavia, a atividade inibitória do *JcTI-I* não foi abolida completamente, mesmo quando a concentração de DTT foi aumentada 100 vezes (0,1 M) e o tempo de incubação estendido para 60 minutos. É provável que isto seja devido à localização das pontes dissulfeto que, uma vez situadas no interior da molécula, dificultaria o acesso do agente redutor e, por conseguinte, sua ação (BRAAKMAN; HELENIUS; HELENIUS, 1992). A propósito, a capacidade de inibição da tripsina de muitos inibidores proteicos tem sido diretamente relacionada à manutenção de suas pontes dissulfeto. Isso pode ser observado para inibidores clássicos, como os do tipo Bowman-Birk (DANTZGER *et al.*, 2015) e Kunitz (SHAH *et al.*, 2016), visto que esse tipo de ligação parece estar próximo ao domínio vinculado às suas respectivas atividades anti-trípticas (SINGH; APPU RAO, 2002). Um inibidor de tripsina isolado de sementes de *Clitoria fairchildiana* teve sua atividade reduzida em 77% nas menores concentrações de DTT (0,001 M) e tempos utilizados (15 minutos) (DANTZGER *et al.*, 2015).

Vários peptídeos e proteínas antimicrobianos têm sido isolados de diversas fontes, tais como bactérias, plantas e fungos (PELLEGRINI *et al.*, 2006). Nas plantas, essas moléculas estão presentes em vários órgãos, mas é das sementes que, geralmente, foram isoladas, dada a sua presença em maior quantidade (CHU; NG, 2003; FRANCO *et al.*, 2006). Incluídas nessa classe de moléculas, estão as albuminas 2S (PELLEGRINI *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2007; ODINTSOVA *et al.*, 2010), que apresentam a função de reserva como seu mais importante papel fisiológico, devido à grande quantidade de resíduos de glutamina em sua estrutura primária, o qual representa uma fonte de nitrogênio, elemento fundamental para o desenvolvimento das sementes (HSIAO *et al.*, 2006; MORENO; CLEMENTE, 2008).

Entretanto, essas moléculas também têm mostrado ação contra fitopatógenos, o que sugere seu envolvimento na defesa vegetal (MARIA-NETO *et al.*, 2011; GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2014).

Na temática acima abordada, encontra-se incluída a proteína denominada *JcTI-I*, purificada a partir da torta de *J. curcas* pelo nosso grupo de pesquisa, que apresenta N-terminal com similaridade às albuminas 2S e capacidade de inibir o crescimento de bactérias de importância na clínica médica, mas, também, se mostra capaz de inibir a tripsina (COSTA, 2012). Porém, até a realização do presente trabalho, nada havia feito no sentido de contribuir para o conhecimento do modo de ação antibacteriana do *JcTI-I* e de saber se essa proteína teria outros alvos. Diante disso, a obtenção de tais informações passou a ser o objetivo principal do presente trabalho e para isso foi, inicialmente, indispensável a obtenção de quantidades do *JcTI-I* puro e, sobretudo, com atividade bacteriana.

Atividade antibacteriana do *JcTI-I* foi verificada com *S. aureus* e *S. choleraesuis*. A concentração inibitória mínima (MIC) do *JcTI-I* para ambas bactérias foi 5 µg/mL. Esta concentração é inferior, cerca de 6 vezes, àquela do inibidor de proteases serínicas purificado de tubérculos de *Solanum tuberosum* (MIC em torno de 30 µg/mL), que se mostrou efetivo contra várias bactérias, incluindo *S. aureus* (KIM *et al.*, 2006) e, também, menor, em torno de 50 vezes, a determinada para Xb-KTI (MIC em torno de 256 µg/mL), um inibidor de tripsina tipo Kunitz purificado de cormos de *Xanthosoma blandum*, ativo contra *Salmonella typhimurium* (LIMA *et al.*, 2011). Em adição, a MIC do *JcTI-I* foi aproximadamente 25 menor do que aquela da cloxacilina (MIC em torno de 128 µg/mL), um antibiótico β-lactâmico usado como droga terapêutica contra MRSA (ISLAM *et al.*, 2008). De acordo com Hancock (2000), os melhores peptídeos ou proteínas candidatos a drogas bacterianas possuem MIC variando de 1 a 8 µg/mL. Com base nesses dados, *JcTI-I* pode ser considerado um potente inibidor do crescimento bacteriano, com perspectiva de uso como proteína antibiótica. No entanto, para que isso venha a ser concretizado, o conhecimento do seu modo de ação é mandatório. Para dar início a essa investigação, a bactéria *S. aureus* foi aqui selecionada como modelo, por se tratar de um patógeno de inequívoca relevância na clínica médica.

É sabido que, em geral, um agente antimicrobiano atua por meio de quatro possíveis mecanismos. O primeiro deles seria destruindo ou impedindo a síntese da parede celular, o que tornaria a célula vulnerável à ação osmótica. Uma segunda possibilidade seria através de danos causados à membrana celular do microrganismo. Outro modo de ação possível seria através da inibição da síntese de proteínas ou enzimas cruciais ao desenvolvimento do microrganismo. Finalmente, o quarto mecanismo seria inibindo a síntese



de DNA ou causando danos a essa biomolécula (IBRAHIM; AOKI; PELLEGRINI, 2002). Considerando que dois desses mecanismos envolvem o comprometimento da superfície celular do microrganismo e, particularmente, já tendo sido reportado que albuminas 2S podem causar alteração na permeabilidade de membranas (MARIA-NETO *et al.*, 2011), os primeiros experimentos aqui realizados tiveram voltados à avaliação da interação do JcTI-I com *S. aureus* e da alteração na permeabilidade da superfície da célula bacteriana porventura induzida por essa proteína.

Um ensaio clássico utilizado na avaliação da interação de proteínas com a superfície celular de microrganismos é o acoplamento da proteína-teste com o fluoróforo FITC. Este composto é um derivado da fluoresceína, capaz de se ligar aos grupos amina da proteína, gerando conjugados fluorescentes. Células de microrganismos postas em contato com proteínas conjugadas ao FITC são capazes de emitir fluorescência, caso ocorra interação entre elas, sugerindo ligação da proteína à superfície da célula alvo. Nesse trabalho, células de *S. aureus* incubadas com o conjugado JcTI-I – FITC apresentaram fluorescência, quando visualizadas por microscopia de fluorescência, sugerindo a interação da proteína com a membrana celular desse microrganismo. Essa ligação pode ser decorrente de interações eletrostáticas, mediadas por regiões negativas dos lipídios de membrana e regiões positivas do JcTI-I. De fato, já foi proposto o envolvimento de interações eletrostáticas em um processo semelhante (SCHIMDT *et al.*, 2010). Há casos, como o observado para a albumina 2S SiAMP-2, isolada de sementes de gergilim, que tais interações eletrostáticas são estabilizadas por forças de Van der Waals (MARIA-NETO *et al.*, 2011).

Além da capacidade de interação com a superfície da bactéria, JcTI-I parece causar danos à membrana celular de *S. aureus*, pois quando células desse microrganismo foram previamente tratadas com a proteína em estudo e postas na presença de iodeto de propídio, fluorescência característica da ligação desse composto químico aos ácidos nucleicos foi observada. A célula é impermeável a esse marcador nuclear e, em princípio, ele não atravessa a membrana da célula viva. Assim, quando esse composto se liga a ácidos nucleicos é porque a célula perdeu a integridade de sua membrana periférica, por rupturas ou formação de poros e, provavelmente, está morta (PINA-VAZ *et al.*, 2001). Alguns peptídeos e proteínas antimicrobianos se acumulam sobre a superfície da membrana celular causando um colapso, resultante da formação de poros oriundos de interações com lipídios mediadas pelas porções catiônicas e/ou hidrofóbicas da macromolécula (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; PELLEGRINI; FRANCO, 2005; NAWROT *et al.*, 2014).

A formação de poros na membrana bacteriana poderia ocasionar a internalização do *JcTI-I* e, conseqüente, interação com moléculas intracelulares. Isso poderia resultar, inclusive, na ligação do *JcTI-I* a proteases bacterianas. De fato, *JcTI-I* se mostrou capaz de inibir em torno de 84,6% e 100% as atividades das enzimas proteolíticas de *S. aureus* e *S. choelerasius*, respectivamente, valores similares ao verificado com PMSF, um inibidor sintético de proteases serínicas. A inibição verificada poderia ser de proteases endógenas ou daquelas secretadas no meio pelas bactérias. Em ambos os casos, essas proteases poderiam estar desempenhando papel importante na aquisição de nutrientes. Em adição, tem sido mostrado que proteases serínicas estão implicadas na virulência de cepas bacterianas (SPERANSKAYA *et al.*, 2006; TRIPATHI *et al.*, 2011). Portanto, o uso de substâncias capazes de interferir com a atividade proteolítica dessas enzimas, como são os inibidores de proteases, pode ser uma estratégia efetiva no controle de infecções bacterianas (GONZÁLEZ-LAMOTHE *et al.*, 2009).

*JcTI-I*, uma vez internalizado, poderia também interagir com o DNA bacteriano. Assim, a atividade desoxirribonucleásica (DNásica) do *JcTI-I* foi investigada, utilizando DNA genômico da bactéria *C. violaceum*. *JcTI-I* (1 µg) se mostrou capaz de degradar DNA e essa atividade provavelmente deve ter contribuído para inibição do crescimento de *S. aureus*. A atividade nucleásica (DNásica e RNásica) de albuminas 2S já é conhecida (BATHIA; LODHA, 2005; TOMAR *et al.*, 2014a,b), suportando os resultados encontrados com *JcTI-I*.

Com base nos dados obtidos com *S. aureus*, um modelo é aqui proposto na tentativa de explicar o modo de ação antibacteriana do *JcTI-I*. Inicialmente, ocorre interação física do *JcTI-I* com a célula bacteriana, resultando na alteração da permeabilidade de sua superfície celular (parede e/ou membrana), o que possibilita o acesso da proteína para o meio intracelular. Uma vez internalizada, a proteína é capaz de atingir múltiplos alvos, dentre eles as proteases e o DNA bacterianos, causando sua inativação e degradação, respectivamente. No caso do DNA, a degradação é suposta com base na atividade desoxirribonucleásica do *JcTI-I* detectada *in vitro*. Esse conjunto de eventos resulta na inibição do crescimento da bactéria.

Com o propósito de avaliar se a ação deletéria do *JcTI-I* seria seletiva para bactérias ou não, essa proteína foi testada contra o patógeno causador da toxoplasmose, *T. gondii*. As análises realizadas tiveram como foco a avaliação do efeito do *JcTI-I* sobre o ciclo de vida desse protozoário, visto que já é relatada na literatura a importância de proteases serínicas no processo de invasão da célula hospedeira e biologia do parasita. Na verdade, o próprio *T. gondii* já produz inibidores de proteases serínicas (TgPI1 e TgPI2), os quais estão

envolvidos na regulação da invasão celular e formação de bradizoítos. Esses inibidores se mostraram capazes de inibir várias proteases serínicas, incluindo a tripsina (MORRIS; CARRUTHERS, 2003; PSZENNY *et al.*, 2011). Além disso, inibidores de proteases serínicas 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI) e 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil fluoreto (AEBSF) foram capazes de inibir a invasão de taquizoítos à célula hospedeira (CONSEIL; SOËTE; DUBREMETZ, 1999).

Nos ensaios de avaliação dos efeitos do *JcTI-I* sobre *T. gondii* foram utilizadas como modelo de célula hospedeira a célula Vero. Tais células são fibroblastos de rim de macaco verde africano que apresentam características como homogeneidade de populações e boa aderência a substratos sólidos, além de suportarem longos períodos de infecção com taquizoítos do parasita *T. gondii*. Assim, essas células são bastante apropriadas para o estudo de interação com esse parasita. Inicialmente, células hospedeiras infectadas com o parasita e, posteriormente, postas em contato com diferentes concentrações de *JcTI-I* mostraram, de maneira geral, uma diminuição do número de células infectadas, bem como do número de parasitas intracelulares. Apenas taquizoítos com a morfologia em forma de meia-lua são considerados viáveis. Porém, nesse estudo, muitas células contendo taquizoítos arredondados, e provavelmente inviáveis, foram consideradas infectadas, o que pode ter subestimado a capacidade de *JcTI-I* em reduzir o número de células hospedeiras infectadas.

O efeito tóxico do *JcTI-I* sobre *T. gondii* também foi avaliado incubando o parasita com essa proteína antes que ele infectasse as células hospedeiras. Foi observado que o contato prévio da proteína com o parasita não alterou sua capacidade de infectar as células hospedeiras. Isso significa que a proteína não agiu sobre as organelas do parasita envolvidas na invasão e/ou formação dos vacúolos parasitóforos. Outra possibilidade é que o tempo de incubação (30 minutos) não tenha sido suficiente para causar danos ao parasita, de modo a impedir ou reduzir sua capacidade de infecção. Um tempo maior não pode ser testado devido às necessidades do protozoário, uma vez que este é um parasita intracelular obrigatório não poderia ficar muito tempo fora de seu hospedeiro. Acredita-se que no processo de invasão do *T. gondii* há o envolvimento de, pelo menos, uma protease serínica, pois conforme já mencionado, os inibidores dessa classe enzimática 3,4-DCI e AEBSF impediram a invasão de células hospedeira pelo *T. gondii*, inibindo o crescimento do parasita. Além disso, tais inibidores causaram mudanças significativas na morfologia, metabolismo e mobilidade do *T. gondii* (RENSLO; CONSEIL *et al.*, 1999; MCKERROW *et al.*, 2006; BECKER, 2011).

Apesar do *JcTI-I* não ter interferido na capacidade de infecção do protozoário, essa proteína interagiu com membranas celulares desse parasita, pois a análise da

ultraestrutura desse protozoário mostrou desorganização tanto de sua membrana pelicular interna quanto da membrana plasmática. Além disso, foi observada a formação de inúmeras vesículas no citoplasma do protozoário; fato este ainda não bem compreendido. No entanto, é sabido que o antibiótico aureobasidina A também é capaz de levar à formação de vesículas no parasita, após tratamento por 24 horas, acarretando a diminuição do espaço intracelular e afetando sua divisão celular (SONDA *et al.*, 2005). Estudos mais aprofundados devem ser realizados para explicar essa vacuolização do citoplasma de *T. gondii* causada pelo JcTI-I.

Diante dos dados promissores de atividades antibacteriana e anti-toxoplasma do JcTI-I, a segurança do uso dessa proteína foi questionada. Assim, estudos preliminares para avaliar os efeitos da proteína sobre indivíduos não-alvo foram realizados, compreendendo os testes de citotoxicidade para célula Vero, lise de hemácias e toxicidade aguda. Nas mesmas concentrações (0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL) em que o JcTI-I se mostrou ativo contra *T. gondii*, citotoxicidade não foi observada para célula Vero, tendo sido preservada sua viabilidade. Ainda com células, foi avaliado se JcTI-I seria capaz de promover lise de hemácias. Essa proteína na concentração de 500 µg/mL, portanto 100 vezes maior do que sua MIC (5 µg/mL) para as bactérias *S. aureus* e *S. choelerasius* e 500-10.000 vezes superior às concentrações que mostraram atividade contra *T. gondii*, não ocasionou lise de hemácias. Avaliação da ação citotóxica geralmente é feita para peptídeos e proteínas antimicrobianos, visando sua aplicação segura, requerendo uma atividade citotóxica baixa ou ausente (KLUVER *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2010; VORONTSOVA *et al.*, 2011). Em adição, JcTI-I a 5 mg/mL não causou mortalidade, nem sinais de toxicidade, em camundongos. Nesse caso, a dose usada foi ainda bem maior, variando de 1.000 a 100.000 vezes, do que aquelas nas quais JcTI-I mostrou atividades antibacteriana e anti-toxoplasma. Tais dados sugerem que o uso de JcTI-I no tratamento de doenças infecciosas ocasionadas por bactérias e *T. gondii* parece seguro para mamíferos, dentre eles o homem.

## 7 CONCLUSÕES

*JcTI-I* é uma albumina 2S de com atividade inibitória de tripsina, com massa molecular de 10,252 kDa, formada por duas cadeias polipeptídicas de 7,133 e 3,124 kDa. A sua estrutura apresenta-se parcialmente estendida, com cauda e região globular, onde estão localizadas, pelo menos, quatro  $\alpha$ -hélices, estabilizadas por quatro pontes dissulfeto, duas intra- e duas intercadeias. Trata-se de uma proteína com alta afinidade pela tripsina, mantida parcialmente mesmo na presença de agente redutor, causando inibição dessa enzima por mecanismo do tipo não competitivo.

*JcTI-I* se mostrou ativo contra patógenos causadores de infecções no homem, tais como as bactérias *S. aureus* e *S. choelerasius* e o protozoário *T. gondii*, agindo em baixas concentrações e de forma seletiva, visto que não apresentou atividades citotóxicas e toxicidade aguda para mamíferos não-alvo.

*JcTI-I* foi capaz de interagir com as células microbianas causando alterações na superfície celular. Em bactérias, essas alterações poderiam levar a internalização da proteína e, conseqüentemente, sua interação com moléculas intramoleculares como proteases e outras enzimas, inibido-as, e o material genético dessas bactérias, degradando-o. Além disso, induziu a formação de inúmeras vesículas em *T. gondii*, o que poderia afetar a divisão celular do protozoário.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de uma nova molécula para o tratamento de doenças no homem é um processo que envolve múltiplas etapas, abrangendo diversas atividades complexas e requerendo muito critério, que leva vários anos até que ocorra sua liberação à população. O presente trabalho se propôs a analisar os aspectos estruturais, cinéticos e funcionais (farmacológicos e toxicológicos) do *JcTI-I*, uma proteína purificada da torta de *J. curcas*, pertencente à classe das albuminas 2S, mas com capacidade de inibir a tripsina e atividade antimicrobiana, como uma continuação da pesquisa realizada anteriormente por nosso grupo de pesquisa.

A realização do presente trabalho permitiu o conhecimento de propriedades importantes do *JcTI-I*, vinculadas às suas características estruturais, parâmetros cinéticos, modo de ação e segurança de uso. Esses achados, somados aos obtidos anteriormente, demonstram o potencial do *JcTI-I* para uso como agente antimicrobiano, além de agregarem valor à torta *J. curcas*.

## REFERÊNCIAS

ALSTCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Souyhamton, v. 17, p. 3389-402, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694>. Acesso em: 15 de abril de 2014.

AMR REVIEW PAPER. **Rapid diagnostics: Stopping unnecessary use of antimicrobials**, London, 2015. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/Paper-Rapid-Diagnostics-Stopping-Unnecessary-Prescription-Low-Res.pdf>. Acesso em: 3 de março de 2015.

ANNONGU, A. A.; BELEWU, M. A.; JOSEPH, J. K. Potentials of *Jatropha* seeds as substitute protein in nutrition of poultry. **Research Journal of Animal Science**, Dubai, v. 4, p. 1-4, 2010. Disponível em: <https://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=rjnasci.2010.1.4>. Acesso em: 14 de março de 2014.

ARAÚJO, C. L.; BEZERRA, I. W.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, F. T.; MACEDO, L. L. P.; GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, F. P.; SOUZA, T. M. S.; FRANCO, O. L.; BLOCH, C.; SALES, M. P. *In vivo* bioinsecticidal activity toward *Ceratitis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *in vitro* bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 4381-4387, 2005. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0502505>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2014.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century — A clinical super-challenge. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 360, p. 439-443, 2009. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp0804651#t=article>. Acesso em: 20 de janeiro de 2013.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P. A.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, p. 789-799, 2004.

ATSAS. <http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

AUNE, K.; RHYAN, J.; ROFFE, T. Environmental persistence of *Brucella* organisms in natural environments of the greater yellowstone area: a preliminary analysis. *In: Proceedings of the 110<sup>th</sup> Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, Minneapolis, p. 205-212, 2006.

BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, Pretoria, v. 14, p. 385-393, 1961. Disponível em: <http://cmr.asm.org/content/1/2/173.long>. Acesso em: 18 de novembro de 2015.

BHATIA, S.; LODHA, M. L. RNase and DNase activities of antiviral proteins from leaves of *Bougainvillea xbutiana*. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Dheli, v. 42, p. 152-155, 2005.

BATISTA, A. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; GIFONI, J. M.; PEREIRA, M. L.; ALMEIDA, M. G. G.; GOMES, V. M.; DA CUNHA, M.; RIBEIRO, S. F. F.; DIAS, G. B.; BELTRAMINI, L. M.; LOPES, J. L. S.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. New insights into the structure and mode of action of *Mo*-CBP<sub>3</sub>, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. **Plos One**, San Francisco, v. 9, p. e111427, 2014. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111427>. Acesso em: 30 maio de 2015.

BAUMGART, S. *Jatropha* cultivation Belize. Proceedings of the Expert Seminar on *Jatropha curcas* L. **Agronomy and Genetics**. FACT Foundation, Wageningen, The Netherlands, 2007.

BELEWU, M. A.; AKANDE, B. A. Biological upgrading of the nutritional quality of *Jatropha curcas* kernel cake: effect on performance characteristics of goat. **International Research Journal of Biotechnology**, Sapele, v. 1, p. 19-22, 2010. Disponível em: <http://www.interestjournals.org/irjob/september-2010-vol-1-issue-2/biological-upgrading-of-the-nutritional-quality-of-jatropha-curcas-kernel-cakeeffect-on-performance-characteristics-of-goat>. Acesso em: 12 de março de 2014.

BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S.; BABU, C. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, Nantes, v. 67, p. 232-241, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942205006308>. Acesso em: 12 de março de 2014.

BHATTACHARYYA, A.; RAI, S.; BABU, C. R. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: isolation, partial characterization and insecticidal properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 169-177, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942807000204>. Acesso em: 27 de junho de 2014.

BIJINA, B.; CHELLAPPANA, S.; BASHEERA, S. M.; ELYASA, K. K.; BAHKALIC, A. H.; CHANDRASEKARANA, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 46, p. 2291-2300, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511311003187>. Acesso em: 14 de janeiro de 2014.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 607-623, 2000.



Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99006/>. Acesso em 20 de janeiro de 2015.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Hoboken, v. 117, p. 458-476, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x/abstract>. Acesso em: 14 de janeiro de 2016.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93-99, 1987. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.1150080203/abstract>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2012.

BODE, W.; GREYLING, H. J.; OTLEWSKI, J.; WILUSZ, T. The refined 2.0 Å, X-ray crystal structure of the complex formed between bovine  $\beta$ -trypsin and CMTI-I, a trypsin inhibitor from squash seeds (*Cucurbita maxima*). **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 242, p. 285-292, 1989. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014579389804867>. Acesso em: 2 de novembro de 2014.

BÖHN, G., MURH, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering**, Oxford, v. 5, p. 191-195, 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409538>. Acesso em: 2 de novembro de 2015.

BOUCHER, H.; TALBOT, G; BENJAMIN, D. Jr., BRADLEY, J.; GUIDOS, R.; JONES, R.; MURRAY, B. E.; BONOMO, R. A.; GILBERT, D.; 10 × '20 progress - Development of new drugs active against Gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 56, p. 1685-1694, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3707426/>. Acesso em: 3 de abril de 2016.

BOYER, K.; McLEOD, R. Toxoplasmosis. *In*: LONG, S.; PROEBER, S.; PICKERING, L. **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. 3rd Ed. NY: Churchill Livingstone, 2007. pp. 1303-1322.

BRAAKMAN, I.; HELENIUS, J.; HELENIUS, A. Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 11, p. 1717-1722, 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC556629/>. Acesso em: 4 de julho de 2015.

BRADFORD, H. H. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, USA, v. 72, p. 248-254, 1976. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>. Acesso em: 4 de maio de 2013.

CALFEE, D. P.; SALGADO, C. D.; MILSTONE, A. M.; HARRIS, A. D.; KUHAR, D. T.; MOODY, J.; AUREDEN, K.; HUANG, S. S.; MARAGAKIS, L. L.; YOKOE, D. S. Strategies to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infection in acute care hospitals: 2014 update. **Infection Control**, Bethesda, v. 35, p. 772-796, 2014. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/10.1086/676534>. Acesso em: 9 de novembro de 2015.

CAMARGO, R.; MALDONADO, A. C. D.; DIAS, P. A. S.; SOUZA, M. F. E.; FRANÇA, M. S. Diagnose foliar em mudas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) produzidas com biossólido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, p. 283-290, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662013000300006](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662013000300006). Acesso em: 4 de julho de 2015.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, p. 1327-1333, 2004. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.200305844/pdf>. Acesso em: 14 de outubro de 2014.

CANO-ASSELEIH, L. M.; PLUMBLEY, R. A.; HYLANDS, P. J. Purification and partial characterization of hemagglutinin from seeds of *Jatropha curcas*. **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v. 13, p. 1-20, 1989. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4514.1989.tb00381.x/abstract>. Acesso em: 5 de janeiro de 2016.

CARS, O.; NATHAN, C. Antibiotic resistance - Problems, progress, and prospects. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 371, p. 1761-1763, 2014. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp1408040#t=article>. Acesso em: 10 de junho de 2015.

CARVALHO, C. S.; MELO, E. J.; TENORIO, R. P.; GOES, A. J. Anti-parasitic action and elimination of intracellular *Toxoplasma gondii* in the presence of novel thiosemicarbazone and 4-thiozolidinones derivatives. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 43, p.139-149, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-879X2010000200004&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-879X2010000200004&script=sci_abstract). Acesso em: 12 de julho de 2015.

CARVALHO, L. P.; GOMES, M. A. G. B.; ROCHA, B. S.; OLIVEIRA, R. R.; MARIA, E. J.; MELO, E. J. T. Anti-parasite effects of new thiosemicarbazones and their products thiazolidinone including cellular aspects of intracellular elimination of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Journal of Developing Drugs**, Westlake, v. 3, p. 1000126, 2014. Disponível em: <https://www.omicsgroup.org/journals/antiparasite-effects-of-new-thiosemicarbazones-and-their-products-thiazolidinone-including-cellular-aspects-of-intracellular-elimination-of-trypanosoma-cruzi-in-vitro-2329-6631.1000126.php?aid=32879>. Acesso em: 14 de outubro de 2015.

CEPEDA, J. A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; HAYMAN, S.; SHAW, S.; KIBBLER, C.; SHULMAN, R.; SINGER,

M.; WILSON, P. R. Linezolid versus teicoplanin in the treatment of Gram-positive infections in the critically ill: A randomized, double-blind, multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, p. 345-355, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711840>. Acesso em: 12 de março de 2015.

CHAN, K. E.; WARREN, H. S.; THADHANI, R. I.; STEELE, D. J.; HYMES, J. L.; MADDUX, F. W.; HAKIM, R. M. Prevalence and outcomes of antimicrobial treatment for *Staphylococcus aureus* bacteremia in outpatients with ESRD. **Journal of the American Society of Nephrology**, Geinesville, v. 23, p. 1551-1559, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22904350>. Acesso em: 20 de janeiro de 2015.

CHANG, S.; SIEVERT, D. M.; HAGEMAN, J. C.; BOULTON, M. L.; TENOVER, F. C.; DOWNES, F. P.; SHAH, S.; RUDRIK, J. T.; PUPP, G. R.; BROWN, W. J.; FRIDKIN, S. K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 348, p. 1342-1347, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672861>. Acesso em: 22 de outubro de 2014.

CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F.; ARAUJO, D. L.; FRANÇA, C. P. Growth, distribution and content of copper and zinc in *Jatropha curcas* L. plants. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, p. 167-176, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-66902010000200001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902010000200001). Acesso em: 14 de janeiro de 2016.

CHHABRA, G.; DIXIT, A. Structure modeling and antidiabetic activity of a seed protein of *Mormodica charantia* in non-obese diabetic mice. **Bioinformation**, USA, v. 9, p. 766-770, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3766308/>. Acesso em: 2 de abril de 2016.

CHIU, C. H.; TANG, P.; CHU, C.; HU, S.; BAO, Q.; YU, J.; CHOU, Y. Y.; WANG, H. S. LEE, Y. S. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*, a high invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Research**, Souyhhamton, v. 21, p. 1690-1698, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1069006/>. Acesso em: 21 de outubro de 2015.

CHIU, C. H.; WU, T. L.; SU, L. H.; CHU, C.; CHIA, J. H.; KUO, A. J.; CHIEN, M. S.; LIN, T. Y. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype *choleraesuis*. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, p. 413-419, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832529>. Acesso em: 15 de novembro de 2015.

CHIU, C. H.; SU, L. H.; CHU, C. *Salmonella enterica* serotype *choleraesuis*: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, p. 311-322, 2004. Disponível em: [http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa012261?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa012261?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em: 21 de dezembro de 2015.

CHU, K.T.; NG, T. B. Isolation of a large thaumatin-like antifungal protein from seeds of the kweilin chestnut *Castanopsis chinensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 301, p. 364-370, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12565869>. Acesso em: 12 de outubro de 2015.

CONSEIL, V.; SOÛTE, M.; DUBREMETZ, J. F. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Texas, v. 43, p. 1358-1361, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02029984>. Acesso em: 14 de setembro de 2015.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of enzyme kinetics**. 3. Ed. London: Portland Press, 1995.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. p. 231.

COSGROVE; S. E.; CARMELI, Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, Washington, v. 36, p. 1433-1437, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766839>. Acesso em: 2 de setembro de 2015.

COSTA, H. P. S. **Purificação e caracterização de um inibidor de tripsina com atividade antimicrobiana da torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFC, Dissertação de Mestrado, Fortaleza, 2012.

COSTA, H. P. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; SOUSA, D. O.; MORAIS, J. K. S.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VIEGAS, R. A.; VASCONCELOS, I. M. JcTI-I, a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacteria infection treatment. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 5, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00005/full>. Acesso em: 14 de maio de 2015.

COSTELLOE, C.; METCALFE, C.; LEVRING, A.; MANT, D.; HAY, A. D. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, London, v. 340, p. 1-11, 2010. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/340/bmj.c2096>. Acesso em: 4 de setembro de 2015.

COUTER, S.; MEROLLINI, K.; ROBERTS, J. A.; GRAVES, N.; HALTON, K. The need for cost-effectiveness analyses of antimicrobial stewardship programmes: A structured review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Marseille, v. 46, p. 140-149, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26058776>. Acesso em: 12 de junho de 2015.

DA SILVA, J. G. JR.; MACHADO, O. L.; IZUMI, C.; PADOVAN, J. C.; CHAIT, B. T.; MIRZA, U. A.; GREENE, L. J. Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. **Archives of**

**Biochemistry and Biophysics**, Texas, v. 336, p. 10-18, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8951029>. Acesso em: 14 de junho de 2015.

DANTZGER, M.; VASCONCELOS, I. M.; SCORSATO, V.; APARICIO, R.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, Nantes, v. 118, p. 224-235, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194221530073X>. Acesso em: 23 de março de 2016.

DAVIES, S. C. **The drugs don't work: a global threat**. London: Penguin, 2013.

DAVIS, J. S.; VAN HAL, S.; TONG, S. Y. Combination antibiotic treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, USA, v. 36, p. 3-16, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643267>. Acesso em: 14 de abril de 2016.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 569-88, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767056>. Acesso em: 13 de maio de 2015.

DEV, S.; SUROLIA, A. Dynamic light scattering study of peanut agglutinin: size, shape and urea denaturation. **Journal of Biosciences**, Bengaluru, v. 31, p. 551-556, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301492>. Acesso em: 15 de abril de 2016.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of protein and peptides from *Jatropha*: Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 6543-6555, 2010a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465279>. Acesso em: 27 de março de 2015.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* toxicity – A review. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, London, v. 13, p. 476-507, 2010b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711929>. Acesso em: 15 de junho de 2015.

D'HONDT, K.; VAN DAMME, J.; VAN DEN BOSCHSCHE, C.; LEEJEERAJUMNEAN, S.; DE RYCKE, R.; DERKSEN, J.; VANDEKERCKHOVE, J.; KREBBERS, E. Studies of the role of the propeptides of the *Arabidopsis thaliana* 2S albumin. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 102, p. 425-33, 1993. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/102/2/425>. Acesso em: 26 de junho de 2015.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; DIAS, D. C. F. S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; PRETTI, L. A. **Cultivo de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa: UFV, 2007.

DIXON, M.; WEBBER, E. C.; THERONE, C. J. R.; TRIPTON, K. F. Inhibition and activation, *In: Enzymes*. New York, 1979. p. 332-381.

DOWSE, T. J.; PASCALL, J. C.; BROWN, K. D.; SOLDATI, D. Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. **International Journal for Parasitology**, Victoria, v. 35, p. 747-756, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15913633>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2016.

DRUMOND, M. A.; ANJOS, J. B.; PAIVA, L. E.; MORGADO, L. B.; REIS, E. M. Produção de pinhão-mansão no semiárido brasileiro. In: Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis. Teresina, 2007.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd edition. CRC Press, Flórida, 2010.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, Hoboken, v. 23, p. 537-546, 1976. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1003342>. Acesso em: 15 de abril de 2016.

DUBEY, J. P.; LYNDSEY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 267-299, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106833/>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

ERLANGER, B. F.; KOLOWSKY, M.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Texas, v. 95, p. 271-278, 1961. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000398616190145X>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2016.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC); CENTER FOR DISEASE CONTROL RESISTANCE (CDC). Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance: Progress report. Recommendations for future collaboration between the US and EU, 2014.

FANG, E. F.; WONG, J. H.; LIN, P.; NG, T. B. Biochemical characterization of the RNA-hydrolytic activity of a pumpkin 2S albumin. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 584, 4089-4096, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816960>. Acesso em: 27 de outubro de 2015.

FAO/WHO/UNU. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (WHO Technical Report Series 935). **World Health Organization**, 265 p., 2007. Disponível em: [http://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO\\_TRS\\_935/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/WHO_TRS_935/en/). Acesso em: 16 de dezembro de 2016.

FLEMING, A. Penicillin. **Nobel Lecture**, Stockholm, p. 83-93, 1945.

FRANCO, O. L.; MURAD, A. M.; LEITE, J. R.; MENDES, P. A. M.; PRATES, M. V.; BLOCK JR, C. Identification of a cowpea C-thionin with bactericidal activity. **The FEBS Journal**, Hoboken, v. 273, p. 3489-3497, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824043>. Acesso em: 14 de janeiro de 2016.

FREIRE, J. E. C.; VASCONCELOS, I. M.; MORENO, F. B. M. B.; BATISTA, A. B.; LOBO, M. D. P.; PEREIRA, M. L.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M.; SOUSA, A. J. S.; A. C. O.; OLIVEIRA, J. T. A.; GRANGEIRO, T. B. *Mo*-CBP<sub>3</sub>, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **Plos One**, San Francisco, v. 10, p. e0119871, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789746>. Acesso em: 17 de janeiro de 2016.

FRIESECKE, H. K. Final report, UNDP/SF Project No. 150 (IRQ/6), 1970.  
GARAU, J.; BOUZA, E; CHASTRE, J.; GUDIOL, F.; HARBARTH, S. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, Hoboken, v. 15, p. 125-136, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291144>. Acesso em: 17 de novembro de 2015.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. **The proteomics protocols handbook**. Humana Press, New York, 2005. p. 571-607.

GENEAU-SBARTAÏ, C.; LEYRIS, J.; SILVESTRE, F.; RIGAL, L. Sunflower cake as a natural composite: composition and plastic properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 11198-11208, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18998703>. Acesso em: 3 de novembro de 2015.

GENOV, N.; GOSHEV, I.; NIKOLOVA, D.; GEORGIEVA, D. N.; FILIPPI, B.; SVENDSEN, I. A novel thermostable inhibitor of trypsin and subtilisin from the seeds of *Brassica nigra*: amino acid sequence, inhibitory and spectroscopic properties and thermostability. **Biochimica et Biophysica Acta**, London, v. 1341, p. 157-164, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9357954>. Acesso em: 14 de dezembro de 2016.

GIANNELLA, R. A. Importance of the intestinal inflammatory reaction in Salmonella-mediated intestinal secretion. **Infection and Immunity**, Washington, v. 23, p. 140-145, 1979. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC550700/>. Acesso em: 14 de junho de 2016.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, Hoboken, v. 98, p. 406-415, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193603>. Acesso em: 14 de outubro de 2015.

GINWAL, H. S.; RAWAT, P. S.; SRIVASTAVA; R. L. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* L. in Central India. **Silvae**

**Genetica**, Warsaw, v. 53, p. 186-192, 2004. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/280139768\\_Seed\\_source\\_variation\\_in\\_growth\\_performance\\_and\\_oil\\_yield\\_of\\_Jatropha\\_curcas\\_Linn\\_in\\_central\\_India](https://www.researchgate.net/publication/280139768_Seed_source_variation_in_growth_performance_and_oil_yield_of_Jatropha_curcas_Linn_in_central_India). Acesso em: 13 de junho de 2015.

GOEL, G.; HARINDER, P.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, S.; BECKER, G. K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Cincinnati, v. 26, p. 279-288, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17661218>. Acesso em: 13 de novembro de 2015.

GONÇALVES, S. B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão-manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio. **Circular Técnica EMBRAPA Agroenergia**, Brasília, p.1-5, 2009. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/736979/substancias-toxicas-alergenicas-e-antinutricionais-presentes-no-pinhao-manso-e-seus-derivados-e-procedimentos-adequados-ao-manuseio>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2015.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M. S.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, p. 3400-3419, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2812829/>. Acesso em 14 de março de 2015.

GOONASEKERA, M. M.; GUNAWARDANA, V. K.; JAYASENA, K.; MOHAMMED, S. G.; BALASUBRAMANIAM, S. Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Pretoria, v. 47, p. 117-123, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8569234>. Acesso em: 27 de setembro de 2015.

GOUET, P.; ROBERT, X.; COURCELLE, E. ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, Souyhhamton, v. 31, p. 3320-3323, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824317>. Acesso em: 14 de setembro de 2015.

GREEN, M.; NEURATH, H. The effects of divalent cations on trypsin. **The Journal of Biological Chemistry**, Massachusetts, v. 204, p. 379-390, 1953. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13084609>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

GUEDES, R. E.; CRUZ, F. A.; LIMA, M. C.; SANT'ANA, L. D'O; CASTRO, R. N.; MENDES, M. F. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: analyses with a central composite rotatable design. **Industrial Crops and Products**, North Dakota, v. 52, p. 673-679, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901300650X>. Acesso em: 14 de janeiro de 2015.

GUPTA, R.; S. BRUNAK. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. **Pacific Symposium on Biocomputing**, Hawaii, v. 7,



p. 310-322, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11928486>. Acesso em: 18 de maio de 2015.

HANCOCK, R. E. Cationic antimicrobial peptides: toward clinical applications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, USA, v. 9, p. 1723-1729, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060771>. Acesso em: 13 de maio de 2015.

HARBARTH, S.; VON DACH, E.; PAGANI, L.; MACEDO-VINAS, M.; HUTTNER, B.; OLEARO, F.; EMONET, S.; UÇKAY, I. Randomized non-inferiority trial to compare trimethoprim/sulfamethoxazole plus rifampicin versus linezolid for the treatment of MRSA infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 70, p. 264-272, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209610>. Acesso em: 14 de março de 2015.

HAWKEY, P. M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 89, p. 241-247, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25737092>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2016.

HE, W.; KING, A. J.; KHAN, M. A.; CUEVAS, J. A.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. A. Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 49, p. 1183-1190, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835630>. Acesso em: 14 de janeiro de 2014.

HERRERA, J. M.; AYALA, A. L. M.; MAKKAR, H.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **European Journal of Scientific Research**, Seychelles, v. 39, p. 396-407, 2010. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/242574839\\_Agroclimatic\\_Conditions\\_Chemical\\_and\\_Nutritional\\_Characterization\\_of\\_Different\\_Provenances\\_of\\_Jatropha\\_Curcas\\_L\\_from\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/242574839_Agroclimatic_Conditions_Chemical_and_Nutritional_Characterization_of_Different_Provenances_of_Jatropha_Curcas_L_from_Mexico). Acesso em: 13 de fevereiro de 2014.

HIRAI, K.; HIRATO, K.; YANAGAWA, R. A cinematographic study of the penetration of cultured cells by *Toxoplasma gondii*. **Japanese Journal of Veterinary Research**, Hokkaido, v. 14, p. 81-90, 1966. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5342929>. Acesso em: 14 de agosto de 2015.

HOLMES, M.; CRATER, A. K.; DHUDSHIA, B.; THADANI, A. N.; ANANVORANICH, S. *Toxoplasma gondii*: inhibitory activity and encystation effect of securinine and pyrrolidine derivatives on *Toxoplasma* growth. **Experimental Parasitology**, Berlin, v. 127, p. 370-375, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833168>. Acesso em: 13 de janeiro de 2016.

HSIAO, E. S.; LIN, L. J.; LI, F. Y.; WANG, M. M.; LIAO, M. Y.; TZEN, J. T. Gene families encoding isoforms of two major sesame seed storage proteins, 11S globulin and 2S albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p.

9544-9550, 2006. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf061505x>. Acesso em: 14 de abril de 2015.

HUTTNER, A.; HARBARTH, S.; CARLET, J.; COSGROVE, S.; GOOSSENS, H.; HOLMES, A.; JALIER, V.; VOSS, A.; PITTET, D. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, London, v. 18, p. 2-31, 2013. Disponível em: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2047-2994-2-31>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2015.

HUTTNER, A. C.; VON DACH, E.; RENZONI, A. M.; HUTTNER, B.; AFFATICATI, M.; PAGANI, L.; DAALI, Y.; PUGIN, J.; KARMIME, A.; FATHI, M.; LEW, D. P.; HARBARTH, S. J. Augmented renal clearance, low  $\beta$ -lactam concentrations and clinical outcomes in the critically ill: An observational prospective cohort study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Marseille, v. 45, p. 385-92, 2015. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924-8579\(15\)00011-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924-8579(15)00011-4). Acesso em: 8 de março de 2016.

IBRAHIM, H. R.; AOKI, T.; PELLEGRINI, A. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. **Current Pharmaceutical Design**, Seattle, v. 7, p. 671-693, 2002. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/64525/article>. Acesso em: 13 de junho de 2015.

INFECTIOUS DISEASE SOCIETY OF AMERICA – IDSA. **Antimicrobial agent use –Antimicrobial prophylaxis for surgery**, 2011. [http://www.idsociety.org/Antimicrobial\\_Agents/#Antimicrobial Prophylaxis for Surgery](http://www.idsociety.org/Antimicrobial_Agents/#Antimicrobial%20Prophylaxis%20for%20Surgery). Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

ISLAM, M. A.; ALAM, M. M.; CHOUDHURY, M. E.; KOBAYASHI, N.; AHMED, M. U. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, Bangladesh, v. 6, p.121-126, 2008. Disponível em: <http://www.banglajol.info/index.php/BJVM/article/view/1350>. Acesso em: 4 de janeiro de 2015.

JEVONS, M. P. “Celbenin” - resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, London, v. 1, p. 124-125, 1961. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1952888/>. Acesso em: 4 de março de 2015.

JOHANSEN, M. B. O.; KIEMER, L.; BRUNAK, S. Analysis and prediction of mammalian protein glycation. **Glycobiology**, Oxford, v. 16, p. 844-853, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762979>. Acesso em: 6 de fevereiro de 2015.

JOLLIFFE, N. A.; BROWN, J. C.; NEUMANN, U.; VICRÉ, M.; BACHI, A.; HAWES, C.; CERIOTTI, A.; ROBERTS, L. M.; FRIGERIO, L. Transport of ricin and 2S albumin precursors to the storage vacuoles of *Ricinus communis* endosperm involves the Golgi and VSR-like receptors. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 39, p. 821-833,

2004. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-131X.2004.02167.x/abstract>. Acesso em: 8 de setembro de 2015.

JONES, T. C.; HIRSCH, J. G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. **The Journal of Experimental Medicine**, Rockefeller, v. 136, p. 1173-1194, 1972. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2139290/>. Acesso em: 5 de fevereiro de 2015.

JONES, T. C.; YEH, S.; HIRSCH, J. G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. **The Journal of Experimental Medicine**, Rockefeller, v. 136, p. 1157-1172, 1972. Disponível em: <http://jem.rupress.org/content/136/5/1157.long>. Acesso em: 6 de fevereiro de 2015.

JONGSCHAAP, R. E. E.; CORRÉ, W. J.; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. **Plant Research International**, Wageningen, Report 58, 2007. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/40104292\\_Claims\\_and\\_facts\\_on\\_Jatropha\\_curcas\\_L\\_Global\\_Jatropha\\_curcas\\_evaluation\\_breeding\\_and\\_propagation\\_programme](https://www.researchgate.net/publication/40104292_Claims_and_facts_on_Jatropha_curcas_L_Global_Jatropha_curcas_evaluation_breeding_and_propagation_programme). Acesso em: 6 de março de 2014.

KHATIB, R.; JOHNSON, L. B.; FAKIH, M. G.; RIEDERER, K.; KHOSROVANEH, A.; SHAMSE, T. M.; SHARMA, M. SAEED, S. Persistence in *Staphylococcus aureus* bacteremia: Incidence, characteristics of patients and outcome. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 38, p. 7-14, 2006. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00365540500372846?journalCode=infdl>. Acesso em: 6 de maio de 2015.

KIM, M. H.; PARK, S. C.; KIM, J. Y.; LEE, S. Y.; LIM, H. T.; CHEONG, H.; HAHM, K. S.; PARK, Y. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinried, v. 346, p. 681-686, 2006. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-291X\(06\)01201-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-291X(06)01201-0). Acesso em: 14 de maio de 2015.

KLÜVER, E.; SCHULZ-MARONDE, S.; SCHEID, S.; MEYER, B.; FORSSMANN, W-G.; ADERMANN, K. Structure-activity relation of human  $\alpha$ -defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity. **Biochemistry**, Washington, v. 44, p. 9804-9816, 2005. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi050272k>. Acesso em: 6 de julho de 2015.

KOO, J. C.; LEE, S. Y.; CHUN, H. J.; CHEONG, Y. H.; CHOI, J. S.; KAWABATA, S.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; HA, K. S.; BAE, D. W.; HAN, C. D.; LEE, B. L.; CHO, M. J. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, London, v. 1382, p. 80-90, 1998. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483897001489>. Acesso em: 7 de junho de 2015.

KREIS, M.; FORDE, B. G.; RAHMAN, S.; MIFLIN, B. J.; SHEWRY, P. R. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. **Journal of Molecular Biology**, California, v. 183, p. 499-502, 1985. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283685900178?via%3Dihub>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2015.

KUMAR, S.; SHARMA S.; PATHAK, D. V; BENIWAL, J. Integrated management of Jatropha root rot caused by *Rhizoctonia bataticola*. **Journal of Tropical Forest Science**, Kepong, v. 23, p. 35-41, 2011. Disponível em: [https://www.jstor.org/stable/23616877?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/23616877?seq=1#page_scan_tab_contents). Acesso em: 6 de maio de 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, Cambridge, v. 227, p. 679-685, 1970. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html>. Acesso em: 6 de setembro de 2015.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: Host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, Hoboken, v. 12, p. 292-300, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2009.01417.x/abstract>. Acesso em: 5 de julho de 2015.

LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão manso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1969-1975, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v32n5/18.pdf>. Acesso em: 6 de agosto de 2015.

LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 35, p. 1267-1272, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC245156/>. Acesso em: 5 de outubro de 2015.

LEHMANN, K.; SCHEIMER, K.; REESE, G.; RANDOW, S.; SUHR, M.; BECKER, W.; VIETHS, S.; RÖSCH, P. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. **Biochemical Journal**, London, v. 395, p. 463-472, 2006. Disponível em: <http://www.biochemj.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=16372900>. Acesso em: 17 de setembro de 2015.

LI, C.; DAI, Y.; WAN, D.; HU, J.; WANG, J.; LIJUN, T. Pharmacognostic and preliminary phytochemical investigation on *Jatropha curcatis* Semen. **Pharmacognosy Journal**, Bangalore, v. 18, p. 1-6, 2010. Disponível em: <http://www.phcogfirst.com/sites/default/files/Pharmacognostic%20and%20Preliminary%20Phytochemical.pdf>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

LI, D.; ZHU, D.; HU, Z.; WANG, D. Crystallization and preliminary x-ray analysis of the highly thermostable sweet-protein mabinlin II. **Protein and Peptide Letters**, Chester, v. 13, p. 319-321, 2006. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?AD0109>. Acesso em: 17 de setembro de 2015.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; MIGLIOLO L.; SOUZA-FILHO, C. R.; GONÇALVES, E. G.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; AMARAL, A. C.; FRANCO O. L. A Kunitz proteinase inhibitor from corms of *Xanthosoma blandum* with bactericidal activity. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 74, p. 969-975, 2011. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np200312r>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2015.

LIN, J.; FIDO, R.; SHEWRY, P.; ARCHER, D. B.; ALCOCER, M. J. The expression and processing of two recombinant 2S albumins from soybean (*Glycine max*) in the yeast *Pichia pastoris*. **Biochimica et Biophysica Acta**, London, v. 1698, p. 203-212, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963903003881>. Acesso em: 5 de março de 2015.

MACEDO, M. L. R.; SÁ, C. M.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J. R. P. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 2533-2540, 2004. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf035389z>. Acesso em: 6 de maio de 2015.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A. HOEKSTRA, R. M.; INTERNATIONAL COLLABORATION ON ENTERIC DISEASE 'BURDEN OF ILLNESS' STUDIES. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 50, p. 882-889, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/650733>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional studies on rats and fish (carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of a non-toxic provenance. **Plant Foods for Human Nutrition**, USA, v. 53, p. 183-192, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10517277>. Acesso em: 6 de setembro de 2015.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 3152-3157, 1997. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970036j>. Acesso em: 4 de julho de 2015.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 88, p. 1542-1548, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.3248/full>. Acesso em: 7 de outubro de 2015.

MANDAL, S.; KUNDU, P.; ROY, B.; MANDAL, R. K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistant plants. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 277, p. 37161-37168, 2002. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/277/40/37161.abstract>. Acesso em: 5 de maio de 2015.

MARIA-NETO, S.; HONORATO, R. V.; COSTA, F. B.; ALMEIDA, R. G.; AMARO, D. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; FRANCO, O. L. Bactericidal activity identified in 2S albumin from sesame seeds and *in silico* studies of structure-function relations. **Protein Journal**, USA, v. 30, p. 340-350, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21691771>. Acesso em: 6 de julho de 2015.

MARTÍNEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; BECKER, K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**, Norwich, v. 96, p. 80-89, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605001603>. Acesso em: 4 de junho de 2015.

MATHEW, C. E.; JURG, A. L.; SHU, X.; GAO, Y.; ZHENG, W. Response to invited commentary - Matthews *et al.* respond to “A challenge for physical activity epidemiology”. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 165, p. 1354-1355, 2007. Disponível em: DOI: 10.1093/aje/kwm087. Acesso em: 5 de outubro de 2015.

MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review of Pathology**, Danvers, v. 1, p. 497-536, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039124>. Acesso em: 6 de fevereiro de 2015.

MCPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. **Methods**, Minneapolis, v. 34, p. 254-265, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202304001094>. Acesso em: 4 de junho de 2015.

MCPHERSON, A.; MALKIN, A. J.; KUZNETSOV, Y. G. The science of macromolecular crystallization. **Structure**, Maryland, v. 3, p. 759-768, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212601002118>. Acesso em: 16 de maio de 2015.

MELO, E. J. T.; MAYERHOFFER, R. O.; SOUZA, W. Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 185, p. 79-82, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/10731610/>. Acesso em: 8 de julho de 2015.

MERTENS, H. D.; SVERGUN, D. I. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle x-ray resolution scattering. **Journal Structural Biology**, Maryland, v. 172, p. 128-141, 2010. Disponível em:

[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047-8477\(10\)00190-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047-8477(10)00190-5). Acesso em: 5 de setembro de 2015.

MILLS, E. N. C.; MADSEN, C.; SHEWRY, P. R.; WICHERS, H. J. Food allergens of plant origin - their molecular and evolutionary relationships. **Trends in Food Science & Technology**, Norwich, v. 14, p. 145-156, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403000268>. Acesso em: 17 de agosto de 2015.

MILLS, E. N. C.; JAKINS, J. A.; ALCOCKER, M. J. C.; SHEWRY, P. R. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 44, p. 379-407, 2004. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408690490489224>. Acesso em: 5 de agosto de 2015.

MONSALVE, R. I.; VILLALBA, M.; LOPEZ-OTIN, C.; RODRIGUEZ, R. Structural analysis of the small chain of the 2S albumin, napin nIII, from rapeseed. Chemical and spectroscopic evidence of an intramolecular bond formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, London, v. 1078, p. 265-272, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065094>. Acesso em: 6 de julho de 2015.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, New York, v. 363, p. 1965-1976, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360416412X>. Acesso em: 5 de maio de 2015.

MORENO, F. J.; CLEMENTE, A. 2S albumin storage proteins: What makes them food allergens? **The Open Biochemistry Journal**, Sharjah, v. 2, p. 16-28, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570561/>. Acesso em: 7 de novembro de 2015.

MORENO, F. J.; MALDONADO, B. M.; WELLNER, N.; MILLS, E. N. Thermostability and *in vitro* digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (*Sesamum indicum* L.). **Biochimica et Biophysica Acta**, London, v. 1752, p. 142-153, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963905002529>. Acesso em: 5 de julho de 2015.

MORRIS, M. T.; CARRUTHERS, V. B. Identification and partial characterization of a second Kazal family serine proteinase inhibitor in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, Texas, v. 128, p. 119-122, 2003. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/10794230\\_Identification\\_and\\_partial\\_characterization\\_of\\_a\\_second\\_Kazal\\_inhibitor\\_in\\_Toxoplasma\\_gondii](https://www.researchgate.net/publication/10794230_Identification_and_partial_characterization_of_a_second_Kazal_inhibitor_in_Toxoplasma_gondii). Acesso em: 26 de julho de 2015.

MURZIN, A. G. How far divergent evolution goes in proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, Cambridge, v. 8, p. 380-387, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X98800730?via%3Dihub>. Acesso em: 6 de agosto de 2015.

MURZIN, A. G.; BRENNER, S. E.; HUBBARD, T.; CHOTHIA, C. SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. **Journal of Molecular Biology**, CA, v. 247, p. 536-540, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605801342>. Acesso em: 4 de maio de 2015.

NAWROT, R.; BARYSLKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYCK, J.; BUCHWALD, W.; GOZDZICKA-JÓZEFIAK, A. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, USA, v. 59, p. 181-196, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971460/>. Acesso em: 5 de agosto de 2015.

NICHOLS, B.A.; O'CONNOR, G. R. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. **Laboratory Investigation – Nature**, USA, v. 44, p. 324-35, 1981. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/15991728\\_Penetration\\_of\\_mouse\\_peritoneal\\_macrophages\\_by\\_the\\_protozoan\\_Toxoplasma\\_gondii](https://www.researchgate.net/publication/15991728_Penetration_of_mouse_peritoneal_macrophages_by_the_protozoan_Toxoplasma_gondii). Acesso em: 6 de setembro de 2015.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, France v. 147, p. 736, 1908.

NORDLEE, J. A.; TAYLOR, S. L.; TOWNSEND, J. A.; THOMAS, L. A.; BUSH, R. K. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. **The New England Journal of Medicine: Research & Review**, Boston, v. 334, 688-692, 1996. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199603143341103#t=article>. Acesso em: 5 de setembro de 2015.

ODINTSOVA, T. I.; ROGOZHIN, E. A.; SKLYAR, I. V.; MUSOLYAMOV, A. K.; KUDRYAVTSEV, A. M.; PUKHALSKY, V. A.; SMIRNOV, A. N.; GRISHIN, E. V.; EGOROV, T. A. Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. **Protein & Peptide Letters**, Florida, v. 17, p. 522-529, 2010. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/85992/article>. Acesso em: 17 de maio de 2015.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: An oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Aberdeen, v. 19, p. 1-15, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953400000192>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

OVERDEVEST, I.; WILLEMSSEN, I.; RIJNSBURGER, M.; EUSTACE, A.; XU, L.; HAWKEY, P.; HECK, M.; SAVELKOUL, P.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; VAN DER ZWALUW, K.; HUIJSDENS, X.; KLUYTMANS, J. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v. 17, p. 1216-22, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381403/>. Acesso em: 16 de julho de 2015.



- PANIGRAHI, S.; FRANCIS, B. J.; CANO, L. A.; BURBAGE, M. B. Toxicity of *Jatropha curcas* seeds from Mexico to rats and mice. **Nutrition Reports International**, Bethesda, v. 29, p. 1089-1100, 1984. Disponível em: <https://eurekamag.com/research/006/818/006818157.php>. Acesso em: 27 de outubro de 2015.
- PANTOJA-UCEDA, D.; BRUIX, M.; GIMÉNEZ-GALLEGO, G.; RICO, M.; SANTORO, J. Solution structure of RicC3, a 2S albumin storage protein from *Ricinus communis*. **Biochemistry**, Washington, v. 42, p. 13839-13847, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636051>. Acesso em: 30 de março de 2015.
- PANTOJA-UCEDA, D.; PALOMARES, O.; BRUIX, M.; VILLALBA, M.; RODRIGUEZ, R.; RICO, M.; SANTORO, J. Solution structure and stability against digestion of rproBnIb, a recombinant 2S albumin from rapeseed: relationship to its allergenic properties. **Biochemistry**, Washington, v. 43, p. 16036-16045, 2004. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi048069x>. Acesso em: 13 de abril de 2015.
- PASTORELLO, E. A.; CONTI, A.; PRAVETTONI, V.; FARIOLI, L.; RIVOLTA, F.; ANSALONI, R.; ISPANO, M.; INCORVAIA, C.; GIUFFRIDA, M. G.; ORTOLANI, C. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Iowa, v. 101, p. 531-537, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564807>. Acesso em: 17 de maio de 2015.
- PATOLIA, J. S.; A. GHOSH, J.; CHIKARA, D. R.; CHAUDHARRY, D. R.; BHUVA, P.; BHUVA, H. M. Response of *Jatropha curcas* grown on wasteland to N and P fertilization. In: **Expert seminar on *Jatropha curcas* L. Agronomy and Genetics**. Wageningen, 2007.
- PAUL, M.; SHANI, V.; MUCHTAR, E.; KARIV, G.; ROBENSHTOK, E.; LEIBOVICI, L. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, p. 4851-4863, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/20733044/>. Acesso em: 6 de outubro de 2015.
- PEIXOTO, A. R. Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo, **Editora Nobel**, 1973. p. 284.
- PELEGRINI, P.B.; FRANCO, O. L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Nedlands, v. 37, p. 2239-2253, 2005. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357-2725\(05\)00197-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357-2725(05)00197-4). Acesso em: 17 de maio de 2015.
- PELEGRINI, P. B.; NORONHA, E. F.; MUNIZ, M. A. R.; VASCONCELOS, I. M.; CHIARELLO, M. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; FRANCO, O. L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Lodon, v. 1764, p. 1141-1146, 2006. Disponível em:

[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570-9639\(06\)00176-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570-9639(06)00176-2). Acesso em: 28 de novembro de 2015.

PELLEGRINI, P. B.; MURAD, A. M.; SILVA, L. P.; DOS SANTOS, R. C. P.; COSTA, F. T.; TAGLIARI, P. D.; BLOCH JR, C.; NORONHA, E. F.; MILLER, R. N. G.; FRANCO, O. L. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. **Peptides**, Oulu, v. 29, p. 1271-1279, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978108001319>. Acesso em: 17 de outubro de 2015.

PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; GIFONI, J. M.; ROCHA, R. O.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential to relieve pain and inflammation. **Protein and Peptide Letters**, Gainesville, v. 18, p. 1078-1085, 2011. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/88794/article>. Acesso em: 4 de abril de 2016.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, N. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, London, v. 8, p. 785-786, 2011. Disponível em: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v8/n10/full/nmeth.1701.html>. Acesso em: 2 de abril de 2015.

PFERFFEKORN, E. R.; PFERFFEKORN, L. C. Quantitative studies of the mutagenesis of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, USA, v. 65, p. 364-370, 1979. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/158076>. Acesso em: 16 de maio de 2015.

PHARMD, S. L. B. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, London, v. 16, p. 151-153, 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.2015.983077>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

PHENGNUAM, T.; SUNTORNSUK, W. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Hiroshima, v. 115, p. 168-172, 2013. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389-1723\(12\)00360-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389-1723(12)00360-X). Acesso em: 3 de maio de 2015.

PINA-VAZ, C.; SANSONETTY, F.; RODRIGUES, A. G.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, Hoboken, v. 7, p. 609-618, 2001. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198-743X\(14\)64050-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198-743X(14)64050-7). Acesso em: 18 de junho de 2015.

PRAY, L. Antibiotic R&D: resolving the paradox between unmet medical need and commercial incentive. Cambridge Healthtech Institute, **Insight Pharma Reports**, Needham, MA, 2008.

PSZENNY, V.; DAVIS, P. H.; ZHOU, X. W.; HUNTER, C. A.; CARRUNTERS, V. B.; ROOS, D. S. Targeted disruption of *Toxoplasma gondii* serine protease inhibitor 1 increases bradyzoite cyst formation in vitro and parasite tissue burden in mice. **Journals ASM, Infection and Immunity**, Washington, v. 80, p. 1156-1165, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294639/>. Acesso em: 17 de setembro de 2015.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. *Salmonella enterica* spp. Pathogen safety data sheet – **Infectious substances**, 2010. Acesso em 20 de julho de 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737085>. Acesso em: 16 de agosto de 2015.

QI, X.; ZHOU, C.; LI, P.; XU, W.; CAO, Y.; LING, H.; CHEN, W. N.; LI, C. M.; XU, R.; LAMRANI, M.; MU, Y.; LEONG, S. S. J.; CHANG, M. W.; CHAN-PARK, M. B. Novel short antibacterial and antifungal peptides with low cytotoxicity: Efficacy and action mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 398, p. 594-600, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1001288X>. Acesso em: 4 de junho de 2015.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RAJ, K. R.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Catalonia, v. 46, p. 3621-3625, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691508004924>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2015.

RASHID, U.; ANWAR, F.; JAMIL, A.; BHATTI, H. N. *Jatropha curcas* seed oil as a viable source for biodiesel. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 42, p. 575-582, 2010. Disponível em: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42\(1\)/PJB42\(1\)575.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42(1)/PJB42(1)575.pdf). Acesso em: 14 de março de 2015.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Marseille, v. 24, p. 536-547, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092485790400322X>. Acesso em: 7 de março de 2015.

RIBEIRO, S. F.; CARVALHO, A. O.; DA CUNHA, M.; RODRIGUES, R.; CRUZ, L. P.; MELO, V. M.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, E. J.; GOMES, V. M. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicology**, Hamburg, v. 50, p. 600-611, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572465>. Acesso em: 16 de novembro de 2015.

ROLINSON, G. N. “Celbenin” - resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, London, v. 1, p. 125-126, 1961. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1952888/>. Acesso em 4 de maio de 2015.

ROUZIC, N.; JANVIER, F.; LIBERT, N.; JAVOUHEY, E.; LINA, G.; NIZOU, J. Y.; PASQUIER, P.; STAMM, D.; BRINQUIN, L.; PELLETIER, C.; VANDENESCH, F.; FLORET, D.; ETIENNE, J.; GILLET, Y. Prompt and successful toxin-targeting treatment of three patients with necrotizing pneumonia due to *Staphylococcus aureus* strains carrying the pantonvalentine leukocidin genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, p. 1952-1955, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863892/>. Acesso em: 16 de julho de 2015.

RUNDQVIST, L.; TENDEL, T.; ZDUNEK, J.; BJORN, E.; SCHLEUDER, J.; ALCOCER, M. J.; LARSSON, G. Solution structure, copper binding and backbone dynamics of recombinant Ber e 1—the major allergen from Brazil nut. **Plos One**, San Francisco, v. 7, e46435, 2012. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046435>. Acesso em: 16 de outubro de 2015.

SAADATNIA, G.; HAJ GHANI, H.; KHOO, B. Y.; MAIMUNAH, A.; RAHMAH, N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. **Tropical Biomedicine**, Malaysia, v. 27, p. 125-130, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562822>. Acesso em: 5 de maio de 2015.

SAALBACH, G.; ROSSO, M.; SHUMANN, U. The vacuolar targeting signal of the 2S albumin from Brazil nut resides at the C terminus and involves the C-terminal pro-peptide as an essential element. **Plant Physiology**, USA, v.112, p. 975-985, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158024/>. Acesso em: 14 de novembro de 2015.

SAETA, D.; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 20, p. 319-324, 2010. Disponível em: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2010&vol=20&num=2&page=319>. Acesso em: 16 de novembro de 2015.

SALGADO-PABÓN, W.; SCHLIEVERT, P. M. Perspectives - Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine. **Nature Reviews – Microbiology**, London, v. 12, p. 585, 591, 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n8/abs/nrmicro3308.html>. Acesso em: 12 de janeiro de 2016.

SATO, S.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S.; FUKAI, E.; WATANABE, A.; KATO, M.; KAWASHIMA, K.; MINAMI, C.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; TAKAHASHI, C.; NAKAYAMA, S.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; YAMADA, M.; TSURUOKA, H.; SASAMOTO, S.; TABATA, S.; AIZU, T.; TOYODA, A.; SHIN-I, T.; MINAKUCHI, Y.; KOHARA, Y.; FUJIYAMA, A.; TSUCHIMOTO, S.; KAJIYAMA, S.; MAKIGANO, E.; OHMIDO, N.; SHIBAGAKI, N.; CARTAGENA, J. A.; WADA, N.; KOHINATA, T.; ATEFEH, A.; YUASA, S.; MATSUNAGA, S.; FUKUI, K. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree *Jatropha curcas* L. **DNA Research**, Oxford, v. 18, p. 65-76, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/dnaresearch/article-lookup/doi/10.1093/dnares/dsq030>. Acesso em: 14 de maio de 2015.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Produção de oleaginosas para biodiesel. **Informe Agropecuário**, Brasília, v. 26, p. 44-74, 2005.

SCALLAN, E.; HOEKSTRAM, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, p. 7-15, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375761/>. Acesso em: 6 de novembro de 2015.

SCHIMDT, N.; MISHRA, A.; LAI, G. H.; WONG, G. C. L. Arginine-rich cell-penetrating peptides. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 584, p. 1806-1813, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925791>. Acesso em: 16 de Agosto de 2015.

SCHMOOK, B.; SERRALTA-PERAZA, L. *J. curcas*: distribution and uses in the Yucatan Peninsula of Mexico, *Jatropha* 97, Managua, Nicaragua, 1997.

SCHRENZEL, J.; HARBARTH, S.; SCHOCKMEL, G.; GENNE, D.; BREGENZER, T.; FLUECKIGER, U.; PETIGNAT, C.; JACOBS, F.; FRANCIOLI, P.; ZIMMERLI, W.; LEW, D. P. Swiss staphylococcal study G A randomized clinical trial to compare fleroxacin-rifampicin with flucloxacillin or vancomycin for the treatment of staphylococcal infection. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 39, p. 1285-1292, 2004.

SCHWEIZER, M. L.; HARRIS, A. D.; JOHNSON, J. K.; SHARDELL, M. D., MCGREGOR, J. C.; THOM, K. A.; COSGROVE, S. E.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E. N. Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. **BioMed Central**, London, v. 11, p. 279, 2011. Disponível em: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-11-279>. Acesso em: 17 de maio de 2015.

SELIGMAN, S. J. Penicillinase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature**, London, v. 209, p. 994-996, 1966.

SHAH, K. R.; PATEL, D. K.; PAPPACHAN, A.; PRABHA, C. R.; SINGH, D. D. Characterization of a Kunitz-type serine protease inhibitor from *Solanum tuberosum* having lectin activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Colorado, v. 83, p. 259-269, 2016. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141-8130\(15\)30164-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141-8130(15)30164-1). Acesso em: 22 de dezembro de 2015.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Review article - The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **Biochemical Journal**, London, v. 267, p. 1-12, 1990. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1131235/>. Acesso em: 15 de março de 2015.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structure and biosynthesis. **The Plant Cell**, USA, v. 7, p. 945-956, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160892/>. Acesso em: 18 de outubro de 2015.

SIBLEY, L. D.; WEIDNER, E.; KRAHENBUHL, J. L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. **Nature**, London, v. 315, p. 416-419, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2860567>. Acesso em: 14 de novembro de 2015.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D. G.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, Heidelberg, v. 7, p. 539, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3261699/>. Acesso em: 18 de março de 2015.

SINGH, S. A.; APU RAO, A. G. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Malden, v. 35, p. 115-123, 2002. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1042/BA20010077/abstract>. Acesso em: 16 de abril de 2015.

SKOU, S.; GILLILAN, R. E.; ANDO, N. Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. **Nature Protocols**, London, v. 9, p. 1727-1739, 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/nprot/journal/v9/n7/full/nprot.2014.116.html>. Acesso em: 27 de agosto de 2015.

SMITH, R.; COAST, J. The true cost of antimicrobial resistance. **British Medical Journal**, London, v. 346, p. 493, 2013. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/346/bmj.f1493>. Acesso em: 2 de setembro de 2015.

SOARES, A. M. S.; CARVALHO, L. P.; COSTA, H. P. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. A protein extract and a cysteine protease inhibitor enriched fraction from *Jatropha curcas* seed cake have *in vitro* anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Experimental Parasitology**, Berlin, v. 153, p. 111-117, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25816973>. Acesso em: 5 de setembro de 2015.

SONDA, S.; SALA, G.; GHIDONI, R.; HEMPHILL, A.; PIETERS, J. Inhibitory effect of aureobasidin A on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, p. 1794-1801, 2005. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/49/5/1794.full>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; ATTÍAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii* - Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, p. 131-143, 2010. Disponível em: <http://vufind.uniovi.es/Record/oai:doaj.org/article:553ab14c01dc4518ac95b097479256cd/Details>. Acesso em: 17 de novembro de 2015.

SPERANSKAYA, A. S.; KRINITSINA, A. A.; REVINA, T. A.; GERASIMOVA, N. G.; KERUCHEN'KO, Y. S.; SHEVELEV, A. B., VALUEVA, T. A. Heterologous expression, purification, and properties of a potato protein inhibitor of serine proteinases. **Biochemistry**, London, v. 71, p. 1176-1182, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140378>. Acesso em: 16 de outubro de 2015.

SPLENDRE A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pela **Revista da Sociedade Científica**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908.

STAPLETON, P. D.; TAYLOR, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science Progress**, USA, v. 85, p. 57-72, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/11969119/>. Acesso em: 17 de outubro de 2015.

SUNDARI, J.; SELVARAJ, R. Antibacterial and antifungal activity of seed extract from *Jatropha curcas* Linn. **International Journal of Current Research**, India, v. 3, p. 84-87, 2011. Disponível em: <http://www.journalcra.com/article/antibacterial-and-antifungal-activity-seed-extract-jatropha-curcas-linn>. Acesso em: 17 de setembro de 2015.

SUNTORNUSUK, W.; SAETAE, D. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, p. 66-77, 2011. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339978>. Acesso em: 13 de maio de 2015.

SVENDSEN, I. B.; NICOLOVA, D.; GOSHEV, I.; GENOV, N. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the seeds of kohlrabi (*Brassica napus* var. *Rapifera*) belonging to the napin family of storage proteins. **Carlsberg Research Communication**, USA, v. 54, p. 231-239, 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2490369>. Acesso em: 29 de agosto de 2015.

SVENDSEN, I. B.; NICOLOVA, D.; GOSHEV, I.; GENOV, N. Primary structure, spectroscopic and inhibitory properties of a two chain trypsin inhibitor from the seeds of charlock (*Sinapis arvensis* L), a member of the napin protein family. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Hoboken, v. 43, p. 425-430, 1994. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3011.1994.tb00540.x/pdf>. Acesso em: 18 de maio de 2015.

SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Applied Crystallography**, USA, v. 25, p. 495-503, 1992. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?wi0087>. Acesso em: 18 de agosto de 2015.

SWEET, R. M.; WRIGHT, H. T.; JANIN, J.; CHOTHIA, C. H.; BLOW, D. M. Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6-Å resolution. **Biochemistry**, Washington, v. 13, p. 4212-4228, 1974.

TEIXEIRA, J. P. Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha* spp. **Bragantia**, Campinas, 1987. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S000687051987000100017&script=sciabstract&tlng=pt>. Acesso em: 25 de março de 2015.

TENTER, A. M.; HECKEROTH; A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 30, p. 1217-1258, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751900001247>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2015.

TERRAS, F. R. G.; TORRENKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; OSBORN, R. W.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKEART, W. F. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. **Federation of European Biochemical Societies**, Netherlands, v. 316, p. 233-240, 1993. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793\(93\)81299-F/abstract;jsessionid=DA3A163C4E1AA9AF0B62F32F21C2C890.f04t02](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793(93)81299-F/abstract;jsessionid=DA3A163C4E1AA9AF0B62F32F21C2C890.f04t02). Acesso em: 28 de fevereiro de 2015.

TOMAR, P. P. S.; CHAUDHARY, N. S.; MISHRA, P.; GAHLOTH, D.; PATEL, G. K.; SELVAKUMAR, P.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Purification, characterization and cloning of 2S albumin with DNase, RNase and antifungal activities from *Putranjiva roxburghii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, USA, v. 174, p. 471-482, 2014a. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-014-1078-9>. Acesso em: 21 de julho de 2014

TOMAR, P. P. S.; NIKHIL, K.; SINGH, A.; SELVAKUMAR, P.; ROY, P.; SHARMA, A. K. Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 448, p. 349-354, 2014b. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-291X\(14\)00829-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-291X(14)00829-8). Acesso em: 5 de maio de 2015. Acesso em 6 de outubro de 2015.

TRIPATHI, V. R.; KUMAR, S.; GARG, S. K. A study on trypsin, *Aspergillus flavus* and *Bacillus* sp. protease inhibitory activity in *Cassia tora* (L.) syn *Sennatoria* (L.) Roxb. seed extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, UK, v. 11, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144011/>. Acesso em: 22 de março de 2015.

TURNIDGE, J. D.; KOTSANAS, D.; MUNCKHOF, W.; ROBERTS, S.; BENNETT, C. M.; NIMMO, G. R.; COOMBS, G. W.; MURRAY, R. J.; HOWDEN, B.; JOHNSON, P. D.; DOWLING, K. Australia New Zealand cooperative on outcomes in staphylococcal sepsis. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a major cause of mortality in Australia and New Zealand. **Medical Journal of Australia**, Sydney, v. 191, p. 368-373, 2009. Disponível em: <https://www.mja.com.au/journal/2009/191/7/staphylococcus-aureus-bacteraemia-major-cause-mortality-australia-and-new-zealand>. Acesso em: 17 de outubro de 2015.



UZUN, B. B.; PÜTÜN, A. E.; PÜTÜN, E. Fast pyrolysis of soybean cake: Production yields and compositions. **Bioresource Technology**, India, v. 97, p. 569-576, 2006.

Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/7793135\\_Fast\\_pyrolysis\\_of\\_soybean\\_cake\\_Product\\_yields\\_and\\_compositions?el=1\\_x\\_8&enrichId=rgreq-f174af85-7fd5-4a85-aa49-097b9614fa88&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzQyMzQ0NzkzO0FTOjEwMTA5MzQ2ODAxNjY1OUAxNDxMTEzOTcwMDEz](https://www.researchgate.net/publication/7793135_Fast_pyrolysis_of_soybean_cake_Product_yields_and_compositions?el=1_x_8&enrichId=rgreq-f174af85-7fd5-4a85-aa49-097b9614fa88&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzQyMzQ0NzkzO0FTOjEwMTA5MzQ2ODAxNjY1OUAxNDxMTEzOTcwMDEz). Acesso em: 14 de dezembro de 2015.

VITALE, A.; HINZ, G. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? **TRENDS in Plant Science**, Maryland, v. 10, p. 1360-1385, 2005.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950520>. Acesso em: 19 de setembro de 2015.

VON HEIJNE, G. Tropical Review: The signal peptide. **The Journal of Membrane Biology**, USA, v. 115, p. 195-201, 1990. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2197415>. Acesso em: 30 de abril de 2015.

VORONTSOVA, O. V.; EGOROVA, N. S.; ARSENIYEV, V. A.; FEOFANOV, V.

Haemolytic and cytotoxic action of laticin Ltc2a. **Biochimie**, Paris, v. 93 p. 227-241, 2011. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908410003329>. Acesso em: 13 de maio de 2015.

WILKINS, M. R.; LINDSKOG, I.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J.-C.; HOCHSTRASSER, D. F.; APPEL, R. D. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - a World-Wide-Web-accessible tool. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, p. 403-408, 1997. Disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.1150180314/abstract>. Acesso em: 27 de outubro de 2015.

WILLIAMSON, R.; COLLATZ, E.; GUTMAN, L. Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance. **La Presse Médicale**, Paris, v. 15, p. 2282-2289, 1986. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2949269>. Acesso em: 18 de setembro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO'S first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. Antimicrobial resistance – global surveillance report. **Virtual Press Conference**, 2014. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/multimedia/amr-transcript.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 de dezembro de 2015.

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. C. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. **American Journal of Botany**, Connecticut, v. 68, p. 44-48, 1981. Disponível em:

[https://www.jstor.org/stable/2442990?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/2442990?seq=1#page_scan_tab_contents). Acesso em: 26 de janeiro em 2016.

ZHAO, Q.; WANG, W.; WANG, Y.; XU, Y.; CHEN, F. The effect of curcumin from *Jatropha curcas* on apoptosis of mouse sarcoma-180 cells. **Fitoterapia**, Novara, v. 83,

p. 849-852, 2012. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367-326X\(12\)00071-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367-326X(12)00071-8). Acesso em: 27 de outubro de 2015.

ZHOU, D.; LOBO, Y. A.; BATISTA, I. F. C.; MARQUES-PORTO, R.; GUSTCHINA, A.; OLIVA, M. L. V.; WLODAWER, A. Crystal structures of a plant trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of its complex with bovine trypsin.

**Plos One**, San Francisco, v. 8, e62252, 2013. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23626794>. Acesso em: 18 de outubro de 2015.