

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KATHARINE DUARTE GONÇALVES

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INIBIDORES PROTEOLITICOS EM SEMENTES DE
Hevea brasiliensis e Hevea spruceana

MANAUS – AM

2022

KATHARINE DUARTE GONÇALVES

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INIBIDORES PROTEOLITICOS EM SEMENTES DE
Hevea brasiliensis e Hevea spruceana

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Estado do Amazonas – UEA/ENS,
como requisito para obtenção do título de licenciada
em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen
Coorientador: Dr. José Francisco de Carvalho
Gonçalves

MANAUS - AM

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

G635pp Gonçalves, Katharine Duarte

Purificação Parcial de Inibidores Proteolíticos Em Sementes De *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana* / Katharine Duarte Gonçalves. Manaus : [s.n], 2022. 33 f.: il.; 15 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia

Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen

Coorientador: José Francisco de Carvalho Gonçalves

1. Germinação. 2. Inibidores de tripsina. 3. Cromatografia de afinidade. 4. *Hevea*. 5. Termoestabilidade . I. Hector Henrique Ferreira Koolen (Orient.). II. José Francisco de Carvalho Gonçalves (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Purificação Parcial de Inibidores Proteolíticos Em Sementes De *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

KATHARINE DUARTE GONÇALVES

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INIBIDORES PROTEOLITICOS EM SEMENTES DE

Hevea brasiliensis e Hevea spruceana

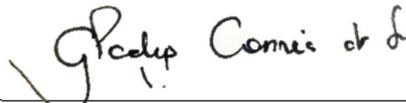
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas, pela Universidade do Estado do Amazonas.

Aprovada em: 05 /05 / 2022

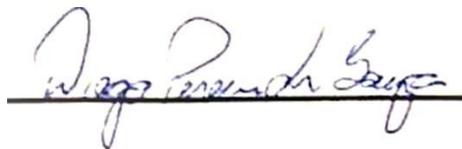
Banca Examinadora



Héctor Henrique Ferreira Koolen
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)



Dra. Gladys Corrêa da Silva
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)



Dr. Diego Pereira de Souza
Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)

A Deus
Meus pais, Nilson e Marciléia
Minhas irmãs, Kethleen e Karol
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, que sempre me conduziu com as devidas lições de amor, fraternidade, e compaixão, hoje e sempre.

A minha mãe, meu pai e minhas irmãs por todo apoio emocional e financeiro que me deram ao longo de toda a minha graduação, sem medir esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos e ter uma educação de qualidade.

Aos meus orientadores Prof.º Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen (UEA) e Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves (INPA), por todos os ensinamentos, críticas construtivas que contribuíram para o meu crescimento pessoal, pela orientação recebida e por não medirem esforços sempre buscando parcerias para que eu pudesse desenvolver o trabalho da melhor forma possível.

A Dra. Andreia Varmes Fernandes (INPA), por toda dedicação e pela brilhante orientação nas 4 iniciações científicas que fiz.

A Dra. Josiane Celerino de Carvalho (INPA), pela amizade valiosa e troca de conhecimentos.

Ao Dr. Adamir Nina Júnior (IFAM-Humaitá), por toda a paciência, amizade e por um dia ter tentado me ensinar a usar o programa estatístico R.

Aos meus amigos, Hugo Rafael, Eleilza Litaiff, Beatriz Braga e Danilo Uchôa, que sempre estiveram torcendo por mim, e incentivando a voar sempre mais alto. Tudo isso me ajuda e ajudou a tentar levar minha vida com maior leveza.

Aos seres iluminados que a universidade colocou em minha vida, João Lopes, Vinicius Cavalcante, Gabriel Gomes, Iago Viana, Talita Bastos, Fernanda Vieira e Yummy Kakizoe, em especial a Paula Dantas e Ingrid Luna, por toda a amizade e por compartilharmos muitas horas de choro e tensão antes das provas.

Aos meus professores da graduação, em especial ao Prof.º Jair Maia, Prof.º Leandro Dutra, Prof.º Raimundo Júnior, Prof.ª Ieda Batista, Prof.ª Larissa Kirsch e Prof.ª Gladys Côrrea, pela sua dedicação, paciência e carinho ao lecionar.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal – LFBV/INPA, por todo o apoio que me deram durante a realização deste trabalho.

Agradeço.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

Carl Sagan

RESUMO

Sementes de espécies do gênero *Hevea* revelam-se como promissora fonte de substâncias para aplicação biotecnológica, com ênfase para proteínas, exibindo teores da ordem de 15 a 20% na base de massa. Portanto, estudos sobre a caracterização e aplicabilidade de algumas classes protéicas como os inibidores de proteases oriundos de sementes de *Hevea* reforçam as expectativas de obtenção de conhecimentos científicos voltados para a aplicação na bioindústria de produtos prospectados na flora Amazônica. Considerando a heterogeneidade das espécies de *Hevea* e a importância biotecnológica dos inibidores, o objetivo deste trabalho foi purificar parcialmente inibidores de proteases presentes em sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*. As sementes foram coletadas em dois sítios florestais no Acre (Parque Zoobotânico e Embrapa, Rio Branco -AC), conduzidas para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal – INPA onde foram beneficiadas, em seguida, parte das sementes foram liofilizadas e trituradas em moinho analítico de facas, até a obtenção de material finamente pulverizado. Nestas amostras foram removidos os lipídeos, para não haver interferência nas extrações de proteínas. Outra parte das sementes foram colocadas para semear afim de se monitorar os teores dos inibidores nos estádios germinativos. A partir da obtenção do extrato proteico, foi realizado o teste de estabilidade do inibidor à temperatura e, posteriormente, foi realizado o teste de atividade de inibição de tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína. Os inibidores de tripsina estão presentes nos extratos proteicos provenientes de sementes de genótipos selvagens de *H. brasiliensis* e *H. spruceana*, as diferenças da atividade inibitória podem estar associadas aos diferentes estádios de germinação, uma vez que as espécies mostraram alta atividade nas sementes quiescentes. Os inibidores testados não são moléculas termoestáveis, possuem estabilidade próxima de 30 a 40 °C. Mediante a cromatografia de afinidade, as duas espécies apresentaram resultados expressivos para os teores desta classe de proteínas. Com registro importante para *H. spruceana* que se destacou pela alta atividade inibitória e maior rendimento proteico, provavelmente, por possuir grande quantidade de inibidores proteolíticos, quando comparado a espécie *H. brasiliensis* que apresentou baixa atividade inibitória.

Palavras-chave: Germinação; cromatografia de afinidade; inibidores de tripsina *Hevea*; termoestabilidade.

ABSTRACT

Seeds of species of *Hevea* genus are a promising source of substances for biotechnological application, with emphasis on proteins, with contents in the order of 15 to 20% in mass basis. Therefore, studies on the characterization and applicability of some protein classes such as protease inhibitors from *Hevea* seeds reinforce the expectations of obtaining scientific knowledge for the application in bioindustry of products prospected in the Amazonian flora. Considering the heterogeneity of *Hevea* species and the biotechnological importance of inhibitors, the objective of this work was to partially purify protease inhibitors present in *Hevea brasiliensis* and *Hevea spruceana* seeds. The seeds were collected in two forest sites in Acre (Parque Zoobotânico and Embrapa, Rio Branco -AC), taken to the Laboratory of Physiology and Plant Biochemistry - INPA where they were processed, then, part of the seeds were freeze-dried and ground in analytical knife mill, until obtaining finely pulverized material. In these samples the lipids were removed so as not to interfere in the protein extractions. Another part of the seeds were placed for sowing in order to monitor the contents of inhibitors in the germinative stages. Once the protein extract was obtained, the inhibitor stability test was performed at temperature, and afterwards, the trypsin, chymotrypsin, papain and bromelain inhibition activity test was performed. The trypsin inhibitors are present in the protein extracts from seeds of wild genotypes of *H. brasiliensis* and *H. spruceana*, the differences of the inhibitory activity can be associated to the different germination stages, once the species showed high activity in the quiescent seeds. The tested inhibitors are not thermostable molecules, having stability near 30 to 40 °C. By affinity chromatography, both species showed significant results for the contents of this class of proteins. With important register for *H. spruceana* that stood out for the high inhibitory activity and higher protein yield, probably, for having large amount of proteolytic inhibitors, when compared to the species *H. brasiliensis* that showed low inhibitory activity.

Key-words: Germination; affinity chromatography; *Hevea* trypsin inhibitors; thermostability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Formação de complexo estável entre enzima (cisteínoproteases) e (inibidor).....	18
Figura 2 - Fluxograma das principais etapas metodológicas.....	20
Figura 3 - Atividade de inibição da tripsina em sementes de <i>Hevea brasiliensis</i> e <i>Hevea spruceana</i>	26
Figura 4 - Atividade de inibição da quimotripsina em sementes de <i>Hevea brasiliensis</i> e <i>Hevea spruceana</i>	27
Figura 5 - Atividade de inibição da papaína em sementes de <i>Hevea brasiliensis</i> e <i>Hevea spruceana</i>	27
Figura 6 - Atividade de inibição da bromelaína em sementes de <i>Hevea brasiliensis</i> e <i>Hevea spruceana</i>	28
Figura 7 - Figura ilustrativa dos estadios germinativos de <i>Hevea brasiliensis</i> (A) e <i>Hevea spruceana</i> (B).....	29
Figura 8 - Atividade de inibidor de tripsina durante a germinação em espécies do gênero <i>Hevea</i> spp.....	30
Figura 9 - Ensaio de estabilidade do inibidor de tripsina em sementes de espécies do gênero <i>Hevea</i> spp.....	31
Figura 10 - Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B do extrato protéico aquecido de sementes de <i>Hevea brasiliensis</i> e <i>Hevea spruceana</i>	33

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

IPS - Inibidores de protease

SQ - Semente quiescente

EM - Semente embebida

PR - Primórdios radiculares

R - Raízes

EP - Epicótilo

EO - Eófilo

FNR – Fração não retida

FR – Fração retida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Gênero <i>Hevea</i>	15
3.2 Inibidores de protease	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Área de coleta	18
4.2 Obtenção do material vegetal	19
4.3 Germinação das sementes	19
4.4 Beneficiamento das sementes	19
4.5 Extração de Lipídeos.....	19
4.6 Extração e quantificação de proteínas solúveis	20
4.7 Determinação de atividades inibitórias	20
4.7.1. Detecção de temperatura ótima.....	20
4.7.2 Detecção da atividade proteolítica total	20
4.7.3. Detecção da atividade de inibição da Tripsina	20
4.7.4 Detecção da atividade de inibição da Quimotripsina.....	21
4.7.5. Detecção da atividade de inibição da Papaína.....	21
4.7.6. Detecção da atividade de inibição da Bromelaína.....	22
4.8. Purificação parcial dos inibidores de tripsina.....	22
4.9. Delineamento experimental e Análises estatísticas	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Atividade de inibição das principais classes de proteínas.....	23
5.2 Atividade de inibição de tripsina durante a germinação	25
5.3. Estabilidade do inibidor de tripsina em sementes	28
5.4 Purificação parcial dos inibidores de tripsina.....	29
6 CONCLUSÃO	30
7 REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae, possui aproximadamente cerca de 8.000 espécies divididas em 334 gêneros, de habitats e hábitos diferentes, representando uma das principais famílias da flora brasileira, e uma das mais complexas do ponto de vista taxonômico. Entre suas características botânicas temos a presença de substâncias latexcentes (SECCO et al., 2008). O gênero *Hevea* é composto de 11 espécies conhecidas, apresentam como características morfológicas principais: folhas trifoliadas, presença de inflorescências, frutos esquizocárpico tricota com três sementes, sendo os principais caracteres de fácil identificação, os frutos e as sementes (BARROSO et al., 1990).

Dentre os órgãos e tecidos vegetais com potencial para prospecção de biomoléculas, que tem como objetivo desenvolver novas matérias-primas para fins industriais, destacam-se as sementes, por constituírem uma das principais fontes de reservas (proteínas, lipídeos e carboidratos). As sementes de *Hevea brasiliensis* possuem a composição bioquímica bem relacionada com a lógica dos processos fisiológicos de sementes recalcitrantes, em particular, no que se refere a síntese e degradação dos seus metabólitos primários. Mas, as aplicações agroindustriais e ecológicas ainda precisam ser melhor investigadas com vista na conservação e uso da diversidade do material genético das espécies do gênero *Hevea* (GONÇALVES et al., 2002; BEWLEY et al., 2013; ROSCHAT et al., 2017).

Estudos têm sido realizados buscando aprimorar cada vez mais a produção de látex natural, com ênfase no metabolismo secundário, onde os programas de melhoramento genético começaram a estudar diferentes performances de clones mais produtivos e tolerantes a diversas doenças da seringueira, como doenças fúngicas foliares e a seca do painel. Iniciaram-se também alguns estudos com sementes, uma vez que é a principal fonte de produção de porta-enxertos para o processo de propagação da enxertia seringueira, visto que para formar o porta-enxerto, base da seringueira, são utilizadas sementes selecionadas de *Hevea brasiliensis*. O tronco, chamado de painel, vem da enxertia de um clone de outra seringueira dessa mesma espécie, comprovadamente produtiva em látex. Por fim, a copa é oriunda de clone resistente ao mal-das-folhas, resultado de cruzamentos entre seringueiras das espécies *Hevea guianensis*, *Hevea pauciflora* e *Hevea rigidifolia* (LI et al., 2016; ROSCHAT et al., 2017).

Estudos mais direcionados para o metabolismo primário têm apontado que as sementes de Euphorbiaceae são fontes de proteínas conhecidas como inibidores de proteases, onde sua massa molecular pode variar de 13 a 25 kDa (BANGRAK E CHOTIGEAT, 2011; BUNYATANG et al., 2012). Com o avanço dos estudos, diversas proteínas apresentaram-se como fontes das mais variadas atividades exercidas pela humanidade, seja de âmbito ambiental,

na saúde humana ou nos diversos tipos de indústrias. Hoje, diversos são os exemplos de estudos bem-sucedidos que conseguiram aplicar proteínas providas de diferentes fontes nas áreas já citadas (KHODAEI et al., 2021; MATHIEU et al., 2021; NAING et al., 2019; MAŁECKI et al., 2021).

Os Inibidores de Proteases são proteínas capazes de bloquear reversível ou irreversivelmente a atividade catalítica de enzimas proteolíticas, por meio da formação de um complexo estável entre enzima-inibidor, a partir de interações entre os aminoácidos presentes no sítio reativo do inibidor, com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, determinando uma interação altamente específica com suas enzimas alvo (MACEDO et al., 2011). Além da importante função como reguladores enzimáticos durante o processo germinativo de sementes, os inibidores de proteases também têm sido associados ao mecanismo de defesa vegetal contra o ataque de insetos e patógenos, uma vez que são responsáveis por inibir/desativar enzimas digestivas ou hidrolíticas de pragas e patógenos (KUHAR et al., 2012; MAGNI et al., 2012). Em todos os organismos, sejam células, bactérias, vírus, animais, plantas e o próprio corpo humano, essas moléculas representam uma maneira ágil e eficaz de controlar a atividade de proteases, onde as enzimas necessitam de um equilíbrio para efetuar a proteólise de forma controlada (COTABARREM et al., 2020).

Nas plantas, os inibidores de proteinases foram bastante estudados, uma vez que são metabolicamente importantes devido às funções que desempenham, podendo atuar como reguladores de proteinases durante o processo germinativo, como proteínas de reserva servindo como fonte de enxofre e nitrogênio, além de participarem do mecanismo de defesa contra o ataque de insetos, pragas e microrganismos. Em sementes, tubérculos e outros tecidos de armazenamento de plantas, os inibidores de proteinases representam cerca de 10% do teor total de proteínas, fornecendo as fontes de Carbono, Nitrogênio e Enxofre necessário durante a germinação (MOSOLOV E VALUEVA, 2005; HARTL et al., 2011; SABOTIC E KO, 2012; COTABARREM et al., 2020).

Alguns estudos de IPs de seringueira têm sido realizados, como de Sritanyarat *et al.* (2006) que purificaram 3 IP do látex de *H. brasiliensis* (RRIM600), que são induzidas por ferimentos. Além disso, Bangrak e Chotigeat (2011), clonaram um gene inibidor de protease da cisteína, do mRNA extraído do látex da borracha (RRIM 600) induzido por um patógeno da seringueira *Phytophthora palmivora*. Nesse contexto, as sementes de diferentes espécies de *Hevea* são promissoras como fonte de inibidores de proteases para aplicações biotecnológicas, ao que se refere à sua ação contra agentes fitopatogênicos, uma vez que foi detectada atividade de inibidores de tripsina e quimotripsina em sementes de *H. brasiliensis* (BUNYATANG *et al.*,

2012).

Portanto, nesta pesquisa hipotetizamos que sementes de diferentes espécies de *Hevea* sintetizam inibidores, isto é a presença dessas proteínas ocorre de forma mais abrangente no gênero *Hevea*. Com isso, pesquisas envolvendo a busca de inibidores de proteases em sementes associadas as defesas das plantas são essenciais, pois podem ampliar as bases conceituais do metabolismo e potencial de aplicação das sementes, propiciando a identificação de moléculas bioativas pertencentes a flora amazônica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar inibidores de protease presentes em sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a quantidade de proteínas presentes em sementes de *Heveabrasiliensis* e *Hevea spruceana*;
- Avaliar a atividade de inibição proteolítica;
- Determinar a estabilidade das enzimas proteolíticas;
- Purificar parcialmente os inibidores de tripsina, por meio da cromatografia de afinidade.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Gênero Hevea

O gênero *Hevea*, pertencente à família Euphorbiaceae, apresenta 11 espécies reconhecidas e de origem amazônica, concentradas em grandes áreas da Amazônia Brasileira e extremos da Amazônia Internacional, presentes em países como Bolívia, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela (SECCO et al. 2012; DE SOUZA,2018). Dentre as espécies do gênero a que mais se destaca é a *Hevea brasiliensis* que apresenta melhor produção de látex comercial e borracha natural (GIREESH et al.,2017).

O aproveitamento das seringueiras como produto comercial, tem levantado uma série de pesquisas com o objetivo de melhorar sua produção, uma vez que são o foco constante de patologias foliares, condições ambientais e a produção de látex. (GALVÃO et al.,2016). Com isso, estudos estão sendo voltados para a propagação de clones mais produtivos, resistentes e tolerantes a doenças fúngicas foliares, uma vez que essa espécie é propagada, principalmente, via enxertia. Porém ainda são necessários o uso de sementes no processo germinativo para a

formação dos porta-enxertos (GARCIA e VIEIRA, 1994).

As sementes apresentam um papel importante para a propagação dessa espécie, e de acordo com Carvalho (2017), as reservas lipídicas de sementes selvagens de *Hevea brasiliensis* chegam a 52%, em contrapartida as sementes de clones apresentam percentual de 42%, o que leva a reconhecê-las como sementes oleaginosas, pela alta fração de lipídeos e pela tendência dessas reservas diminuírem a partir da degradação de triacilgliceróis nos estádios da germinação.

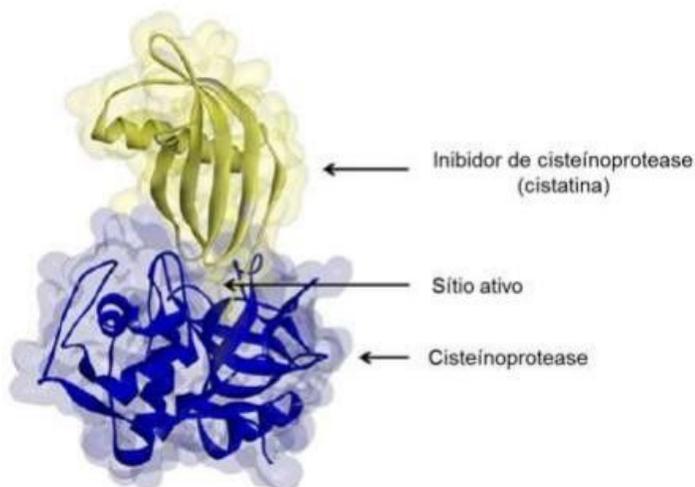
3.2 Inibidores de protease

Os inibidores de protease que possuem origem vegetal têm sido bastante estudados e caracterizados devido aos seus aspectos estruturais e funcionais, e dentre os inibidores mais estudados estão incluídos os que afetam diretamente as serino e cisteínoproteases (RICHARDISON,1991; BHATTACHARYYA et al., 2007). No entanto, novas famílias têm sido criadas devido as novas descobertas com inibidores que apresentam distintas sequências e propriedades bioquímicas (RAWLINGS et al., 2010; OLIVEIRA,2011).

Estudos sobre proteases de plantas e seus inibidores proteicos têm aumentado nas últimas décadas. Grande parte deles visa identificar características fisiológicas e bioquímicas importantes para o entendimento de diversos mecanismos moleculares. Esses inibidores são moléculas que inibem a ação das proteases. Tais moléculas classificam-se pelo mecanismo de ação que apresentam ou pelo tipo de protease que inibem. Uma das aplicações bem elucidadas dos inibidores de proteases de plantas é seu uso no controle de patógenos e pragas. Nesse campo, destacam-se os inibidores de tripsina (BENDRE et al.,2018).

Os inibidores de protease são moléculas capazes de reduzir a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima, o que resulta na construção de um complexo estável que causa um efeito reversível ou irreversível em toda a sua atividade catalítica, através da complementariedade do sítio reativo do inibidor ao sítio ativo da enzima (HABIB e FRAZILI,2007; JOSHI et al., 2013). A formação desse complexo entre enzima e inibidor é dependente da interação dos aminoácidos, sendo então uma interação específica com as enzimas. Essas moléculas são consideradas estáveis sendo elas resistentes à variação de temperatura e pH (JOSHI et al., 2013; SILVA,2010).

Figura 1. Formação de complexo estável entre enzima (cisteínoproteases) e inibidor.



Fonte: (Chevreuil, L. R., 2014).

Em muitas espécies de plantas essas proteínas estão presentes em altas concentrações representando de 5 a 15% do conteúdo de proteínas totais (BHATTACHARYYA et al., 2006; SHEE e SHARMA,2008). As proteases são divididas em 4 classes que são: Serinoproteases, onde se encontram as enzimas tripsina e a quimotripsina), cisteíno, aspártico e metaloproteases. Os inibidores, por sua vez, são classificados de acordo com as enzimas que inibem. Além disso esses inibidores de serinoproteases são encontrados com grande frequência em várias espécies de plantas e em diferentes tecidos desta mesma planta, por isso são os mais estudados com destaque para os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk(BHATTACHARYYA et al., 2007; PRASAD et al., 2010; KLOMKLAO et al.,2011).

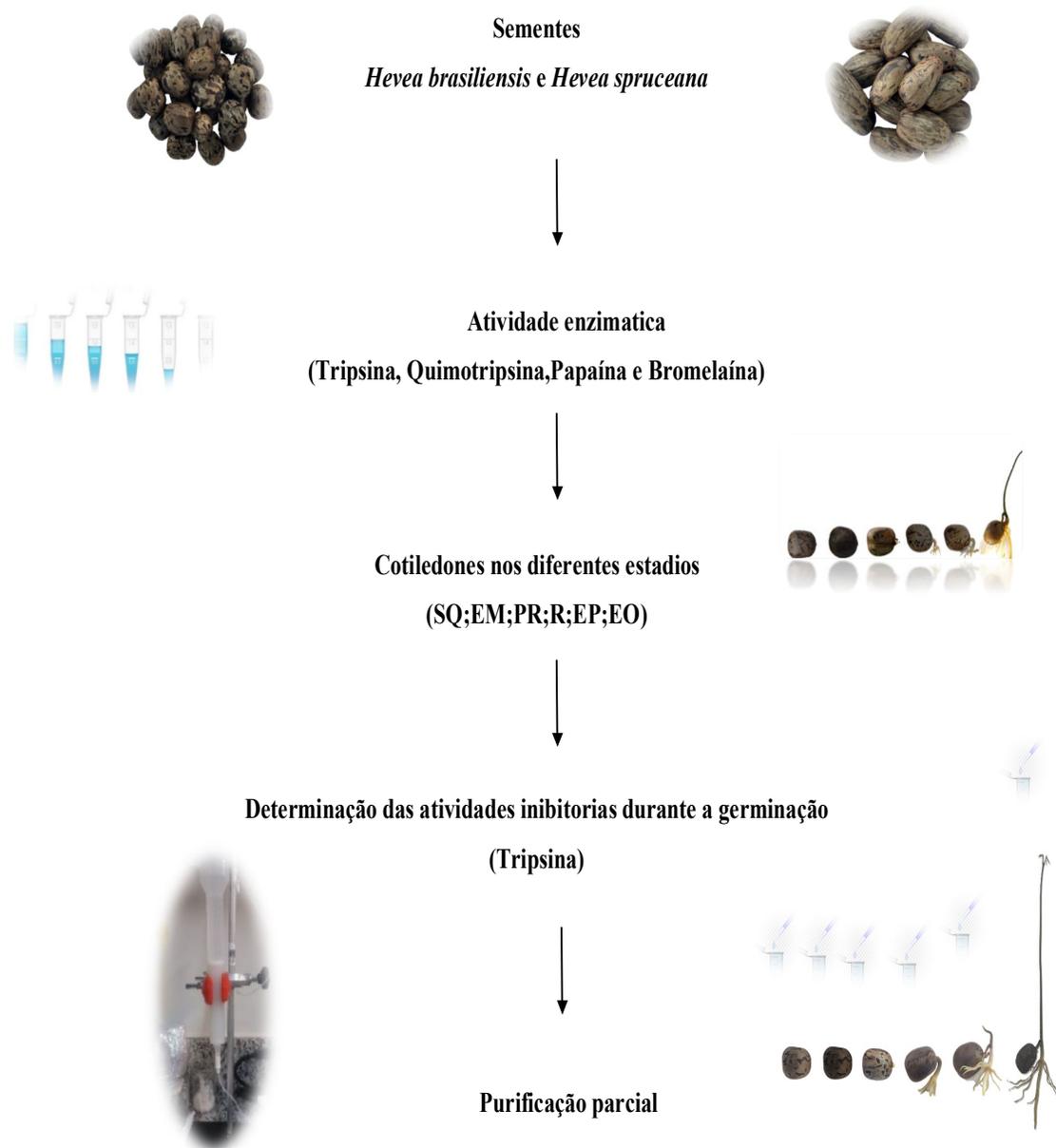
Inibidores do tipo Kunitz, ocorrem predominantemente nas famílias botânicas de Fabaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae e Gramineae, podendo ser encontrados em todas as partes das plantas. Segundo a literatura esses inibidores apresentam cadeia polipeptídica única com massamolecular em torno de 20 kDa. (PRASAD et al.,2010; KLOMKLAO et al., 2011). Os inibidores de Bowman-Birk também são encontrados nas seguintes famílias botânicas, sendo elas a Fabaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae e Gramineae, são caracterizados por apresentarem massa molecular em torno de 8 a 10 kDa e pela presença, de dois domínios ou sítios inibitórios, em alguns casos é possível ser encontrado com 3, 4 ou 8 domínios (RICHARDSON,1991; ZHOU *et al.*, 2008; PRASAD *et al.*, 2010; KUMAR e GOWDA, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa é de natureza aplicada, com abordagens qualitativa, fins descritivos

e procedimentos experimentais, de acordo com o estudo de PROVDANOV e FREITAS (2013).

Figura 2. Fluxograma das principais etapas metodológicas.



Fonte: A autora, 2022.

4.1 Área de coleta

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV), situado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Campus III (INPA/V8)

situado na cidade de Manaus, Amazonas.

4.2 Obtenção do material vegetal

As sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*, foram coletadas no Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (UFAC) e na Embrapa, ambos situados em Rio Branco – AC, em seguida foram conduzidas para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, INPA-LFBV/Campus III.

4.3 Germinação das sementes

As sementes, após assepsia em hipoclorito de sódio 2% durante 2 minutos, foram acondicionadas em bandejas plásticas utilizando areia lavada como substrato e, colocadas para germinar em casa de vegetação à temperatura ambiente em torno de 29 e 30 °C, com acompanhamento e contagem diária. Após serem postas para semear, foi feita a coleta de 10 sementes em cada estádio estudado, sendo eles: Semente quiescente (SQ); Semente embebida (EM); Primórdios radiculares (PR); Raízes (R); Epicótilo (EP); Eófilo (EO). Totalizando 60 sementes. Essas sementes foram coletadas, lavadas e submetidas aos mesmos procedimentos de congelamento que as demais sementes quiescentes previamente reservadas.

4.4 Beneficiamento das sementes

A preparação das amostras consiste na retirada dos tegumentos (testa e tégmen) das sementes, após isso serão liofilizadas e trituradas em moinho de facas analítico, até a obtenção de material finamente pulverizado. As amostras trituradas foram tratadas com Hexano na proporção de 1: 6(m/v) para a retirada dos lipídeos. Após quatro trocas em intervalos de 12 h, o Hexano é removido e o material seco por 24 h a 30 °C sob fluxo de ar forçado.

4.5 Extração de Lipídeos

A extração dos lipídeos para a obtenção da massa seca e desengordurada, foi feita segundo o método modificado de Soares et al. (2015). Onde os tecidos liofilizados são triturados em moinho analítico (Cadance, modelo MDR302) até serem obtidos 50 g de material finamente pulverizado. O tratamento irá prosseguir com a adição de 20 mL do extrato Hexano (Sigma) em temperatura ambiente (25 °C) à amostra pulverizada. A mistura obtida será então homogeneizada em agitador magnético (Iuchi, modelo HPS-100P) durante 2 h e submetida a precipitação por 30 min. O precipitado coletado será acondicionado em tubos Falcon para secagem em estufa durante 24 h a 30 °C, objetivando-se a vaporização do extrator

e obtenção da massa seca.

4.6 Extração e quantificação de proteínas solúveis

O material finamente pulverizado, proveniente das sementes desengorduradas, foi submetido a extração salina em Tris HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,15M (10% p/v). A extração acontece sob homogeneização durante 2 h à temperatura ambiente (26 ± 3 °C), seguida de centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos a 6 °C. O sobrenadante será dialisado contra água destilada durante 72 h, para retirada do sal, e liofilizado, resultando no extrato proteico seco.

4.7 Determinação de atividades inibitórias

4.7.1. Detecção de temperatura ótima

A determinação da temperatura ótima para o ensaio será realizada utilizando 50 mg da farinhadesengordurada, diluída em 100 µL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 as amostras serão vortexizadas e submetidas a temperaturas crescentes de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60,70,80,90 e 100°C em banho-maria. Todos os testes serão realizados em triplicatas.

4.7.2 Detecção da atividade proteolítica total

A atividade proteolítica total foi estimada a partir de ensaio enzimático contendo 300 µl (50 mg/mL em acetato de sódio 50 mM pH 5,0) das amostras de material fresco, que serão pré-incubadas com 40 µl de DTT 3 mM durante 10 min a 37 °C, 200 µl de azocaseína 1 % e o volume ajustado para 500 µl com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Após 60 min a 37 °C, a reação será paralisada com adição de 300 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. É utilizado controle positivo com enzima tripsina e branco contendo o meio de reação com adição da azocaseína após a paralisação da reação. Os tubos serão centrifugados (10.000 rpm por 10 minutos 25 °C) e 400 µL do sobrenadante será alcalinizado com 400 µL de uma solução de Hidróxido de Sódio 2 N, e a absorbância medida por espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm.

4.7.3. Detecção da atividade de inibição da Tripsina

A inibição da tripsina foi detectada por meio de ensaio enzimático contendo 290 µL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5; 10 µL de solução de tripsina (0,1 mg/mL, Sigma) e 200 µL da amostra. A mistura foi pre-incubada durante 30 minutos a 37 °C e, em seguida, acrescentou-se 200 µL do substrato de Azocaseína (Sigma) 1 %, prosseguindo a incubação por mais 30 minutos

a 37 °C. Após 60 minutos a 37 °C, a reação será paralisada com a adição de 300 µL de Ácido tricloroacético (TCA) 10 %, onde após essa paralisação, será adicionado azocaseína no branco da reação. Os tubos serão centrifugados (10.000 rpm por 10 minutos 25 °C) e 400 µL do sobrenadante será alcalinizado com 400 µL de uma solução de Hidróxido de Sódio 2 N. A absorbância será medida em espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido quando as reações foram interrompidas. O cálculo da atividade inibitoria foi obtido a partir da determinação da atividade residual da tripsina no ensaio, de acordo com Erlanger et al., (1961).

4.7.4 Detecção da atividade de inibição da Quimotripsina

A inibição da quimotripsina foi detectada por meio de ensaio enzimático contendo 290 µL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5; 10 µL de solução de quimotripsina (0,2 mg/mL, Sigma) e 200 µL da amostra. A mistura foi pr-e-incubada durante 30 minutos a 37 °C e, em seguida, acrescentou-se 200 µL do substrato de Azocaseína (Sigma) 1 %, prosseguindo a incubação por mais 30 minutos a 37 °C. Após 60 minutos a 37 °C, a reação será paralisada com a adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %, onde após essa paralisação, será adicionado azocaseína no branco da reação. Os tubos serão centrifugados (10.000 rpm por 10 minutos 25 °C) e 400 µL do sobrenadante será alcalinizado com 400 µL de uma solução de Hidróxido de Sódio 2 N. A absorbância será medida em espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido quando as reações foram interrompidas. O cálculo da atividade inibitoria foi obtido a partir da determinação da atividade residual da quimotripsina no ensaio, de acordo com Erlanger et al., (1961).

4.7.5. Detecção da atividade de inibição da Papaína

A inibição da papaína foi detectada por meio de ensaio enzimático contendo 290 µL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5; 10 µL de solução de papaína (0,1 mg/mL, Sigma) e 200 µL da amostra. A mistura foi pre-incubada durante 30 minutos a 37 °C e, em seguida, acrescentou-se 200 µL do substrato de Azocaseína (Sigma) 1 %, prosseguindo a incubação por mais 30 minutos a 37 °C. Após 60 minutos a 37 °C, a reação será paralisada com a adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %, onde após essa paralisação, será adicionado azocaseína no branco

da reação. Os tubos serão centrifugados (10.000 rpm por 10 minutos 25 °C) e 400 µL do sobrenadante será alcalinizado com 400 µL de uma solução de Hidróxido de Sódio 2 N. A absorbância será medida em espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e, paracada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido quando as reações foram interrompidas.

4.7.6. Detecção da atividade de inibição da Bromelaína

A inibição da bromelaína foi detectada por meio de ensaio enzimático contendo 290 µL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5; 10 µL de solução de bromelaína (0,1 mg/mL, Sigma) e 200 µL da amostra. A mistura foi pre-incubada durante 30 minutos a 37 °C e, em seguida, acrescentou-se 200 µL do substrato de Azocaseína (Sigma) 1 %, prosseguindo a incubação por mais 30 minutos a 37 °C. Após 60 minutos a 37 °C, a reação será paralisada com a adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %, onde após essa paralisação, será adicionado azocaseína no branco da reação. Os tubos serão centrifugados (10.000 rpm por 10 minutos 25 °C) e 400 µL do sobrenadante será alcalinizado com 400 µL de uma solução de Hidróxido de Sódio 2 N. A absorbância será medida em espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e, paracada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido quando as reações foram interrompidas.

4.8. Purificação parcial dos inibidores de tripsina

Os extratos proteicos, foram submetidos a cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose 4B (6,0 cm x 1,5 cm) contendo 7 mL de resina CNBr- Sepharose 4B e tripsina bovina acoplada e equilibrada em Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Frações de 2 mL foram coletadas por meio de coletor de frações a um fluxo de 40 mL/h. A fração de interesse (Pico Retido) foi eluído com HCl 5 mM. As leituras das frações coletadas serão realizadas em espectrofotômetro a 280 nm (Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences). No geral, foram realizadas 30 cromatografias de cada espécie, totalizando 60 cromatografias.

4.9. Delineamento experimental e Análises estatísticas

Foi realizado o Delineamento inteiramente casualizado (DIC), no experimento de germinação, onde foram usados 4 repetições de 25 sementes cada. Para as atividades enzimáticas foram utilizadas 20 sementes de cada estágio germinativo. Para a purificação

parcial foram usadas 300 sementes, sendo 150 sementes de *H. brasiliensis* e 150 sementes de *H. spruceana*. As análises realizadas foram médias, desvio padrão e análises comparativas dos espectros de cromatografia. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 9.0 e os gráficos obtidos a partir do Programa SigmaPlot 12.0.

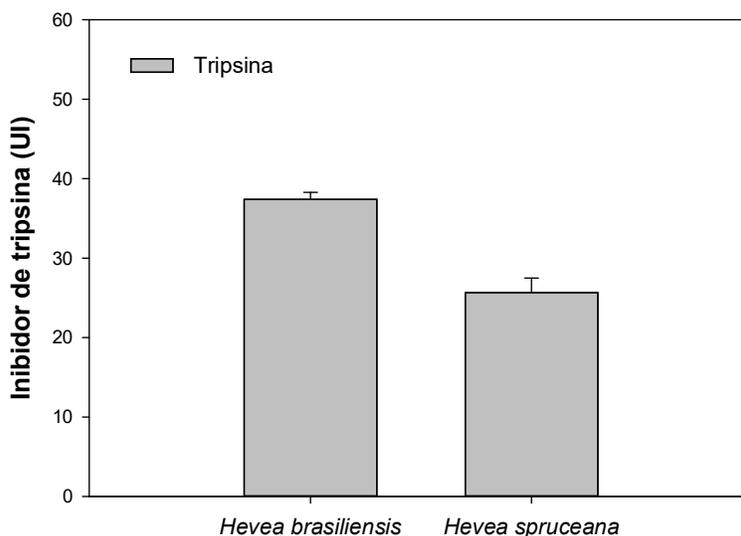
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade de inibição das principais classes de proteínas

Para a realização da atividade inibitória foram selecionadas as sementes quiescentes das espécies *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*, a partir do resultado da atividade inibitória a enzima que se mostrou mais ‘ativa’ foi selecionada como a norteadora do estudo. Mediante aos resultados das atividades de inibitórias, as sementes foram colocadas para semear sob 6 estágios germinativos, sendo eles: Semente quiescente (SQ); Semente embebida (EM); Primórdios radiculares (PR); Raízes (R); Epicótilo (EP); Eófilo (EO).

As atividades inibitórias das sementes quiescentes de *H. brasiliensis* e *H. spruceana* foram investigadas em diferentes enzimas, sendo elas a enzima Tripsina (Figura 3), Quimotripsina (Figura 4), Papaína (Figura 5) e Bromelaína (Figura 6). Na Figura 3 podemos observar demasiada atividade inibitória das duas espécies sob a enzima tripsina bovina, uma serinoprotease, isso acontece devido ao seu alto grau de afinidade com a enzima. No entanto, a espécie *Hevea brasiliensis* apresenta maior atividade quando comparada a espécie *Hevea spruceana*, provavelmente por possuir maior afinidade.

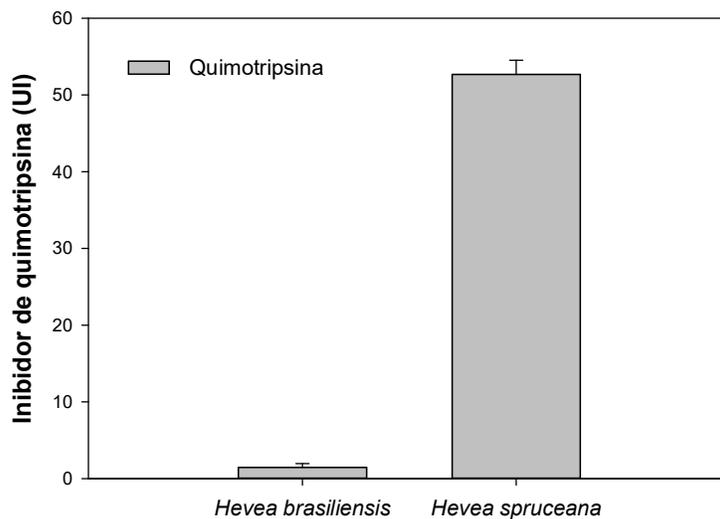
Figura 3. Atividade de inibição da tripsina em sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*.



Fonte: A autora, 2022.

Na Figura 4, podemos observar que a espécie *H. spruceana* apresentou alta atividade sob a enzima quimotripsina, quase que 90% superior a espécie *H. brasiliensis* que apresentou baixa atividade.

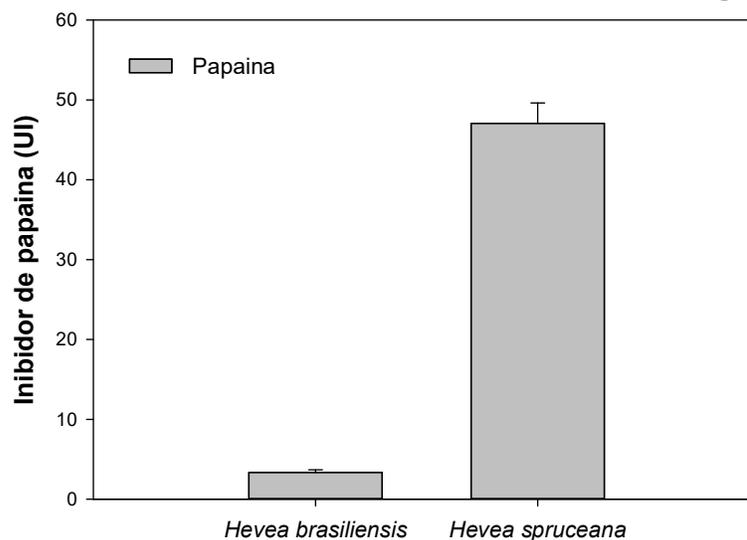
Figura 4. Atividade de inibição da quimotripsina em sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*.



Fonte: A autora, 2022.

Na Figura 5 podemos observar que a espécie *H. spruceana* apresentou alta atividade sob a enzima Papaína, e que o mesmo não é observado para a espécie *H. brasiliensis* que apresentou baixa atividade sob a enzima.

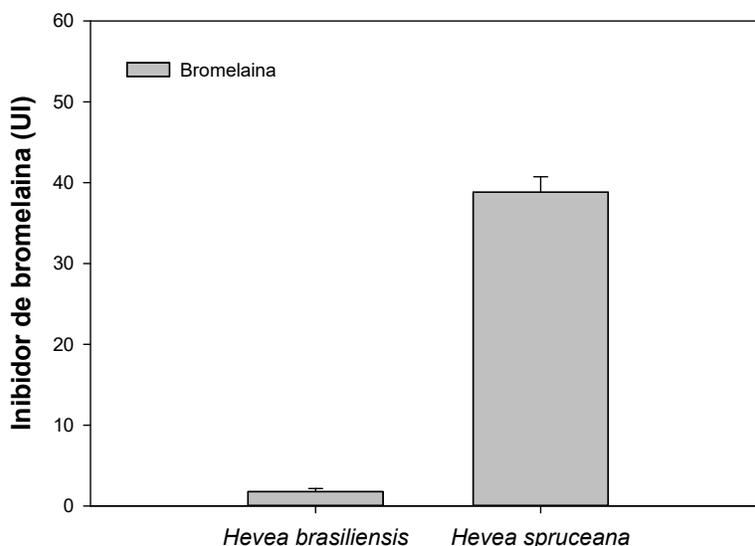
Figura 5. Atividade de inibição da papaína em sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*.



Fonte: A autora, 2022.

Na Figura 6 podemos observar que a espécie *H. spruceana* também apresentou alta atividade inibitoria sob a enzima Bromelaína, o mesmo não é observado para a espécie *H. brasiliensis* que apresentou baixa atividade sob a enzima.

Figura 6. Atividade de inibição da bromelaína em sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*.



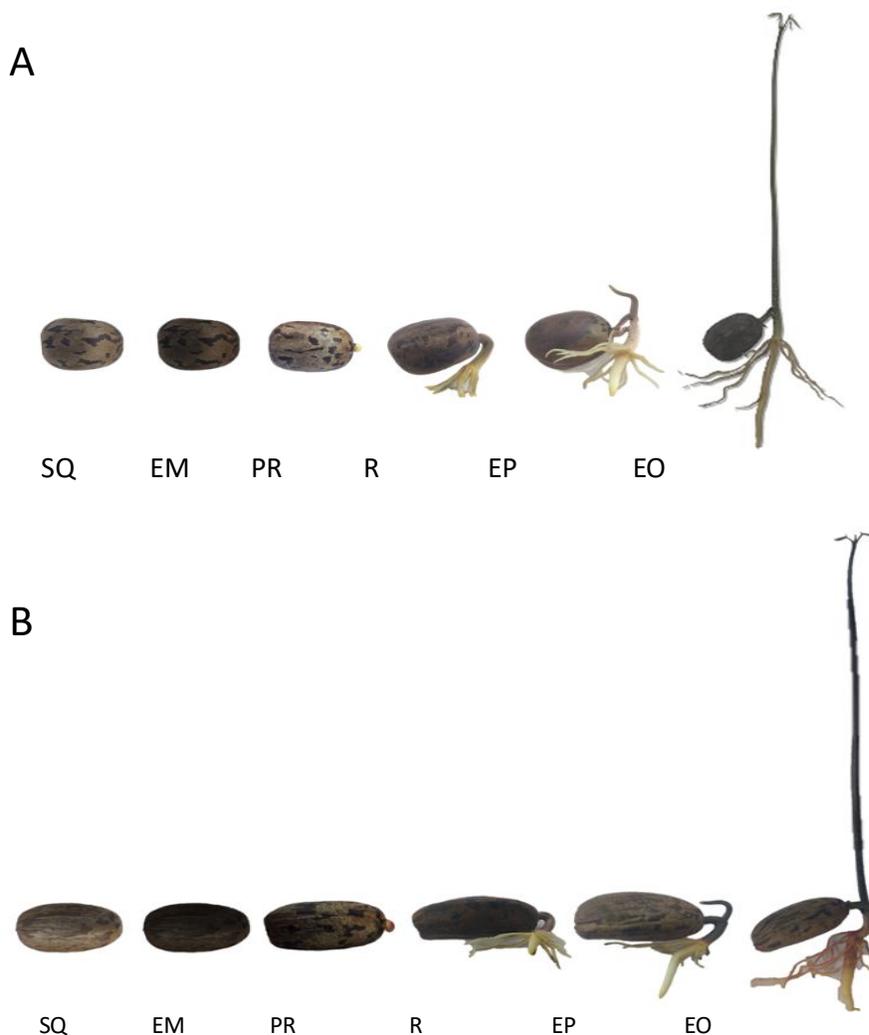
Fonte: A autora, 2022.

Diante dos dados da atividade enzimática das duas espécies observadas, identificamos que a espécie *H. brasiliensis* apresentou atividade satisfatória apenas para a enzima tripsina, essa afirmação é consistente quando comparada aos dados obtidos por Musor et al. (2008) que relatou que o IP recombinante, produto de um gene que codifica o inibidor de protease de *H. brasiliensis* (*Hb*-PI), é específico para tripsina. De acordo com o estudo anterior sobre a purificação de um inibidor de protease (PI) da suspensão de células de *Hevea brasiliensis* e seu efeito sobre o crescimento de *P. palmivora* (Bunyatang et al., 2013), possui forte atividade inibitória contra a tripsina, mas não contra a quimotrisina e papaína. No entanto, a espécie *H. spruceana* apresentou alta atividade sob todas as enzimas, porém teve um valor expressivo sob a enzima tripsina.

5.2 Atividade de inibição de tripsina durante a germinação

A atividade inibitória de tripsina foi investigada em diferentes estádios da germinação dos dois genótipos selvagens *H. brasiliensis* (figura 7) e *H. Spruceana* (figura 8). Esses estádios representam as fases iniciais da germinação das sementes.

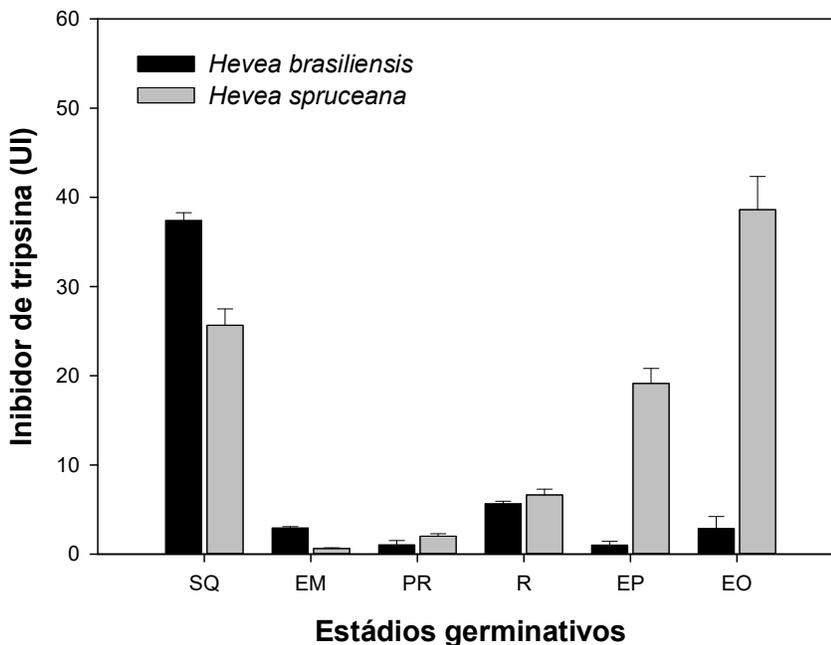
Figura 7. Estádios germinativos de *Hevea brasiliensis* (A) e *Hevea spruceana* (B). Legenda: Semente quiescente (SQ); Semente embebida (EM); Primórdios radiculares (PR); Raízes (R); Epicótilo (EP); Eófilo (EO).



Fonte: A autora, 2022.

Em todos os estádios da germinação dos dois genótipos observamos a presença de inibidores, dando destaque para a espécie *H. spruceana*, que apresentou aumento da atividade dos inibidores de tripsina no estágio de alongamento das raízes e uma atividade mais expressiva no estágio de emergência da plântula. A espécie de *H. brasiliensis* não apresentou estabilidade da atividade durante o processo de germinação, no entanto apresentou uma atividade bastante expressiva no estágio inicial, de semente quiescente (SQ) (Figura 8). Esses resultados mostram estratégias distintas entre esses genótipos para a inibição de tripsina ao longo da germinação e o crescimento inicial das plântulas. Essas proteínas são sintetizadas a partir da EP, ao passo que essas proteínas podem estar sendo associadas a produção de latex (GOMES, 2016).

Figura 8. Atividade de inibidor de tripsina durante a germinação em espécies do gênero *Hevea* spp. Legenda: Semente quiescente (SQ); Semente embebida (EM); Primórdios radiculares (PR); Raízes (R); Epicótilo (EP); Eófilo (EO).



Fonte: A autora, 2022.

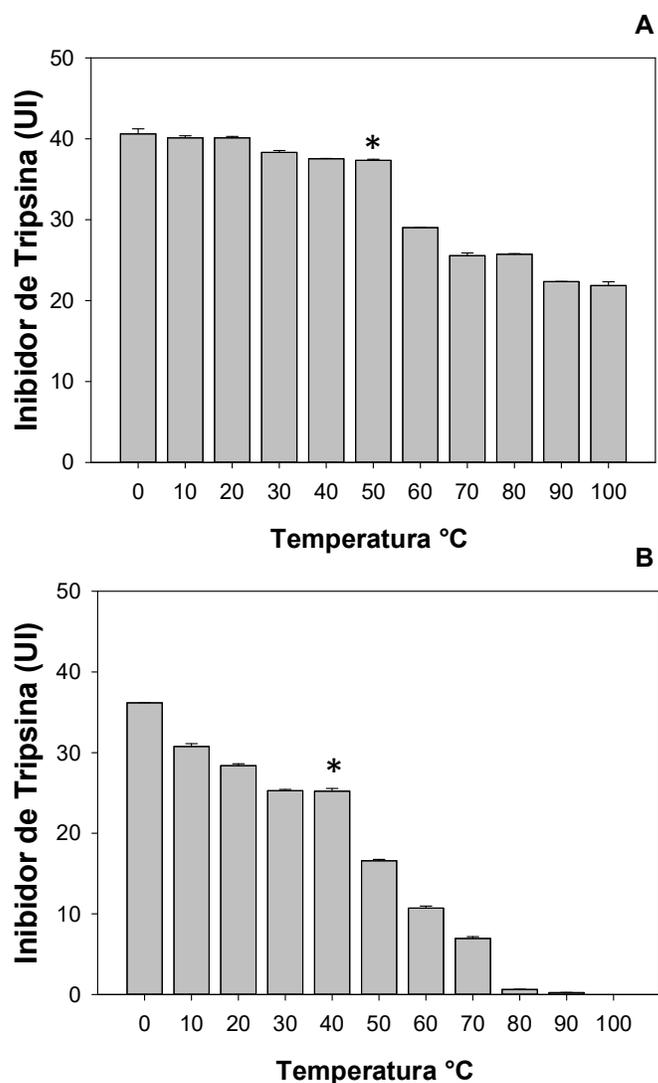
Podemos observar que há atividade de inibidores de tripsina durante todo o processo de germinação, onde as maiores atividades inibitorias são observadas no estádio inicial de semente quiescente (SQ) para ambas as espécies, porém para a espécie *H. spruceana* foi detectada alta atividade no estádio de semente quiescente (SQ) e na emissão do Eófilo (EO), as diferenças das atividades inibitórias podem estar associadas aos diferentes genótipos e estádios de desenvolvimento das plântulas. Segundo Gomes (2016) existe um acúmulo de metabolitos durante a emissão da R. Apesar desses inibidores serem encontrados com maior abundância nas sementes, eles também podem ser encontrados em outros tecidos vegetais (VANDERJAGT *et al.* 2000).

Importante ressaltar, que as proteases são enzimas-chave, importantes na mobilização de proteínas durante a germinação, uma vez que promovem a hidrólise de proteínas de reserva. Os IPs são proteínas regulatórias nos processos proteolíticos, uma vez que reduzem a velocidade da reação que é catalisada pela enzima. Diante disso, os IPs são de extrema importância para a regulação da mobilização de proteínas de reserva, pois eles evitam a hidrólise prematura (BEWLEY *et al.* 2013; JOSHI *et al.* 2013).

5.3. Estabilidade do inibidor de tripsina em sementes

O caracter bioquímico que se refere a estabilidade de temperatura deste IP obtido também foi determinado. Foi estável até 40°C para a espécie *H. brasiliensis* (Figura 2A). A espécie *H. spruceana* apresentou estabilidade em 30°C (Figura 2B), mostrando que essas moléculas não são consideradas termoestáveis. Isso concorda com os resultados de Sritanyarat *et al.* (2006) que relataram que todos os 3 iso-inibidores de HPI são relativamente ativos após incubação a 90 °C por 2 h, mas se mostram com alta atividade com uma incubação de até 50°C.

Figura 9. Ensaio de estabilidade do inibidor de tripsina em sementes de espécies do gênero *Hevea* spp. (A) *Hevea brasiliensis*. (B) *Hevea spruceana*. (*) melhor estabilidade do inibidor.



Fonte: A autora, 2022.

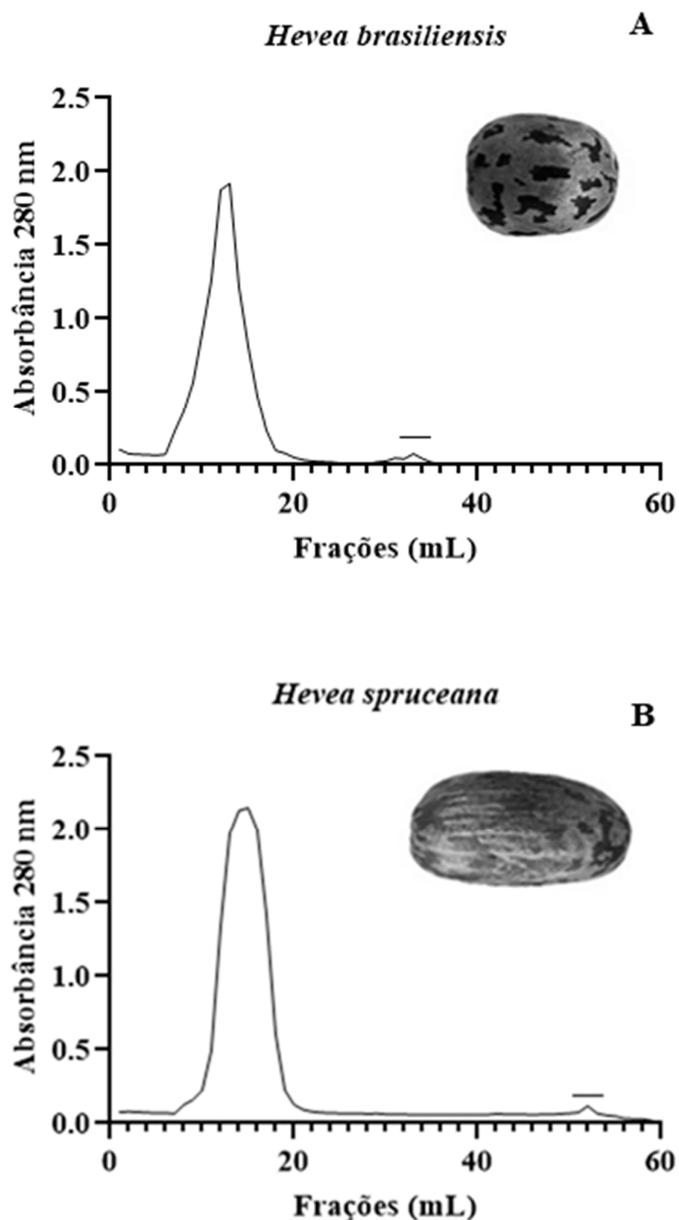
5.4 Purificação parcial dos inibidores de tripsina

Para a purificação parcial dos extratos proteicos foram selecionadas as espécies que mantiveram maior atividade inibitória, *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*. As espécies apresentaram afinidade com a enzima tripsina, logo o extrato proteico parcialmente purificado das sementes de *H. brasiliensis* e *H. spruceana* apresentaram dois picos distintos. O primeiro pico corresponde às proteínas que não interagiram com a tripsina imobilizada na coluna a Fração Não Retida (FNR) e o segundo pico refere-se às proteínas com afinidade de interação, a Fração Retida (FR), tratando-se, possivelmente, de inibidores de tripsina (Figura 10 A). A purificação parcial dos inibidores de tripsina envolveu uma etapa cromatográfica proveniente da tripsina-Sepharose (afinidade). Dentre as técnicas cromatográficas, destaca-se a cromatografia de afinidade, pela qual propriedades biológicas específicas podem ser exploradas, com destaque a sua alta capacidade de purificação de inibidores de proteases, além de permitir uma rápida absorção para análises como: bioinceticidas, bionematicida, bactericida (Santos *et al.* 2012).

Mediante o ensaio de inibição de tripsina, foi verificada elevada atividade nas frações retidas das espécies avaliadas, sendo superior nas amostras de *H. spruceana* (Figura 10 B). A cromatografia foi eficiente para a purificação parcial dos extratos proteicos. Contudo, observa-se que a espécie *H. spruceana* destaca-se por apresentar demasiada atividade inibitória, bem como maior rendimento proteico, provavelmente, por possuir grande quantidade de inibidores proteolíticos, quando comparado a espécie *H. brasiliensis* que apresentou baixa atividade inibitória (Figura 10 A).

Tanto a quantidade de inibidores encontrados em sementes de *H. brasiliensis* quanto de *H. spruceana* são poucos quando comparadas a outras espécies como as pertencentes a família Fabaceae, uma vez que existem cerca de 6.720 inibidores derivados de plantas, e a família Euphorbiaceae está no grupo das 22 famílias mais importantes, esse grupo corresponde a 93,4% dos inibidores registrados. No entanto a família Euphorbiaceae apresenta 93 inibidores identificados, que equivale a cerca de 1,4% do total registrado (Hellinger e Gruber, 2019). Isso nos leva a pensar que são poucos os estudos com inibidores mapeados na família Euphorbiaceae.

Figura 10. Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B do extrato protéico aquecido de sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana*. Tampão de eluição: HCl 0,100 M.



Fonte: A autora, 2022.

6 CONCLUSÃO

Os inibidores de proteases estão presentes em sementes durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas de genótipos selvagens *H. brasiliensis* e *H. spruceana*, e possuem grande afinidade com a enzima tripsina. Inibidores de tripsina provenientes de espécies do gênero *Hevea* apresentaram baixa estabilidade térmica (30 a 40 °C) e estão

diretamente relacionados ao tipo de espécie. Acredita-se que seja necessário utilizar sementes no início de germinação ou sementes quiescentes para que se possa identificar e purificar o Inibidor de protease de *H. brasiliensis* e *H. spruceana*. Apesar disso, os resultados lançam luz nas abordagens a serem utilizadas em estudos futuros, os quais se fazem necessários. Vale ressaltar que esse estudo é o primeiro a mapear inibidores de protease em sementes de espécies do gênero *Hevea* spp.

7 REFERÊNCIAS

BANGRAK, Phuwadol; CHOTIGEAT, Wilaiwan. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex. **Plant physiology and biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 244-250, 2011.

BARROSO, Graziela Maciel et al. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. **Viçosa: Ufv**, v. 443, 1990.

BENDRE, AD, Ramasamy S, Suresh CG. Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018; v. 27, n. 113: 933-943

BEWLEY, J. Derek et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer Science & Business Media, 2012.

BEWLEY J.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M.; Nonogaki, H. 2013. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. (3rd edn) (Springer: New York).

BHATTACHARYYA, Arindam et al. Um inibidor de Kunitz proteinase de sementes de *Archidendron ellipticum*: purificação, caracterização e propriedades cinéticas. **Phytochemistry**, v. 67, n. 3, pág. 232-241, 2006.

BHATTACHARYYA, Arindam; RAI, Shruti; BABU, CR Inibidor de tripsina e quimi tripsina de sementes de *Caesalpinia bonduc*: isolamento, caracterização parcial e propriedades inseticidas. **Fisiologia vegetal e bioquímica**, v. 45, n. 3-4, pág. 169-177, 2007.

BUNYATANG, Orawan; CHIRAPONGSATONKUL, Nion; CHURNGCHOW, Nunta. Purification of a Protease Inhibitor from *Hevea brasiliensis* cell suspension and its effect on the growth of *Phytophthora palmivora*. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 185-192, 2013.

CARVALHO, Josiane Celerino de. Caracterização morfofuncional e mobilização de reservas primárias durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR de Juss.) Muell. Arg. 2017.

CHEVREUIL, Larissa Ramos. Purificação, caracterização química e atividade de proteases e inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*. Orientador: Jose Francisco de Carvalho Gonçalves. 2014. 119 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2014.

COTABARREN, Juliana et al. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, v. 292, p. 110398, 2020.

ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. A preparação e propriedades de dois novos substratos cromogênicos de tripsina. *Arquivos de bioquímica e biofísica*, v. 95, n. 2, pág. 271-278, 1961.

GARCIA, ANICE; VIEIRA, ROBERVAL DAITON. Germinação, armazenamento e tratamento fungicida de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Revista Brasileira de Sementes, Londrina**, v. 16, n. 2, p. 128-133, 1994.

GIREESH, T.; MEENAKUMARI, T.; MYDIN, Kavitha K. Fast track evaluation and selection of *Hevea brasiliensis* clones from a clonal nursery. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 195-201, 2017.

Gomes, L. R. (2016). Mobilização de Proteínas de Reserva Durante a Germinação de *Hevea brasiliensis*. In *Anais do V Congresso de Iniciação do INPA-CONIC*.

GONÇALVES, Paulo de Souza et al. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 131-138, 2002.

HABIB, Huma; FAZILI, Khalid Majid. Inibidores de protease de plantas: uma estratégia de defesa em plantas. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n. 3, pág. 68-85, 2007.

HARTL, Markus et al. As múltiplas funções dos inibidores de serina protease de plantas: defesa contra herbívoros e além. **Sinalização e comportamento de plantas**, v. 6, n. 7, pág. 1009-1011, 2011.

HELLINGER, Roland; GRUBER, Christian W. Inibidores de protease à base de peptídeos de plantas. *Descoberta de drogas hoje*, v. 24, n. 9, pág. 1877-1889, 2019.

JOSHI, Rakesh S. et al. Complementação de interações intramoleculares para estabilidade estrutural-funcional de inibidores de serina proteinase de plantas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Affairs**, v. 1830, n. 11, pág. 5087-5094, 2013.

KHODAEI, Diako; CARLOS, Á.; MULLEN, Anne Maria. Biodegradable Packaging Materials from Animal Processing Co-Products and Wastes: An Overview. *Polymers*, [S. l.], 2021.

KLOMKLAO, Sappasith et al. Extração, purificação e propriedades do inibidor de tripsina do feijão-mungo tailandês (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Química Alimentar**, v. 129, n. 4, pág. 1348-1354, 2011.

KUHAR, Kalika et al. Cloning, characterization and expression analysis of a novel gene encoding Kunitz-type protease inhibitor from *Dolichos biflorus*. **3 Biotech**, v. 2, n. 3, p. 199-209, 2012.

KUMAR, Vinod; GOWDA, Lalitha R. Produção de inibidor de Bowman-Birk (*Dolichos biflorus*) por um sistema de purificação de proteína mediada por intein. **Protein Expression and Purification**, v. 89, n. 1, pág. 16-24, 2013.

LI, Dejun et al. As análises do transcriptoma revelam o mecanismo molecular subjacente à secura do painel de drenagem da seringueira (*Hevea brasiliensis*). **Relatórios científicos**, v. 6, n. 1, pág. 1-10, 2016.

MACEDO, Maria Lígia Rodrigues et al. Caracterização prática e teórica do inibidor *Inga laurina* Kunitz no controle de *Homalinotus coriaceus*. **Bioquímica e Fisiologia Comparada Parte B: Bioquímica e Biologia Molecular**, v. 158, n. 2, pág. 164-172, 2011.

MAGNI, Chiara et al. Identificação em sementes de tremoço de uma atividade serina-endopeptidase clivando entre pares gêmeos de arginina e causando proteólise limitada de proteínas de armazenamento de sementes. **Molecular plant**, v. 5, n. 5, pág. 1011-1019, 2012.

MAŁECKI, Jan; MUSZYŃSKI, Siemowit; SOŁOWIEJ, Bartosz G. Proteins in Food Systems Bionanomaterials, Conventional and Unconventional Sources, Functional Properties, and Development Opportunities. *Polymers*, [S. l.], v. 13, n. 15, p. 2506, 2021.

MATHIEU, Chantal; MARTENS, Pieter-Jan; VANGOITSENHOVEN, Roman. One hundred years of insulin therapy. *Nature Reviews Endocrinology*, [S. l.], v. 0123456789, 2021. 46

MOSOLOV, VV; VALUEVA, TA Inibidores da proteinase e sua função em plantas: uma revisão. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 3, pág. 227-246, 2005.

NAING, Aung Htay; KIM, Chang Kil. A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering. *3 Biotech*, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1–9, 2019.

OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho de et al. Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia*. 2011.

PRASAD, ER; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Purificação e caracterização de um inibidor de proteinase Bowman-Birk a partir de sementes de grama preta (*Vigna mungo*). **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, pág. 363-372, 2010.

PROVDANOV, C. C.; FREITAS, ECD. Metodologia do trabalho científico: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico. [Sl: sn], 2013. 276 p.

RAWLINGS, Neil D .; BARRETT, Alan J .; BATEMAN, Alex. MEROPS: o banco de dados de peptidase. **Pesquisa de ácidos nucleicos**, v. 38, n. suppl_1, pág. D227-D233, 2010.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Amino acids, proteins and nucleic acids**, 1991.

ROCHAT, Wuttichai et al. Óleo de semente de borracha como matéria-prima não comestível potencial para produção de biodiesel usando catalisador heterogêneo na Tailândia. **Energia renovável**, v. 101, p. 937-944, 2017.

SABOTIČ, Jerica; KOS, Janko. Inibidores de protease microbiana e fúngica - aplicações atuais

e potenciais. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 93, n. 4, pág. 1351-1375, 2012.

SANTOS, Fernando A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química nova*, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SECCO, R. de S. A botânica da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. Jussieu) Müll.Arg.). **Seringueira. EPAMIG, Viçosa. 894p**, 2008.

SECCO, Ricardo de S. et al. Uma visão geral dos estudos taxonômicos recentes sobre Euphorbiaceae sl no Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, pág. 227-242, 2012.

SHEE, Chandan; SHARMA, Ashwani Kumar. Propriedades de armazenamento e afinidade do inibidor de tripsina *Murraya koenigii*. **Química alimentar**, v. 107, n. 1, pág. 312-319, 2008.

SILVA, Desireé Soares da et al. Efeito do inibidor de tripsina de sementes de *Adrenanthera pavonina* sobre os lepidopteros *Anticarsia gemmatalis* e *Anagasta kuehniella*. 2010.

SOARES, AMS et al. Um extrato de proteína e uma fração enriquecida com inibidor de protease de cisteína da torta de semente de *Jatropha curcas* têm atividade anti-Toxoplasma gondii in vitro. **Parasitologia experimental**, v. 153, p. 111-117, 2015.

DE SOUZA, Clemeson Silva. Caracterização da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira. **Embrapa Acre-Tese/dissertação (ALICE)**, 2018.

SRITANYARAT, Wannapa et al. Isolamento e caracterização de iso-inibidores da família dos inibidores de protease I da batata do látex da seringueira, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 15, pág. 1644-1650, 2006.

VANDERJAGT, DJ; FREIBERGER, C.; Vu, HTN; Mounkaila, G.; Glew, RS; Glew, RH 2000. O conteúdo de inibidor de tripsina de 61 alimentos vegetais silvestres comestíveis do Níger. **Alimentos vegetais para nutrição humana**, 55: 335-346.

XAVIER-FILHO, J. et al. Baixa correlação entre os níveis de inibidores de proteinase encontrados em sementes de diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e a resistência / suscetibilidade à predação por *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 4, pág. 1139-1143, 1989.

ZHOU, Jia-Yu et al. Identificação de um inibidor de Kunitz de *Albizia kalkora* e seu efeito inibitório contra proteases do intestino médio de pragas. **Cartas de biotecnologia**, v. 30, n. 8, pág. 1495-1499, 2008.