

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

**ADRIANNE MAIA LIMA**

**BIOPROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO EM  
FOLHAS DE *Morinda citrifolia* L.**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2017**

ADRIANNE MAIA LIMA

BIOPROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO EM FOLHAS DE  
*Morinda citrifolia* L.

Monografia apresentada ao curso Bacharelado em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Co-orientador: Me. Adson Ávila de Sousa

FORTALEZA - CEARÁ

2017

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)

---

- L696b Lima, Adrienne Maia.  
Bioprospecção de proteínas de interesse biotecnológico em folhas de *Morinda citrifolia* L. /  
Adrienne Maia Lima. – 2017.  
57 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de  
Oliveira. Coorientação: Prof. Me. Adson  
Ávila de Souza.
1. *Morinda citrifolia* L.. 2. Proteínas de folhas. 3. Cultura in vitro de tecidos vegetais. 4.  
Inibidor de tripsina. I. Título.

CDD 661

---

ADRIANNE MAIA LIMA

BIOPROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO EM FOLHAS DE  
*Morinda citrifolia* L.

Monografia apresentada ao Curso Bacharelado em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família e todos aqueles que tornaram esta  
jornada possível.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e por acreditar no meu potencial.

Ao meu namorado, Thalesson, por me incentivar e não me deixar desistir.

Ao meu orientador, Dr. Hermógenes David de Oliveira, por ter me aceitado como sua orientanda, pelos conselhos, incentivos e pelo *coffee break* científico, assim como pelas cobranças que me fizeram crescer como aluna e como pessoa.

Agradeço também ao meu co-orientador, Adson Ávila, pela paciência, pelas ideias, pelas explicações e pelo companheirismo.

À todos aqueles que compõem o BioAP, pelas conversas, pela ajuda e pelos conselhos. Um obrigado especial a turma que compõe os Orientandos Hermógenes: Vilmara Farias, Sheila Costa, Cristiane Nogueira, Andréa Costa, Dyély Campos, Amanda Dias e Mighay Lovera.

Aos meus outros companheiros de bancada, Acrísio Bastos, Áurea Anette, Éwerton Lima, Ingrid Queiroz, Carol Dantas, Chris Veríssimo, Carol Landim, George Meredite, que trabalharam ao meu lado por todos esses anos. Assim como a professora Márjory Holanda, pelas discussões e pela disposição a ajudar quando precisei.

Aos amigos de outros laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, que me ajudaram e que tornaram etapas desse trabalho possíveis, especialmente Thiago Fernandes, Pedro Filho, Ivna Salmito e Dhel Neres, que se mostraram sempre dispostos a me ajudar.

A todos os professores do curso de Biotecnologia que tornaram possível a minha formação e me mostraram como bonitas são a ciência e a pesquisa.

Aos meus amigos do curso de Biotecnologia, Mayara Azevedo, Misrael Sales, Nadine Salgueiro e Patrícia Lucas, pelos anos que passamos juntos, estudando e nos divertindo.

À UFC, por oferecer um ensino de qualidade com professores altamente capacitados.

À FUNCAP, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro concedido por meio de bolsa de iniciação científica e financiamento de projetos de pesquisa.

## RESUMO

*Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae), conhecida popularmente como noni, é utilizada pelos polinésios para fins alimentares e medicinais há mais de 2000 anos. Mesmo sendo uma espécie amplamente utilizada com finalidade medicinal, poucos são os estudos voltados para o isolamento e a avaliação do potencial biotecnológico de suas proteínas. Assim, este trabalho objetivou prospectar proteínas nas folhas de noni e avaliar o seu potencial de aplicação em áreas de interesse econômico e biotecnológico. As folhas, obtidas de plantas cultivadas em campo, secas à temperatura ambiente por sete dias, foram postas em contato com os seguintes tampões: acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, na proporção de 1:10 (p/v). A condição mais alcalina foi capaz de extrair significativamente o maior teor de proteínas ( $3,642 \pm 0,259$  mgP/g de folha seca), com um perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) composto majoritariamente por bandas proteicas com massas aparentes de 18, 30 e 40 kDa. O extrato bruto mostrou a presença de atividades hemaglutinante ( $154,95 \pm 3,34$  UH/mgP), proteolítica ( $197,02 \pm 7,07$  UAP/mgP), peroxidásica ( $4,15 \pm 0,17$  UAPox/mgP) e, principalmente, inibitória de tripsina ( $1335,01 \pm 27,84$  UI/mgP). Utilizando a mesma condição alcalina de extração para folhas obtidas *in vitro*, foi possível extrair  $6,480 \pm 0,366$  mgP/g de folhas frescas, bem como detectar as atividades peroxidásica ( $1,00 \pm 0,09$  UAPox/mgP), proteolítica ( $140,07 \pm 2,82$  UAP/mgP) e inibitória de tripsina ( $200,00 \pm 14,14$  UI/mgP). Devido a elevada atividade específica obtida para a inibição da tripsina no extrato bruto das folhas de noni obtidas de plantas cultivadas em campo, foi delineado um protocolo para a purificação parcial de um inibidor de tripsina dessa espécie. NLTI (Noni Leaf Trypsin Inhibitor) foi isolado utilizando as etapas de partição trifásica e cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose-4B contendo tripsina bovina imobilizada, apresentando atividade específica de 9.000 UI/mg, massa molecular aparente de 16 kDa, com um índice de purificação de 6,74 vezes e rendimento de 0,42%. Os resultados obtidos mostraram que as folhas de *M. citrifolia* L. apresentam-se como uma promissora fonte de proteínas com potencial biotecnológico, particularmente de inibidores de tripsina, dando suporte para investigações futuras que permitam o desenvolvimento de produtos biotecnológicos baseados nessas macromoléculas, bem como a obtenção destas a partir de tecidos vegetais cultivados *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Morinda citrifolia* L., proteínas de folhas, cultura *in vitro* de tecidos vegetais, inibidor de tripsina.

## ABSTRACT

*Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae), popularly known as noni, has been used by Polynesians for food and medicinal purposes for over 2000 years. Although it is a widely used species with medicinal purpose, few studies are focused on the isolation and evaluation of the biotechnological potential of its proteins. Thus, this work aimed to prospect proteins in the noni leaves and to evaluate their potential for application in areas of economic and biotechnological interest. The leaves obtained from field-grown plants were dried at room temperature for seven days and used for protein extraction with the following buffers: 50 mM sodium acetate, pH 5.0, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, in the ratio of 1:10 (w/v). The most alkaline condition was able to significantly extract the highest protein content ( $3.642 \pm 0.259$  mg/g of dry leaf), with an electrophoretic profile (SDS-PAGE 12.5%) composed mainly of protein bands with apparent masses of 18, 30 and 40 kDa. The crude extract showed the presence of hemagglutinating activities ( $154.95 \pm 3.34$  HU/mg), proteolytic ( $197.02 \pm 7.07$  AU/mg), peroxidase ( $4.15 \pm 0.17$  U/mg) and mainly inhibitory trypsin ( $1335.01 \pm 27.84$  IU / mgP). Using the same alkaline condition for protein extraction from leaves obtained *in vitro*, it was possible to extract  $6,480 \pm 0,366$  mgP/g of fresh leaf, as well as to detect the peroxidase ( $1.00 \pm 0.09$  U/mg), proteolytic ( $140,07 \pm 2, 82$  AU/mg) and trypsin inhibitory activities ( $200.00 \pm 14.14$  IU/mg). A protocol for the partial purification of a trypsin inhibitor of this species was delineated due to the high specific activity obtained for the inhibition of trypsin in the crude extract of the noni leaves obtained from field cultivated plants. NLTI (Noni Leaf Trypsin Inhibitor) was isolated using the steps of three-phase partition and affinity chromatography on Sepharose-4B matrix containing immobilized bovine trypsin, exhibiting specific activity of 9,000 IU/mg, an apparent molecular mass of 16 kDa, with an index of purification of 6.74 times and yield of 0.42%. The results showed that the leaves of *M. citrifolia* L. are a promising source of proteins with biotechnological potential, particularly trypsin inhibitors, supporting future investigations that allow the development of biotechnological products based on these macromolecules, as well as the production of these macromolecules from plant tissues grown *in vitro*.

**Keywords:** *Morinda citrifolia* L., leaf proteins, plant tissue culture, trypsin inhibitor.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Aspectos botânicos de <i>Morinda citrifolia</i> L.....	13
<b>Figura 02</b> – Distribuição geográfica de <i>M. citrifolia</i> L.....	14
<b>Figura 03</b> – Esquema da estratégia experimental adotada no trabalho.....	23
<b>Figura 04</b> – SDS-PAGE (12,5%) dos extratos de folhas de noni de plantas cultivadas em campo e <i>in vitro</i> em tampão Tris- HCl pH 8,0 .....	33
<b>Figura 05</b> – Detecção da atividade proteolítica dos extratos das folhas de plantas cultivadas em campo e <i>in vitro</i> pela técnica de zimografia.....	36
<b>Figura 06</b> – Partição trifásica do concentrado proteico obtido de folhas de noni de cultivo não experimental em campo.....	38
<b>Figura 07</b> – SDS-PAGE (12,5%) do extrato bruto, da fração obtida a partir de precipitação com sulfato de amônio e da fase aquosa das folhas de noni de cultivo não experimental em campo.....	39
<b>Figura 08</b> – Perfil cromatográfico de cromatografia de afinidade, em coluna de tripsina-sepharose-4B, da fase aquosa.....	41
<b>Figura 09</b> – SDS-PAGE (12,5%) do inibidor de tripsina purificado de folhas de noni.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Extração de proteínas das folhas de noni utilizando diferentes tampões.....	32
<b>Tabela 02</b> – Detecção e quantificação de proteínas bioativas presentes no extrato bruto obtido a partir de folhas de noni.....	35
<b>Tabela 03</b> – Purificação do inibidor de tripsina de folhas de <i>Morinda citrifolia</i> L. ....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1 <i>Morinda citrifolia</i> L.</b> .....	12
<b>1.1.1 Aspectos botânicos</b> .....	12
<b>1.1.2 Atividades biológicas relatadas para <i>M. citrifolia</i> L.</b> .....	15
<b>1.2 Potencial biotecnológico de proteínas de vegetais</b> .....	17
<b>1.3 Cultura de tecidos de vegetais para a produção de moléculas bioativas</b> .....	20
<b>3.OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3.1 Geral</b> .....	22
<b>3.2 Específicos</b> .....	22
<b>4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	23
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
<b>5.1 Reagentes químicos</b> .....	24
<b>5.2 Obtenção do material vegetal</b> .....	24
<b>5.2.1 Material de campo</b> .....	24
<b>5.2.2 Material de cultura <i>in vitro</i></b> .....	24
<b>5.3 Estabelecimento do protocolo de extração das proteínas de folhas de noni</b> .....	25
<b>5.4 Análise eletroforética</b> .....	25
<b>5.5 Atividade hemaglutinante</b> .....	26
<b>5.6 Atividade proteolítica (E.C. 3.4)</b> .....	26
<b>5.6.1 Atividade proteolítica utilizando a técnica de zimografia</b> .....	27
<b>5.7 Atividade peroxidásica (E.C. 1.11.1.7)</b> .....	27
<b>5.8 Atividade inibitória de proteases serínicas (tripsina e quimotripsina)</b> .....	27
<b>5.9 Concentração e fracionamento por partição das proteínas extraídas das folhas de noni</b> .....	28
<b>5.9.1 Precipitação com sulfato de amônio</b> .....	28
<b>5.9.2 Partição trifásica da F0-90%</b> .....	29
<b>5.10 Purificação do inibidor de tripsina de folhas de noni</b> .....	29
<b>5.11 Análise estatística</b> .....	30
<b>6. RESULTADOS</b> .....	31
<b>6.1 Seleção do tampão de extração</b> .....	31

<b>6.2 Detecção de proteínas bioativas no extrato de folhas de noni de plantas cultivadas em campo e <i>in vitro</i></b> .....	34
<b>6.3 Isolamento de um inibidor de tripsina a partir das folhas de noni obtidas de cultivo não experimental em campo</b> .....	37
<b>6.4 Cromatografia de afinidade em coluna de tripsina-sepharose-4B</b> .....	40
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

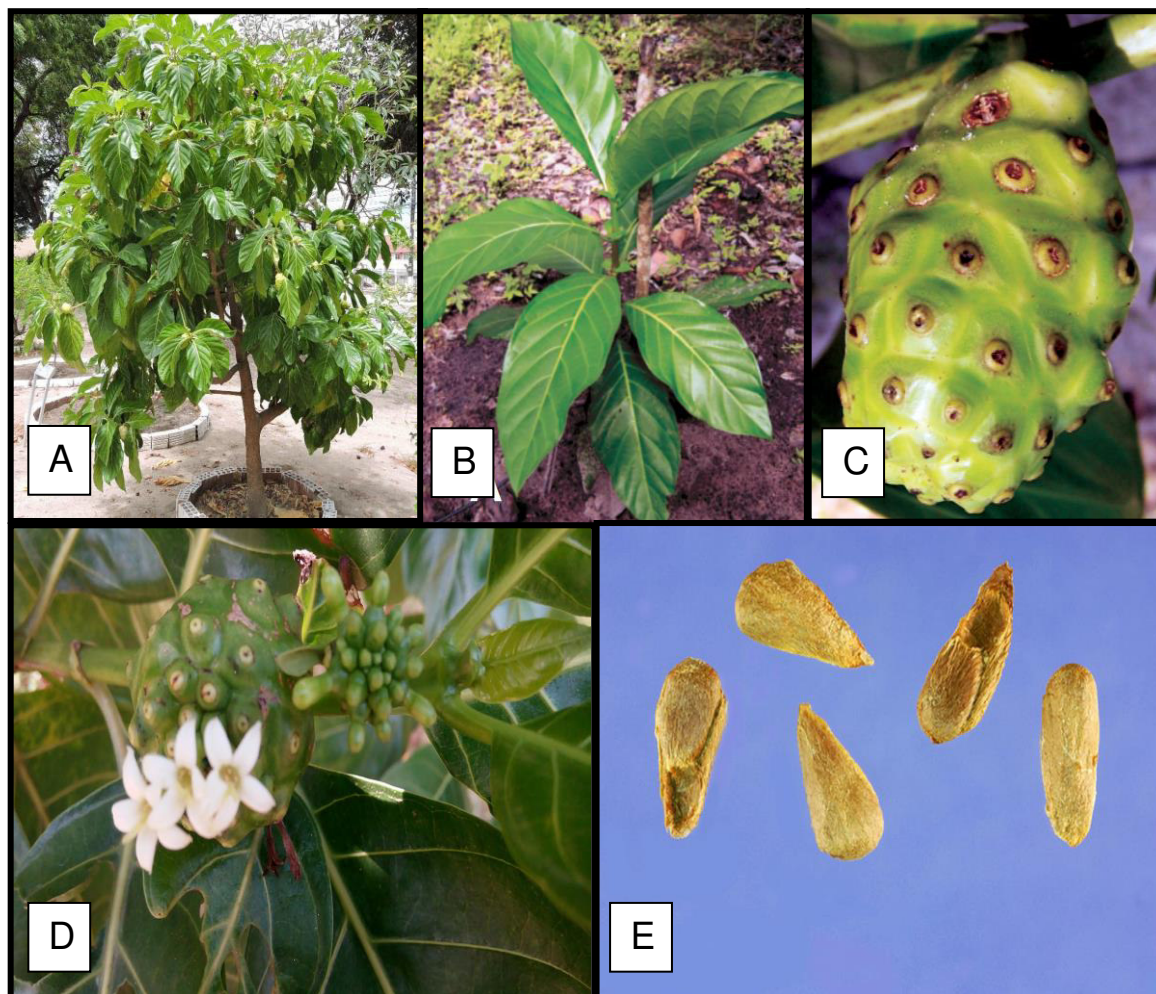
### 1.1 *Morinda citrifolia* L.

#### 1.1.1 Aspectos botânicos

*Morinda citrifolia* L. é uma planta pertencente à família Rubiaceae, utilizada pelos polinésios para fins alimentares e medicinais há mais de 2000 anos. Possui porte arbustivo ou arbóreo, variando de 3-10 m de altura, com folhas abundantes e elípticas, de 5-17 cm de comprimento e 10-40 cm de largura. As flores são pequenas, brancas, tubulares e todas ficam agrupadas no pedúnculo do fruto (KRISHNAIAH; NITHYANANDAM; SARBATLY, 2012). Os frutos podem atingir 3 a 10 cm de comprimento e apresentam-se ovais, carnosos, ligeiramente enrugados, semi-translúcidos, com uma coloração que varia entre verde ao amarelo e, após a colheita, apresentam-se com odor forte e desagradável, além de conterem muitas sementes, como pode ser observado na **Figura 01** (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

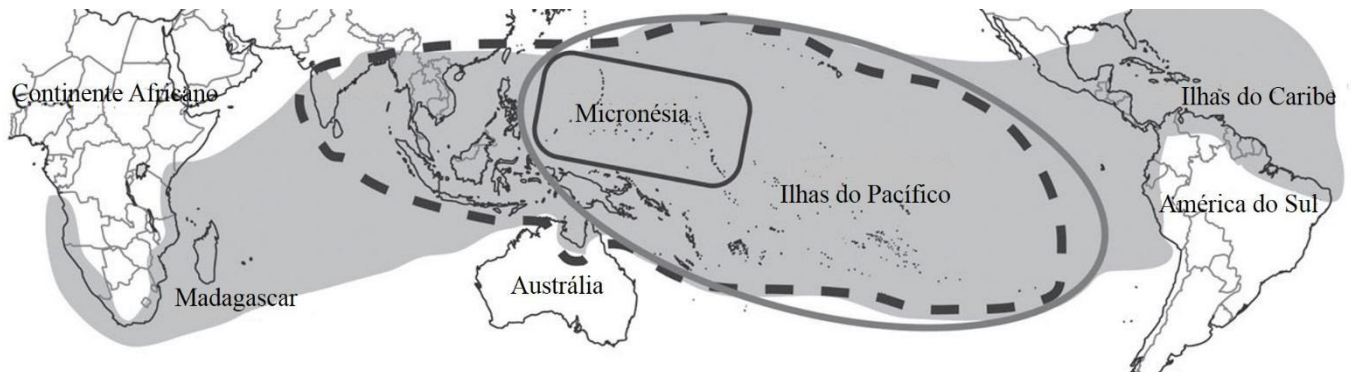
Outras denominações mais populares para *M. citrifolia* L. são amora indiana, nuna, ach, mengkudu, nhau, fruta queijo, ou, como é mais conhecida no Brasil, noni. O noni é nativo do Sudeste da Ásia e Austrália e é cultivado na Polinésia, Índia, Caribe, América Central e norte da América do Sul (ASSI *et al.*, 2015). No Brasil o cultivo é recente, sendo encontrados plantios no Nordeste do país, especialmente nos estados de Sergipe e Ceará, embora também possam ser encontrados plantios no Acre, São Paulo e Minas Gerais (CORREIA *et al.*, 2011). Atualmente existem três variedades reconhecidas de noni, *M. citrifolia* var. *citrifolia* de frutos grandes, mais comumente encontrada e que possui maior importância terapêutica e econômica, *M. citrifolia* var. *bracteata*. e *M. citrifolia* var. *potteri* de distribuição mais restrita. *M. citrifolia* L. var *citrifolia* apresenta-se ainda na forma dotada de frutos pequenos que são encontradas particularmente na Micronésia (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010). A distribuição geográfica das variedades e do cultivar de *M. citrifolia* L. é mostrada na **Figura 02**.

**Figura 01** - Aspectos botânicos de *Morinda citrifolia* L.



(A) visão geral da planta em campo; (B), (C) e (D), folhas, flores, frutos e sementes, respectivamente. Fonte: SALES, 2016; EMBRAPA, 2009.

**Figura 02** – Distribuição geográfica de *M. citrifolia* L.



A área cinza denota a distribuição geográfica atual de *M. citrifolia* L. e sua variedade *citrifolia* de frutos grandes. A linha tracejada preta delimita a área de *M. citrifolia* var. *bracteata*, enquanto a linha cinza delimita a região de *M. citrifolia* var. *potteri*, e a linha preta delimita a Micronésia, onde é encontrado *M. citrifolia* var. *citrifolia* de frutos pequenos. FONTE: RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010.

### 1.1.2 Atividades biológicas relatadas para *M. citrifolia* L.

Os diversos usos de *M. citrifolia* L. têm se refletido no crescimento do seu mercado consumidor. No início de 1990, foram lançados os primeiros produtos derivados do noni nos EUA. Mais tarde, em 1996, o suco foi introduzido como uma bebida que promovia o bem-estar devido aos numerosos relatos afirmando seus efeitos terapêuticos. Surpreendentemente, mesmo com a ausência de estudos que esclarecessem os mecanismos de ação específicos para os efeitos atribuídos a *M. citrifolia*, as vendas anuais chegaram até US \$ 1,3 bilhões (ASSI, 2015).

Nos últimos anos, o número de trabalhos científicos que descrevem aplicações do noni, principalmente suas propriedades terapêuticas, cresceu bastante.

Extratos de folhas de noni, obtidos com diferentes solventes (clorofórmio, acetato de etila, benzeno, etanol e água), apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* numa ordem dependente da concentração (USHA; SANGHEETA; PALANISWAMY, 2010). Já o extrato metanólico do fruto conseguiu inibir o crescimento em quase 50% espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* (JAYARAMAN; MANOHARAN; ILLANCHEZIAN, 2008).

Também foi atribuída atividade antiviral à planta, onde o damnacantal, um metabólito secundário presente no fruto, mostrou-se capaz de inibir a morte celular induzida pela proteína viral R (ou Vpr), proteína acessória presente no vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Contudo, o mecanismo de inibição da apoptose pelo damnacantal ainda é desconhecido e precisa ser elucidado (KAMATA *et al.*, 2006). Já extratos foliares obtidos com metanol, acetato de etila e hexano mostraram atividade antiviral *in vitro* contra o vírus da hepatite C (RATNOGLIK *et al.*, 2014).

Já o suco dos frutos do noni apresentou atividade anti-inflamatória, onde a resposta inflamatória e o edema da pata induzidos por bradicinina foram revertidos quando ratos foram pré-tratados por administração oral ou intraperitoneal com o suco. Esse efeito pode ser um resultado da interferência do mecanismo mediado pelo receptor B2 pelo qual a bradicinina induz o edema de pata (SU *et al.*, 2001). Outro estudo concluiu que o suco dos frutos de *M. citrifolia* inibe seletivamente as enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) envolvidas na inflamação (DUSSOSSOY *et al.*, 2011).

Campos *et al.* (2017) relatou o efeito anti-inflamatório de uma proteína transferidora de lipídeos obtida de sementes dos frutos de noni, denominada *McLTP<sub>1</sub>*, onde essa proteína



conseguiu inibir significativamente a migração de células para o sítio inflamatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina e dextrana em camundongos. Este efeito pode estar relacionado na capacidade desta molécula de modular a ação das citocinas envolvidas no processo de inflamação, já que *McLTP<sub>1</sub>* foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e aumentar a produção de uma citocina antiinflamatória (IL-10). Além disso, *McLTP<sub>1</sub>* também apresentou efeito antinociceptivo, onde, administrada por via oral na dose de 8 mg/kg, conseguiu reverter significativamente as contorções abdominais induzida por ácido acético em camundongos (CAMPOS *et al.*, 2016).

Outras atividades na área de saúde humana atribuídas ao noni incluem: anticâncer, hipoglicêmica, hepatoprotetora, antioxidante, cicatrizante, nefroprotetora, entre outras (ALI; KENGANORA; MANJULA, 2016; TORRES *et al.*, 2017)

Embora estudos com o noni sejam, em sua maioria, sobre suas propriedades terapêuticas, outras aplicações também têm sido relatadas, como, por exemplo, na indústria de alimentos. O hidroxitolueno butilado, presente em folhas, frutas e raízes, possui atividade conservante e foi eficaz no bloqueio da perda de sabor pela ação do calor, em tortas de carne bovina, mantidas em estufas, ao reduzir a oxidação lipídica, bem como melhorando a cor, a estabilidade e a vida útil das tortas aerobicamente embrulhadas (NATHAN *et al.*, 2012).

Outra possível aplicação industrial do noni seria na produção de inseticidas, já que foi observada atividade inseticida das folhas de noni com sucesso em diferentes concentrações. As atividades de extratos de folhas em água, hexano, clorofórmio, acetona e metanol foram sequencialmente observadas nas fases de desenvolvimento do vetor da malária, *Anopheles stephensi*, vetor da dengue, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose. Os estudos foram realizados durante 24 e 48 h, onde o extrato metanólico teve a maior taxa de mortalidade das larvas e pupas (KOVENDAN *et al.*, 2012). O extrato etanólico das folhas também apresentou atividade larvicida e pupicida contra o vector da malária *Anopheles stephensi*, tanto isoladamente, quanto combinado com *Metarhizium anisopliae* (um fungo entomopatogênico), onde esta combinação apresentou a maior taxa de mortalidade das larvas e pupas (KOVENDANA *et al.*, 2014).

Diferentemente do que foi observado para outras partes da planta, as folhas de noni não têm apresentado casos de toxicidade aguda, subaguda ou subcrônica, sendo consumidas desde os tempos antigos, em razão de suas propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras e

cicatrizantes (WEST *et al.*, 2007). Lagarto *et al.* (2013) em estudo a partir de extratos aquosos das folhas, demonstraram a inexistência de efeitos nocivos em camundongos que receberam o extrato pela via oral em administrações repetidas, mesmo na dose de 1000 mg/kg. Também não foram observados efeitos danosos no teste de toxicidade crônica (SHALAN; MUSTAPHA; MOHAMED, 2017). Além disso, as folhas *M. citrifolia* têm mostrado propriedades farmacológicas promissoras, como atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivas, efeitos anti-inflamatório e analgésico (LAGARTO *et al.*, 2013). Contudo, ainda são escassos os estudos feitos com as folhas, principalmente aqueles que investiguem moléculas de caráter proteico presentes nesta parte da planta.

## **1.2 Potencial biotecnológico de proteínas de vegetais**

As plantas são importantes fontes de substâncias naturais biologicamente ativas, utilizadas pelo homem desde os tempos antigos, com o objetivo de melhorar suas condições de existência, e são frequentemente obtidas a partir de coleta predatória e indiscriminada (BAQUE *et al.*, 2012). Dentre estas substâncias, as proteínas e os peptídeos podem ser considerados produtos bioativos ideais porque intervêm, essencialmente, em todos os processos biológicos e reações, caracterizando-se por elevada eficiência e potência, ou seja, atuam especificamente e em baixas concentrações (WANG, 1999).

O estudo de proteínas vegetais, principalmente de partes naturalmente renováveis como as folhas, garantem a exploração sustentável de plantas de interesse (PINHO *et al.*, 2012). Outra alternativa para a exploração e uso dessas proteínas é a cultura de tecidos vegetais *in vitro*. Entretanto, são escassos os estudos feitos com esta parte da planta, principalmente com moléculas proteicas, pois essas são encontradas em baixas concentrações nas folhas (por exemplo, paredes celulares contêm 90-95% de polissacarídeos e proteínas 5-10%), necessitando, assim, de uma grande quantidade de material (RIGHETTI; BOSCHETTI, 2016). Contudo, algumas proteínas de defesa, como proteínas antifúngicas, expressas nas folhas, apresentam interesse biotecnológico, e podem ser aplicadas em várias áreas (YAN *et al.*, 2015).

Um bom exemplo são as lectinas. Em vegetais, as lectinas são frequentemente isoladas de sementes, como também de raízes (SOUZA *et al.*, 2011), tubérculos (KAUR *et al.*, 2006), caule (SÁ *et al.*, 2008) e folhas (SILVA *et al.*, 2010).

Por serem as únicas proteínas de plantas que reconhecem e se ligam específica e reversivelmente a glicoconjugados presentes na superfície de microrganismos ou expostos no trato intestinal de insetos, mamíferos e herbívoros, acredita-se que elas podem desempenhar importante papel de defesa na planta. As lectinas ligantes de quitina são as principais responsáveis pelo mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de insetos (CRUZ, 2015). O estudo de suas propriedades biológicas tem sugerido importantes aplicações biotecnológicas, como, por exemplo, a investigação de estruturas de proteínas e carboidratos em células; na utilização em matrizes comerciais de afinidade, empregadas na purificação e caracterização de polissacarídeos e glicoconjugados. Já na área da saúde, são utilizadas na caracterização de grupos sanguíneos; na estimulação da mitogênese de linfócitos; na aglutinação de células cancerígenas e estudos de oncogênese (CRUZ, 2015).

Outras importantes moléculas com interesse biotecnológico são as enzimas. As proteases, enzimas que hidrolisam ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos, são responsáveis por mais de 60% do mercado mundial de enzimas industriais e têm sido exploradas comercialmente pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (ISHWARYA; SANGEETHA, 2013).

Assim como as proteases, as peroxidases também têm sido alvo de aplicações biotecnológicas. Nas plantas, estão envolvidas em muitas reações metabólicas e processos fisiológicos, influenciando o crescimento desde a fase de germinação até a senescência, nas respostas às condições de estresses bióticos e abióticos (PANDEY *et al.*, 2017). Em processos biotecnológicos, elas têm sido utilizadas como biossensores. Já na indústria farmacêutica, devido à capacidade das peroxidases de produzir produtos cromogênicos à baixas concentrações e à sua estabilidade relativamente boa, elas são adequadas para a preparação de anticorpos conjugados com enzimas e aplicação em kits de diagnóstico. Na indústria alimentar, as peroxidases têm sido amplamente utilizadas como indicadores da adequação de hortaliças no processo branqueamento, devido à sua relativamente elevada estabilidade térmica e ampla distribuição (SAKHAROV, 2001; HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009).

Uma outra classe de proteínas que tem atraído bastante interesse são os inibidores de proteases. Os inibidores de protease são proteínas ou peptídeos que formam complexos com proteases, impedindo a catálise (FAN; WU, 2005). Estão distribuídos de forma ubíqua em animais, plantas e microrganismos (KATUNUMA *et al.*, 2003). Em tecidos vegetais, além de

serem considerados proteínas de armazenamento (MANDAL *et al.*, 2002) estão associados à regulação e controle de proteases endógenas durante o desenvolvimento e germinação de sementes (XAVIER-FILHO; CAMPOS, 1889; RICHARDSON, 1991), à morte celular programada (SOLOMON *et al.*, 1999), à resposta ao estresse abiótico (FRANCO; MELO, 2000) e à proteção contra patógenos e insetos (RYAN, 2000; CARRILLO, *et al.*, 2011).

Sua classificação é feita com base no modo de ação ou no tipo de protease que inibem. De acordo com esses parâmetros, os inibidores podem ser classificados em serínicos, cisteínicos, aspárticos e de metalo-proteinases. Outra forma de classificação, feita por Rawlings *et al.* (2004), utiliza a estrutura primária dos inibidores para agrupá-los em famílias. Inicialmente, essa classificação tinha 48 famílias que podiam ser agrupadas em 26 superfamílias.

Dentre as classes, os inibidores de proteases serínicas são os mais frequentemente encontrados e estudados, mais especificamente aqueles pertencentes às famílias de inibidores do tipo Kunitz e de Bowman-Birk (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Por serem altamente específicos, os inibidores têm sido utilizados no tratamento de doenças, inibindo proteases-chave do processo patológico. Um bom exemplo é o uso de inibidores de protease no tratamento da AIDS. Estudos com inibidores de tripsina de *Phaseolus lunatus* e *Glycine max* mostraram que essas moléculas foram capazes de inibir a transcriptase reversa do HIV-1 (WANG; NG, 2001). Essas moléculas podem atuar também sobre microorganismos patogênicos, pois são capazes de inibir proteases extracelulares e/ou intracelulares, promover danos na membrana e/ou parede celular, alterar a permeabilidade celular, inibir transcrição e/ou tradução de proteínas e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PAIVA *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2016; MAJCHRZAK-GORECKA *et al.*, 2016).

Os inibidores têm sido utilizados também no tratamento de outras doenças como câncer, osteoporose, artrite reumatoide e problemas cardiovasculares (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). Já na agroindústria, são utilizados no controle de pestes, em especial de insetos, onde agem contra proteases digestivas de lepidópteros e coleópteros, levando à sua morte (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). Estudos mostram que essas moléculas podem, também, serem utilizadas na indústria de alimentos como conservantes (BIJINA *et al.*, 2011).

### 1.3 Cultura de tecidos de vegetais para a produção de moléculas bioativas

As plantas são utilizadas como fonte para a produção de pigmentos, produtos farmacêuticos, nutracêuticos, alimentares e cosméticos (BAQUE *et al.*, 2012). Dessa forma, a cultura de tecidos vegetais *in vitro* surge como uma técnica biotecnológica viável para a produção de compostos bioativos que podem ser usados nas mais diversas áreas e tendo sobretudo em vista um esforço adicional para a conservação sustentável e utilização racional da biodiversidade (DIAS, 2017).

Essa técnica já vem sendo empregada na produção de metabólitos secundários, que são utilizados como produtos farmacêuticos, agroquímicos, corantes, biopesticidas e aditivos alimentares (FUMAGALI *et al.*, 2008), bem como na produção de proteínas recombinantes de interesse terapêutico e industrial, onde as células e/ou tecidos vegetais são utilizados como sistemas de expressão (HUANG; MCDONALD, 2012). A cultura *in vitro* tem se mostrado bastante eficiente na produção dessas moléculas, pois é independente de variações geográficas, sazonais e de vários fatores ambientais; oferece um sistema de produção definido, que garante o fornecimento contínuo de produtos; qualidade uniforme e rendimento; e rapidez de produção (RAO; RAVISHANKAR, 2002). Contudo, são poucos os relatos na literatura que utilizam essa técnica para a produção de compostos de natureza proteica naturalmente expressos pelas plantas cultivadas.

*Morinda citrifolia* L., por ser uma potencial fonte para moléculas de interesse, está exposta à erosão genética provocada pela coleta indiscriminada e pelos frequentes desmatamentos provocados pelo homem (PAWLUS; KINGHORN, 2007). Diante desse aspecto, a adoção de metodologias biotecnológicas para a conservação desta espécie *in vitro* adotada é requerida. Atualmente, seu cultivo é feito de forma convencional, através de sementes ou por estacas de raízes ou caule. No entanto, as sementes apresentam-se em estado de dormência e a sobrevivência das estacas é de 83,3% (SHEKHAWAT *et al.*, 2015).

Estudos anteriores mostraram que a culturas *in vitro* de raízes de *M. citrifolia* poderia ser uma metodologia para a produção comercial de metabólitos secundários de interesse, tais como rubiadina, flavonoides, compostos fenólicos e antraquinonas (BAQUE *et al.*, 2012). Já a presença de proteínas de interesse biotecnológico presentes no noni foi reportada de maneira pioneira no estudo realizado por Campos *et al.* (2016) que tratou do isolamento e da caracterização de uma proteína transferidora de lipídeos (denominada *McLTP<sub>1</sub>*) a partir das

sementes de *Morinda citrifolia*. Assim, devido à ausência de estudos na literatura, este trabalho objetivou investigar a presença de proteínas de interesse biotecnológico em folhas de noni, moléculas estas ainda pouco exploradas nesta parte da planta.

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

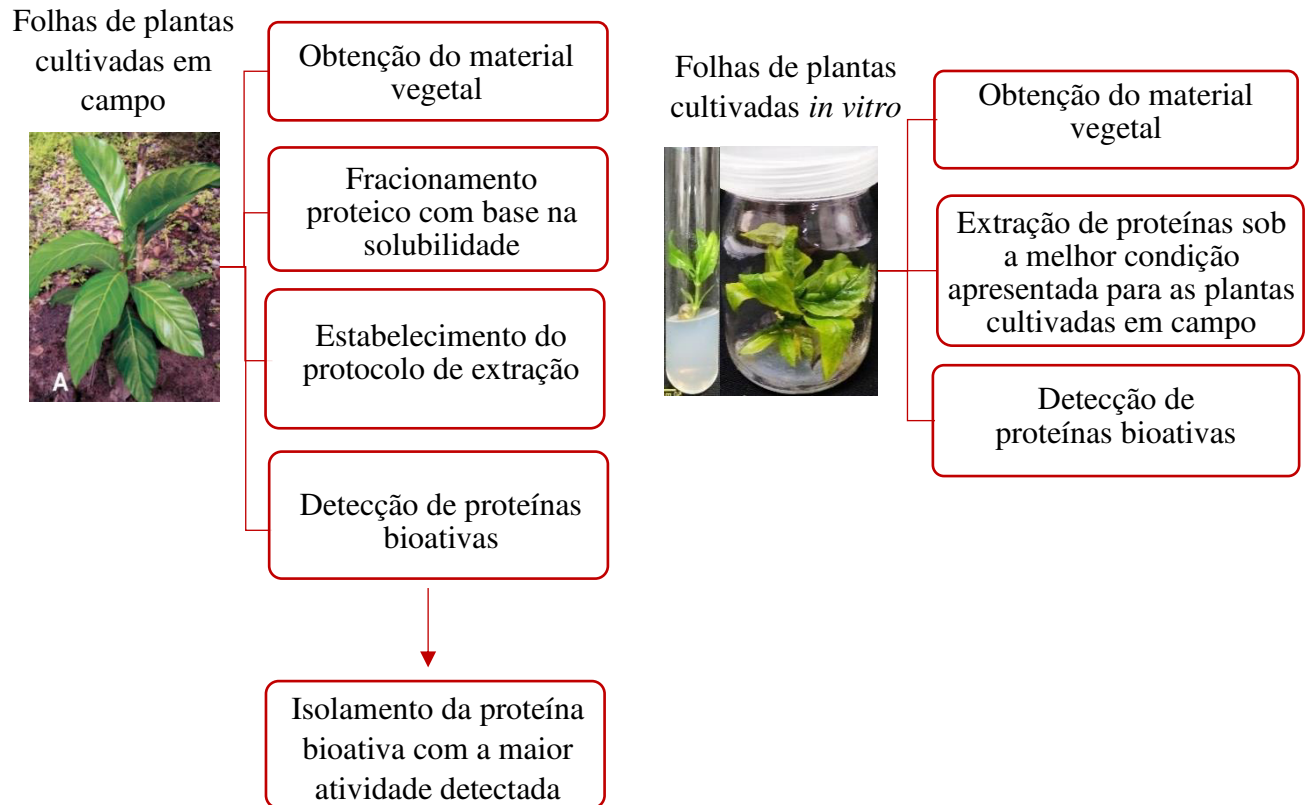
- Prospectar proteínas bioativas a partir das folhas de *Morinda citrifolia* L., cultivadas em campo e *in vitro*, para criar bases para a realização de estudos posteriores que viabilizem sua aplicação biotecnológica.

#### 3.2 Específicos

- Estabelecer um protocolo de extração para as proteínas das folhas de *M. citrifolia* de cultivo não-experimental em campo.
- Obter extratos de tecidos foliares produzidos *in vitro* sob a melhor condição observada para folhas de cultivo não-experimental em campo.
- Realizar atividades peroxidásica, proteolítica, hemaglutinante, inibitória de tripsina e quimotripsina nos extratos proteicos de folhas de campo cultivadas em campo e *in vitro*.
- Purificar um inibidor de tripsina a partir de folhas de noni.

#### 4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

**Figura 03** - Esquema da estratégia experimental adotada no trabalho.





## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### Parte I – Extração e caracterização das proteínas de folhas de noni

#### 5.1 Reagentes químicos

Os reagentes: Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue R-250, azocaseína, ditioneitol (DTT) e tripsina (*Trypsin from bovine pancreas, Type I, ~10,000 BAEE units/mg protein*), foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Os marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (USA). A matriz cromatográfica (Sephacrose® 4B Ativada com Brometo de Cianogênio) foi obtida da GE Healthcare®. Demais reagentes de grau analítico como: tris(hidroximetil)aminometano, t-butanol, sulfato de amônio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio foram obtidos comercialmente.

#### 5.2 Obtenção do material vegetal

##### 5.2.1 Material de campo

As folhas de noni, livres de injúrias mecânicas, foram coletadas no Setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, UFC, Fortaleza – Ceará (latitude: 3°44'24,1"S/longitude: 38°34'36,2"W). Após a coleta, as folhas foram lavadas exaustivamente com água destilada e, em seguida, deixadas para secar por sete dias a temperatura ambiente (25° C), sendo imediatamente utilizadas após a secagem para a extração de proteínas.

##### 5.2.2 Material de cultura *in vitro*

As folhas de noni foram obtidas de plantas cultivadas *in vitro* originadas a partir de segmentos nodais cultivados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG et al., 1962) suplementado com 5,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP), 1,0 mg/L cinetina (CIN) e 1,0 mg/L de ácido indol butírico, contendo 20 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121 °C, 15 minutos), mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, como determinado por SALES (2016). As folhas foram coletadas de plantas com 5, 9 e 11 meses de

idade. Esse material foi fornecido pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal, situado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, UFC, Fortaleza – Ceará. Após a coleta, as folhas ainda frescas foram utilizadas para extração de proteínas.

### **5.3 Estabelecimento do protocolo de extração das proteínas de folhas de noni**

Para determinação da melhor condição de extração das proteínas, as folhas secas foram homogeneizadas em liquidificador com os seguintes tampões: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0; na proporção de 1:10 (p/v) durante três minutos para a produção do suco da folha. Posteriormente, o suco da folha foi deixado sob agitação constante por 3 horas a 4 °C, sendo filtrado em pano de trama fina. O material filtrado foi centrifugado a 10.000 x g; 30 min, 4 °C, sendo coletado o sobrenadante, denominado como extrato bruto. A condição que apresentou o maior rendimento proteico solúvel ( $\text{mgP.gF}^{-1}$ ) foi utilizada para prosseguir com as etapas de fracionamento proteico. Todas as extrações foram realizadas em triplicata. As dosagens de proteína foram feitas de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão. A condição de extração com maior rendimento proteico foi adotada também para a obtenção de proteínas solúveis de folhas de plantas cultivadas *in vitro*.

### **5.4 Análise eletroforética**

As análises eletroforéticas sob condições não redutoras das proteínas das folhas de noni foram realizadas em géis de poliacrilamida a 12,5% (PAGE-SDS) de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (1:1, v/v) contendo Tris-HCl 625 mM, pH 6,8, SDS 1% (m/v), glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v), para acompanhamento da corrida eletroforética. Antes de serem aplicadas nos géis, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g, 5 minutos à temperatura ambiente. As corridas foram realizadas em sistemas verticais (HOEFER SE 250, Amersham Biosciences), onde os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V e amperagem 20 mA. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase b (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica

bovina 34 (29 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa). As bandas proteicas foram reveladas pelo uso de *Comassie Brilliant Blue R-250*.

### 5.5 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante do extrato bruto das folhas de noni foi avaliada segundo metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), adaptada para tubos de ensaio. Para isto, foram usados eritrócitos provenientes de sangue de coelhos albinos adultos (linhagem Nova Zelândia). Os extratos brutos obtidos dos materiais de campo e *in vitro*, numa concentração inicial de 0,4 mgP/mL, foram diluídos em série com NaCl 150 mM (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc) e, a cada diluição, adicionada, na proporção de 1:1, uma suspensão de 2,0% de eritrócitos de coelho, tratados ou não com tripsina (1 mg de tripsina/10 mL da suspensão, por 1 hora, com agitações periódicas, seguida de centrifugações e lavagens com NaCl 150 mM). Os tubos foram incubados a 37 °C, por 30 minutos, e posteriormente mantidos a temperatura ambiente por mais 30 minutos. Após esse tempo, a aglutinação dos eritrócitos foi visualizada a olho nu. Os resultados foram expressos como unidades de hemaglutinação (UH) por miligrama de proteína, sendo uma UH correspondente ao valor recíproco da maior diluição na qual ainda se visualiza aglutinação de eritrócitos, em triplicata.

### 5.6 Atividade proteolítica (E.C. 3.4)

A atividade proteolítica foi avaliada segundo metodologia descrita por Xavier-Filho (1989). Em tubos tipo eppendorf, foram adicionados 200 µL de uma solução de azocaseína 1% (dissolvida em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0), 360 µL desse mesmo tampão, 40 µL de DTT 3 mM e 100 µL do extrato bruto na concentração de 0,5 mg/mL, de ambas as folhas. Nos brancos, ao invés da amostra, foram adicionados 500 µL do tampão mencionado e os demais reagentes citados acima. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C, por 1 hora. Após o período de incubação, foi adicionada a solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% para interromper a reação e, posteriormente, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 minutos. Foi retirada uma alíquota de 500 µL do sobrenadante e a ele foi adicionado 500 µL da solução de NaOH 2 M, a fim de intensificar a cor do produto da clivagem da azocaseína pela enzima. A absorbância foi lida a 420 nm. A atividade proteolítica foi realizada em triplicata e expressa em unidades de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

### 5.6.1 Atividade proteolítica utilizando a técnica de zimografia

A detecção de atividade proteolítica por zimografia foi realizada após a separação das proteases em gel de poliacrilamida 12,5%, adicionado de gelatina 0,1% (MACEDO *et al.*, 2004). Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de Triton X-100 2,5%, sendo suavemente agitado por 40 minutos, a temperatura ambiente, para remoção do SDS e renaturação das proteínas. O gel foi, então, incubado em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0, contendo DTT 3 mM, durante 2 hora a 37 °C. As bandas proteicas foram reveladas pelo uso de *Comassie Brilliant Blue R-250*.

### 5.7 Atividade peroxidásica (E.C. 1.11.1.7)

Para verificar a presença de peroxidases no extrato de folhas de noni, foi usada a metodologia descrita por Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991). Nesse ensaio, o guaiacol e o peróxido de hidrogênio foram utilizados como doador e acceptor de prótons, respectivamente. Uma alíquota de 100 µL de extrato bruto (0,431 mg/mL e 0,703 mg/mL, das folhas cultivadas em plantas de campo e *in vitro*, respectivamente) foi incubada por 10 minutos (30 °C) com 500 µL de guaiacol 20 mM, 500 µL de peróxido de hidrogênio 60 mM e tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2. Em seguida, registrou-se a variação de absorbância da solução durante 3 minutos em intervalos de 30 segundos, em comprimento de onda de 480 nm. O branco foi realizado substituindo-se o extrato por alíquota correspondente do tampão do ensaio. Uma unidade de atividade peroxidásica (UAPox) equivale à quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 1 a pH 5,2. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 5.8 Atividade inibitória de proteases serínicas (tripsina e quimotripsina)

A presença de inibidores de tripsina no extrato das folhas de noni foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Erlanger *et al.* (1961), com algumas modificações. Primeiramente, foi realizada uma curva padrão utilizando alíquotas de 10, 20 e 30 µL de tripsina (0,3 mg/mL). A reação foi realizada adicionando-se tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM perfazendo um volume de 500 µL. Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C, em banho-maria, por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de uma solução de azocaseína 1% (substrato). Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução de parada, 300 µL de ácido tricloroacético 20%.

As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 440 nm. Uma vez determinado o volume de tripsina a ser utilizado no ensaio, a atividade inibitória do extrato bruto (folha de plantas cultivadas em campo e *in vitro*) foi conduzida nas mesmas condições utilizando amostras de 100 µL (0,2 mgP/mL, no estoque). A atividade inibitória de tripsina, realizada em triplicata, foi expressa em unidades de inibição por miligrama de proteína (UI/mgP).

A atividade inibitória sobre a quimotripsina foi avaliada segundo metodologia descrita por Erlanger *et al.* (1961). Primeiramente, foi realizada uma curva padrão utilizando alíquotas de 10, 20 e 30 µL de quimotripsina (0,3 mg/mL). A reação foi realizada adicionando-se tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, perfazendo um volume de 500 µL. Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C, em banho-maria, por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de uma solução de azocaseína 1% (substrato). Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução de parada, 300 µL de ácido tricloroacético 20%. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 440 nm. Uma vez determinado o volume de quimotripsina a ser utilizado no ensaio através da curva padrão, a atividade inibitória do extrato bruto (folha de plantas cultivadas em campo e *in vitro*) foi conduzida nas mesmas condições utilizando amostras de 100 µL (0,2 mgP/mL no estoque). A atividade inibitória de quimotripsina, realizada em triplicata, foi expressa em unidades de inibição por miligrama de proteína (UI/mgP).

## **Parte II. Purificação do inibidor de tripsina presente em folhas de noni cultivadas em campo**

As etapas de purificação foram guiadas de acordo com atividade inibitória de tripsina (como descrito no item 5.9). Em cada etapa, foi determinado teor de proteínas solúveis totais foi pelo método de Bradford (1976) e o perfil eletroforético analisado por SDS-PAGE 12,5% (LAEMMLI, 1970).

### **5.9 Concentração e fracionamento por partição das proteínas extraídas das folhas de noni**

#### **5.9.1 Precipitação com sulfato de amônio**

As proteínas do extrato bruto das folhas de noni foram concentradas através de precipitação com sulfato de amônio à 90% de saturação, *overnight*. A seguir, a amostra foi

centrifugada a 10.000 x g, 30 min, 4 °C, onde foi coletado o precipitado, que foi solubilizado no tampão de extração e dialisado a 4°C em membrana de diálise de cut off 12 kDa contra água. O dialisado coletado foi denominado como fração 0-90% (F0-90%), sendo utilizado na etapa seguinte de clarificação.

### **5.9.2 Partição trifásica da F0-90%**

Com o objetivo de fracionar as proteínas do extrato das folhas de noni, o material foi submetido ao método de partição trifásica descrito por Wati *et al.* (2009). À F0-90% já dialisada foi adicionado sulfato de amônio 30% (m/v) de saturação sob agitação suave para dissolver o sal, seguindo-se da adição de t-butanol, na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi deixada em repouso durante 1 h à temperatura ambiente e, em seguida, submetida à centrifugação a 5.000 x g durante 10 minutos, 4° C, para formação e a separação das três fases (orgânica, intermediária e aquosa). Dentre as três fases, a fase aquosa (FA) se mostrou mais adequada para prosseguir com a purificação do inibidor de tripsina, já que a fase orgânica não é compatível com os métodos de detecção utilizados e pode levar a inativação de algumas proteínas e a fase intermediária apresentou problemas de solubilidade. Assim, FA foi coletada e dialisada contra água destilada a 4 °C para remoção o sulfato de amônio, posteriormente liofilizada e armazenada a -20 °C.

### **5.10 Purificação do inibidor de tripsina de folhas de noni**

A fase aquosa liofilizada foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 500 mM, perfazendo 2 mg/mL, e aplicada na matriz de Sepharose 4B com tripsina imobilizada (dimensões de 1 x 5,8 cm, perfazendo um volume de matriz de 4,55 mL), previamente equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas não retidas foram eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 500 mM. Já as proteínas retidas foram eluídas com tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 2,2, contendo NaCl 500 mM. A cromatografia foi realizada com fluxo constante de 1 mL/minuto, sendo coletados 3 mL por tubo. A eluição de proteínas foi monitorada pela leitura das absorbâncias a 280 nm. A fração retida na cromatografia de afinidade foi dialisada contra água destilada e liofilizada.

### **5.11 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e submetidos às análises de variância e a significância das diferenças entre as médias, determinada pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). O software utilizado foi o *Graphpad Prism 5.0*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Seleção do tampão de extração

Na **Tabela 01**, encontram-se as concentrações de proteínas extraídas das folhas de noni, obtidas de plantas cultivadas em campo, quando utilizados diferentes tampões. De um modo geral, o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 foi capaz de extrair significativamente o maior teor de proteínas das folhas ( $3,642 \pm 0,259 \text{ mgP.gF}^{-1}$ ) quando comparado com as concentrações proteicas dos tampões acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 ( $0,927 \pm 0,077$  e  $1,583 \pm 0,186 \text{ mgP.gF}^{-1}$ , respectivamente).

Dessa forma, o tampão Tris-HCl foi escolhido para a extração de proteínas das folhas de noni obtidas de plantas cultivadas *in vitro*. O rendimento proteico mostrou-se maior ( $6,480 \pm 0,366 \text{ mgP.gF}^{-1}$ ), quando comparado àquele das folhas de plantas cultivadas em campo, podendo estar relacionado ao material ser fresco. Contudo, apesar do maior rendimento, o perfil eletroforético de folhas de plantas cultivadas em campo mostrou-se com bandas mais intensas e definidas, de massas aparentes de 18, 30 e 40 kDa. A **Figura 04** mostra o perfil eletroforético dos extratos proteicos de ambas as folhas.



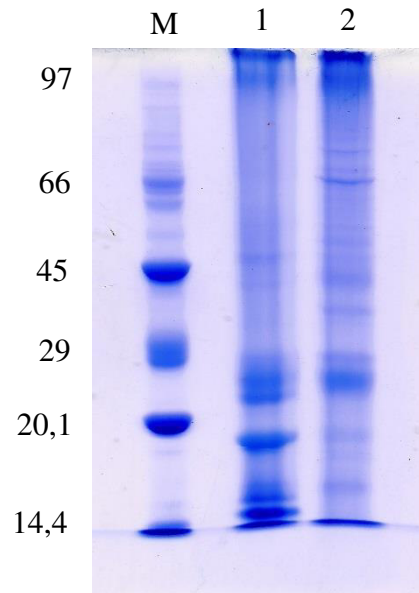
**Tabela 01** - Extração de proteínas das folhas de noni utilizando diferentes tampões

Tampão	Concentração de proteína (mgP.gF <sup>-1</sup> )	
	Campo	<i>In vitro</i>
Tris-HCl (50 mM, pH 8,0)	3,642 ± 0,259 <sup>a</sup>	6,480 ± 0,366 <sup>d</sup>
Acetato de Sódio (50 mM, pH 5,0)	0,927 ± 0,077 <sup>b</sup>	-
Fosfato de Sódio (50 mM, pH 7,0)	1,583 ± 0,186 <sup>c</sup>	-

Todos os valores representam médias de triplicatas ± desvio padrão.

Letras diferentes representam valores que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

**Figura 04** – SDS-PAGE (12,5%) dos extratos de folhas de noni de plantas cultivadas em campo e *in vitro* em tampão Tris- HCl pH 8,0



M: Marcadores de massa molecular. Raia 1: Extrato bruto de folhas de plantas cultivadas em campo. Raia 2: Extrato bruto de folhas de plantas cultivadas *in vitro*. Foram aplicados 10 $\mu$ g de proteína das amostras.

## **6.2 Detecção de proteínas bioativas no extrato de folhas de noni de plantas cultivadas em campo e *in vitro***

O extrato bruto de folhas de plantas cultivadas em campo se mostrou capazes de aglutinar hemácias de coelho, não sendo detectada nas folhas de plantas cultivadas *in vitro*. Os extratos também se mostraram capazes de inibir a tripsina, uma protease do tipo serínica, atividade peroxidásica e proteolítica para folhas de campo e *in vitro* (TABELA 02), sendo esta última detectada também por zimografia (FIGURA 05). Em ambos os extratos não foi detectada atividade inibitória de quimotripsina.

Diante dos resultados obtidos, a atividade inibitória de tripsina em folhas de plantas cultivadas em campo foi a mais proeminente, e foi escolhida para dar prosseguimento a este trabalho.

**Tabela 02** - Detecção e quantificação de proteínas bioativas presentes no extrato bruto obtido a partir de folhas de noni

Atividade	Extrato Bruto	
	Campo	<i>In vitro</i>
Hemaglutinante (UH/mgP)	154,95 ± 3,34	ND <sup>f</sup>
Inibitória de Tripsina (UI/mgP)	1335,01 ± 27,84 <sup>a</sup>	200,00 ± 14,14 <sup>b</sup>
Inibitória de Quimotripsina (UI/mgP)	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>
Proteolítica (UAP/mgP)	197,02 ± 7,07 <sup>c</sup>	140,07 ± 2,82 <sup>d</sup>
Peroxidásica (UAPox/mgP)	4,15 ± 0,17 <sup>e</sup>	1,00 ± 0,09 <sup>e</sup>

Campo – Folhas de noni obtidas de plantas cultivadas em campo.

*In vitro* – Folhas de noni obtidas de plantas cultivadas *in vitro*.

Os valores representam médias de triplicatas ± desvio padrão.

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 tratados com tripsina.

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 440 nm.

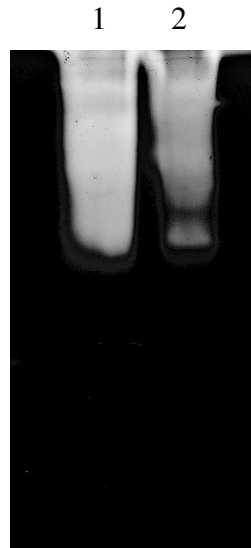
Uma unidade de atividade proteolítica (UA) equivale à quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a pH 6,0.

Uma unidade de atividade peroxidásica (UAPox) equivale à quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 1 a pH 5,2.

<sup>e</sup>Não detectado

Letras diferentes representam valores que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste t de Student.

**Figura 05** – Detecção da atividade proteolítica dos extratos das folhas de plantas cultivadas em campo e *in vitro* pela técnica de zimografia

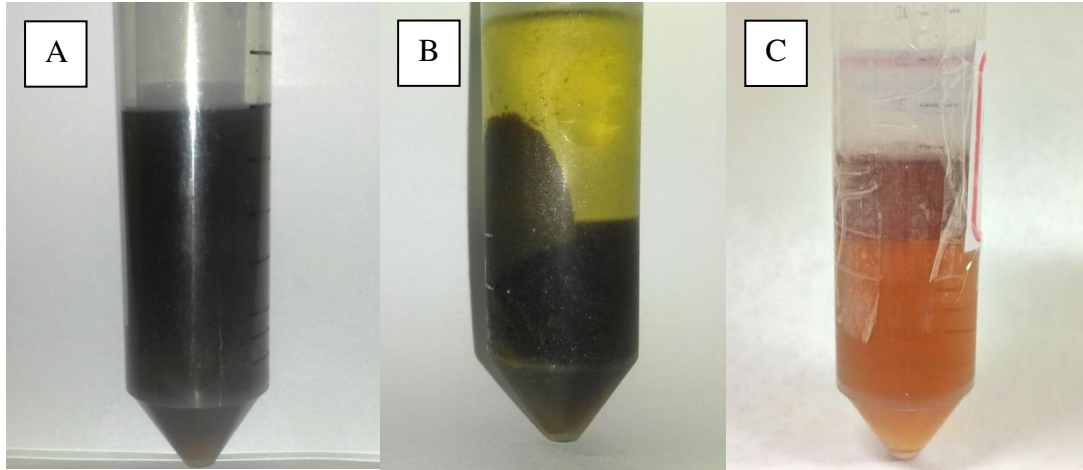


Raia 1: Extrato bruto de folhas de plantas cultivadas em campo. Raia 2: Extrato bruto de folhas de plantas cultivadas *in vitro*. Foram aplicados 10 $\mu$ g de proteína das amostras.

### **6.3 Isolamento de um inibidor de tripsina a partir das folhas de noni obtidas de cultivo não experimental em campo**

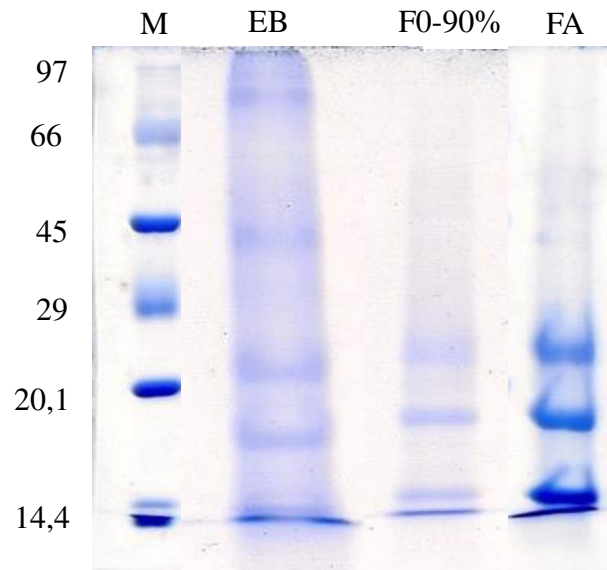
Uma vez que o extrato bruto apresentou baixo rendimento, que dificultaria etapas posteriores de isolamento do inibidor de tripsina, foi realizada uma concentração proteica com sulfato de amônio 90% de saturação. O concentrado proteico (F0-90%) manteve o mesmo perfil eletroforético do extrato bruto, sendo capaz de concentrar as proteínas cerca de 6,7 vezes, passando de  $0,42 \pm 0,04$  mgP/mL (extrato bruto, EB) para  $2,86 \pm 0,15$  mgP/mL, sendo então utilizado para posterior fracionamento proteico. Após a realização do processo de partição, pode-se observar a formação das três fases: a fase superior ou orgânica, correspondente ao t-butanol, a fase intermediária (precipitado), correspondente as proteínas que sofrem o processo de *salting out* com sulfato de amônio a 30% (m/v) de saturação, e a fase inferior ou aquosa (FIGURA 06). Como mencionado anteriormente, a fase aquosa (FA) foi escolhida para prosseguimento das próximas etapas. O perfil eletroforético do EB, F0-90% e da FA pode ser observada na Figura 07. As etapas de purificação foram guiadas de acordo com atividade inibitória de tripsina (como descrito no item 5.9).

**Figura 06** – Partição trifásica do concentrado proteico obtido de folhas de noni de cultivo não experimental em campo



Em A, o concentrado proteico de folhas de noni antes do fracionamento por partição trifásica. Em B, formação das três fases pós partição trifásica. Em C, fase aquosa, obtida no processo de partição, pós diálise.

**Figura 07** – SDS-PAGE (12,5%) do extrato bruto, da fração obtida a partir de precipitação com sulfato de amônio e da fase aquosa das folhas de noni de cultivo não experimental em campo



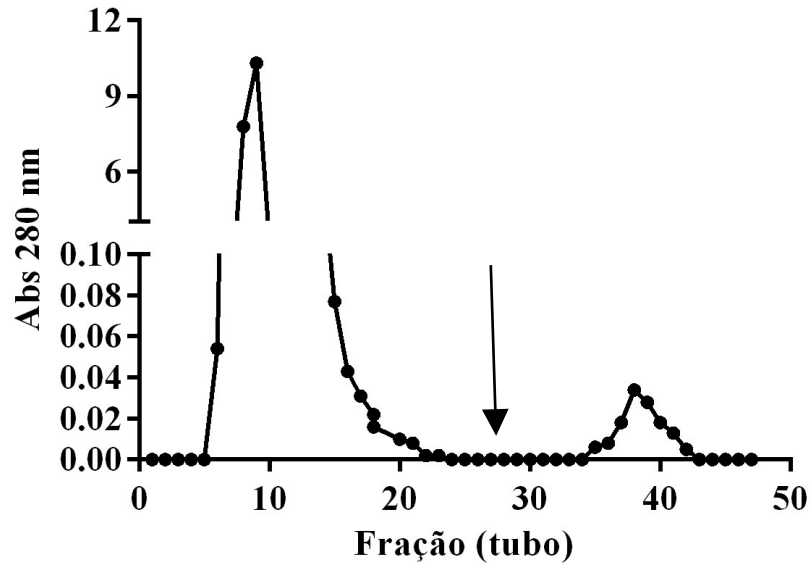
M: Marcadores de massa molecular. As quantidades aplicadas foram de 5,27  $\mu$ gP do EB (extrato bruto), 2  $\mu$ gP de F0-90% (concentrado proteico) e do 4,8  $\mu$ gP FA (fase aquosa).



#### **6.4 Cromatografia de afinidade em coluna de tripsina-sepharose-4B**

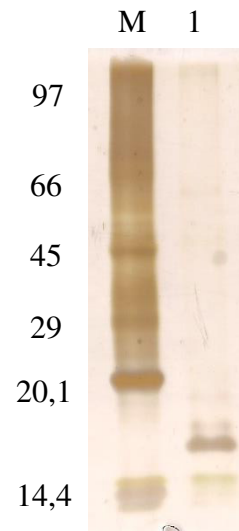
A fase aquosa liofilizada e ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, adicionado de NaCl 500 mM, foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de tripsina-sepharose-4B, previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, adicionado de NaCl 500 mM (FIGURA 08). O material não retido, eluído com o tampão de equilíbrio, foi composto por um único pico destituído de atividade inibitória de tripsina. O material retido, eluído com tampão Glicina-HCl 50 mM pH 2,2, adicionado de NaCl 500 mM, apresentou atividade inibitória de tripsina de 9.000 UI/mg, com massa aproximada de 16 kDa, sendo denominado de NLTI (Noni Leaf Trypsin Inhibitor) (TABELA 03).

**Figura 08** - Perfil cromatográfico de cromatografia de afinidade, em coluna de tripsina-sepharose-4B, da fase aquosa



Amostra de fase aquosa liofilizada (2 mg), obtida após partição trifásica, foi aplicada em coluna (4,55 mL) de tripsina-sepharose-4B, equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 500 mM. As proteínas retidas foram eluídas com tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 2,2, contendo NaCl 500 mM. Fluxo: 60 mL/h; Fração: 3 mL.

**Figura 09** – SDS-PAGE (12,5%) do inibidor de tripsina purificado de folhas de noni cultivadas em campo



M: marcadores de massa molecular. 1: Inibidor de tripsina de folhas de noni. Foram aplicados 300 ngP no poço. A revelação das bandas proteicas foi feita com nitrato de prata (BLUM *et al*, 1987).

**Tabela 03** – Purificação e rendimento do inibidor de tripsina de folhas de *Morinda citrifolia* L.

<b>Etapa</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Atividade total (UI)</b>	<b>Atividade específica (UI/mgP)</b>	<b>Rendimento proteico (%)<sup>a</sup></b>	<b>Índice de Purificação<sup>b</sup></b>
<b>Extrato Bruto</b>	57,60	76.896,58	1335,01	100	1
<b>Fase Aquosa</b>	14,85	23.673,57	1.594,18	25,78	1,2
<b>Fração Retida (Tripsina-Sepharose 4B)</b>	0,24	2160,00	9.000,00	0,42	6,74

Os valores representam médias (n=3)

<sup>a</sup>O rendimento foi calculado pela razão entre a quantidade de proteína total em cada etapa e aquela do extrato bruto, multiplicado por 100.

<sup>b</sup>O índice de purificação obtido em cada etapa foi calculado como sendo a razão entre a sua atividade específica e aquela do extrato bruto.

## 7. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados no intuito de demonstrar o potencial farmacológico de *M. citrifolia* L., muitos deles associando seus efeitos a metabólitos secundários (TORRES *et al.*, 2017). Dessa forma, poucos são os relatos na literatura que investiguem compostos proteicos, particularmente de suas folhas. Neste trabalho então, foram utilizados tampões com diferentes valores de pH para obtenção de proteínas solúveis; dentre eles, o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 mostrou-se mais eficiente, onde a quantidade de proteínas totais solúveis obtida (3,642 mgP/gF) foi a maior dentre os tampões testados. De acordo com as tabelas de composição de alimentos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (DIGNAN *et al.*, 2004) em 100 gramas de folhas de noni são encontradas 2,7 gramas de proteínas e com a condição de extração estabelecida é obtido cerca de um sétimo desse valor. Esta condição foi adotada também para a extração de proteínas de folhas de plantas cultivadas *in vitro*.

Para avaliar a presença de proteínas bioativas, os extratos brutos de ambos os materiais vegetais (de campo e *in vitro*) foram submetidos a atividades hemaglutinante, proteolítica, peroxidásica e inibitória de proteases serínicas (tripsina e quimotripsina).

O extrato bruto de folhas de campo se mostrou capaz de aglutinar hemácias de coelho, tendo sido determinada uma atividade específica de 154,95 UH/mgP, capacidade esta relacionada a presença de lectinas que não foi observada para o extrato bruto de folha de plantas cultivadas *in vitro*.

As lectinas são proteínas que reconhecem e se associam de forma reversível, com alta afinidade e especificidade a carboidratos (SILVA *et al.*, 2010). Por serem ricas dessas moléculas, as plantas têm sido a principal fonte para a obtenção, isolamento e análise dessas moléculas. As lectinas são capazes de gerar vários efeitos nas células como aglutinação, estimulação mitogênica, redistribuição dos componentes da superfície celular, modificação da atividade de enzimas de membrana, inibição do crescimento bacteriano e fúngico, agregação celular, toxicidade, imunomodulação, destacando-se assim em áreas bioquímica, biologia celular e molecular, imunologia, farmacologia, medicina e análises clínicas (SANTOS *et al.*, 2014).

A capacidade de aglutinar hemácias de coelhos já foi reportada em extratos aquosos de folhas de outras plantas, como por exemplo, de *Bauhinia cheilantha* (Caesalpinioideae) (CRUZ, 2015), *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) (SILVA *et al.*, 2010). Já o extrato salino (NaCl 0,15 M) de folhas *Mussaenda alicia*, uma planta pertencente à família Rubiaceae, assim como o noni, também foi capaz de aglutinar hemácias de coelho tendo sido determinada uma atividade específica 96,6 UH/mgP (SILVA *et al.*, 2016), valor inferior ao observado para as folhas de noni de plantas cultivadas em campo. Outras atividades biológicas destas moléculas de bastante relevância foram relatadas por Campos *et al.* (2016), onde uma lectina purificada a partir de folhas de *Bauhinia monandra* apresentou efeitos anti-inflamatório por edema de pata, induzido por carragenina, e antinociceptivo nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Ademais, essa lectina foi capaz de causar mortalidade a *Zabrotes subfaciatus* e a *Callosobruchus maculatus*, coleópteros de interesse agroindustrial.

Os extratos brutos exibiram ação proteolítica ( $197,02 \pm 7,07$  e  $140,07 \pm 2,82$  UAP/mgP em folhas de plantas cultivadas em campo e *in vitro*, respectivamente). As atividades específicas encontradas em ambos os materiais se mostraram superiores àquelas observadas para os extratos brutos de folhas de outras plantas, como, por exemplo, *Coriandrum sativum* (2,47 UAP/mgP), *Nicotiana tobaccum* (5,6 UAP/mgP), *Murraya koenigii* (3,32 UAP/mgP), *Moringa oleífera* (4,27 UAP/mgP) (SHARMILA *et al.*, 2012) e *Thespesia populnea* (33,32 UAP/mgP) (ISHWARYA; SANGEETHA, 2013).

As proteases são enzimas importantes na regulação dos processos de desenvolvimento celular. Nas plantas, essas moléculas têm sido objeto de estudo por muitos anos, não só para entender suas funções fisiológicas, como também para identificar proteases com aplicações industriais (ISHWARYA; SANGEETHA, 2013). São as enzimas mais comercializadas e utilizadas no mundo, sendo empregadas na produção de detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos, couros e reagentes para diagnóstico (JELLOULI *et al.*, 2011).

A aplicação de proteases de folhas em processos industriais foi reportada por Piero; Puglisi; e Petrone (2002), que isolaram uma protease denominada de “Lettucine”, a partir de folhas de alface (*Lactuca sativa* L. *cul.* Romana), que foi capaz de hidrolisar  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína, e leites com diferentes teores de gordura, com a maior atividade observada com leite parcialmente desnatado. Além disso, essa protease se mostrou estável a temperatura e pH, fatores importantes durante o processamento industrial de coagulação do leite.

Já a bromelaína, uma protease obtida a partir do caule, suco, casca e também das folhas do abacaxi, é capaz de restringir o crescimento de células tumorais. É benéfica no tratamento de doenças cardiovasculares, de queimaduras e como agente anti-inflamatório (CHANALIA *et al.*, 2011).

Outra avaliação feita no extrato bruto de folhas de noni foi quanto a presença de peroxidases, as quais foram detectadas ( $4,15 \pm 0,17$  e  $1,00 \pm 0,09$  UAPox/mgP em folhas de plantas cultivadas em campo e *in vitro*, respectivamente), onde a atividade específica encontrada mostrou-se inferior às encontradas em extratos foliares de outras plantas.

As peroxidases são uma das enzimas mais amplamente em plantas, onde estão envolvidas em vários processos fisiológicos, formação de parede celular, lignificação, suberização, etc (SAKHAROV, 2001). Essas enzimas são amplamente utilizadas em bioquímica clínica e imunoensaios enzimáticos, no tratamento de resíduos industriais, na degradação de corantes, na produção de papel, etc. (PANDEY *et al.*, 2017).

A presença de peroxidases em folhas e suas aplicações já tem sido descritas na literatura. Extratos aquosos e metanólicos de folhas de *Adhatoda vasica* apresentaram atividade peroxidásica, sendo sugerido o seu envolvimento na ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas detectadas nos extratos (KAUR *et al.*, 2012). O potencial de aplicação de peroxidases presentes em membranas de células de folhas de *Yucca filamentosa* foi demonstrada por Yue *et al.* (2013), sendo utilizadas para detecção de peróxido de hidrogênio, em resíduos industriais e hospitalares, para a prevenção de chuvas ácidas.

Outra importante ferramenta biotecnológica encontrada foi a capacidade dos extratos de inibirem a ação da tripsina, uma protease do tipo serínica, cuja atividade inibitória específica foi maior nas folhas cultivadas em campo quando comparada a atividade inibitória específica das folhas cultivadas *in vitro*, sendo de  $1335,01 \pm 27,84$  e  $200,00 \pm 14,14$  UI/mgP, respectivamente.

Uma vez que inibidores de proteases podem ser constitutivamente expressos ou induzidos pela presença de patógenos (SILVA-LOPEZ, 2009), fato este encontrado apenas em situações de campo diferente da cultura *in vitro*. Contudo, esta resposta pode ser induzida na cultura *in vitro* por meio de elicitores, compostos estes que são capazes de ativar respostas de defesa localizada ou sistêmica em plantas, incluindo a síntese de proteínas de defesa (ZANARDO, 2009). Como agentes elicitores, podem ser utilizados fragmentos de parede celular e proteínas de patógenos, ácido salicílico, jasmonato, entre outros (SILVA, 2016).

Inibidores de proteases já têm sido isolados e purificados a partir de folhas de diversas plantas, como, por exemplo, *TesTI*, um inibidor de tripsina isolado a partir de folhas de *Tecoma stans*, capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans* e *Candida krusei*, leveduras de interesse médico, sem causar toxicidade às células humanas (PATRIOTA *et al.*, 2016). Já um inibidor obtido de folhas de *Moringa oleífera* foi capaz de inibir a ação da trombina, uma enzima importante na coagulação sanguínea, além de inibir a proliferação de micro-organismos responsáveis pela degradação de espécies de camarões de interesse econômico durante o seu armazenamento (BIJINA *et al.*, 2011).

Assim, dentre as diferentes proteínas detectadas, a atividade inibitória de tripsina foi a mais proeminente, em especial em plantas cultivadas em campo e foi escolhida para dar seguimento a este estudo com este material vegetal.

Para a obtenção de NLTI (Noni Leaf Trypsin Inhibitor), foi utilizado, inicialmente, o método da partição trifásica (do inglês, *Three phase partitioning* - TPP), uma técnica emergente que é utilizada para a extração e purificação de biomoléculas, removendo interferentes, como alguns compostos de massa molecular pequena, tais como lipídeos, compostos fenólicos e alguns detergentes (DENNISON; LOVREIN, 1997).

Esse método tem sido empregado no isolamento de inibidores de tripsina de sementes de leguminosas, onde a fase inferior (aquosa) possui atividade específica aumentada em relação ao extrato bruto (WATI *et al.*, 2009). Este fato também foi observado para a fase aquosa obtida a partir da F0-90% de folhas de noni, a qual foi capaz de aumentar a atividade inibitória específica cerca de 1,2 vezes. Este método já tem sido utilizado na purificação de moléculas de caráter proteico a partir de folhas (CHAIWUT; PINTATHONG; RAWDKUEN, 2010; NARAYAN; MADHUSUDHAN; RAGHAVARAO, 2008), contudo não foram encontrados na literatura relatos de sua utilização na purificação de inibidores de proteases de folhas.

Outra vantagem do método é a sua capacidade de despigmentar o material, onde a fase aquosa (FA), em comparação a F0-90% apresenta-se mais clarificada e translúcida, pois alguns pigmentos, como a clorofila, apresentam-se na fase orgânica, por serem mais solúveis no t-butanol (FIGURA 06).

Dando prosseguimento ao processo de purificação, a fase aquosa liofilizada foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de tripsina-Sepharose 4B (FIGURA 08). O resultado foi altamente satisfatório, já que o inibidor de tripsina ficou retido na matriz, tendo sido



eluído com tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 2,2, acrescido de NaCl 500 mM, apresentando uma atividade inibitória de tripsina de 9.000 UI/mgP. O aumento da atividade inibitória de tripsina foi expressivo ao longo das etapas de purificação empregadas, tendo sido alcançado um índice de purificação de 6,74 vezes e um rendimento de 0,42% (TABELA 03). Quando analisada por SDS-PAGE (FIGURA 09), a fração retida da cromatografia apresentou uma banda majoritária com massa de aproximadamente 16 kDa.

Quando comparada aos inibidores purificados obtidos de folhas de *Moringa oleifera* (rendimento proteico de 0,013% e atividade específica de 547,4 UI/mgP) (BIJINA *et al.*, 2011) e *Coccinia grandis* (rendimento proteico de 0,106% e atividade específica de 377,9 UI/mgP) (SANTHEESH; MURUGAN, 2011), NLTI mostrou atividade inibitória específica maior, com um rendimento proteico superior. Uma vez que as folhas são os principais tecidos atacados por pragas e agentes patogênicos, a acumulação dessas moléculas é superior nas folhas, quando comparado com outras partes da planta, indicando uma expressão tecido específica destas proteínas (BIJINA *et al.*, 2011).

Pode-se observar, então, que o extrato preparado a partir de folhas do noni possui proteínas que podem ser exploradas de diferentes formas quanto ao seu potencial de uso. Assim como a detecção dessas atividades em folhas obtidas de cultura *in vitro* abre novas perspectivas para a exploração sustentável de *Morinda citrifolia*, além de ser um relato inédito, tanto em relação ao uso dessa técnica na obtenção de moléculas bioativas de caráter proteico, quanto para a detecção das mesmas nessa espécie. E, apesar de *Morinda citrifolia* conter vários compostos bioativos com aplicações farmacêuticas e industriais (ASSI *et al.*, 2015), inibidores de proteases ainda não haviam sido relatados para esta espécie.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que as folhas de *M. citrifolia* L. apresentam-se como uma promissora fonte de proteínas com potencial biotecnológico, como, por exemplo, lectinas, peroxidases e proteases, dando suporte para investigações futuras que permitam o desenvolvimento de produtos biotecnológicos baseados nessas macromoléculas. Ademais, a obtenção de um inibidor de tripsina purificado traz como perspectivas diversas aplicações, tais como na área médica como anti-inflamatórios e anti-hipertensivos, na produção de espécies vegetais resistentes ao ataque de pragas e até mesmo no desenvolvimento de conservantes biológicos de alimentos. Os resultados demonstram ainda que cultura de tecidos pode ser utilizada como abordagem para a aquisição de material vegetal, particularmente nesse estudo tecidos foliares de noni, visando a obtenção de proteínas com potencial biotecnológico.

## 9. REFERÊNCIAS

ALI, M.; KENGANORA, M.; MANJULA, S. N. Health Benefits of *Morinda citrifolia* (Noni): A Review. **Pharmacognosy Journal**, Vol 8, P. 321-334, 2016.

ASSI, R. A.; DARWIS, Y.; ABDULBAQI, I. M.; KHAN, A. A.; VUANGHAO, L.; LAGHARI, M. H. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

BAQUE, M. A.; MOH, S.; JUNG, E.; JIAN-JIANG, Z.; KEE-YOEUP. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1255-1267, 2012.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2291–2300, 2011.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; KRISHNA, J. G.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 273-281, 2011.

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**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSSA, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987

CAMPOS, D. C. O.; COSTA A.S.; LIMA, A. D. R.; SILVA, F. D. A.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; LEAL, L. K. A. M.; MIRON, D.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, H. D. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 71–79, 2016.

CAMPOS, D. C. O.; COSTA, A. S.; LUZ, P. B.; SOARES, P. M. G.; ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, H. D. *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1121–1129, 2017.

CAMPOS, J. K. L.; ARAÚJO, C. S. F.; ARAÚJO, T. F. S.; SANTOS, A. F. S.; TEIXEIRA, J. A.; LIMA, V. L. M.; COELHO, L. C. B. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, p. 62-68, 2016.

- CARRILLO, L.; HERRERO, I.; CAMBRA, I.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 1191–1200, 2011.
- CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; MERCEDES, P. A.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19 p. 645-654, 2006.
- CHAIWUT, P.; PINTATHONG, P.; RAWDKUEN, S. Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1172–1175, 2010.
- CHANALIA, P.; GANDHI, D.; JODHA, D.; SINGH, J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 22, p. 96–101, 2011.
- CORREIA, A. A. S.; GONZAGA, M. L. C.; AQUINO, A. C.; SOUZA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 609-615, 2011.
- CRUZ, D. R. R. **Isolamento, purificação e caracterização parcial da lectina de folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) steudel, nativa do bioma caatinga**. Petrolina, 2015. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semi-árido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco.
- DENNISON, C.; LOVREIN, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. **Protein Expression and Purification**., v. 11, p. 149-161, 1997.
- DIAS, M. I. M. F. **Cultura in vitro e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais**. Porto, 2017. Tese (Doutorado em Química Sustentável) – Universidade do Porto.
- DIGNAN, C; BURLINGAME, B; KUMAR, S; AALBERSBERG, W. The Pacific Islands Food Composition Tables (2nd edn). **UN FAO**, Rome (2004).
- DUSSOSSOY, E.; BRAT, P.; BONY E, BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 108-115, 2011
- EMBRAPA, AGROINDÚSTRIA TROPICAL. **Noni (*Morinda citrifolia* L.)**. Fortaleza – Ceará. 2009.

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

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

FRANCO, O.L.; MELO, F.R. Osmoprotectants – a plant strategy in response to osmotic stress. **Russ. J. Plant Physiology.**, v. 47, p. 137–144, 2000.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 627-641, 2008.

HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177–1186, 2009.

HUANG, T.; MCDONALD, K. A. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 2, p. 398–409, 2012.

ISHWARYA, S.; SANGHEETA, R. A new serine protease from the leaves of *Thespesia populnea*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 43, p. 95–107, 2013.

JAYARAMAN, S. K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International Journal of Integrative Biology** 3, v. 3, p. 44-48, 2008.

JELLOULI, K. et al. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1248–1256, 2011.

KAMATA, M.; WU, R. P.; AN, D. S.; SAXE, J. P.; DAMOISEAUX, R.; PHELPS, M. E.; HUANG, J.; CHEN, I. S. Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 348, p.1101-1106, 2006.

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

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with antiinsect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156 -165, 2006.

KAUR, I.; CHAUHAN, P. K.; JARYAL, M.; SAXENA, S.; KANISHA. Antioxidant and antimicrobial activity of leaf extract of *Adhatoda vasica* against the bacteria isolated from the sputum samples of asthmatic patients. **International Journal of Drug Research and Technology**, v. 2, p. 273-278, 2012.

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; SHANTHAKUMAR, S. P.; VINCENT, S. Evaluation of larvicidal and pupicidal activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: *Rubiaceae*) against three mosquito vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 362-369, 2012.

KOVENDANA, K.; SHANTHAKUMARB, S. P.; PRASEEJAC, C.; KUMARA, P. M.; MURUGANA, K.; VINCENTD, S. Mosquitocidal properties of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (family: *Rubiaceae*) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 173–180, 2014.

KRISHNAIAH, D.; NITHYANANDAM, R.; SARBATLY, R. Phytochemical Constituents and Activities of *Morinda citrifolia* L. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. University Malaysia Sabah, Malaysia, p. 127-150, 2012.

KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; MEGHARAJ, M.; NIROLA, R.; LEE, Y. B.; NAIDU, R. Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 630-663, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 679-685, 1970.

LAGARTO, A.; BUENO, V.; MERINO, N.; PILOTO, J.; VALDÉS, O.; APARICIO, G.; BELLMA, A., COURET, M.; VEJA, Y. Safety evaluation of *Morinda citrifolia* (noni) leaves extract: assessment of genotoxicity, oral short term and subchronic toxicity. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 2, p. 15-22, 2013.

LI, S.; YANG, S.; YANG, X.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, 2012.

LÖBLER, L.; SANTOS, D.; RODRIGUES, E. S.; SANTOS, N. R. Z. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no bairro Três de Outubro da cidade de São Gabriel, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, p. 81-89, 2014.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 486–498, 2007.

MACEDO, M. L., FREIRE, M. D., PARRA, A. 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**, 52: 2533-2540, 2004.

MACEDO, M. L. R.; RIBEIRO, S. F. F.; TAVEIRA, G. B.; GOMES, V. M.; BARROS, K. M. C. A.; MARIA-NETO, S. Antimicrobial activity of ILTI, a Kunitz-Type trypsin inhibitor from *Inga laurina*. **Current Microbiology**, v. 72, p. 538–544, 2016.

MAJCHRZAK-GORECKA, M.; MAJEWSKI, P.; GRYGIER, B.; MURZYN, K.; CICHY, J. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 2016.

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

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783–787, 1977

MURASHIGE T.; SKOOG. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologiae Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

NARAYAN, A. V.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Extraction and purification of ipomoea peroxidase employing three-phase partitioning. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 263–272, 2008.

NATHAN, T. W., JANEAL, Y. W.S., APPLE, J. K.; DIKEMAN, M. E.; GODBEE, G R. Noni puree (*Morinda citrifolia*) mixed in beef patties enhanced color stability. **Meat Science**, v. 92, p. 131-136, 2012.

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

PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; COELHO, L. C. B. B.; NAPOLEÃO, T. H. Protease inhibitors from plants: biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. **Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education**, vol. 1, ed. A. M. éndez-Villas, p. 641–649, 2013.

PANDEY, V. P; AWASTHI, M.; SINGH, S.; TIWARI, S.; DWIVEDI, U. N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2017.

PATRIOTA, L. L. S.; PROCÓPIO, T. F.; SOUZA, M. F. D.; OLIVEIRA, A. P. S.; CARVALHO, L. V. N.; PITTA, M. G. R.; REGO, M. J. B. M.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V. Trypsin Inhibitor from *Tecoma stans* Leaves Inhibits Growth and Promotes ATP Depletion and Lipid Peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-10, 2016.

- PAWLUS, A.D.; KINGHORN, A.D. Review of ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1587-1609, 2007.
- PIERO, A. R.; PUGLISI, I.; PETRONE, G. Characterization of “Lettucine”, a Serine-like Protease from *Lactuca sativa* Leaves, as a Novel Enzyme for Milk Clotting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2439–2443, 2002.
- PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v.42, n.2, p.326-331, 2012.
- RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p.101–153, 2002.
- RATNOGLIK, S. L.; AOKI, C.; SUDARMONO, P.; KOMOTO, M.; DENG, L.; SHOJI, I.; FUCHINO, H.; KAWAHARA, N.; HOTTA, H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites, pheophorbide and pyro pheophorbide a, against hepatitis C virus. **Microbiology and Immunology**, v. 58, p. 188–194, 2014.
- RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acid Research**, v. 32, p. 160-164, 2004.
- RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; MCDOWELL, T. D.; HALFORD, D. A.; BREMER, B. Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): Comments on its distribution range and circumscription. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 3, p. 520–529, 2010.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**, New York Academic Press, New York, v. 5, p. 259–305, 1991.
- RIGHETTI, P. G.; BOSCHETTI, E. Global proteome analysis in plants by means of peptide libraries and applications. **Journal of Proteomics**, v.30, p. 3–14, 2016.
- ROBERT, A. C. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. **Wiley**, Germany, 2005.
- RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, 112–121, 2000.
- SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 460- 464, 2008.



- SALES, M. S. **Cultivo *in vitro* de *Morinda citrifolia* L. Visando à obtenção de moléculas com atividade antifúngica**, Fortaleza, 2016. Monografia (Curso de Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará.
- SAKHAROV, I. Y. Long-term chemiluminescent signal is produced in the course of luminol peroxidation catalyzed by peroxidase isolated from leaves of African oil palm tree. **Biochemistry (Moscow)**, v. 66, n. 5, p. 515–519, 2001.
- SANTHEESH, L. S.; MURUGAN, K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, p. 366-374, 2011.
- SANTOS, A. F. S.; SILVA, M. D. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current Topics in Peptide & Protein Research**, v. 15, p. 41-62, 2014.
- SHALAN, N. A. A. M.; MUSTAPHA, N. M.; MOHAMED, S. Chronic toxicity evaluation of *Morinda citrifolia* fruit and leaf in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 83, p.46-53, 2017.
- SHARMILA, S.; REBECCA, L. J.; DAS, M. P.; SADUZZAMAN, M. Isolation and partial purification of Protease from plant leaves. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 8, p. 3808–3812, 2012.
- SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016.
- SHEKHAWAT, M. S.; KANNAN, N.; MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C. P. Enhanced micropropagation protocol of *Morinda citrifolia* L. through nodal explants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 174-181, 2015.
- SILVA-LOPEZ, R. E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos**, v. 4, p. 108-119, 2009.
- SILVA, M. C.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU C.M. P. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 103-107, 2010.
- SILVA, P. M. P.; VILA-NOVA, I. C.; CAMAROTI, J. R. S. L.; PATRÍCIA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V. **Efeito da lectina de folhas de *Mussaenda alicia* hort. (Rubiaceae) sobre bactéria e fungo de interesse médico**. In: XVI JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, Pernambuco, 2016, Resumo: 1026-2.
- SILVA, R. C. **Cultura *in vitro* de calos e quantificação de compostos fenólicos em gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

SINGH, R. D. *Morinda citrifolia* L. (noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 6, p. 77-91, 2012.

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

SOUZA, J.D.; SILVA, M. B.R.; ARGOLO, A. C.C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T.S.; PAIVA, P. M.G.; SILVA, M. D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696 -702, 2011.

SU, C.; WANG, M. Y.; NOWICKI, D.; JENSEN, J.; ANDERSON, G. Selective COX- 2 inhibition of *Morinda citrifolia* (noni) *in vitro*. The Proceedings of the eicosanoids and other bioactive lipids in cancer, inflammation and related disease. **7<sup>th</sup> Ann Conf.**, p. 14-17, 2001.

TORRES, M. A. O.; MAGALHÃES, I. F. B.; MÔNDEGO-OLIVEIRA, R.; SÁ, J. C.; ROCHA, A. L.; ABREU-SILVA, A. L. One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*. **Phytotherapy Research**, 2017.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 13, p. 43-50, 1991.

USHA, R.; SANGEETHA, S.; PALANISWAMY, M. Antimicrobial activity of a rarely known species, *Morinda citrifolia* L. **Ethnobotanical Leaflets.**, v. 14, p. 306-11, 2010.

WANG, H. X.; NG, T. B. Examination of lectins polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. **Planta Medica**, v. 67, p. 669–672, 2001.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 185, p.129-88. 1999.

WATI, R. K.; THEPPAKOM, T.; BENJAKUL, S.; RAWDKUEN, S. Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1307–1314, 2009.

WEST, B.; TANI, H.; PALU, A.; TOLSON, C.; JENSEN, C. Safety tests and antinutrient analyses of noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87(14), p. 2583–2588, 2007.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P.; ARY, M. B.; SILVA, C. P.; CARVALHO, M. M. M.; MACEDO, M. L. R.; LEMOS, F. J. A.; GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in some seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*)

and the esistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1139-1143, 1989.

YAN, J.; YUAN, S.; JIANG, L.; YE, X.; NG, T. B.; WU, Z. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology**, p.4961–4981, v. 99, 2015.

YUE, H.; HE, J.; XIAO, D.; CHOI, M. M. F. Biosensor for determination of hydrogen peroxide based on *Yucca filamentosa* membrane. **Analytical Methods**, p. 5437–5443, v. 5, 2013.

ZANARDO, N. M. T. **Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos®) e abiótico (Bion®) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematoide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro) e organismo não-alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja)**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.