

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade

Alcides Alves de Freitas

**DETECÇÃO DE PROTEÍNAS EM *Plectranthus barbatus* E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS RAW 264.7 e A549.**

**Teófilo Otoni
2017**

Alcides Alves de Freitas

**DETECÇÃO DE PROTEÍNAS EM *Plectranthus barbatus* E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS RAW 264.7 e A549.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia, Ambiente e Sociedade (PPGTAS) da Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Orientadora: Dr^a. Alessandra de Paula Carli

Coorientador: Dr. Caio César Souza Alves

Teófilo Otoni

2017

Ficha Catalográfica
Preparada pelo Serviço de Biblioteca/UFVJM
Bibliotecária responsável: Graziela Lopes da Costa – CRB6 nº 2807

F866d Freitas, Alcides Alves de.
2017 Detecção de proteínas em Plectranthus Barbatus e avaliação da atividade biológica sobre linhagens de células RAW 264.7 e A549. / Alcides Alves de Freitas. Teófilo Otoni: UFVJM, 2017.
42 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, 2017.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Alessandra de Paula Carli

1. Plectranthus Barbatus. 2. Lectinas. 3. Proteases. 4. Cultura de células. I. Título.

CDD: 615.321

ALCIDES ALVES DE FREITAS

**DETECÇÃO DE PROTEÍNAS EM *Plectranthus barbatus* E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS RAW
264.7 e A549.**

Dissertação apresentada ao
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM TECNOLOGIA, AMBIENTE E
SOCIEDADE - STRICTO SENSU,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MAGISTER SCIENTIAE EM
TECNOLOGIA, AMBIENTE E
SOCIEDADE

Orientador : Prof.^a Dr.^a Alessandra De
Paula Carli

Data da aprovação : 20/04/2017



Prof.Dr. NERILSON MARQUES LIMA - UNESP



Prof.^a Dr.^a SANDRA BERTELLI RIBEIRO DE CASTRO - UFJF



Prof.Dr. CAIO CESAR DE SOUZA ALVES - UFVJM



Prof.^a Dr.^a ALESSANDRA DE PAULA CARLI - UFVJM

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus por me conceder a realização desse sonho;

À minha família que sempre apoiaram e acreditaram em minha capacidade;

À minha esposa, Vitória, por ser tão importante na minha vida, me apoiando e fazendo acreditar que posso mais que imagino. O seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, fizeram meu sonho ser o nosso sonho.

Às minhas pequenas, Maria Clara e Maria Sophia, que me inspiram a buscar sempre mais...

Aos meus orientadores, Prof^a Alessandra de Paula Carli e Prof^o Caio Cesar Souza Alves, sempre disponíveis e dispostos a ajudar, fizeram-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, vocês foram e são referências profissionais e pessoais.

Aos meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos... Obrigado por compartilhar comigo as angústias e as alegrias. Foi muito bom poder contar com vocês.

A todos os alunos, professores e funcionários que com ensinamentos, orientações e amizade, me ajudaram ativa ou passivamente neste projeto.

Finalmente, quero agradecer a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este sonho. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O boldo da terra (*Plectranthus barbatus*) é popularmente utilizado para o tratamento de distúrbios gastrintestinais e para doenças hepáticas. Devido à existência de um grande número de espécies disponíveis para pesquisa e estudos farmacológicos, o estudo dessa planta torna-se importante para o conhecimento técnico-científico, especialmente com a finalidade do desenvolvimento de novos fármacos. Com isto, o objetivo desse trabalho foi detectar proteínas ativas de *Plectranthus barbatus* (boldo da terra) e avaliar a atividade biológica em células A549 e RAW264.7. As amostras dos procedimentos de extração das folhas e caule do *P. barbatus* foram submetidas à quantificação de proteína. Foi detectado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% proteínas com peso molecular em torno de 30kDa e 94kDa o que é descrito na literatura como lectinas e lipoxigenases. Os extratos foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência com picos aparentes em 16 e 27 minutos. Não foi detectada atividade de inibição da tripsina. Os resultados dos testes biológicos em cultura de células demonstraram que o extrato purificado de inibidores de protease não alterou a viabilidade celular de ambas as linhagens, no entanto, foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico na concentração de 10 µg/ml para folha e caule e 100 µg/ml para folha. Este trabalho demonstra pela primeira vez a extração de proteínas em folhas e caule de *Plectranthus barbatus* e a atividade dessa molécula em cultura celular. Esse extrato não alterou a viabilidade celular de ambas as linhagens celulares, podendo ser caracterizados como não citotóxico nas concentrações testadas. Conclui-se, portanto, que embora as folhas, caules e flores do *Plectranthus barbatus* seja utilizado amplamente pela população esse trabalho demonstrou a detecção de lectina e lipoxigenase até agora desconhecidos nessa espécie em estudo.

Palavras – Chave: *Plectranthus barbatus*; Lectinas; Proteases; cultura de células.

ABSTRACT

The boldo da terra (*Plectranthus barbatus*) is popularly used for the treatment of gastrointestinal disorders and for liver diseases. Due to the existence of a large number of species available for research and pharmacological studies, the study of this plant becomes important for technical-scientific knowledge, especially for the purpose of developing new drugs. With this, the objective of this work was to detect active proteins of *Plectranthus barbatus* and to evaluate the biological activity in cells A549 and RAW264.7. Samples of *P. barbatus* leaf and stem extraction procedures were submitted to protein quantification. SDS-PAGE was detected in 12% proteins with molecular weight around 30kDa and 94kDa which is described in the literature as lectins and lipoxygenases. The extracts were characterized by high performance liquid chromatography with apparent peaks at 16 and 27 minutes. No trypsin inhibition activity was detected. The results of the biological tests in cell culture demonstrated that the purified protease inhibitor extract did not alter the cell viability of both strains, however, it was able to inhibit the production of 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ nitric oxide to leaf and And 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for leaf. This work demonstrates for the first time the extraction of proteins in leaves and stem of *Plectranthus barbatus* and the activity of this molecule in cell culture. This extract did not alter the cellular viability of both cell lines and could be characterized as non-cytotoxic at the concentrations tested. It was concluded, therefore, that although the leaves, stems and flowers of *Plectranthus barbatus* were used extensively by the population, this work demonstrated the detection of lectin and lipoxygenase hitherto unknown in this species under study.

Keywords: *Plectranthus barbatus*; Lectins; Proteases; Cell culture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Plantas Medicinais	9
1.2. <i>Plectranthus barbatus</i>	10
1.3. Proteases.....	11
1.4. Lectinas	13
1.5. Lipoxigenases.....	13
2. OBJETIVOS	15
Geral.....	15
Específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Coletas do Material	16
3.2 Submissão ao GenBank	16
3.3. Preparo do Extrato da Espécie Vegetal.....	16
3.4. Purificação dos inibidores de proteases	17
3.4.1. <i>Obtenção do extrato enriquecido de inibidores de proteases</i>	17
3.4.2. <i>Dosagem de proteínas</i>	18
3.4.3. <i>SDS-PAGE</i>	18
3.4.4. <i>Varredura do Comprimento de Onda</i>	19
3.4.6. <i>Determinação Estequiométrica de Inibição</i>	19
3.5. Ensaio <i>in vitro</i>	20
3.5.1. <i>Cultura de Células</i>	20
3.5.2. <i>Viabilidade Celular</i>	20
3.5.3. <i>Dosagem de Óxido Nítrico (NO)</i>	21
3.5.4. <i>Análises Estatísticas</i>	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Identificação Botânica.....	22
4.2. Submissão ao GenBank	22
4.3. Análise de proteína.....	23
4.4. Detecção de proteases por eletroforese	24

4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos enriquecidos de inibidores de proteases.....	29
4.6. Determinação Estequiométrica de Inibição	30
4.7 Modulações da viabilidade celular e produção de oxido nítrico pelas proteases das folhas e caule do boldo.....	31
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais

As plantas são fontes de produtos naturais biologicamente ativos que diferem em termos de estrutura e propriedades biológicas. A atuação de seus componentes químicos no organismo constitui-se um relevante caminho para a exploração da atividade bioquímica dos vegetais a partir das quais produtos de interesse terapêutico podem ser obtidos (VIEGAS JUNIOR, 2006).

Considerando a importância do resgate de informações sobre plantas medicinais empregadas pelos povos antigos, atualmente a ciência se beneficia desses conhecimentos para caracterizar, sintetizar e produzir medicamentos com concentrações desejadas a partir de espécies vegetais (SILVEIRA, LASSEN E BEUTER 2013).

Nos últimos anos, o uso das plantas medicinais voltou a ser reconhecido em todo o mundo, o que nos mostra a crescente valorização dos medicamentos e o profundo interesse da indústria farmacêutica em compostos naturais que possuem propriedades farmacológicas (SILVEIRA, LASSEN E BEUTER 2013). No entanto, apenas 17% (dezessete por cento) foram estudadas de alguma maneira para emprego medicinal, ainda assim, sem o devido aprofundamento nos aspectos fito-químicos e farmacológicos, o que amplia novamente a área de estudo para a descoberta de novos fitoterápicos e fito-medicamentos (FOGLIO, 2006).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias naturais com atividades biológicas, o que torna um grande potencial para a descoberta de novos fármacos sintetizados que dão origem a uma série de compostos químicos com aplicações biotecnológicas, que em seu processo de produção, envolvem estudos que incluem aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos para possíveis tratamentos de doenças (CALIXTO, 2003).

Entre as muitas espécies utilizadas pela população encontram-se o boldo, que tem sido amplamente empregado na medicina popular para tratamento de várias doenças (GERHARDT et al., 2013). Estudos farmacológicos descreveram o potencial biológico do boldo do Chile, observado para o alcalóide boldina, descrito como o principal componente do chá de boldo. No entanto, o boldo da terra (*Plectranthus barbatus*), comumente confundido boldo do Chile, é popularmente utilizado para os tratamentos de perturbações gástricas, mas

não apresenta boldina como um de seus componentes (KAPEWANGOLO, 2013).

Assim, o presente trabalho propõe o estudo e avaliação da atividade biológica do boldo da terra, família *Lamiaceae* (*Plectranthus barbatus*).

1.2. *Plectranthus barbatus*

O *P. barbatus* (Figura 1A) é muito confundido com o *Peumus boldus* (Figura 1B), que é uma espécie arbórea, pertencente à família *Monimiaceae*, nativa das regiões central e sul do Chile, onde ocorre abundantemente (RUIZ et al., 2008). A espécie *P. barbatus*, popularmente conhecida como boldo da terra, boldo nacional, boldo do Brasil, malva-santa, sete-dores e tapete-de-Oxalá pertence à família *Lamiaceae*, provavelmente advinda da África. (BRANDOLT et al.2007).



Figura1: A - *Plectranthus barbatus*/ B - *Peumus boldus*

O *P. barbatus* é empregado principalmente para o tratamento de perturbações gástricas, associados com espasmos intestinais, sendo as partes da planta, em sua maioria folha, administrados oralmente pela população (KAPEWANGOLO, 2013). Os compostos isolados de suas folhas, caules e raízes apresentam diversas ações farmacológicas.

As folhas contêm óleos essenciais bioativos, alcalóides e flavonóides (UQUICHE et al., 2012), tendo sido caracterizados 23 componentes, dos quais nove são monoterpenos sendo majoritários o α - pineno (22,20%), o mirceno (12,38%) e o α -ocimeno (Z) (6,53%); 10 são sesquiterpenos dos quais os compostos majoritários são eremofileno (13,32%) e o cariofileno (E) (8,01%); e dois são sesquiterpenos oxigenados a humulenona (10,01%) e óxido de cariofileno (0,91%). Também, foram registrados dois diterpenos, um de massa molecular de 272 dalton (3,11%), não identificado, e manool (1,05%) (COSTA, 2005).

Estudos demonstram que os extratos hexânico e metanólico de folhas, caules e raízes do *P. barbatus* também podem estimular resposta inflamatória. Contudo, são necessários mais estudos para esclarecer os efeitos destes extratos sobre a imunidade local. Dessa forma, é necessário a investigação das propriedades inibitórias, da citotoxicidade, das capacidades anti-inflamatórias e antioxidantes de *P. barbatus*, a fim de determinar efeitos farmacológicos reais e relacionar o uso etnomedicinal da planta com estudos *in vitro*, que validam as ações medicinais do *P. barbatus*. (Barreiro; Fraga, 2001).

Ainda que o *P. barbatus* pertence ao grupo mais estudado como resultado de sua alta diversidade de uso. As infusões aquosas de algumas folhas de *P. barbatus* contêm muitos compostos antioxidantes e exibem vários efeitos farmacológicos que além das atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifúngicas, as decocções de folhas apresentam também a elevada atividade inibidora de acetilcolinesterase (LUKHOBBA ET AL., 2006).

1.3. Proteases

Proteases são enzimas presentes nas plantas, animais e também em grande parte dos micro-organismos, desempenham papel muito importante na sobrevivência e na manutenção do organismo (SHAMSI, 2016). Nas plantas o papel das proteases na patogenicidade, depende do sistema patógeno-hospedeiro, onde as proteases atuam no rompimento das ligações peptídicas e tem um papel nas funções fisiológicas, sendo os grupos catalíticos das proteases, cisteína, serino, aspártico em que são classificados baseados na reação nucleofílica do sítio da enzima (BUTLER, 2001).

Porém, suas atividades necessitam de certo controle, haja vista que a hidrólise de uma ligação peptídica é irreversível, assim, se essa atividade ocorrer sem o devido controle, processos patológicos podem abrigar num organismo causando sua morte (LÓPEZ, 2009). Portanto, a presença de inibidores para proteases, pode representar um excelente mecanismo

de controle da atividade biológica (TREMACOLDI, 2009).

Os inibidores de proteases são encontrados em todos os tipos de organismos. São compostos que possuem a capacidade de diminuir a atividade de uma enzima das quais as funções fisiológicas são importantes na regulação de diferentes processos que envolvem as proteases, desde a quebra de proteínas intracelulares, transcrição, ciclo celular, invasão celular, apoptose, entre outras (FEDATTO, 2004).

Os inibidores de proteases de plantas são polipeptídios de baixo peso molecular, com a capacidade de inibir uma grande variedade de enzimas proteolíticas, incluindo proteases digestivas de mamíferos, insetos, bactérias e fungos, e estão também envolvidos na regulação do metabolismo de proteínas endógenas das plantas (CLEMENTE; DOMONEY, 2006).

As diferentes formas e mecanismo de reação dos inibidores de proteases permitem classificá-los em grupos, considerando a especificidade de cada inibidor, sendo que existe aqueles que reagem com mais de uma classe de proteases e aqueles que reagem especificamente para uma única classe de proteases (TREMACOLDI, 2009 apud PERONA; CRAIK, 1995).

Os inibidores de proteases de grãos de soja são representados pelo inibidor de tripsina Kunitz (KTI) e pelo inibidor de quimotripsina e tripsina Bowman-Birk (BBI). O KTI foi o primeiro inibidor de proteases vegetais a ser amplamente estudado, tendo sido caracterizados sua estrutura, seu mecanismo de ação e sua significância para a saúde e nutrição humana e animal (BRANDON et al., 1987).

Dentre as várias classes de proteases, as serino-proteases possuem seus inibidores subdivididos em 16 classes, destacam-se os inibidores de Bowman-Birk (BBI), comumente chamados de BBI, que são moléculas protéicas caracterizadas pela presença de dois domínios independentes, capazes de inibir serino-proteases, cujo interesse por essa classe de inibidores está relacionado com a capacidade de atuar como agente preventivo de várias doenças (RYAN, 1990).

1.4. Lectinas

As lectinas podem ser encontradas na natureza em animais, plantas e micro-organismos. Sendo que, nos animais e micro-organismos elas podem atuar para mediar o reconhecimento biológico na comunicação celular, defesa, metástase tumoral, inflamação, dentre outros. Já nas plantas, as lectinas ainda não possuem sua função fisiológica claramente

definida, podendo ser para o armazenamento ou transporte de carboidratos em flores, inibição do crescimento de fungos ou atividade inseticida (PEREIRA, 2005).

Embora, estudos descrevem efeitos tóxicos de lectinas, devido à habilidade destas substâncias em ligar-se a sítios receptores específicos na superfície de células intestinais, os efeitos anti-nutricional das lectinas não é completamente entendido. Porém, se utilizadas de forma purificada, apresentam grande potencial em pesquisas biológicas, principalmente para diagnóstico clínico na investigação da estrutura de proteína e carboidratos em células (SILVA et al. 2000).

Segundo De Mejía & Prisecaru (2005), estudos demonstram que as lectinas têm a capacidade em aglutinar células e/ou precipitar glico-conjugados devido a sua capacidade específica de reconhecimento e ligação sem, entretanto, alterar a estrutura de nenhum glicosil ligante. No caso do princípio terapêutico para tratamento do câncer, a sua função é ligar-se a carboidratos das membranas das células mutantes e, causar a sua apoptose por intensa aglutinação, conseqüentemente diminuir o tumor.

1.5. Lipoxigenases

Lipoxigenases são dioxigenases que catalisam a oxigenação estereoespecífica do ácido linolênico em hidroperóxidos. Estudos recentes indicam que ferimentos e elicitores são sinais extracelulares na via da lipoxigenase. Estes sinais provocam ativação de lipases que contribuem na degradação da membrana iniciando a via octadecanóide para síntese de ácido jasmônico (CARLI, 2000).

As lipoxigenases são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poli-insaturados. A inibição da 5-lipoxigenase pode representar uma importante modalidade terapêutica em doenças que envolvem uma fisiopatologia mediada pelos leucotrienos, incluindo a asma, a doença intestinal inflamatória e a artrite reumatóide. A inibição da lipoxigenase constitui uma abordagem terapêutica interessante nessas doenças, visto que os leucotrienos são potentes mediadores de ação local (OLIVEIRA, 2006).

Em tecidos foliares, tem sido demonstrado o envolvimento de lipoxigenases na via de síntese de jasmonatos, que, por sua vez, atuam na indução da síntese de inibidores de proteases em resposta a ferimentos e, portanto, como uma reação à infestação por pragas e patógenos (FARMER e RYAN, 2002). Tratamentos de plantas com inibidores de

lipoxigenases reduz a síntese de ácido jasmônico (CARLI, 2000).

Estudos têm sido realizados a fim de verificar a indução da expressão de genes que codificam inibidores, uma vez que tem sido descrito o envolvimento das isoenzimas lipoxigenases em vários processos fisiológicos, torna-se cada vez mais necessário a caracterização bioquímica e cinética dessas isoenzimas, principalmente aquelas presentes nas folhas, que exercem papel fundamental no mecanismo de defesa contra inseto e patógenos (FERREIRA et al., 2011).

Segundo Golan (2009), diversas estratégias são possíveis para o planejamento de inibidores da lipoxigenase, com base na estrutura, na função e no mecanismo das enzimas, uma vez que no sistema animal desempenham funções na inflamação, imunidade e nas reações de defesa, já nas plantas atua principalmente na resistência a inseto e patógenos.

As lipoxigenases de soja apresentam homologia estrutural com lipoxigenases de animais (GARDNER, 1995). No entanto, em plantas as lipoxigenases metabolizam o ácido linoléico e linolênico, enquanto que as lipoxigenases de animais metabolizam o ácido araquidônico produzindo prostaglandinas e leucotrienos.

Nesse contexto, estudos já descrevem os inibidores de proteases como uma das alternativas quimiopreventiva do câncer sendo capaz de prevenir ou suprimir os processos carcinogênicos em vários modelos in vitro e in vivo (KENNEDY 1998).

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a atividade química e biológica do *Plectranthus barbatus* sobre linhagens de células RAW 264.7 e A549.

Específicos

- Depositar a espécie *Plectranthus barbatus* no herbário da UFVJM – Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, para realização do estudo botânico;
- Verificar as sequências dos inibidores de proteases no banco de dados do GenBank;
- Extrair, purificar e detectar em gel de poliacrilamida proteases;
- Detectar usando HPLC proteases purificadas;
- Realizar ensaios estequiométricos de atividade enzimática;
- Avaliar o potencial citotóxico do extrato de *Plectranthus barbatus* sobre células RAW 264.7 (macrófagos murinos) e A549 (carcinoma de pulmão).
- Avaliar a capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coletas do Material

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Imunologia da UFVJM – Campus Mucuri.

O *Plectranthus barbatus* foi coletado na UFVJM e as incursões em fragmentos selecionados para localização, identificação e coleta do material botânico. Foram coletadas partes representativas da espécie botânica, conforme sua indicação de uso, bem como partes em fase de floração para confecção de exsiccatas e depósito em herbário, que foram fundamentais para a correta identificação da espécie. Os instrumentos de coleta foram podão, tesoura de poda e facão. As amostras coletadas nas proximidades da UFVJM foram devidamente prensadas em prensas de madeira e submetidas à secagem em estufas a uma temperatura média de 40°C. Após a secagem fez-se a montagem das exsiccatas de acordo com as técnicas sugeridas por Cunningham (2001).

A identificação botânica da espécie foi realizada através da análise morfológica, com auxílio de materiais como lupas, pinças, agulhas histológicas, e ainda, comparadas com exsiccatas de coleção botânica, mantidas em herbários representativos sobre a flora da região.

Com o objetivo de confirmação da nomenclatura correta, os nomes científicos, a origem e o hábito das plantas citadas foram utilizados Lorenzi & Matos (2008), Lista de Espécies da Flora do Brasil (2016), Missouri Botanical Garden (MOBOT, 2016) e o *site The Plant List* (2016). Os exemplares coletados foram identificados, depositados e tombados na coleção do herbário da UFVJM em Diamantina – MG.

3.2 Submissão ao GenBank

A espécie vegetal em estudo foi submetida ao *GenBank* no *National Institute of Health* (NIH), para verificar a descrição das sequências de inibidores de proteases presentes nas mesmas.

3.3. Preparo do Extrato da Espécie Vegetal

Os materiais referentes às espécies selecionadas foram coletados no campus da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri campus Teófilo Otoni, no período

de janeiro a novembro de 2016. O processo de extração ocorreu nessas partes específicas das espécies vegetais (folhas e caule) por serem utilizadas na medicina tradicional.

Para obtenção do extrato aquoso de folhas e caule do *P. barbatus* foram utilizados 200g. Cada material foi moído cru, em liquidificador, com acréscimo de 10% p/v de água destilada. Após, a completa trituração, o material foi aquecido por 30 minutos a 55°C sob agitação constante e disposto em repouso em banho de gelo por 2 horas. O resultante desse tratamento foi filtrado em algodão para retirada das fibras insolúveis presentes e o líquido submetido a uma segunda filtração a vácuo em funil de *Buchner* com auxílio de um papel filtro e liofilizado (LS 3000, Terroni, São Paulo). O material foi armazenado -80° para posterior análise.

3.4. Purificação dos inibidores de proteases

3.4.1. Obtenção do extrato enriquecido de inibidores de proteases

Com o objetivo de isolar, purificar e caracterizar os inibidores presentes foram utilizados os seguintes protocolos:

A soja (*Glycine max*) foi utilizada como padrão para a extração dos inibidores de proteases. Realizou-se a extração protéica, baseada na metodologia proposta por Yavelow et al. (1985). Os grãos de soja (100g) selecionados foram triturados em liquidificador e delipidadas com 10 volumes de acetona P.A. As proteínas foram extraídas acrescentando-se 10% p/v de etanol a 60% a 55°C, com agitação constante por 1 hora e, em seguida, resfriado em banho de gelo e disposto em repouso por 24 horas.

Para a extração dos inibidores de proteases nas folhas e caule do *P. barbatus* e para as folhas do *Peumus boldus* foi utilizado à metodologia de Yavelow adaptada:

As folhas e caule do *P. barbatus* e folhas do *Peumus boldus* foram triturados em liquidificador, para cada preparação foi utilizado 100g de material vegetal acrescentando-se 10% p/v de etanol a 60%, aquecidos por 1 h à 55 °C com agitação constante e, em seguida, resfriado em banho de gelo e disposto em repouso por 24 horas.

Depois do período de extração, ambos os materiais foram filtrados em gaze, e mantido o pH 5,3. Acrescentou-se 2 volumes de acetona e posteriormente centrifugou-se a 4724 x g por 30 minutos, o precipitado resultante foi ressuspenso em água destilada e armazenado à - 80° C.

3.4.2. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas da *Glycine Max* e do *P. barbatus* foram determinadas pelos métodos colorimétricos, utilizando os reagentes de Bradford (1976), na absorção do reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250*, utilizando soro albumina bovina (BSA) em soluções de 20 a 100mg/mL para obtenção da curva-padrão, como padrão analítico na concentração de 1 mg/mL. A leitura de quantificação proteica foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nanômetros (UV-Vis Cary 50, Varian).

3.4.3. SDS-PAGE

As amostras provenientes dos procedimentos utilizados para realizar a purificação dos inibidores de proteases foram identificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida no sistema descontínuo, sendo os suportes eletroforéticos géis de poliacrilamida de separação a 12% e de concentração a 5%, preparados em condições desnaturantes (SDS), segundo método de Laemmli (1970).

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, e posteriormente foi dado um *spin* de 1 minuto a 2800 x g, retirado 40 µL do sobrenadante para diluição em 20 µL de tampão da amostra de Tris 1M pH 6,8; SDS 20% p/v, glicerol 20% v/v, EDTA 0,5M, azul de bromofenol 0,1% p/v, β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e água destilada q.s.p. e submetidas ao banho de água fervente por 5 minutos para desnaturação das proteínas. Uma mistura de isoformas da proteína Conavalina A (ConA SIGMA) de massas moleculares 10 a 250 kDa foi utilizada como padrão de massa molecular (Pageruler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific)

O tampão Tris-HCl 25 mM contendo glicina 0,19 M e SDS 0,1% p/v foi utilizado como tampão de corrida. A eletroforese foi realizada sob uma corrente elétrica constante de 120 V durante aproximadamente 180 minutos (vert-il0, loccus, São Paulo). Após, o término da eletroforese, a presença das bandas proteicas foi detectada com a imersão dos géis em solução de *Coomassie Blue R-250* 0,025%, em metanol 25% e 5% de ácido acético sob agitação branda por 2 horas. Em seguida, os géis foram descorados em solução 40% metanol e 10% ácido acético até a visualização plena das bandas.

3.4.4. Varredura do Comprimento de Onda

Os sobrenadantes dos extratos proteicos foram diluídos (10x, 100x, 1000x) em água destilada para realização de uma varredura de comprimento de onda em espectrofotômetro (UV-Vis Cary 50), para a identificação da melhor absorção. Os dados foram gerados pelo *software Scan* versão 3.0 (Interscience) e analisados pelo programa *Origin pro 8*.

As amostras diluídas (1:100), sujeitadas a varredura de comprimento de onda em espectrofotômetro, foram submetidas à cromatografia de fase reversa para análise de pureza. A cromatografia foi realizada em coluna LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) (Supelcosil, Sigma-Aldrich), em sistema de HPLC (*ProStarVarian*) utilizando o *software Galaxie* e os dados foram analisados no programa *origin pro 8*.

A coluna foi previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,08% em água (H₂O) (solvente A), e eluída em um gradiente de 5 a 100% do solvente acetonitrila (ACN) + TFA 0,08% (solvente B), sob um fluxo de 0,8 mL/min durante 45 minutos. A eluição foi monitorada entre 190 e 300 nm.

Após a coluna ter sido equilibrada, as amostras diluídas e filtradas foram submetidas a corrida no HPLC com a injeção de 20 µL sob a condição cromatográfica para análise da pureza com a Fase móvel de A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%; eluição por gradiente: 0 a 100% de B em 45 minutos.

3.4.6. Determinação Estequiométrica de Inibição

Para a determinação da atividade enzimática, na presença ou ausência de inibidores, utilizou-se o método proposto por Erlanger et al. (1961), no qual foi medida a atividade proteolítica da tripsina bovina utilizando como substrato sintético o D,L-BApNA. A concentração do produto p-nitroanilina, liberado a partir da hidrólise enzimática do D, L-BapNA, que foi medida espectrofotometricamente a 410nm.

Para o controle, o ácido acético 60% (v/v) foi adicionado antes do D,L-BApNA. O percentual de inibição da tripsina foi calculado a partir das leituras do controle da enzima e das amostras testadas. O cálculo da atividade de inibidor de tripsina (TIA) foi feito pela conversão dos resultados obtidos em miligramas de tripsina pura inibida por grama de amostra, conforme sugerido por Rackiset al.,1996, como apontado abaixo: mg de tripsina inibida/g de amostra = (AxB)/(C x 1000 x P) em que A (410nm) = absorbância do padrão –

absorbância da amostra (corrigida pela absorbância do branco da amostra); B = diluição da amostra; C = fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato D,L-BAPNA fornece uma leitura de absorbância em 410nm, nas condições de ensaio; P = peso da amostra em g.

3.5. Ensaio *in vitro*

3.5.1. Cultura de Células

Macrófagos RAW 264.7 e linhagem de fibroblasto de pulmão humano (A549) foram mantidos em garrafas de cultura contendo meio RPMI-1640 suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais, 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina e penicilina, e 5% de soro fetal bovino (SIGMA), em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C. Após, atingirem confluência as garrafas foram raspadas e as células plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 5x10⁴ células.mL⁻¹.

Para o ensaio de viabilidade celular linhagem de macrófago (RAW 264.7) ou linhagem de fibroblasto pulmão humano (A549) foram incubados em placas de 96 poços na concentração de 5x10⁴ células.mL⁻¹ em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C na presença do extrato enriquecido de inibidores de proteases nas concentrações de 100, 10 e 1 µg.mL⁻¹ ou com extrato aquoso nas concentrações de 200, 50 e 10 µg.mL⁻¹ por 48 horas.

Para a dosagem de NO, os macrófagos foram incubados em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C na presença do extrato enriquecido de IP nas concentrações de 100, 10 e 1 µg.mL⁻¹ ou com extrato aquoso nas concentrações 200, 50 e 10 µg.mL⁻¹ por uma hora e, subsequentemente, estimuladas com LPS (10 µg.mL⁻¹) e IFN-γ (9 ng.mL⁻¹) a 10% do volume da cultura. Depois de 48 horas de cultura, o sobrenadante foi coletado para posterior análise.

3.5.2. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi medida usando o ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, em cultura de células não estimuladas]. Depois de 48 horas de cultura, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com 100 µL de RPMI suplementado e 10 µL de MTT (5 mg. mL⁻¹), durante 4 horas em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a

1500 rpm. O sobrenadante foi retirado dos poços sem que houvesse alteração no precipitado. Os cristais de formazan formados foram então dissolvidos pela adição de 100µL de DMSO em cada poço. A completa solubilização foi feita pela leve agitação das placas. A densidade óptica foi medida no comprimento de onda de 560nm (EZ Read 200, Biochrom).

3.5.3. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Os sobrenadantes de 48 horas das culturas estimuladas foram analisados para a quantificação de nitritos através do método de *Griess*. As alíquotas dos sobrenadantes foram plaqueadas com volumes iguais de 1% de sulfanilamida e 0,1% de N-(1-naphthyl) (ethylenediamine). A produção de nitritos foi quantificada pela comparação a uma curva padrão com diferentes concentrações de NaNO₂. A densidade óptica foi medida no comprimento de onda de 540nm (EZ Read 200, Biochrom).

3.5.4. Análises Estatísticas

Os resultados apresentados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes e são mostrados como média ± desvio padrão. A significância de diferença foi analisada usando o teste t de *Student* e teste de *Mann-Whitney* quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação Botânica

De acordo com a caracterização botânica, a espécie vegetal em estudo, foi depositada no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili-HDJF do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, cujo nome científico é *Plectranthus barbatus*, conforme características das folhas, flores e galhos da espécie (figura 2). A exsicata encontra-se depositada sob o número HDJF3358.



Figura 2 – Espécie de *Plectranthus barbatus*

A identificação botânica é essencial para auxiliar a elaboração de trabalhos científicos sobre as espécies da flora de uma determinada região, assim como facilitar o conhecimento de plantas medicinais e aquelas potencialmente tóxicas, com o propósito de melhor utilizá-las e controlá-las, bem como armazenar possíveis exemplares para identificação ou comparação, uma vez que, as espécies de plantas possuem diferentes características e particularidades (WIGGERS, 2008).

4.2. Submissão ao GenBank

A pesquisa realizada no *GenBank* para *P. barbatus*, demonstrou a ausência de informações sobre a sequência de inibidores de proteases o que não inviabiliza o estudo, pois o fato de não ter encontrado a sequência de inibidores de proteases pode estar relacionado em as mesmas não terem sido estudadas até o momento e por isso não estarem depositadas no banco de dados. Ao

contrário da *Glycine Max* que apresenta as sequências depositadas na base de dados do *GenBank*, e classificados em duas principais categorias, alta massa molecular, e os de massa molecular entre 6.000 e 10.000, e capacidade para inibir tripsina e quimotripsina em sítios de ligação independentes, classificados como *Kunitz* e *Bowman-Birk*, respectivamente (SILVA, 2000).

4.3. Análise de proteína

Após a extração, as folhas, flores e caule do *P. barbatus* foram submetidos à análise de quantificação proteica, utilizando a soja como padrão. A eficácia da metodologia para a extração de proteínas pode ser comprovada pela detecção de aproximadamente 0,45 mg/ml de proteínas nas folhas, no caule e nas flores do *P. barbatus* (Figura 3).

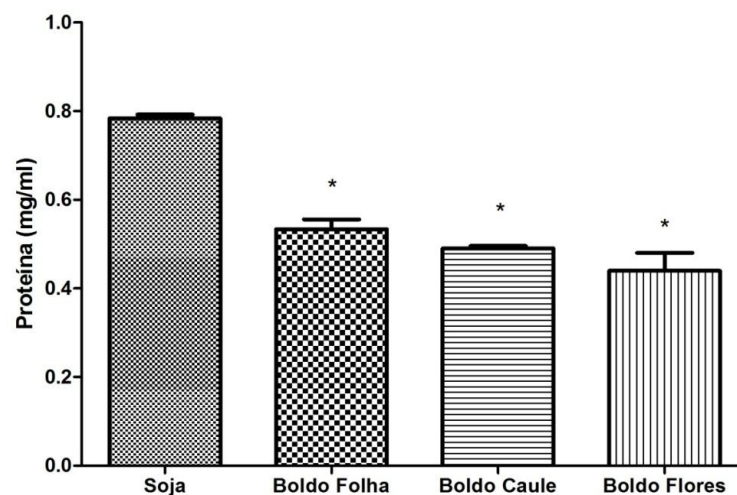


Figura 3 - Quantificação de proteína dos extratos enriquecidos das folhas das espécies selecionadas e do padrão de soja absorvância de 595 nm. Barras = média±desv.pad. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos 3 (três) experimentos independentes e são mostrados como média ± P. barbatus desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas em relação à soja quando *p<0,05.

A metodologia utilizada para a extração é bem caracterizada para leguminosas (YAVELOW, 1985), sendo esta a primeira vez aplicada nessa espécie. A menor quantidade de proteínas encontrada pode ser por características do ou de ajustes na técnica (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Colares (2016) e Carli (2011) descrevem em seus estudos, a aplicação da mesma em outras espécies de plantas para isolamento e purificação de inibidores de proteases.

4.4. Detecção de proteases por eletroforese

Tendo como base os dados da quantificação de proteínas presentes nos extratos enriquecidos, os mesmos foram submetidos à detecção em gel de poliacrilamida. A figura 4 mostra o perfil eletroforético dos extratos purificados e preparados a partir dos grãos de soja.

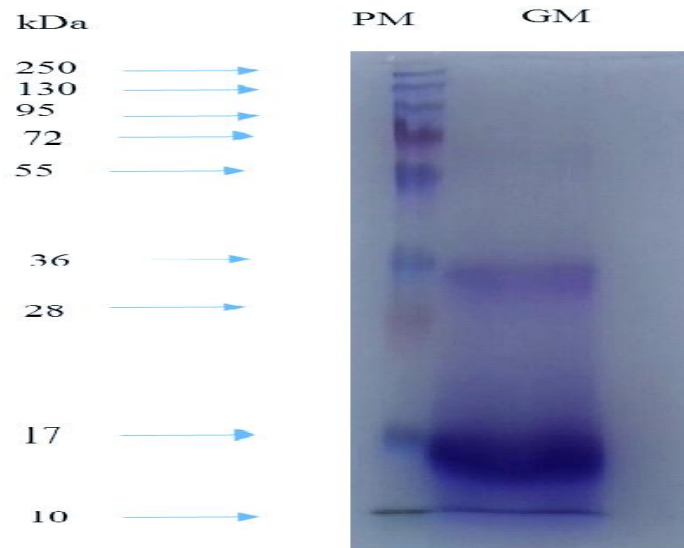


Figura 4—Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de inibidores de proteases de semente de soja obtidos pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). PM: Peso Molecular de 10 a 250kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases). Foi aplicado no poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue R-250*.

A detecção de proteínas com massa molecular aparente de 13, 23 e 30 kDa está de acordo com o demonstrado por Leal (2010), o que comprova a eficiência do processo de purificação utilizado para extração de inibidores conforme a metodologia descrita por Yavelow e colaboradores (1985).

A banda demonstrada na altura de 13 kDa, no perfil eletroforético do extrato de soja, pode estar relacionando, como estudos já têm demonstrado, ao peso molecular dos inibidores de tripsina e Bowman-Birk (BBI) em espécies de *Vigna* como sendo de 10-16 kDa (KUMAR et al., 2013), podendo assim, essa banda representar a forma do dímero do inibidor, comportamento recorrente em inibidores BBI encontrado em várias leguminosas (FIELDS et al., 2012).

Nas plantas, os inibidores são classificados em família de acordo com suas características de homologia na estrutura primária, massa molecular e especificidade inibitória, portanto, esses inibidores podem ser classificados a partir da classe de enzima que

inibem fato que constitui uma importante iniciativa científica para caracterização e isolamento de metabólitos com atividade biológica (CHEVREUIL et al., 2011).

O teor de inibidores em muitas espécies de plantas tem despertado o interesse na caracterização e as funções biológicas que eles exercem, mas também da sua utilização na prevenção e/ou tratamento de várias patologias (DECLERCK, ET AL., 2002).

Os inibidores de proteases nas plantas são encontrados principalmente nas famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae (HAMMOND *et al.*, 1984; BAEK et al., 1994) e são compostos que possuem a capacidade de diminuir a atividade de uma enzima. O interesse em estudar as funções fisiológicas desses inibidores se dá devido a sua importância na regulação de diferentes processos em que as proteases estão envolvidas, desde a quebra de proteínas intracelulares, transcrição, ciclo celular, invasão celular, apoptose, entre outras (FEDATTO, 2004).

Embora os inibidores de Bowman-Birk (BBI), sejam comumente encontrados em plantas, principalmente em leguminosas, ainda é necessário estudos que esclareçam os mecanismos biológicos dessas moléculas, sobretudo em termos de utilidade como ferramenta nos estudos bioquímicos e fisiológicos das funções de proteases, principalmente aquelas envolvidas em carcinogênese e ação anti-inflamatória (SILVA e SILVA et al., 2000).

A *Glycine max* possui ampla distribuição de inibidores de proteases em suas sementes, além da lectina que apresenta massa molecular em torno de 30 kDa. As mesmas são resistentes ao tratamento térmico empregado para extração de inibidores de proteases, não sendo a temperatura de aquecimento suficiente para desnaturá-las o que torna sua presença esperada no gel de poliacrilamida (LEAL, 2010).

O gel de poliacrilamida dos extratos purificados do caule e das folhas de boldo da terra demonstram a presença de proteínas de massa molecular em torno de 30 kDa (Figura 5, 6, 7). No caule do boldo da terra também foi encontrado uma banda em torno de 90 kDa (Figura 6, 7). No extrato das folhas do boldo do chile e das flores de boldo da terra não foi detectado nenhuma banda (Figura 7, 8).

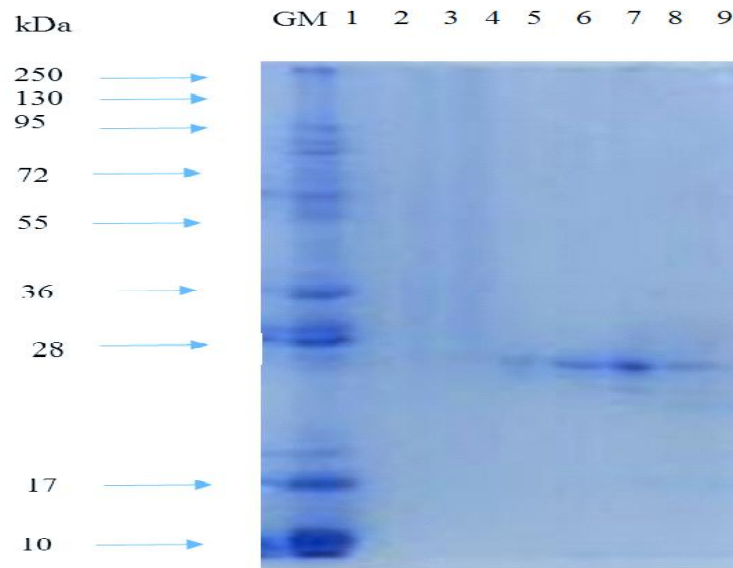


Figura 5–Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de inibidores de proteases do boldo da terra obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). PM: Peso Molecular de 10 a 250 kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de protease). As colunas 1-2-3 representam os extratos de flores do Boldo da terra. As colunas 4-5-6 indicam os extratos à base de folhas do boldo. E ainda, as colunas 7-8-9 constituem os resultados para os extratos de caule do boldo da terra. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue R-250*.

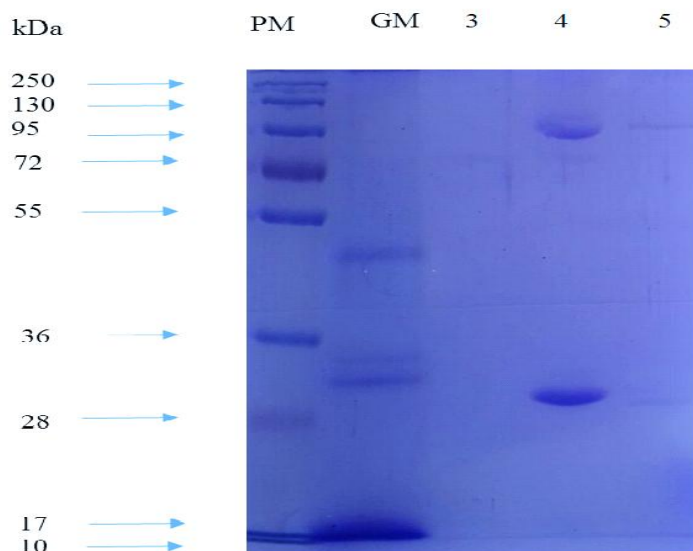


Figura 6–Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de caule, folhas e flores do Boldo da terra obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). PM: Peso Molecular de 10 a 250kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases). A Coluna 3 representa os extratos a base de flores do boldo da terra. A coluna 4 para os extratos do Caule do boldo da terra e a coluna 5 para os extratos a base de folha do boldo da terra. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue R-250*.

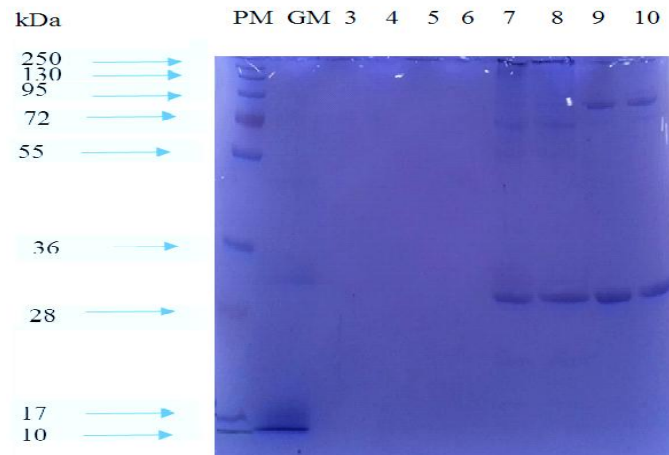


Figura 7–Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de inibidores de protease de Boldo do Chile processado e Boldo da Terra obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985).PM: Peso Molecular de 10 a 250kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases).Assim, as coluna 3 e 4 indicam o extrato a base de folhas de Boldo do Chile processado. As Colunas 5 e 6, o extrato das flores do Boldo da Terra. As colunas 7 e 8, o extrato da Folha do Boldo da Terra e ainda as colunas 9 e 10 que representam os extrato do Caule do Boldo da terra. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue R-250*.

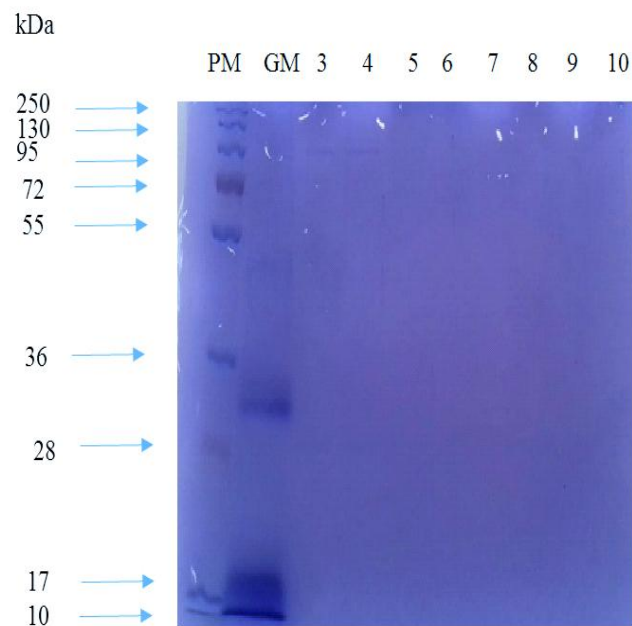


Figura 8–Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de inibidores de proteases do Boldo Da Terra e Boldo do Chile, obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985).PM: Peso Molecular de 10 a 250kDa, GM: extrato a base de *G. max* grão (padrão de inibidores de proteases). As coluna 3 e 4 indicam o extrato a base de flores do Boldo da Terra. As colunas 5 e 6 para o extrato a base do Boldo do Chile processado e as colunas de 7 a 10 representam o extrato do Boldo do Chile processado e purificado. Foi aplicado em cada poço 50 mg/mL de proteína. Gel corado com *Coomassie Blue R-250*.

Segundo Sharon e Lis (2001), esses resultados (figura 5,6,7) podem sugerir a presença de lectinas, que geralmente consistem de duas ou quatro subunidades, com massa molecular que varia de 25kDa a 30KDa. As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em tecidos vegetais tais como: raiz, folha, talo, vagem, frutas, flores e até mesmo casca. A maior quantidade de lectinas de plantas é encontrada nos órgãos de estoque, dependendo da planta, os órgãos de estoque apresentam diferentes localizações (MACIEL, 2004).

Uma vez que essas moléculas são capazes de “decifrar os glicocódigos” codificados na estrutura dos glicoconjugados que compõem as membranas celulares, as lectinas têm o papel essencial em muitos processos biológicos, como comunicação celular, resposta imunológica, fertilização, desenvolvimento de infecções parasitárias e metástase de tumores (GABIUS; GABIUS, 1997).

Assim, a partir dos resultados satisfatórios para a detecção de lectinas dos extratos enriquecidos de folhas de boldo da terra, por meio dos perfis eletroforético, os mesmos foram submetidos a uma varredura de comprimento de onda a fim de identificar a melhor absorção presentes nos extratos, para posteriormente ser realizada a purificação em cromatografia líquida de alta eficiência em sistema de HPLC.

O resultado demonstra a presença de uma banda no comprimento de onda de 230nm para o extrato a base boldo caule e boldo folha (Figura 09).

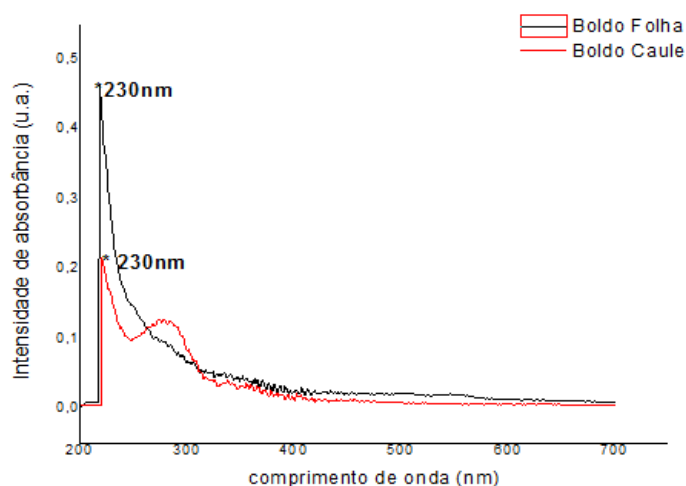


Figura 09 -Espectro de absorção molecular de inibidores de proteases dos extratos enriquecidos a base de folhas e caule do boldo da terra em espectrofotômetro. As amostras apresentaram curvas analíticas de absorção em 230 nm para os extratos, sendo monitorados de 200 a 700 nm. A varredura foi realizada com as amostras diluídas em água destilada e a temperatura ambiente.

Tendo em vista que a interação da luz com a matéria depende da estrutura química dos compostos, esse resultado permite caracterizar e verificar qual a faixa de comprimento de onda apresenta maior afinidade de absorção. A sensibilidade desse método auxilia na escolha do melhor comprimento de onda para detectar compostos mesmo em menores concentrações em equipamento CLAE (ROCHA, 2004).

4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos enriquecidos de inibidores de proteases

O resultado da varredura em sistema CLAE dos extratos de folhas de *P. barbatus* enriquecidos demonstraram a presença de picos aparentes entre 12 e 13 minutos.

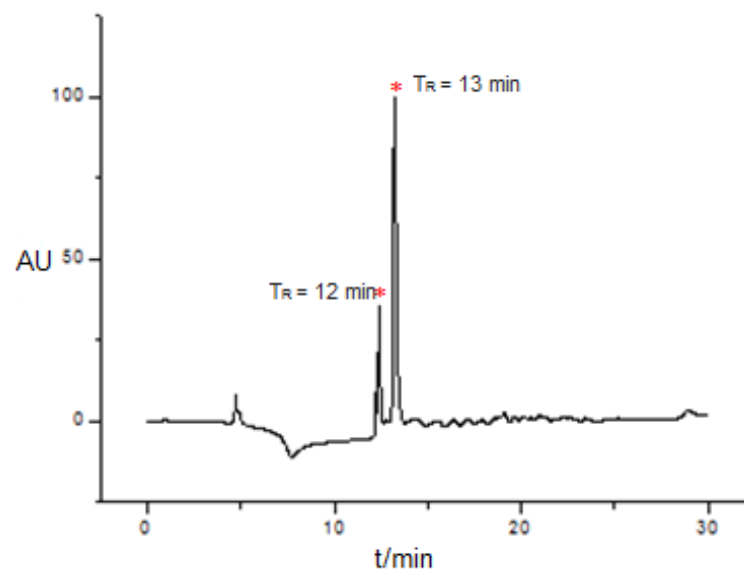


Figura 10: Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura das amostras dos extratos enriquecidos a base de folhas de *A. colubrina*, sementes de *Punica granatum* e grãos de *Glycine max*. Condições cromatográficas: Coluna utilizada C₁₈ (25 cm x 4,6 mm) Vydac 218TP. Fase Móvel: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%. Eluição por gradiente: 0 a 100% B em 30 minutos; fluxo: 0,8 mL min⁻¹ em uma absorbância de 260 a 400 nm.

As preparações do extrato enriquecido a partir das folhas e caule do boldo da terra foram submetidas à análise por equipamento CLAE para repetição do experimento. A análise apresentou componentes que puderam ser detectados em absorbância de 215 a 400nm.

O perfil cromatográfico mostrou dois picos em tempos de retenção de 16,396 e 27,485 minutos para o boldo caule e 13,452 e 27,127 para o boldo folha (Figura 11). O pico em torno de 27 minutos possivelmente representam lectinas como já caracterizado por Leal (2010) em sementes de soja.

Amostra	Tempo de Retenção	Área	Altura
IPBC	16,396	158272,50	38506,96
	27,485	38582,47	29767,58
IPBF	13,452	52962,04	30400,4
	27,127	38582,47	29767,58

Figura 11: Picos cromatográficos mais intensos observados no cromatograma obtido por sistema CLAE e seus respectivos tempos de retenção, área e altura obtidos nos espectros UV.

4.6. Determinação Estequiométrica de Inibição

Os extratos enriquecidos a base folhas e caule do *P. barbatus*, caracterizados previamente em gel de poliacrilamida e por equipamento CLAE, foram submetidos à atividade anti-tripsina.

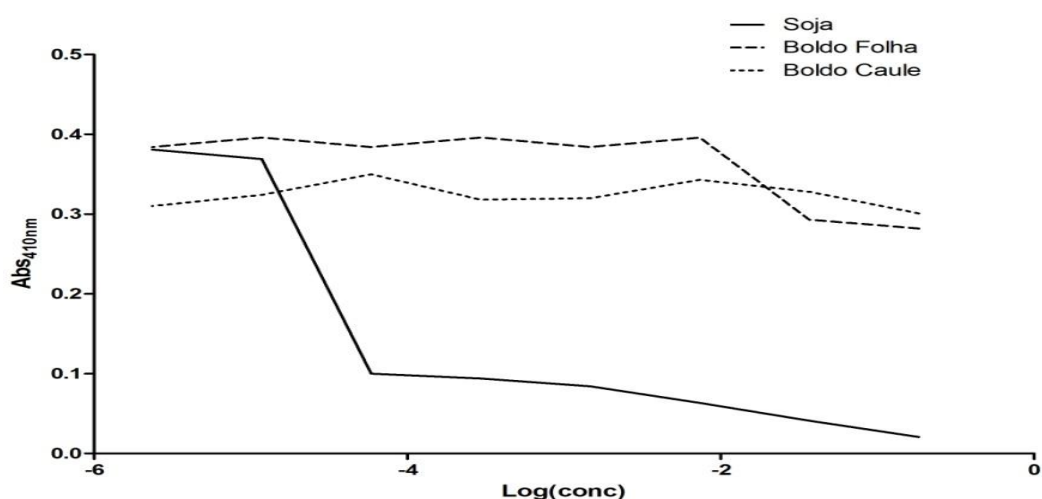


Figura 12 - Atividade anti-tripsina do extrato enriquecido a base de sementes de soja, boldo folha e boldo Caule. 20 μ L de diluições seriadas do inibidor foram adicionadas a cada tubo de ensaio que continha 200 μ L de DL-BAPNA (N- α -benzoi-DL-arginil-p-nitroanilida) e 20 μ L de tripsina (0,05 mg mL⁻¹). A quantificação da atividade inibitória foi analisada em 410 nm. A EC₅₀ foi calculada através da análise da regressão não-linear da curva.

Os resultados demonstraram indicativos de que os extratos purificados de boldo caule e boldo folha não apresentaram ação inibitória da atividade da tripsina em comparação com os extratos purificados de sementes de soja (Figura 12). Embora aparecerem dois picos no cromatograma é possível inferir que mesmos não são referentes ao inibidor de proteases da família Bowman-Birk (BBI), com massas variam de 6 a 9 kDa como já caracterizado em estudos descritos por Leal (2010), mas que não foi observado no gel (GARIANI; LEATHERBARROW, 1997). Esses inibidores de proteases apresentam proteínas que possuem propriedades de formar complexos proteína-proteína reversíveis ou não, como

diversas enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da atividade dessas proteases pelo seu sítio catalítico, como é o caso dos inibidores de tripsina de sementes de soja (LEAL, 2012).

4.7 Modulações da viabilidade celular e produção de óxido nítrico pelas proteases das folhas e caule do boldo

A elucidação de mecanismos celulares para o diagnóstico de patologias e inclusive para tratamento tem despertado o interesse para muitos aspectos a respeito da interação entre compostos bioativos com o sistema biológico, principalmente em relação a influência sobre o metabolismo celular, ainda porque muitos permanecem sem compreensão (RAELE, 2013).

Para melhor compreensão dessa interação, as células RAW 264.7 e A549 foram tratadas com diferentes concentrações de extrato enriquecido de protease das folhas e do caule. O resultado demonstra uma pequena redução na viabilidade das células RAW 264.7 (Figura 12) e não alteração da viabilidade de A549 (Figura 13).

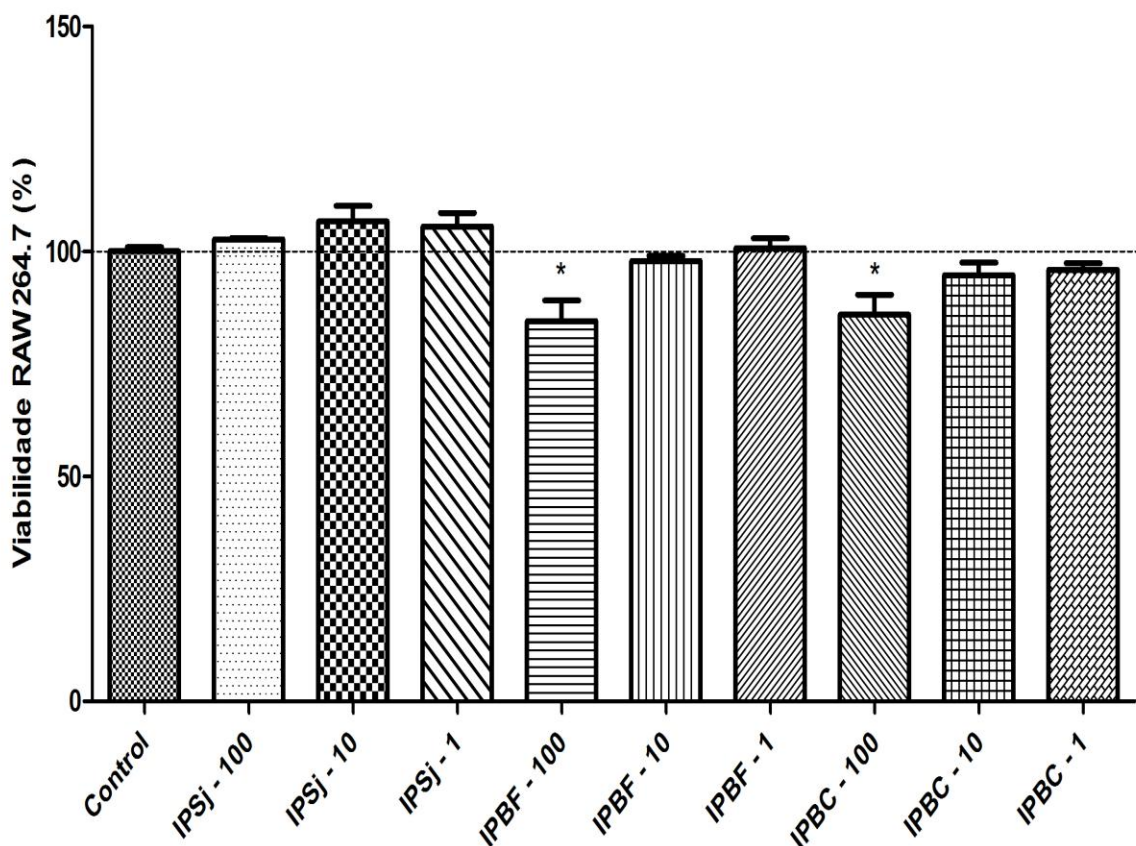


Figura 12–Viabilidade celular. RAW 264.7 foram tratadas com 100, 10 ou 1 µg/ml de extrato enriquecido de inibidores de proteases das folhas (IPBF) e do caule (IPBC) do *P. barbatus* e a viabilidade foi analisada pelo método de MTT. As colunas representam Média±SEM. Control=células não tratadas com extrato enriquecido de inibidores de protease.

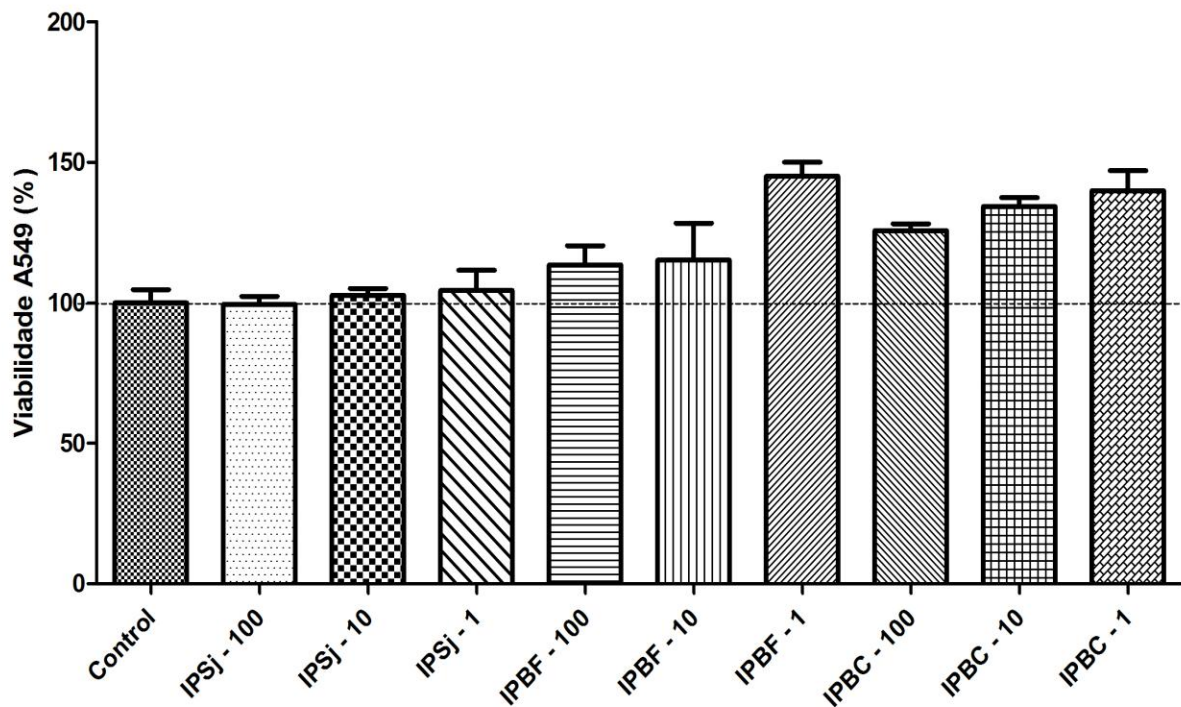


Figura 13–Viabilidade celular. As células A549 foram tratadas com 100, 10 ou 1 $\mu\text{g/ml}$ de extrato enriquecido de inibidores de proteases das folhas (IPBF) e do caule (IPBC) do *P. barbatus* e a viabilidade foi analisada pelo método de MTT. As colunas representam Média \pm SEM. Control=células não tratadas com extrato enriquecido de inibidores de protease.

As Lipoxigenases tem uma importância significativa no câncer, com efeito estimulatório nas células tumorais elevando a expressão e secreção de catepsina B e aumentando a invasão e migração de células tumorais através da indução da produção de metaloproteases por essas células (HONN et al, 1994). Por outro lado, nas duas últimas décadas, as lectinas de plantas têm sido usadas como ferramentas para diferenciar tumores malignos de benignos e também para avaliar o grau de glicosilação associado com metástase (GORELIK et al., 2001). Além do potencial diagnóstico elas também possuem um potencial para a terapia antitumoral em uma variedade de células malignas.

Embora métodos de entrega de proteínas tenham sido desenvolvidos, existem muitos obstáculos remanescentes, como a exposição dessas macromoléculas a possível degradação pelos fluidos biológicos, o que resulta na necessidade de doses frequentes, fato que pode estar relacionado com a não alteração da viabilidade celular (CLELAND e DAUGHERT, 2001).

A produção de óxido nítrico é um dos eventos causados pela interação compostos bioativos e sistemas biológicos (IGNARRO, 2002). O óxido nítrico (NO) é um radical livre, que constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelular. Ainda, é

um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais (QUEIROZ; BATISTA, 1999). Assim, foi testado o efeito dos compostos na produção de óxido nítrico, e após o tratamento com os extratos enriquecidos de proteases do caule e das folhas, a produção de óxido nítrico apresentou maiores índices de inibição nas concentrações em 100 $\mu\text{g/ml}$ e 1 $\mu\text{g/ml}$ para boldo folha e boldo caule respectivamente (Figura 14).

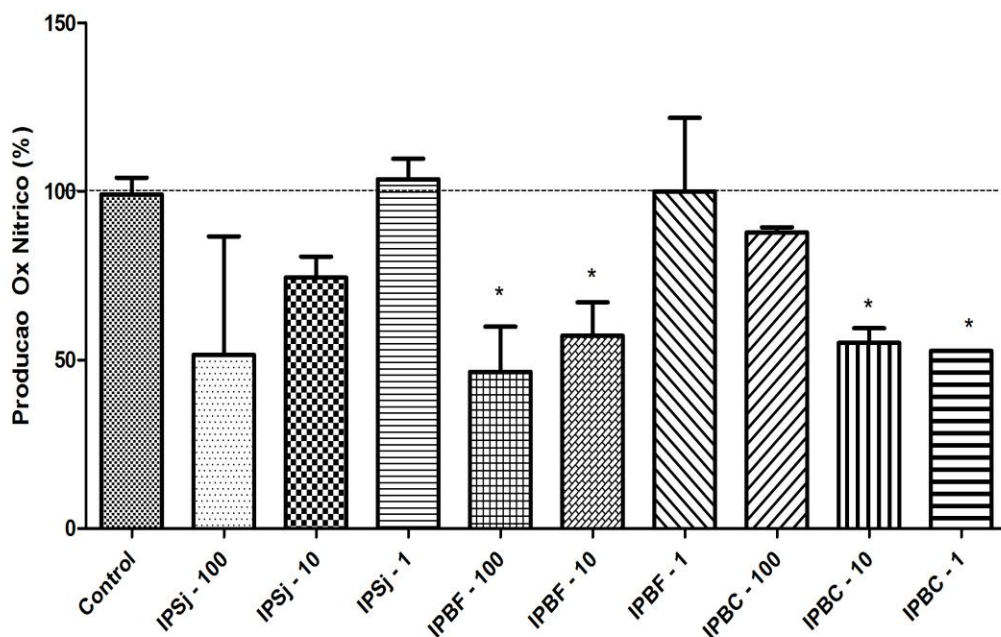


Figura 14—Produção de Óxido Nítrico. RAW 264.7 foram estimuladas com LPS e IFN- γ e tratadas com 100, 10 ou 1 $\mu\text{g/ml}$ de extrato enriquecido de inibidores de proteases das folhas (IPBF) e do caule (IPBC) do *P. barbatius*. A produção de Óxido Nítrico foi determinada pelo método de Griess. As colunas representam Média \pm SEM. Control=células estimuladas e não tratadas com extrato enriquecido de inibidores de protease.

O óxido nítrico é o principal mediador citotóxico de células imunes e constitui uma importante molécula reguladora do sistema imune, atuando como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos. O uso de inibidores de óxido nítrico tem mostrado um efeito benéfico em várias patologias, sendo que grande parte das células estudadas até agora têm a capacidade de produzir esse composto (KATZUNG; JULIUS, 2002). Ao analisar o efeito da administração *in vitro* dos compostos sobre a produção de óxido nítrico, os resultados indicam que ora estimulam, ora deprimem a produção de NO por macrófagos, dependendo da concentração, sendo que a capacidade em inibir a produção de óxido nítrico representa um indicativo de atividade antiinflamatória (BARBOSA, 2009).

Frente à crescente utilização de plantas nas diversas áreas de saúde, os interesses em estudar seus efeitos correlacionando com seus possíveis efeitos citotóxicos, a fim de ampliar a utilização terapêutica segura destes produtos naturais. E ainda, selecionar um ou mais extratos que apresentem uma aplicação mais específica em determinada área da saúde (LASTRES *et al.*, 2001). Para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto não deve ocasionar a morte das células nem afetar suas funções celulares (GUO *et al.*, 2009). Sendo assim, os extratos não apresentam citotoxicidade em nenhuma das linhagens celulares estudadas, porém tem capacidade de inibir a produção de óxido nítrico, o que sugere testes mais aprofundados para verificar o mecanismo de ação antiinflamatória.

As populações utilizam preparações de extrato aquoso no tratamento de várias enfermidades, que podem se tornar fatais dependendo da forma errada de uso, entretanto, ainda não há a comprovação dos possíveis efeitos adversos do extrato aquoso de *P. barbatus* (catalan *et al.*, 2012).

No intuito de elucidar alguns destes efeitos, foram realizados os testes de viabilidade e de produção de óxido nítrico com o extrato aquoso do *P. barbatus*. Nos ensaios de viabilidade, pode-se inferir que o extrato aquoso a base de boldo folhas do *P. barbatus* não foi tóxico na menor concentração, apresentou elevada citotoxicidade na maior concentração e na concentração de 500 µg/ml apresentou 29% de citotoxicidade para as células RAW (Figura 15) e de mais de 60% na A549 (figura 16).

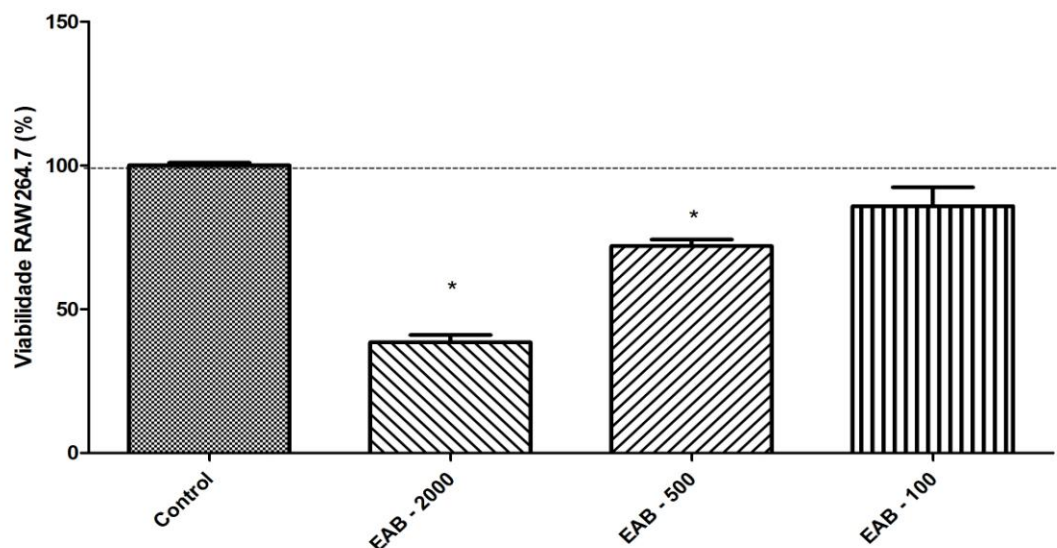


Figura 15–Viabilidade celular. As células RAW 264.7 foram tratadas com 2000, 500 ou 100 µg/ml de extrato aquoso das folhas (EAB) do *P. barbatus* e a viabilidade foi analisada pelo método de MTT. As colunas representam Média±SEM. Control=células não tratadas com extrato aquoso.

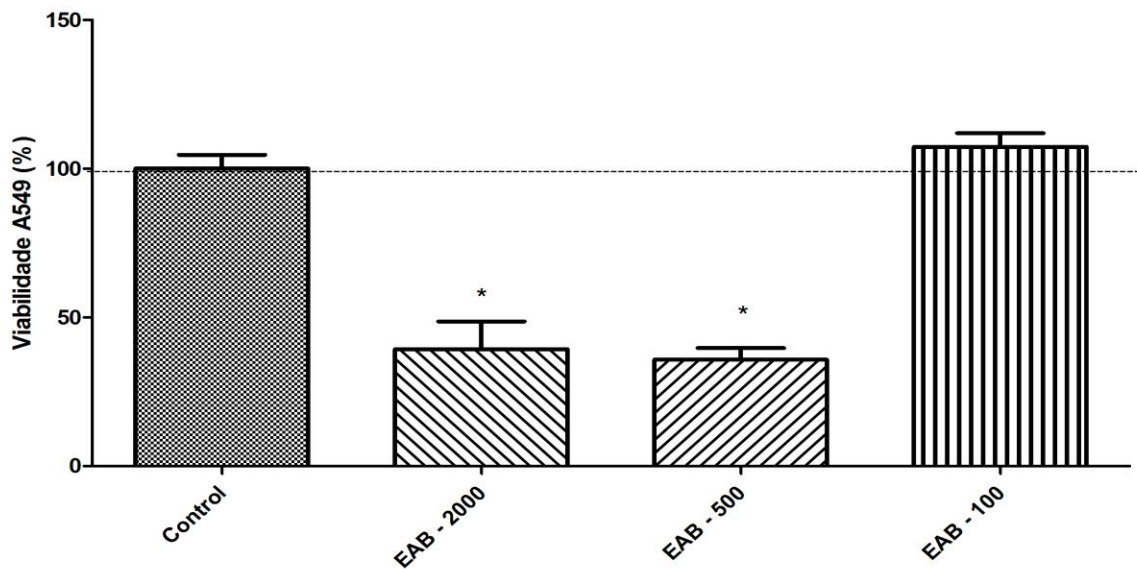


Figura 16- Viabilidade celular. As células A549 foram tratadas com 2000, 500 ou 100 µg/ml de extrato aquoso das folhas (EAB) do *P. barbatus* e a viabilidade foi analisada pelo método de MTT. As colunas representam Média±SEM. Control=células não tratadas com extrato aquoso.

Vicentini et al. (2001) relataram que alguns chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos, porém, há poucos relatos acerca da presença destes compostos em folhas de *P. barbatus* bem como seus possíveis males à saúde dos usuários, sugere ainda que melhores estudos que comprovem suas características farmacológicas ou não sejam realizados. Além disso, Gardner (1994) constatou que as folhas de *P. barbatus* são ricas em cristais de oxalato de cálcio, os quais podem provocar lesões nas mucosas, auxiliando na penetração de constituintes tóxicos de plantas quando consumido em grande quantidade, ressaltando que seu uso deve ser feito com cautela.

Hoshina (2002) descreve em seus estudos que um decréscimo acentuado no índice mitótico é indicador de citotoxicidade da substância, já um aumento indica indução da divisão celular, o que pode induzir ao aparecimento de tumorização nos seres vivos. A inibição da divisão celular observada através dos valores dos índices mitóticos em *Plectranthus barbatus* demonstra que esta planta medicinal possui capacidade antiproliferativa. Resultados que corrobora com os obtidos (fig. 16), uma vez que na dose de 500 µg/ml obteve-se os menores índices de viabilidades para as células A549 (carcinoma de pulmão).

No âmbito do estudo das plantas medicinais é necessário verificar a existência de características desejáveis como a eficácia, baixa toxicidade para o ser humano, assim como um padrão de qualidade para que sejam manipuladas de forma segura como agentes

terapêuticos (SIMÕES; LINO, 2003). Nesse contexto o óxido nítrico desempenha papel nas funções regulatórias e de citotoxicidade, uma vez que é produzido em grande quantidade por macrófagos (BELLOWS et al., 2006). Portanto, após exposição dos extratos aquoso da folha do Boldo da Terra, os resultados apresentados permitiram observar que o extrato aquoso reduziu a produção de NO em relação ao controle (Figura 17).

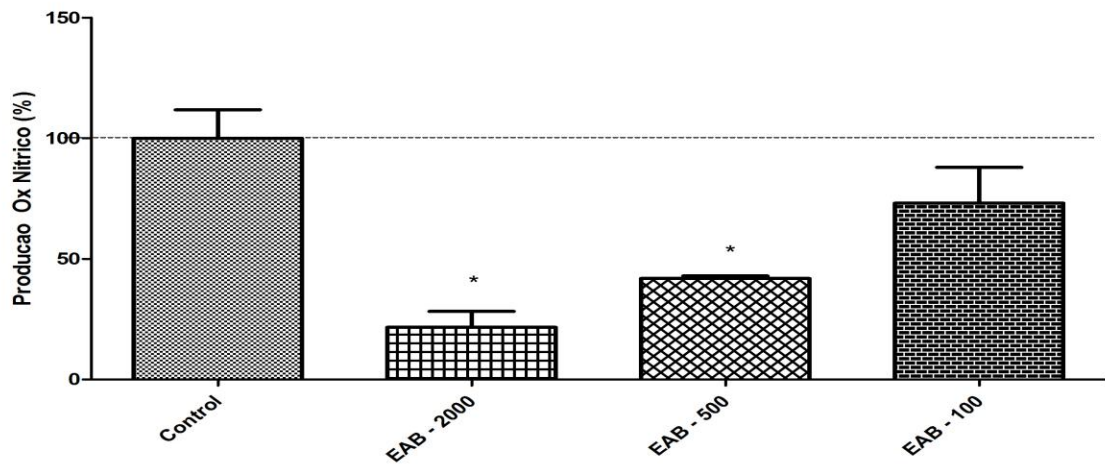


Figura 17—Produção de Óxido Nítrico. RAW 264.7 foram estimuladas com LPS e IFN- γ e tratadas com 2000, 500 ou 100 μ g/ml de extrato aquoso das folhas (EAB) do *P. barbatius*. A produção de Óxido Nítrico foi determinada pelo método de Griess. As colunas representam Média \pm SEM. Control=células estimuladas e não tratadas com extrato aquoso.

O extrato aquoso interferiu na viabilidade das células tumorais e conseqüentemente, na atividade inibitória da produção de óxido nítrico devido à alta toxicidade das maiores concentrações do extrato, o que corrobora com as informações acerca dos estudos realizados quanto à atividade citotóxica sobre linhagens de células tumorais (BARBOSA, 2009).

Considerando a alta prevalência do uso de plantas medicinais, estudos sobre seus reais efeitos devem ser realizados, ressaltando a necessidade de orientar as comunidades quanto ao uso racional da espécie, seja pelo seu valor histórico cultural ou pela necessidade de confirmação das indicações de uso na medicina tradicional para o tratamento de doenças e a divulgação das suas atividades farmacológicas (BARQAWI et al., 2004).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o *Plectranthus barbatus* seja utilizado pela população principalmente para distúrbios gástricos, um grande número de ações farmacológicas já foram testadas e comprovadas, envolvendo compostos isolados de suas folhas, caule e raízes. Visando contribuir para um maior conhecimento da espécie, esse trabalho demonstrou a detecção de lectina e lipoxigenase até agora desconhecidos em *Plectranthus barbatus*. Além disso, o extrato obtido apresentou potencial anti-inflamatório sendo capaz de inibir a produção de óxido nítrico na concentração de 10 µg/ml para folha e caule e 100 µg/ml para folha. Esse extrato não alterou a viabilidade celular de ambas as linhagens celulares, podendo ser caracterizados como não citotóxico nas concentrações testadas.

REFERÊNCIAS

- BATTISTI, Caroline. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 11, n. 03, p.338-348, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2457/1205>>. Acesso em: 13 abr. 2016.
- BELLOWS C.G., AUBIN J. E., HEERSCHU J.N., ANTOSZ ME. **Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations**. *Calcif Tissue Int* 1986; 38:143-54
- BRANDOLT, Thelma Duarte Delgado. Efeito do extrato de *Plectranthus barbatus* (Andr.) Benth no desempenho reprodutivo de *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769). **Biotemas**, Uruguaiana – Rs, v. 20, n. 02, p.49-58, mar. 2007. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/20725>>. Acesso em : 10 ago. 2016.
- BUTLER A.M; AILTON A.L; WARNER A.H., Characterization of a novel heterodimeric cathepsin L-like protease and cDNA encoding the catalytic subunit of the protease in embryos of *Artemia franciscana*, **Biochem. Cell Biol.**, v.79 p.43-56, 2001.
- CALIXTO, João Batista. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. São Paulo , v. 55, n. 3, p.37-39, jan. 2003. Disponível em:< <http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v55n3/a22v55n3.pdf>>. Acesso em: 02 out 2016
- CARLI, Alessandra de Paula. **Correlação da Atividade do Proteossoma Expressão de CD44 e Enzimas Proteolíticas em Extratos Intestinais de Camundongos Tratados com 1,2 Dimetilhidrazina e Inibidores Bowman-Birk**. 2011. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/2510/1/TESE_CorrelaçãoAtividadeProteossoma.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2016.
- CARLINI, C.R.; GROSSI de Sá, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539. 2002.
- CHEVREUILI, Larissa Ramos. Prospecção de inibidores de serinoproteínases em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. **Acta Amazonica**. Manaus, v. 41, n. 1, p.16-25, mar. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672011000100019>. Acesso em: 15 maio 2016.

CLEMENTE A.; DOMONEY C. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. **Curr Protein Pept Sci**. Granada, v. 201, n. 16, p.03-07, jun. 2006.

CLEMENTE, A., SONNANTE, G., DOMONEY, C. Bowman–Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, p. 358–373, 2011.

COLARES, Lara Franca. **Deteção de Inibidores de Proteases em Cinco Espécies Vegetais nos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia, Ambiente e Sociedade, Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni, 2016.

COSTA-LOTUFO. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**. Ceará, v. 02, n. 01, p.47-58, ago. 2010. Disponível em: < <http://www.uff.br/rvq>>. Acesso em 08 jul 2016.

COSTA, M.C.C.D. **Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 81-88, 2006

CUNNINGHAM, W.A., NEZLEK, J.B., & BANAJI, M.R (2001). **Conscious and unconscious ethnocentrism: Revisiting the ideologies of prejudice**. Unpublished manuscript, Yale University, New Haven, CT.

DECLERCK, C. H., BRABANDER, B., BOONE, C., & Gerits, P. (2002). Locus of control, marital status and predictors of early relapse in primary breast cancer patients. **Psychology and Health**, 17, 63-76.

De Mejía EG & Prisecaru VI. **Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment**. Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign, Chicago. 2000.

DESHIMARU, M.; YOSHIMI, S.; SHIOI, S.; TERADA, S. **Multigene family for Bowman Birk type proteinase inhibitors of wild soja and soybean: the presence of two BBIA genes and pseudogenes**. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v.68, p.1279-1286, 2004. DOI: 10.1271/bbb.68.1279.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2^a ed. England, 2002.

ERLANGER, B.F., KOKAWSKY, N., and COHEN, W. 1961. **The preparation and properties of two new chromogenic substances of trypsin**. Arch, Biochem. Biophys. 95:281-278

FEDATTO, Luciana Maria. **Caracterização de Proteases Extracelulares Produzidas Por Xylella fastidiosa de Citros e Videira**. 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia de Agroecossistemas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2004. Disponível em: <file:///C:/Users/alcides/Downloads/LucianaFedatto (10).pdf>. Acesso em: 08 jul. 2016.

FERREIRA, C. **Atividade anti-angiogênica de inibidores de tripsina em membrana corioalantóica de Gallus domesticus**. 2013, 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

FERREIRA, Fabielle Negrão et al. Avaliação da atividade da lipoxigenase na castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). **B.ceppa**. Curitiba, v. 29, p.1-8, jun. 2011.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**. n. 7, p: 1-8, 2006. Disponível em : <http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm> Acesso em 17 dez 2016.

GERHARDT, Daniéli et al. Boldine Attenuates Cancer Cell Growth in an Experimental Model of Glioma In vivo. **Journal Of Cancer Science & Therapy**. Rio Grande do Sul, v. 05, n. 05, p.194-199, 2013.

GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GUO, Shuguang et al. A MAP Kinase Dependent Feedback Mechanism Controls Rho1 GTPase and Actin Distribution in Yeast. **Plos One**. Canadá, v. 4, n. 6, p.21-32, jun. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006089>. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006089>>. Acesso em: 14 jul. 2016.

HAMMOND, R. W.; FOARD, D. E.; LARKINS, B. A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 15, p. 9883-9890, 1984.

KAPEWANGOLO, Petrina; HUSSEIN, Ahmed A.; MEYER, Debra. Inhibition of HIV-1 enzymes, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Plectranthus barbatus*. **Journal Of Ethnopharmacology**. Ireland, v. 149, n. 1, p.184-190, ago. 2013.

KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; ALI, I.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemo preventive agents. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 467-471, 2000.

KENNEDY, A.R. (1998). **Chemo preventive agents: protease inhibitors**. *Pharmacol Ther.* 78, 167-209.

KIM, B.S.; CHO, M.; KIM, H.J. **Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay**. *Mutation Research*, v. 469, p. 233–241, 2000.

LEAL, S. C. **Purificação preparativa de inibidores Bowman-Birk, quantificação em alimentos e características imunogênicas dos inibidores de *Glycinemaxe* da *Macrotylomaaxillare***. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

LOPES, J.L. de S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

LÓPEZ, R.E. da S. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química. Nova**, v. 33, n. 7, p.1541-1548, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2º ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the bowman-birk inhibitor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 94-118, 2008.

LUKHOBBA, Catherine W.; SIMMONDS, Monique S.j.; PATON, Alan J.. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal Of Ethnopharmacology**. Nairobi, Kenya, v. 103, n. 1, p.1-24, jan. 2006.

MACIEL, Elba Verônica Matoso. **Elba Verônica Matoso Maciel**. 2002. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Bioquímica., Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004. Disponível em: <<http://www.liber.ufpe.br/teses/arquivo/20050226130637.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

OLIVEIRA, M. E. **Isolamento, propriedades bioquímicas e estudos biológicos no inibidor proteico da *Macrotyloma axillare***. 2004. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

OWENGA, E.O. et al. **Ethnobotanical survey of traditionally used medicinal plants for infections of skin, gastrointestinal tract, urinary tract and the oral cavity in Borabu sub-county, county Nyamira, Kenya**. Disponível em: <<http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/ensaioeciencia/article/view/2754/2611>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

PEREIRA, Samira Fabre. **Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) e, prepações do sistema nervoso central e em células tumoral**. 2005. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestrado em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

RODRIGUES, Igor de Almeida. **Medicina tradicional: a sabedoria popular a serviço da saúde**. 2013. Disponível em: <<http://www.microbiologia.ufrj.br/porta/index.php/pt/destaques/novidades-sobre-a-micro/304-medicina-tradicional-a-sabedoria-popular-a-servico-da-saude>>. Acesso em: 09 jun. 2016.

RODRIGUES, Marcelo Antônio; DELLAMEA, Aline Segatto; PEDROSO, Jussara Lensen. **Mandala e espiral de plantas medicinais e temperos: uma possibilidade em projetos paisagísticos**. 2016. Disponível em: <http://www.psicopedagogia.com.br/new1_artigo.asp?entrID=1926>. Acesso em: 14 jun. 2016.

RUIZ, Ana Lúcia T. G. et al. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Campinas-sp, v. 18, n. 2, p.295-300, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200025>.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants – genes for improving defenses against insects and pathogens, **Annual Review of Phytopathology**. v. 28, p28 425-449, 1990.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. **Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases**. *Exp and Molecular Pathology*. 2012, 93.

SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal Of Biological Macromolecules**. New Delhi, v. 91, p.1120-1133, out. 2016

SHARON N, Lis H., **The structural basis for carbohydrate recognition by lectins**. In: **Wu AM**. Editors. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001: 1-9.

SILVA, J.A. et al. Biochemical Characterization and N-Terminal Sequences of Two New Trypsin Inhibitors from *Copaifera langsdorffii* Seeds. **Journal Of Protein Chemistry**. Caratinga, v. 20, n. 01, p.01-07, jan. 2000.

SILVA JUNIOR, Eduardo Afonso da. **Estudos de metabolismo in vitro de produtos naturais: biotransformação microbiana da piplartina**. 2013. 160 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Estudos de Metabolismo In Vitro de Produtos Naturais: Biotransformação Microbiana da Piplartina, Estudos de Metabolismo In Vitro de Produtos Naturais: Biotransformação Microbiana da Piplartina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SILVA-LOPEZ, R. E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, Rj, v. 04, n. 01, p.1-12, jan. 2009.

SILVA, Mara Reis; SILVA, Maria Aparecida Azevedo Pereira da. **Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas**. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 13, n. 1, p.01-07, 01 abr. 2000.

SILVEIRA, Marcelo Anzolin; LASSEN, Manoel Francisco Mendes; BEUTER, Sidiane Betina. **Utilização das plantas medicinais e fitoterápicas: o conhecimento popular em uma revisão bibliográfica histórica**. 21. ed. Rio Grande do Sul: Unijui, 2013. 04 p.

Disponível em:

<<https://www.revistas.unijui.edu.br/index.php/salaoconhecimento/article/viewFile/1923/1590>>. Acesso em: 21 nov. 2014.

TAIZ, Licon; ZEIGNER, Eduardo. **Filosofia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Ars - Artmed Saude, 2006.

TOUIL, T.; CIRIC, B; VENTUR, E; SHINDLER, K., S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A. Bowman–Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**. v.271, p.191–202, 2008.

TREMACOLDI, Célia Regina. **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas**. 1ª edição Versão Eletrônica (2009). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/28164/1/Doc353.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2009.

WALKER, A. J.; FORD, L.; MAJERUS, M. E. N.; GEOGHEGAN, A. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Characterization of the mid gut digestive 56 proteinase activity of the two spot lady bird (*Adalia bipunctata*) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 173-180, 1997.

WIGGERS, I. STANGE, C. E. B. – **Manual de instruções para coleta, identificação e herborização de material botânico**. Laranjeiras do Sul – PR. 2008.

YAVELOW, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W. & Kennedy, A. R. **Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985, 82: 5395-5399.