



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CLÁUDIO ALBERTO ALVES DA ROCHA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E INIBIDORES DE TRIPSINA DE FOLHAS E
RAMOS DE *Jacaranda rugosa* E CAULE DE *Pilosocereus gounellei***

Recife
2019

CLÁUDIO ALBERTO ALVES DA ROCHA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E INIBIDORES DE TRIPSINA DE FOLHAS E
RAMOS DE *Jacaranda rugosa* E CAULE DE *Pilosocereus gounellei***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Rocha Filho, Cláudio Alberto Alves da
Identificação e determinação de atividades biológicas de metabólitos secundários e inibidores de tripsina de folhas e ramos de *Jacaranda rugosa* e caule de *Pilosocereus gounellei* / Cláudio Alberto Alves da Rocha Filho - 2019.
101 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva
Coorientador: Thiago Henrique Napoleão
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências e anexo.

1. *Jacaranda rugosa* 2. *Pilosocereus gounellei* 3. Atividade antimicrobiana
I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.) II. Napoleão, Thiago Henrique (coorient.) III. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-213

CLÁUDIO ALBERTO ALVES DA ROCHA FILHO

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E INIBIDORES DE TRIPSINA DE FOLHAS E
RAMOS DE *Jacaranda rugosa* E CAULE DE *Pilosocereus gounellei***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas.

Aprovada em: 20 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maiara Celine de Moura (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus familiares, os grandes incentivadores dessa longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar ao meu lado sempre, ele que sempre foi o autor da minha vida e do meu destino. O maior apoio nos momentos difíceis.

Aos meus pais Cláudio Alberto Alves da Rocha e Maria Veronica Borges da Rocha pelo amor, carinho e incentivo dado nessa trajetória. Sem eles não chegaria aonde cheguei.

À minha irmã Maiara Borges da Rocha que não mediu esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida.

À minha namorada Mariana Duarte pelo amor e carinho dados nessa caminhada, a grande responsável por me incentivar todos os dias com palavras de apoio.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pela excelente supervisão e orientação; ao longo desses anos adquiri um vasto conhecimento na área trabalhando ao seu lado.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão pelo exemplo de professor/pesquisador que é; sempre esteve à disposição para me auxiliar nessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual pelo acolhimento e ensinamentos logo quando cheguei ao laboratório.

A Genecy Frazão e família pela amizade, amor e carinho.

Aos colegas de laboratório por tornar o clima de trabalho mais leve e amigável.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica pela assistência quando requisitada.

Aos amigos de Graduação, que apesar da distância, nunca deixaram de incentivar a minha trajetória na pós-graduação.

Aos colegas de bairro pelos momentos de divertimento e descontração.

A todos que apoiaram de alguma forma a minha trajetória acadêmica.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FACEPE pelo auxílio financeiro.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação (BEAUVOIR, S., 2009).

RESUMO

Inibidores de protease de natureza proteica são descritos como agentes antimicrobianos e metabólitos secundários de plantas são apontados como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios. A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e grande parte do seu patrimônio biológico não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo. Para a realização do presente trabalho, duas plantas da Caatinga foram selecionadas com o intuito de explorar suas potencialidades farmacológicas: *Pilosocereus gounellei* (xiquexique) e *Jacaranda rugosa* (pindaíba do cerrado). A presente tese teve como objetivos isolar, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de inibidores de tripsina do caule de *P. gounellei* (PgTI) e de ramos de *J. rugosa* (JrTI). Extratos metanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa* foram também estudados quanto à presença de metabólitos secundários e atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. PgTI foi isolado a partir do extrato salino do caule de *P. gounellei* por cromatografia de gel filtração (Sephadex G-100) seguida de cromatografia de troca iônica (DEAE). Esse inibidor é uma proteína de massa molecular de 37,1 kDa e ponto isoelétrico 5,88, cuja atividade inibidora de tripsina foi resistente ao aquecimento até 50 °C. PgTI inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* (concentração mínima inibitória, CMI: 37,5 a 150 µg/mL), sendo bactericida somente para *E. coli* (concentração mínima bactericida, CMB: 75 µg/mL). JrTI foi purificado a partir do extrato salino de ramos de *J. rugosa* por fracionamento com sulfato de amônio seguido de cromatografia de afinidade em coluna de Tripsina-Agarose. A massa molecular nativa de JrTI é de 27 kDa e sua atividade inibidora de tripsina foi fortemente reduzida quando incubado a 50 °C. A atividade inibidora de tripsina de JrTI foi em máxima em pH 10,0 e reduzida em pH ácido. JrTI apresentou atividade antimicrobiana somente contra *Candida krusei* (CMI: 150 µg/mL), não sendo fungicida. JrTI causou danos à permeabilidade da parede celular do fungo. Os extratos etanólicos de folhas e ramos de *J. rugosa* continham flavonoides e esteroides. Foi detectada a presença de rutina no extrato de folhas e de rutina, quercetina e hiperosídeo no extrato de ramos. Adicionalmente, foi identificada a presença de fenilpropanoides nos extratos. O extrato de folhas apresentou atividade bacteriostática contra *E. coli* (CMI: 10 mg/mL) e *Streptococcus pyogenes* (CMI: 20 mg/mL). Já o extrato de ramos inibiu o crescimento de *E. coli* (CMI: 5 mg/mL). Os extratos foram ativos contra os radicais livres DPPH (IC₅₀ de 17,04 e 9,37 µg/mL para ramos e folhas, respectivamente) e ABTS⁺

(IC₅₀ de 16,39 e 9,10 µg/mL para ramos e folhas, respectivamente). No teste de peritonite induzida por carragenina, nenhuma morte e alterações em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos foram detectadas. Ainda no mesmo teste, os extratos (200 mg/kg, via oral) reduziram significativamente a migração celular de leucócitos para o exsudato peritoneal. Em conclusão, os resultados obtidos valorizam as espécies *P. gounellei* e *J. rugosa* como fontes de recursos farmacológicos de origem natural.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Antioxidante. Cromatografia. Extratos etanólicos. Inibidor de protease. Caatinga.

ABSTRACT

Proteinaceous protease inhibitors are described as antimicrobial agents and plant secondary metabolites are designated as antioxidants and anti-inflammatory agents. The Caatinga is an exclusively Brazilian biome and much of its biological patrimony is not found anywhere else in the world. For the accomplishment of the present work, two Caatinga plants were selected with the purpose of exploring their pharmacological potentials: *Pilosocereus gounellei* (xiquexique) and *Jacaranda rugosa* (pindaíba do cerrado). The aim of the present thesis was to isolate, characterize and evaluate the antimicrobial activity of trypsin inhibitors from *P. gounellei* stem (PgTI) and *J. rugosa* (JrTI) branches. Ethanolic extracts of branches and leaves of *J. rugosa* were also studied for the presence of secondary metabolites and antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities. PgTI was isolated from the saline extract of *P. gounellei* stem by gel filtration chromatography (Sephadex G-100) followed by ion exchange chromatography (DEAE). This inhibitor is a protein with a molecular mass of 37.1 kDa and isoelectric point 5.88, whose trypsin inhibitory activity was resistant to heating to 50 °C. PgTI inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* (minimal inhibitory concentration, MIC: 37.5 to 150 µg/mL), being bactericidal only for *E. coli* (minimum bactericidal concentration, CMB: 75 µg/mL). JrTI was purified from the *J. rugosa* branches extract by fractionation with ammonium sulfate followed by affinity chromatography on a Trypsin-Agarose column. The native molecular mass of JrTI is 27 kDa and its trypsin inhibitory activity was strongly reduced when incubated at 50 °C. The trypsin inhibitory activity of JrTI was maximal at pH 10.0 and reduced at acidic pH. JrTI showed antimicrobial activity only against *Candida krusei* (MIC: 150 µg/mL), and it was not fungicide. JrTI caused damage to the cell wall permeability of the fungus. The ethanolic extracts of leaves and branches of *J. rugosa* contained flavonoids and steroids. The presence of rutin in leaf extract and rutin, quercetin and hyperoside in the extract of branches was detected. Additionally, the presence of phenylpropanoids in the extracts was identified. Leaf extract presented bacteriostatic activity against *E. coli* (MIC: 10 mg/mL) and *Streptococcus pyogenes* (MIC: 20 mg/mL). The extract of branches inhibited *E. coli* growth (MIC: 5 mg/mL). The extracts were active against the free radicals DPPH (IC₅₀ of 17.04 and 9.37 µg/mL for branches and leaves, respectively) and ABTS⁺ (IC₅₀ of 16.39 and 9.10 µg/mL for branches and leaves, respectively). In carrageenan-induced peritonitis test, no deaths and

changes in physiological, biochemical and hematological parameters were detected. Still on the same test, the extracts (200 mg/kg, oral route) significantly reduced the cellular migration of leukocytes to the peritoneal exudate. In conclusion, the results value the species *P. gounellei* and *J. rugosa* as sources of pharmacological resources of natural origin.

Keywords: Antimicrobial activity. Antioxidant. Chromatography. Ethanolic extracts. Protease inhibitor. Caatinga.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tríade catalítica do sítio ativo da tripsina	21
Figura 2 – Representação da estrutura tridimensional do inibidor de tripsina de <i>Inga laurina</i> . (A) Visão geral da formação do complexo entre o inibidor e a enzima tripsina e (B) detalhe da interação entre o resíduo de Lisina 64 e os resíduos da tríade catalítica (Ser195, His57 e Asp102) presentes no sítio catalítico durante a formação do complexo	22
Figura 3 – Estrutura química dos flavonóides com 15 carbonos, organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos.....	25
Figura 4 – Exemplos de fitoesteroides	26
Figura 5 – Exemplos de alcaloides, metabólitos secundários nitrogenados	26
Figura 6 – Características morfológicas do xique-xique. (A) Caule, (B) flor, (C) fruto ..	32
Figura 7 – Aspectos de <i>J. rugosa</i> : (A) Árvore, (B) Folhas, (C) Inflorescência	34

ARTIGO 1

Figure 1 – Purification of the trypsin inhibitor from stem of <i>P. gounellei</i> (PgTI). (A) Gel-filtration chromatography (Sephadex G-100) of the extract from <i>P.gounellei</i> stem (2 mL) in 0.15 M NaCl (flow rate of 6.0 ml/min). (B) Ion exchange chromatography of P1 (2.0 mL; 2.0 mg of protein) on DEAE FF 16/10 column equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (flow rate of 5.0 mL/min) and eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 1.0 M NaCl. The arrow indicates the addition of eluent solution	51
Figure 2 – Flow cytometric analysis of the cell viability of <i>Escherichia coli</i> (A) and <i>Candida krusei</i> (B) treated with PgTI at the MIC. The negative control (NC) consisted of cells incubated in the absence of lectin. Isopropyl alcohol (70%, v/v) was used as a positive control (PC). FL1 vs FL3 dot plots are shown (counting beads are not shown). The bar charts display mean fluorescence in the FL3 channel, which corresponds to the staining by propidium iodide. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments	52

ARTIGO 2

Figura 1 – Purificação de inibidor de tripsina de ramos de <i>Jacaranda rugosa</i> . (A) Cromatografia da fração precipitada 0-40% em coluna de Tripsina-Agarose. (B) SDS-PAGE dos padrões de massa molecular (1), P1 (2) e JrTI (3). A seta indica uma banda polipeptídica de 23 kDa encontrada em P2. (C) Cromatografia de gel filtração em coluna Hiprep Sephacryl S-100 HR	69
--	----

Figura 2 – Efeitos do aquecimento e da variação de pH na estabilidade de JrTI. (A) Atividade inibidora de tripsina de JrTI incubada em diferentes temperaturas. (B) Espectros de fluorescência da sonda bis-ANS quando incubado com JrTI previamente aquecido. (C) Atividade inibidora de tripsina de JrTI incubada em diferentes valores de pH. (D) Espectros de fluorescência da sonda bis-ANS quando incubado JrTI foi incubado em pH 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0	70
---	----

Figura 3 – Análise por citometria de fluxo da ocorrência de apoptose ou necrose em células de <i>Candida krusei</i> tratadas ou não com JrTI na CMI. Quadrante UL: células marcadas com iodeto de propídeo (necróticas). Quadrante LR: células marcadas com anexina V (apoptóticas). Quadrante UR: células duplamente marcadas (necrose ou apoptose tardia)	70
---	----

ARTIGO 3

Figura 1 – Perfis cromatográficos da mistura de padrões (A), do extrato de ramos de <i>J. rugosa</i> (B) e do extrato de folhas de <i>J. rugosa</i> (C) observados a 350 nm. Padrões: 1'= ácido cafeico; 2'= vitexina; 3'= rutina; 4'= quercetina; 5'= hiperosídeo	80
--	----

Figura 2 – Espectros de varredura dos picos presentes no perfil cromatográfico do extrato de folhas de <i>J. rugosa</i> observados em 350 nm. (A) e (B) fenilpropanoides e (C) rutina	81
---	----

Figura 3 – Espectros de varredura dos picos presentes no perfil cromatográfico do extrato de ramos de <i>J. rugosa</i> observados em 350 nm. (A) e (B) fenilpropanoides, (C) rutina, (D) quercetina e (E) hiperosídeo	81
---	----

Figura 4 – Peso corporal dos animais do grupo controle e tratados com os extratos de <i>J. rugosa</i> (2000 mg/kg) durante o ensaio de toxicidade aguda	82
---	----

Figura 5 – Número de leucócitos polimorfonucleares no exsudato da cavidade peritoneal após 4 h de indução de peritonite por carragenina em animais não tratados ou tratados previamente com extrato de ramos ou folhas de <i>J. rugosa</i> (200 mg/kg) ou com indometacina (25 mg/kg, controle positivo). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de grupos de 6 animais. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o controle de acordo com ANOVA seguida de teste de Tukey	84
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 – Purification of the trypsin inhibitor from <i>P. gounellei</i> stem extract (PgTI)	52
Table 2 – Peptide matches and respective amino acid sequences obtained by MS/MS analysis of PgTI after in-gel tryptic digestion	53
Table 3 – Antimicrobial activity of the trypsin inhibitor from <i>P. gounellei</i> stem extract..	54

ARTIGO 2

Tabela 1 – Sumário da purificação do inibidor de tripsina de ramos de <i>J. rugosa</i> (JrTI)..	71
---	----

ARTIGO 3

Tabela 1 – Efeito de extratos de ramos e folhas de <i>J. rugosa</i> (2000 mg/kg) em parâmetros fisiológicos dos camundongos 14 dias após a administração	83
Tabela 2 – Efeito de extratos de ramos e folhas de <i>J. rugosa</i> (2000 mg/kg) em parâmetros hematológicos dos camundongos 14 dias após a administração	83
Tabela 3 – Efeito de extratos de ramos e folhas de <i>J. rugosa</i> (2000 mg/kg) em parâmetros bioquímicos do sangue dos camundongos 14 dias após a administração	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	(2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BAPNA	N- α benzoil-DL-arginina- ρ -nitroanilida
bis-ANS	[(bis (8-anilinaftaleno-1-sulfonato))]
CCD	cromatografia em camada delgada
CFU	do inglês <i>colony forming units</i>
CI ₅₀	concentração inibitória média
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos
DEAE	dietilaminoetil
DL ₅₀	Dose letal mediana
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FP	Fração precipitada
FS	Fração sobrenadante
HIV	do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
JrTI	do inglês <i>Jacaranda rugosa trypsin inhibitor</i>
K _i	constante de dissociação
MBC	do inglês <i>minimum bactericidal concentration</i>
MFC	do inglês <i>minimum fungicidal concentration</i>
MHA	do inglês <i>Mueller Hinton Agar</i>
MHB	do inglês <i>Mueller Hinton Broth</i>
MIC	do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>
MS/MS	do inglês <i>Tandem mass spectrometry</i>
NC	do inglês <i>negative control</i>
NO	óxido nítrico
OD ₆₀₀	do inglês <i>optical density at 600 nm</i>
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PC	do inglês <i>positive control</i>
PgTI	do inglês <i>P. gounellei trypsin inhibitor</i>
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PIs	do inglês <i>Protease inhibitors</i>
PVDF	fluoreto de polivinilideno
SD	do inglês <i>standard deviation</i>
SDA	do inglês <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SDB	do inglês <i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SDS–PAGE	do inglês <i>sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
tr	tempo de retenção
URM	do inglês <i>University Recife Mycologia</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	PROTEÍNAS COM ATIVIDADE INIBIDORA DE TRIPSINA	21
2.1.1	Inibidores de tripsina como agentes antimicrobianos	23
2.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	24
2.2.1	Compostos fenólicos	24
2.2.2	Terpenos	25
2.2.3	Compostos nitrogenados	26
2.2.4	Atividade antimicrobiana	27
2.2.5	Atividade antioxidante	27
2.2.6	Atividade anti-inflamatória	29
2.3	ESPÉCIES DA CAATINGA	30
2.3.1	Família Cactaceae	30
2.3.1.1	<i>Pilosocereus gounellei</i>	31
2.3.2	Família Bignoniaceae	33
2.3.2.2	<i>Jacaranda rugosa</i>	34
3	RESULTADOS.....	36
3.1	ARTIGO 1 – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE INIBIDOR DE TRIPSINA DE RAMOS DE <i>Jacaranda rugosa</i>	36
3.2	ARTIGO 2 – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE INIBIDOR DE TRIPSINA DE RAMOS DE <i>Jacaranda rugosa</i>	55
3.3	ARTIGO 3 – AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE RAMOS E FOLHAS DE <i>Jacaranda rugosa</i>	72
4	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários são compostos responsáveis pela defesa natural de plantas quando há estresses bióticos e/ou abióticos. Nesse grupo de moléculas estão compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos. Os metabólitos secundários também atuam na regulação de atividades vitais do vegetal, como na germinação, crescimento, desenvolvimento e floração (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Alguns metabólitos secundários e determinadas proteínas bioativas encontradas nas plantas são capazes de atuar como inibidores de proteases, interagindo de forma específica e reversível com o sítio ativo de enzimas proteolíticas ou através da ligação a outras regiões da estrutura da enzima (KIM et al., 2009). Inibidores de protease de natureza proteica têm sido descritos como agentes antitumoral, antiparasitário, inseticida e muitos apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos. (KIM et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; CÂNDIDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; PAULA et al., 2012).

O aumento no número de populações de microorganismos resistentes aos antibióticos utilizados atualmente tem estimulado a investigação de novos agentes antimicrobianos (FERNANDO et al., 2016). Vários estudos têm avaliado o potencial de moléculas alternativas que possam ser utilizadas isoladamente ou em conjunto com outras drogas. Nesse sentido, plantas utilizadas popularmente no combate de infecções têm demonstrado grande importância para a descoberta de novos agentes farmacológicos (AGRA et al., 2008). Estudos confirmam que inibidores de protease de *Inga laurina*, *Tecoma stans*, *Capsicum annuum* apresentam atividade antimicrobiana. (RIBEIRO et al., 2014; MACEDO et al., 2016; PATRIOTA et al., 2016).

Outra propriedade que vem sendo estudada nas plantas medicinais é a capacidade antioxidante. Danos teciduais são causados por grupos de substâncias químicas, os radicais livres, que podem ter origem endógena ou exógena. Já se conhece bastante sobre o papel dos radicais livres na origem de diversas doenças, buscando-se agora tentativas de intervenção que possam minimizar os danos causados (PEREIRA et al., 2012). Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas aos metabólitos secundários, destaca-se a atividade antioxidante, devido à habilidade que os mesmos têm em sequestrar radicais livres e/ou inibir a sua formação (REGO-JUNIOR et al., 2011).

A reação inflamatória é uma resposta do organismo a um processo infeccioso ou agressão tecidual na tentativa de restabelecer a homeostasia. O desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios também tem sido importante objeto de estudo por muitos grupos

de pesquisa, e as plantas medicinais surgem como uma fonte promissora de agentes anti-inflamatórios (JULIUS e BASBAUM, 2001). Metabólitos secundários são descritos por apresentarem atividade anti-inflamatória, sobretudo flavonoides (OLIVEIRA et al. 2016).

A Caatinga caracteriza-se por ser um bioma exclusivamente brasileiro, onde grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo (SILVA et al., 2003). A Caatinga ocupa uma área de 844.453 km² (IBGE, 2012) e sua flora destaca-se pela presença de várias espécies vegetais endêmicas, predominantemente de porte arbustivo ou arbóreo. As plantas encontradas na região da Caatinga possuem morfologia e fisiologia peculiares para garantir a sobrevivência em condições extremas de clima e solo, o que resulta em uma grande variedade de metabólitos com características únicas (MALAFAIA et al., 2017). As práticas médicas populares nessa região utilizam essas plantas que, na maioria das vezes, são os únicos recursos disponíveis para prevenção e cura de doenças (ALBUQUERQUE et al., 2010; ROQUE et al., 2010). No nordeste brasileiro, estudos etnobotânicos têm sido intensificados em áreas da Caatinga, buscando informações valiosas sobre plantas utilizadas na medicina popular (DIAS et al., 2017).

Devido à relevância atual dos estudos no campo etnofarmacológico, duas plantas da Caatinga foram selecionadas com o intuito de explorar suas potencialidades farmacológicas. *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Byles & G.D. Rowley, conhecida popularmente como xiquexique, é uma espécie vegetal da Caatinga que se desenvolve nas áreas mais secas da região semiárida (GOMES, 1977). Do ponto de vista terapêutico, Roque et al. (2010) relatam a utilização do xiquexique no tratamento médico popular de impigem e gastrite. Adicionalmente, preparações das raízes do xiquexique são utilizadas no tratamento de inflamações prostáticas e na uretra (AGRA et al., 2008; ROQUE et al., 2010). A espécie *Jacaranda rugosa*, conhecida popularmente como pindaíba do cerrado ou pindaibinha, cresce em solos rochosos e arenosos dos estados de Pernambuco e Bahia (GENTRY, 1992). Do ponto de vista medicinal, a *J. rugosa* apresenta algumas propriedades terapêuticas. Por exemplo, uma infusão em água ou maceração em álcool de suas folhas demonstraram ação contra sífilis e úlceras (SILVA et al., 2014). O extrato de aquoso de folhas de *J. rugosa* demonstrou atividade antibiofilme contra *Staphylococcus epidermidis*. Ainda, o mesmo extrato inibiu o crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA et al., 2014).

A presente tese descreve atividades biológicas de metabólitos secundários e inibidores de tripsina obtidos do caule de *P. gounellei* e de ramos de *J. rugosa*. Com base nas

propriedades relatadas popularmente, foram avaliadas a atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória das preparações obtidas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Identificar e determinar atividades biológicas de inibidores de tripsina e metabólitos secundários obtidos de ramos e folhas de *Jacaranda rugosa* e caule de *Pilosocereus gounellei*.

1.1.2 Específicos

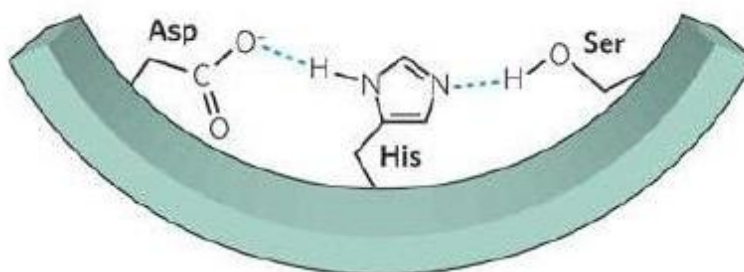
- Purificar inibidores de tripsina do caule de *P. gounellei* (PgTI) e ramos de *J. rugosa* (JrTI).
- Caracterizar PgTI e JrTI quanto a massa molecular nativa e composição em subunidades.
- Determinar o ponto isoelétrico e constante de inibição para tripsina (K_i) de PgTI.
- Avaliar a estabilidade conformacional de PgTI e JrTI frente ao aquecimento.
- Determinar o efeito de PgTI e JrTI sobre o crescimento e sobrevivência de micro-organismos de importância médica.
- Identificar a presença de metabólitos secundários em extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa*.
- Avaliar a ação antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana de extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PROTEÍNAS COM ATIVIDADE INIBIDORA DE TRIPSINA

A tripsina caracteriza-se por ser uma serinoprotease com uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina, aspartato e histidina (Figura 1). Essa conformação em tríade confere ao resíduo de serina um caráter nucleofílico, criando um ambiente eletrostático favorável à interação com resíduos de aminoácidos positivamente carregados, cuja especificidade é maior para a arginina do que para lisina (HEDSTROM, 2002). Por ser expressa em diversos grupos taxonômicos, a tripsina é de suma importância para vários seres vivos, como por exemplo: os vertebrados, invertebrados e micro-organismos (BHATTACHARYYA et al., 2007). Sabendo da importância dessa enzima, estudos têm investigado inibidores de tripsina como agentes terapêuticos, antibióticos e pesticidas (MACEDO et al., 2016; COLARES et al., 2017).

Figura 1 - Tríade catalítica do sítio ativo da tripsina



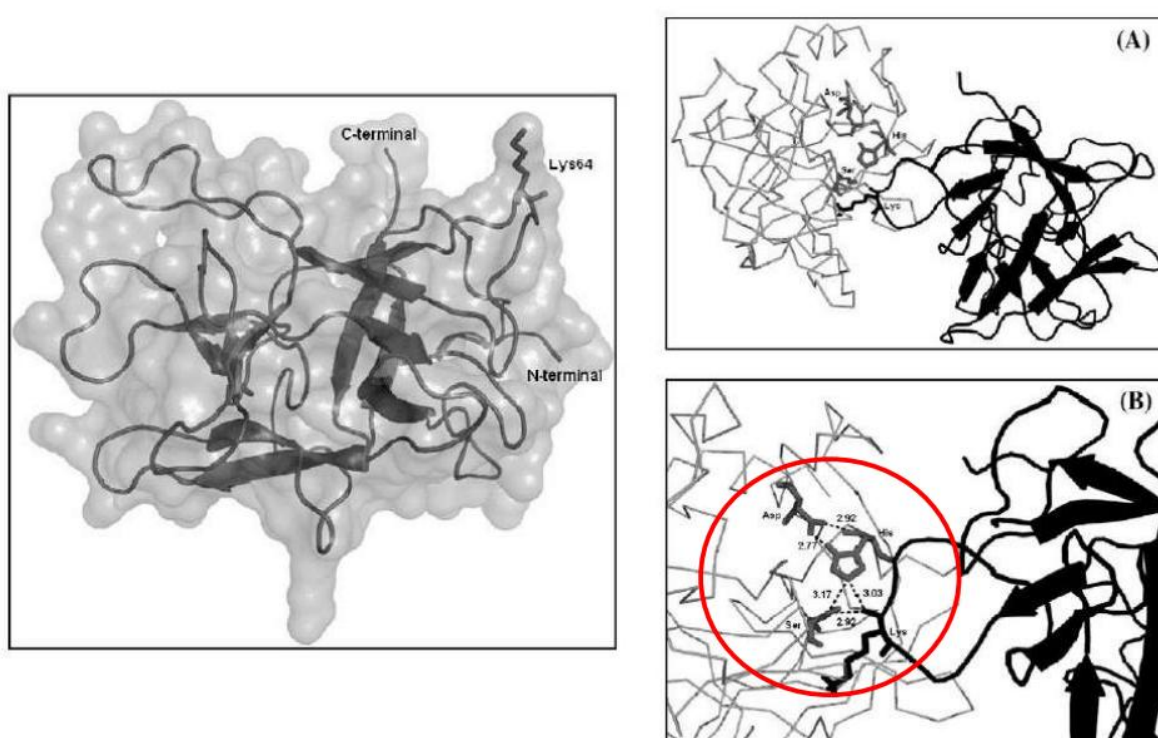
Fonte: graduacao.iqsc.usp.br

Inibidores de protease de origem vegetal são geralmente proteínas capazes de reduzir ou bloquear a atividade catalítica, atuando na regulação da atividade proteolítica endógena (ZHU-SALZMAN e ZENG, 2015). Existem diversos tipos de inibidores de protease de natureza proteica, sendo classificados de acordo com suas características em pelo menos 7 famílias: Kunitz, Pacifastina, Serpina, Kazal, Bowman-Birk, Batata I e II (BEZERRA et al., 2016; COLARES et al., 2017).

Os inibidores proteicos agem geralmente competindo com substratos pelo sítio ativo das proteases, com o qual estabelecem interações estáveis. A inibição enzimática competitiva acontece quando a sequência de aminoácidos presente no sítio reativo do inibidor é complementar aquela existente no sítio ativo da enzima (MAJOR e CONSTABEL, 2008). Os

inibidores de protease atuam quando aminoácidos lisina ou arginina em seu sítio reativo interagem com resíduos de aminoácidos da tríade catalítica da enzima; porém, essa ligação impede a catálise enzimática como ilustra a Figura 2.

Figura 2 - Representação da estrutura tridimensional do inibidor de tripsina de *Inga laurina* e sua interação com o sítio ativo da enzima. (A) Visão geral da formação do complexo entre o inibidor e a enzima tripsina e (B) detalhe da interação entre o resíduo de Lisina 64 do inibidor e os resíduos da tríade catalítica (Ser195, His57 e Asp102) presentes no sítio catalítico durante a formação do complexo.



Fonte: MACEDO et al. (2011)

Proteínas com atividade inibidora de tripsina interagem com o sítio ativo da enzima por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou ainda eletrostáticas. Nessa interação, o inibidor bloqueia o sítio ativo da enzima, ligando-se a esta de maneira estável, impedindo sua ligação com o substrato e, conseqüentemente, sua atividade hidrolítica. Em relação aos inibidores não competitivos, esses podem atuar interagindo com outras regiões da molécula enzimática, o que pode ocasionar alterações conformacionais nas mesmas, formando complexos estáveis inativos ou com baixa atividade (LIAO et al., 2007).

2.1.1 Inibidores de tripsina como agentes antimicrobianos

Os antimicrobianos ou antibióticos são fármacos utilizados com o objetivo de afetar a sobrevivência ou inibir o crescimento de determinado agente microbiano. São originados de substâncias naturais ou sintéticas (ALTERTHUM e TRABULSI, 2003). Devido ao aumento do número de microorganismos patogênicos resistentes a várias drogas associado ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, surge a preocupação com a investigação de novas alternativas terapêuticas (ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007). Várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema relativo à resistência microbiana, sendo uma delas a procura de novos agentes a partir de espécies vegetais (FISCHER et al., 2008). Devido à especificidade e versatilidade dos inibidores de protease, as ciências médica e farmacêutica têm explorado seu potencial como agentes antimicrobianos e de importância médica (FEAR et al., 2007).

A síntese de inibidores de proteases pelas plantas ocorre quando há situações adversas no ambiente, como o caso de estresse hídrico, variações sazonais de temperatura e luminosidade (BEZERRA et al., 2016). Ainda, a atuação de inibidores na defesa de vegetais contra patógenos tem sido confirmada cientificamente, sendo essas biomoléculas avaliadas quanto a sua ação antimicrobiana (MACEDO et al., 2016; COLARES et al., 2017).

A atividade de inibidores de protease contra micro-organismos pode estar relacionada à inibição de proteases intracelulares e/ou extracelulares. Ainda, esses inibidores podem danificar a membrana celular de microorganismos, causar alteração na permeabilidade celular, promover inibição da transcrição e/ou tradução, além de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (PAIVA et al., 2013; MAJCHRZAK-GORECKA et al., 2016). O inibidor de tripsina de folha de *Tecoma stans* (TesTI) causou redução do nível de ATP intracelular e perodixação lipídica em células de *Candida albicans* e *Candida krusei*, resultando em inibição do crescimento e morte celular (PATRIOTA et al., 2016). Um inibidor de tripsina de sementes de *Inga vera* (IvTI) apresentou várias atividades biológicas, dentre elas atividades antimicrobiana contra *Candida buinensis* e *Escherichia coli*; IvTI promoveu agregação e perda de material citoplasmático nas células de *C. buinensis* (BEZERRA et al., 2016). O inibidor de tripsina de flores de *Moringa oleifera* (MoFTI) inibiu o crescimento de bactérias presentes em larvas de *Aedes aegypti* (PONTUAL et al., 2014).

Portanto, proteínas com atividade inibidora de tripsina e com ação antimicrobiana constituem alternativas interessantes para a produção de novos agentes que afetam a sobrevivência de microorganismos (KIM et al., 2005; LI et al., 2007).

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Metabólitos secundários são moléculas orgânicas que constituem um grupo extremamente diversificado de produtos naturais produzidos por plantas e outros organismos como fungos, bactérias, algas e animais (BERNHOF, 2010). Diferentes classes destes compostos são frequentemente associadas a um conjunto restrito de espécies dentro de um grupo filogenético (ROZE et al, 2011). Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse está no número elevado de substâncias farmacologicamente importantes e seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana (SOBRINHO et al., 2011).

A classificação geral dos metabólitos secundários inclui três grandes grupos: compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonóides, taninos e lignina), terpenos (tais como os voláteis de plantas, glicosídeos, carotenóides e esteróides vegetais) e compostos nitrogenados (como alcalóides e glucosinolatos) (TAIZ e ZEIGER, 2006).

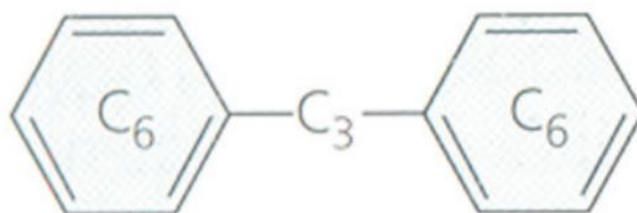
2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são encontrados em todos os órgãos de vegetais e possuem mais de 8.000 estruturas relatadas (CROZIER et al., 2009). Suas composições químicas podem variar muito, incluindo fenóis simples (C_6), como derivados do ácido hidrobencóico e cateóis, bem como polímeros de cadeia longa com alto peso molecular, como catecol melaninas (C_6)₆, ligninas (C_6-C_3)_n e taninos condensados ($C_6-C_3-C_6$)_n. Estilbenos ($C_6-C_2-C_6$) e flavonoides ($C_6-C_3-C_6$) são compostos fenólicos com peso molecular intermediário que apresentam muitas atividades farmacológicas. Flavonoides, incluindo antocianinas, flavonóis (como quercetina e miricetina), isoflavonas (como daidzeína e genisteína) e outros são formados por múltiplos ramos biossintéticos que se originam da chalcona (AHMED et al., 2015).

Os flavonoides possuem estrutura química com 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos (Figura 3). Esses compostos têm

demonstrado múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, poder de redução da fragilidade e permeabilidade de capilares; inibição da destruição do colágeno a agregação plaquetária. A ingestão de flavonóides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares (ARAÚJO, 2008; VELDERRAIN- RODRÍGUEZ et al., 2014).

Figura 3 - Estrutura química dos flavonóides com 15 carbonos, organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos



Fonte: Taiz e Zeiger (2006)

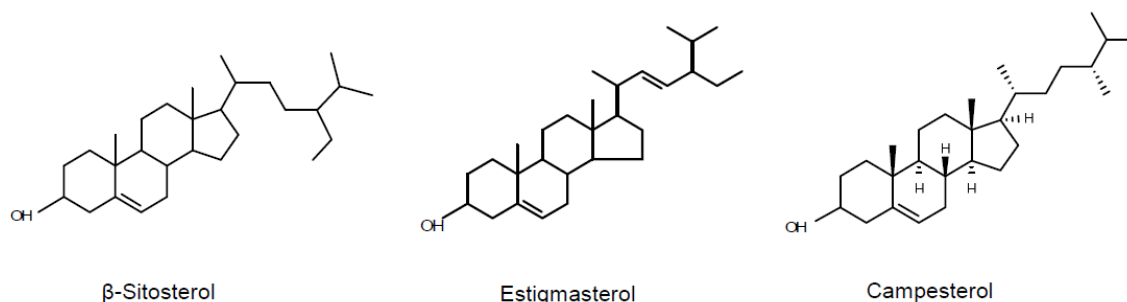
2.2.2 Terpenos

Os terpenos representam uma das maiores e mais diversas classes de metabólitos secundários, com mais de 55.000 compostos. A enorme diversidade estrutural representada por esta classe de produtos naturais se reflete em um grande número de propriedades biológicas, tais como anti-câncer, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (DE MARINO et al., 2008; BAYOR et al., 2009).

Derivados de unidades isoprênicas pentacarbonadas, os terpenos são classificados quanto ao número de unidades de isopreno em monoterpenos (2 unidades, 10C), sesquiterpenos (3 unidades, 15C), diterpenos (4 unidades, 20C), triterpenos (6 unidades, 30C) e carotenoides (8 unidades, 40C) (HARTMANN et al., 2007; DEWICK, 2009). Um dos grupos de princípios ativos de natureza terpênica mais interessantes são esteroides vegetais (Figura 4), com uma grande gama de compostos com atividades biológicas (DEWICK, 2009).

O β -sitosterol, encontrado em óleos de abacate e semente de abóbora, é um dos fitoesteróis mais importantes em termos medicinais, apresentando atividades hipocolesterolêmica, antioxidante, anticâncer e anti-arteriosclerótica (VEERPORTE e ALFERMANN, 2000). Adicionalmente, o estudo dos fitoesteróis possui grande interesse para as indústrias farmacológicas, na medida em que são potenciais precursores e intermediários para a produção de hormônios sintéticos (BAYOR et al., 2009; HARAGUCHI et al., 2011).

Figura 4 - Exemplos de fitoesteroides

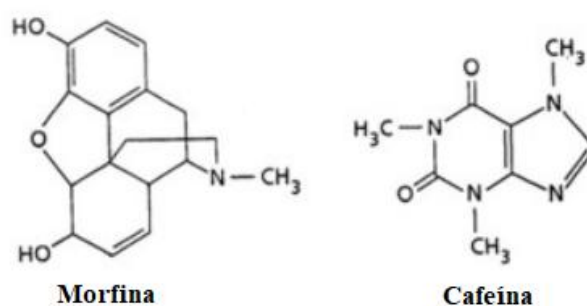


Fonte: Martins et al. (2004)

2.2.3 Compostos Nitrogenados

Vários metabólitos secundários possuem nitrogênio na sua estrutura química, normalmente como parte do anel aromático. Esses compostos são formados a partir de aminoácidos aromáticos, como o triptofano e a tirosina, e de aminoácidos alifáticos como a lisina e ornitina. Neste grupo de metabólitos estão os alcaloides (Figura 5), aminas, aminoácidos, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos (RÊGO-JÚNIOR et al., 2011). Assim como diversos outros compostos secundários, esses também estão envolvidos em várias funções fisiológicas do vegetal, como na defesa contra parasitas e herbívoros, bloqueio metabólico de detoxificação, fator de regulação de crescimento, reserva de nitrogênio e outros elementos necessários ao crescimento da planta. (KUKULA-KOCH et al., 2017).

Figura 5 - Exemplos de alcaloides, metabólitos secundários nitrogenados



Fonte: Taiz e Zeiger (2006)

2.2.4 Atividade antimicrobiana

Pela grande riqueza de plantas existentes no Brasil, há um grande interesse de pesquisadores pela investigação de extratos vegetais contendo metabólitos secundários com ações terapêuticas, principalmente com atividade antimicrobiana. Virtuoso et al. (2005) observaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da *Erythrina velutina*, planta utilizada na medicina popular do nordeste brasileiro, contra as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

Um estudo realizado por Lima Neto et al. (2015) confirmou a presença de flavonoides, taninos e saponinas em extratos etanólicos de *Cariniana rubra* e *Qualea grandiflora* e sua ação contra cepas fúngicas de *Candida neoformans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*, assim como descreveu a atuação dos extratos etanólicos de *Luhea paniculata* e *Qualea grandiflora* contra as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente.

Com relação ao mecanismo de ação desses compostos, sabe-se que eles agem em células bacterianas através da inibição da síntese da parede celular, da função da membrana celular, da síntese proteica e/ou da síntese de ácidos nucleicos, por exemplo. Além disso, os metabólitos podem causar o rompimento de estruturas lipídicas das paredes e membranas microbianas, promovendo a morte do micro-organismo (SILVA, et al., 2019). Extrato hexânico de folhas de *Spondias tuberosa*, contendo ácido gálico, o flavonoide hiperosídeo e ácidos graxos, apresentou atividade antifúngica contra *Candida glabrata* induzindo a produção de ânion superóxido mitocondrial e hiperpolarização da membrana mitocondrial, além de danificar a membrana lisossomal das células fúngicas (CORDEIRO et al., 2018).

A investigação de novas espécies vegetais que atuam como fitoterápicos contra micro-organismos pode constituir uma alternativa viável, sustentável e acessível para combater bactérias e fungos prevenir resistência às várias drogas utilizadas atualmente.

2.2.5 Atividade antioxidante

Antioxidantes são compostos que possuem o potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou inibindo a sua ação. Eles estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais

livres constantemente produzidos. Quando essa equivalência não existe, há o estresse oxidativo. Nos organismos há um sistema de defesa contra o estresse oxidativo formado principalmente pelos antioxidantes enzimáticos, que consistem em proteínas que se localizam no interior das células e agem tanto na prevenção da oxidação gerada pelos radicais livres quanto na reparação dos danos causados (AMAROWICZ et al., 2004; TUBEROSO et al., 2013). Auxiliando esse sistema, ainda existe o sistema não enzimático composto pelas vitaminas, polifenóis, flavonoides, carotenoides e licopeno presentes na dieta. A ação desses antioxidantes pode ocorrer por uma reação de oxiredução onde eles próprios participam como reagentes ou por interação com metais de transição, principalmente ferro e cobre (AMAROWICZ et al., 2004; ASIMI et al., 2013).

A partir dos anos 80, houve um aumento considerável no interesse da busca por antioxidantes de origem natural para o uso farmacêutico, com o objetivo de substituir antioxidantes de origem sintética (ZHEN e WANG, 2001; SOOBRATTEE et al., 2005). Esse fato está atrelado aos efeitos deletérios causados por alguns antioxidantes sintéticos a saúde humana, principalmente pelo seu potencial carcinogênico (REGO-JUNIOR et al., 2011).

A utilização de plantas medicinais como antioxidante se deve à capacidade que os metabólitos produzidos por elas apresentam de neutralizar espécies reativas de oxigênio, envolvidas no desenvolvimento de enfermidades para as quais a planta é indicada (ASIMI et al., 2013). Na busca de novas substâncias com ação antioxidante, muitas plantas têm sido avaliadas quanto a sua capacidade de neutralização de radicais livres (PAREJO et al., 2003; CAI et al., 2004). Espécies vegetais podem apresentar uma ampla variedade de moléculas capazes de inativar radicais livres, tais como compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, estilbenos, taninos, etc), compostos nitrogenados (alcaloides, amins), vitaminas (E, C), terpenoides (carotenoides), bem como muitos outros metabólitos endógenos que exercem ação antioxidante (SOOBRATTEE et al., 2005; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). O mecanismo de ação desses compostos frente aos radicais livres ocorre devido à capacidade de atuar como agentes redutores de hidrogênio e/ou doadores de oxigênio. Estudos recentes afirmam que compostos fenólicos e terpenos são efetivos agentes antioxidantes (BARBOZA et al., 2018).

Estudos confirmam o poder de extratos vegetais frente a radicais livres, como o extrato etanólico de *Cnidioscolus quercifolius*, uma planta medicinal brasileira endêmica do bioma Caatinga, que apresentou atividade antioxidante pela presença de flavonoides, sobretudo rutina (TORRES et al., 2018). Ainda, o extrato etanólico da espécie *Caesalpinia pyramidalis*,

também pertencente ao bioma Caatinga, apresentou atividade antioxidante correlacionada com os teores de fenóis totais, sugerindo ser uma fonte de compostos fenólicos com potencial aplicação na indústria farmacêutica (REGO-JUNIOR et al., 2011). Estudos afirmam que alguns compostos com poder antioxidante também demonstram atividades anti-inflamatória, antiaterosclerótica, antitumoral, antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana e antiviral (YOU DIM et al., 2002; CAI et al., 2004; WILLCOX et al., 2004).

2.2.6 Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório é caracterizado como uma resposta fisiológica a patógenos e lesões teciduais que envolvem vários tipos de células e mediadores, resultando na formação de uma cicatriz da parte lesada, a fim de separá-la do tecido saudável circundante (DENNIS e NORRIS, 2015).

Padrões moleculares associados a danos celulares ou patógenos são reconhecidos pelas células imunes (macrófagos, leucócitos, neutrófilos e mastócitos), que são atraídas para o local da lesão. Essas células liberam vários mediadores químicos responsáveis pela inflamação, incluindo citocinas, histamina, óxido nítrico, leucotrienos e prostaglandinas. Citocinas, como fator de necrose tumoral e interleucinas, são liberadas por macrófagos e atuam no reparo do dano local através da ligação a receptores acoplados à proteína G que ativam a expressão de selectinas e integrinas. A histamina é liberada pelos mastócitos e causa vasodilatação para aumento da permeabilidade vascular. O óxido nítrico, que é liberado pelas células endoteliais, difunde-se nas células musculares lisas e causa seu relaxamento, promovendo a vasodilatação. As prostaglandinas e os leucotrienos são produzidos pelas células endoteliais a partir dos fosfolipídeos das membranas danificadas e aumentam a dilatação e a permeabilidade dos vasos. Além disso, durante a inflamação, uma enorme quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) é gerada. As EROs produzidas intracelularmente são os principais supressores da inflamação à medida que iniciam a apoptose dos neutrófilos. Ao todo, esses mediadores inflamatórios e promovem o recrutamento de células imunes para o local da lesão e provocam febre, vermelhidão, edema e dor (DVORAKOVA e LANDA, 2017).

Extrato etanólico das folhas de *Luehea divaricata*, na dose de 160 mg/kg, reduziu o edema da pata do rato provocado pela administração de carragenina, em relação ao grupo controle. Os prováveis compostos bioativos responsáveis pela ação anti-inflamatória eram

flavonoides, saponinas e taninos caquéticos (BATISTA et al., 2016). O pré-tratamento com flavonoides de *Pistacia integerrima* apresentou efeito anti-inflamatórios no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Nesse caso, concluiu-se que os flavonóides isolados possuíam forte atividade anti-inflamatória (RALF et al., 2016). A ação dos metabólitos secundários pode ocorrer pela inibição da síntese de mediadores da inflamação, tais como, citocinas, interleucinas, prostaglandinas ou óxido de nitrogênio, através da inibição das vias de sinalização relacionadas ao receptor nuclear NF- κ B (JOUNG et al., 2017).

2.3 ESPÉCIES DA CAATINGA

2.3.1 Família Cactaceae

Cactaceae constitui uma família importante do semiárido brasileiro fazendo parte de um grupo de plantas bastante diverso e de ampla distribuição (ROCHA e AGRA, 2002). Espécies de cactáceas demonstram vantagens para absorção hídrica por terem uma eficiência de 5 a 10 vezes maior no uso da água comparada a outras famílias, justamente em locais onde a água é fator limitante, como nas regiões semiáridas e em microrregiões epífitas (CUSHMAN e BOHNERT, 1997).

A família das cactáceas compreende 128 gêneros e 1.450 espécies, distribuídas em regiões de zonas temperadas e tropicais das Américas ocupando uma ampla variedade de habitats, desde regiões áridas até florestas úmidas. Adicionalmente, suas espécies crescem até mesmo em solos pedregosos formando a paisagem típica do semiárido nordestino (CARNEIRO et al., 2016).

As plantas dessa família apresentam algumas características denominadas adaptativas para sua sobrevivência em regiões áridas, sendo esses caracteres essenciais para identificação e classificação das espécies (ARRUDA et al., 2005). Estruturas como cladódios mucilaginosos, parênquima retrátil, ramos laterais reduzidos em aréolas (onde se encontram os meristemas apicais), caule fotossintetizante, ausência de folhas, presença de espinhos, flores com estames e tépalas numerosas, bem como a produção de metabólitos secundários específicos são adaptações anatômicas e metabólicas da família Cactaceae para garantir sua sobrevivência durante períodos de extrema seca (ALMEIDA, 2005).

Alguns autores citam a utilização de cactáceas para fins terapêuticos. O trabalho de Ribeiro et al. (2014) cita o mandacaru (*Cereus jamacaru*) como de grande utilidade para tratar

dor no intestino, disenteria, dor de barriga e diarreia. *Arrojadoa rhodantha*, popularmente conhecida como rabo de raposa, é uma cactácea popularmente utilizada para tratamento de problemas no estômago e baço (ALMEIDA et al., 2005). O quipá (*Opuntia palmadora*) é utilizado para tratamento de inflamações, asma e verminoses (ALBUQUERQUE et al., 2007).

As cactáceas também são caracterizadas pela produção de fenois e triterpenos, compostos químicos originados do metabolismo secundário vegetal (ALMEIDA et al., 2005; GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Carvalho et al. (2002) confirmaram o envolvimento de fenois e triterpenos obtidos de plantas da Caatinga, inclusive cactáceas, em atividades diversas, tais como: antibacteriana, antiviral, antioxidante, diurética, anti-reumática, e ainda contra doenças gástricas e problemas hepáticos.

Nesse sentido, há a necessidade de analisar a concordância de conhecimentos e uso dessas espécies vegetais com finalidades terapêuticas, principalmente espécies de cactáceas endêmicas do semiárido brasileiro.

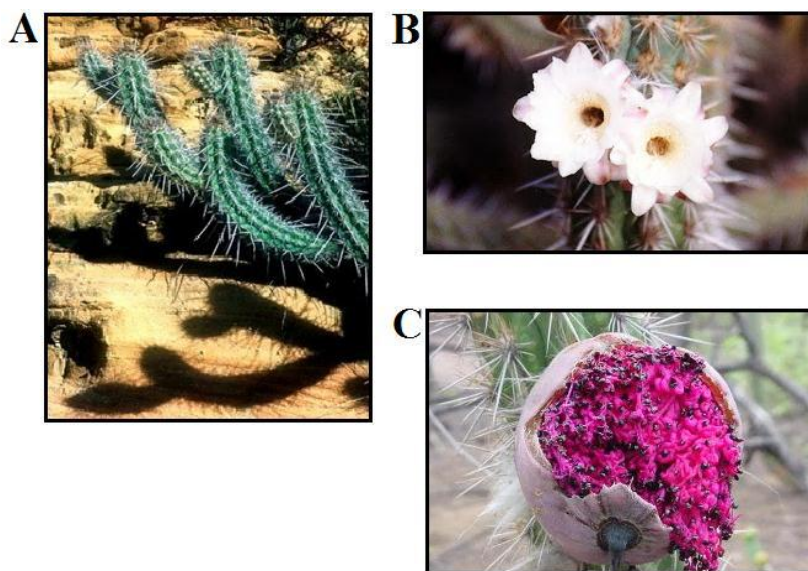
2.3.1.1 *Pilosocereus gounellei* (xiquexique)

Pilosocereus gounellei (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Byles & G.D. Rowley, conhecida popularmente como xiquexique, alastrado ou sodoro, é uma espécie vegetal da Caatinga que se desenvolve muito bem nas áreas mais secas da região semiárida, onde cresce em solos rasos, em cima de rochas e se multiplica regularmente, cobrindo áreas extensas (ARRUDA et al., 2005; AGRA et al., 2008). Sua distribuição ocorre principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia, em áreas denominadas edafoclimáticas, ou seja, áreas de elevadas temperaturas, precipitações chuvosas irregulares e solo de baixa fertilidade (TAYLOR e ZAPPI, 2002).

O xiquexique demonstra características peculiares observadas na Figura 6. Seu caule apresenta posição ereta com ramificação de galhos, sendo ambos cobertos por espinhos (Figura 6A). O crescimento ocorre primeiramente no sentido horizontal para posteriormente ocorrer na posição vertical. A espécie pode atingir altura aproximada de 3,76 m, com diâmetro de copa variando entre 1,45 m a 3,27 m. Sua inflorescência (Figura 6B) possui coloração branca e são protegidas por um tipo de algodão característico produzido pela planta. Os frutos (Figura 6C) são do tipo baga de tamanho mediano, verdes no exterior e vermelhos no interior, constituídos de sementes que aves e outros animais da Caatinga utilizam para alimentação (CAVALCANTI e RESENDE, 2007).

Estudo da composição química do xiquexique revelou teores de proteína bruta e minerais de 5,07% e 18%, respectivamente, com elevado teor de cálcio (1,8 a 3,1 %) e potássio (1,5 a 2,9%) (BARBOSA et al., 1996). As informações anteriormente citadas sugerem o porquê da utilização do xiquexique nos períodos de escassez de alimentos em regiões do semiárido do nordeste brasileiro. *P. gounellei* é uma das espécies que se sobressaem em relação a outras opções de forragem e são utilizadas nesse período como um dos principais suportes de forrageio dos ruminantes (SILVA et al., 2013).

Figura 6 - Características morfológicas do xique-xique. (A) Caule, (B) flor, (C) fruto



Fonte: <http://belezadacaatinga.blogspot.com.br>

Do ponto de vista terapêutico, Roque et al. (2010) confirma a utilização do xiquexique no tratamento médico popular de impigem e gastrite. Há também a utilização da pomada produzida a partir do miolo do xiquexique macerado para tratamento de processos inflamatórios decorrentes de perfurações nos membros superiores e inferiores (OLIVEIRA, 2011). Adicionalmente, preparações das raízes do xiquexique são utilizadas no tratamento de inflamações prostáticas e na uretra (AGRA et al., 2008; ROQUE et al., 2010). Ainda, *P. gounellei* é popularmente utilizado para cura de infecções nos rins (ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007). Resultado de análise toxicológica de infuso etanólico do caule de xiquexique, administrado intraperitonealmente em camundongos, indicou uma dose letal (DL₅₀) de 1.012 mg/kg, caracterizando toxicidade moderada (BARROS e DAVINO, 2008). Extrato salino do caule de *P. gounellei* demonstrou atividade antinociceptiva em

camundongos e não apresentou efeitos tóxicos agudos, como foi confirmado a partir de análises hematológicas, bioquímicas e histológicas, e ainda, sem efeitos na coordenação motora dos animais testados (OLIVEIRA et al., 2018). O mesmo extrato também não se mostrou tóxico quando administrado (250, 500, and 1000 mg/kg) por 28 dias consecutivos em camundongos, não alterando ganho de peso, consumo de água e ração, temperatura corporal e parâmetros histológicos; na dose de 500 mg/kg, apresentou atividade antipirética (OLIVEIRA et al., 2019).

2.3.2 Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae apresenta 827 espécies alocadas em 82 gêneros, possui distribuição pantropical, ocorrendo principalmente nos neotrópicos. O Brasil apresenta alguns táxons endêmicos e é considerado o centro de diversidade da família com 33 gêneros e 413 espécies, ocorrendo em vários tipos de ambiente, desde o Cerrado até florestas úmidas perenifólias (SILVA et al., 2018).

A família é caracterizada por apresentar plantas predominantemente lenhosas, com folhas, em geral, compostas e opostas, flores bissexuadas, gamopétala com tubo e lobos bem definidos, bilabiadas, frequentemente com quatro estames férteis, didínamos e um reduzido a estaminódio, ovário súpero, quase sempre bilocular, raramente unilocular, com estilete terminal e estigma bilamelado, sendo o fruto com cápsula septígrafa ou loculicida, raramente baga e sementes aladas (JUDD et al. 2002; LORENZI, 2008).

De acordo com Lorenzi (2008), a exuberância durante o florescimento faz com que muitas espécies de Bignoniaceae sejam utilizadas na arborização de ruas, praças, parques e avenidas. A madeira dos exemplares dessa família é amplamente utilizada como matéria-prima de diversos artigos da carpintaria e marcenaria, sendo também de grande utilidade na construção civil e naval (LORENZI, 2008).

Espécies da família apresentam metabólitos secundários característicos, tais como: terpenoides, quinonas, alcaloides e flavonoides. As duas primeiras classes de metabólitos mencionadas merecem destaque, pois apresentam grande ocorrência na família, o que as caracterizam como marcadores químicos do táxon (CIPRIANI, 2006).

Hiruma-Lima e Di Stasi (2002) detectaram que o macerado das folhas de *Jacaranda caroba* em aguardente pode ser aplicado externamente como cicatrizante e contra úlceras. Estudo realizado por Arruda et al. (2012) demonstrou a presença de atividade antimicrobiana

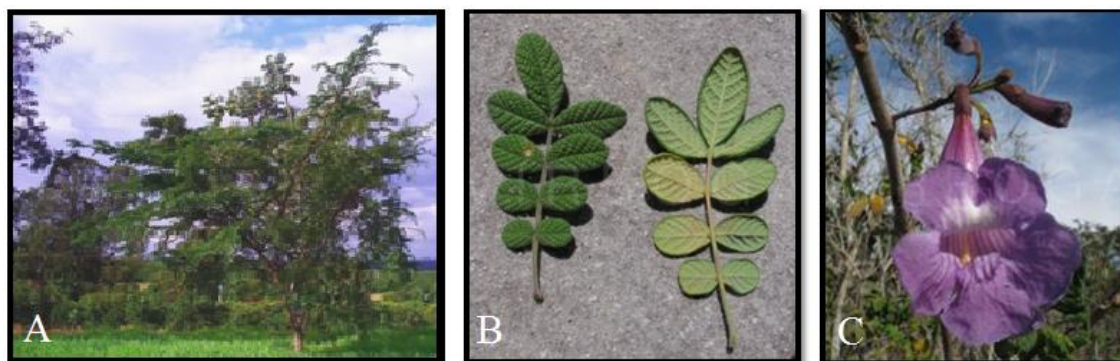
do *Jacaranda cuspidifolia* frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Ainda, a presença de compostos da classe dos terpenoides e dos ariletanoides de cinamoil glicosídeos foram as prováveis substâncias responsáveis pela ação antimicrobiana. De acordo com Silva et al. (2012) espécies do gênero *Handroanthus* apresentaram diversas atividades biológicas, como antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, antifúngica, de modo que a presença das atividades ocorreu pela existência de naftoquinonas nas espécies de Bignoniaceas testadas.

Desse modo, a investigação de produtos de origem vegetal da família Bignoniaceae e suas atividades biológicas são pertinentes, visto que espécies da família foram eficazes no uso médico popular e apresentaram substâncias bioativas.

2.3.2.2 *Jacaranda rugosa*

A espécie de porte arbustivo *Jacaranda rugosa* (Figura 7A) pertence à família Bignoniaceae e é popularmente conhecida como pindaíba do cerrado ou pindaibinha. Endêmica do Brasil ocorre nos Estados de Pernambuco e da Bahia onde cresce em solos rochosos e arenosos da região semiárida, atingindo uma altura de até 4 m de comprimento. Suas folhas (Figura 7B) são pinadas e fortemente rugosas, daí o nome de seu epíteto específico. As flores (Figura 7C) dispostas em racemos axilares são hermafroditas, violetas, tubulares, com quatro estames didínamos, um estaminódio glandular desenvolvido e um estigma composto por dois lobos sensitivos (GENTRY, 1992).

Figura 7 - Aspectos de *J. rugosa*: (A) Árvore, (B) Folhas, (C) Inflorescência



Fotos: http://www.virboga.de/Jacaranda_rugosa.htm

Do ponto de vista terapêutico, *J. rugosa* é utilizada popularmente como planta medicinal. Uma infusão em água ou maceração em álcool de suas folhas demonstrou ação contra sífilis e úlceras (SILVA et al., 2014). Com relação às suas atividades biológicas, o

extrato de folhas de *J. rugosa* apresentou atividade antibiofilme contra *Staphylococcus epidermidis* e inibiu o crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias de importância médica (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2014). Folhas de *J. rugosa* contêm fitoquímicos eficazes na inibição do crescimento celular e da formação de biofilme da espécie *Ralstonia solanacearum*, bactéria responsável pela murcha vascular em vegetais agronomicamente importantes. Além disso, o extrato de folhas apresentou atividade antimicrobiana contra todos os isolados de *Ralstonia solanacearum* com percentual de inibição de crescimento acima de 90% na concentração de 4 mg/ml (MALAFAIA, 2017). Logo, os resultados anteriormente citados sugerem a utilização de extratos de *J. rugosa* em ensaios para análise de atividades biológicas e investigação da sua composição química. De acordo com Arcoverde et al. (2014), os ramos de *J. rugosa* contêm inibidor de tripsina, o que estimulou a investigação de propriedades terapêuticas desta biomolécula isolada.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1 – PgTI, THE FIRST BIOACTIVE PROTEIN ISOLATED FROM THE CACTUS *Pilosocereus gounellei*, IS A TRYPSIN INHIBITOR WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Artigo submetido ao periódico “Microbial Pathogenesis”



Fator de impacto: 2.332 (JCR-2018)

PgTI, the first bioactive protein isolated from the cactus *Pilosocereus gounellei*, is a trypsin inhibitor with antimicrobial activity

Cláudio Alberto Alves da Rocha Filho^a, Poliana Karla Amorim^a, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Maiara Celine de Moura^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Russolina Benedeta Zingali^b, Emmanuel Viana Pontual^c, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil*

^b*Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

^c*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Abstract

A trypsin inhibitor (PgTI) from *Pilosocereus gounellei* was purified from stem extract by gel filtration and ion exchange chromatographies. The inhibitor appeared as a single polypeptide band of 37.1 kDa and pI 5.88. The K_i for bovine trypsin was 14 nM and MS-MS analysis of PgTI did not reveal similarities with other plant proteins. Trypsin inhibitor activity was stable at temperatures up to 50 °C. PgTI inhibited growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria (minimal inhibitory concentrations (MIC) from 7.5 to 150 µg/mL) with bactericidal activity only against *Escherichia coli* (minimal bactericidal concentration: 75.0 µg/mL). PgTI also inhibited the growth of *Candida krusei* (MIC of 60 µg/mL). Flow cytometry using thiazol orange and propidium iodide confirmed that PgTI did not affect the viability of *E. coli* and *C. krusei* cells at the MIC. This is the first report on a bioactive protein purified from *P. gounellei*, which provides biotechnological value to this cactus.

Keywords: xique-xique; protease inhibitor; antimicrobial activity; Cactaceae.

1. Introduction

Antibiotic resistance is a big concern for health care systems due to the possibility of multiple infectious diseases with no viable therapy. Self-medication, indiscriminate prescribing, and prolonged use are factors associated with resistance. In addition, overuse and/or misuse of antibiotics in the food industry and veterinary medicine has led to resistance (Morehead and Scarbrough, 2018). The search for new antimicrobial agents is stimulated aiming at developing antibiotics to be used together or as substitutes for the current drugs.

Protease inhibitors (PIs) are molecules able to interact with an enzyme molecule to reduce or block its catalytic activity. In plants, they can be secondary metabolites, such as flavonoids, or proteins (Pontual et al., 2012). Proteinaceous PIs isolated from plants have been reported as insecticidal, anti-angiogenic, trypanocidal, and antimicrobial agents (Li et al., 2007; Pontual et al., 2014; Bezerra et al., 2016; Pontual et al., 2017; Rasouli et al., 2017). These inhibitors can affect replication or viability of microbial cells by inhibiting the activity of proteases or damaging the cell wall or plasma membrane leading to alteration of permeability (Paiva et al., 2013).

The Caatinga region is an exclusive Brazilian plant formation that stands out due to its high diversity of plant species, many of which are employed in traditional medicine (Albuquerque et al., 2009). Arcoverde et al. (2014) reported on the presence of trypsin inhibitor activity in 23 plants from Caatinga and considered these plants interesting materials for exploitation by the scientific community.

Pilosocereus gounellei (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Byles & G.D. Rowley, popularly known as “xique-xique”, is a cactus endemic of Caatinga. Its use in folk medicine has been reported. An ointment prepared from the stem is used for treating inflammatory processes resulting from injuries (Andrade et al., 2006) and preparations of xique-xique roots are used for treating prostate and urethra inflammations (Agra et al., 2008). There are few scientific publications on the biotechnological potentials of *P. gounellei*. Sousa et al. (2018) showed gastroprotective effects of *P. gounellei* stem and root ethanolic extracts and Oliveira et al. (2018a) reported that saline extract from the stem showed antinociceptive activity in mice.

In this study, we purified and characterized a trypsin inhibitor (PgTI) from the stem of *P. gounellei*. In addition, the antimicrobial activity of PgTI against medically important bacteria and fungi was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Stem (columnar cladode) of *P. gounellei* was collected in Limoeiro, Pernambuco, Brazil. The authors have authorization (No. 38690) from the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from the Brazilian Ministry of the Environment for plant collection. The access was recorded (AE65D9B) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional. Associado* (SisGen). A voucher specimen (no. 82,853) was deposited at the Herbarium UFP Geraldo Mariz from the *Universidade Federal de Pernambuco*. The thorns were removed, and the stems were cut into small pieces and dried at 28 °C for 3 days. Next, the material was powdered and stored at -20 °C.

2.2. Purification of PgTI

Stem powder was added to 0.15 M NaCl (5% w/v) and the mixture was stirred for 16 h at 28 °C. After centrifugation ($3,000 \times g$, 15 min, 28 °C), the supernatant (saline extract) was loaded (2 mL) onto a Sephadex G-100 column (33×1 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 6.0 mL/min. Fractions of 2 mL were collected and absorbance at 280 nm was monitored. Pooled fraction tubes 16–28 (P1) were evaluated for protein concentration and trypsin inhibitor activity as described below. P1 was dialyzed for 4 h in a 10-kDa cut-off membrane against 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and 2.0 mL (2.0 mg of protein) was loaded onto an ion exchange DEAE FF 16/10 column coupled to the ÄKTAprime system (GE Healthcare Life Sciences, Sweden). The column was equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 at a flow rate of 5.0 mL/min. After equilibrating the column, adsorbed proteins were eluted with Tris buffer containing 1.0 M NaCl. Eluted fractions with an absorbance higher than 0.100 were pooled, dialyzed against distilled water for 4 h, and dried by lyophilization. Purification yield corresponded to the amount of protein from P1 recovered following purification. For determination of trypsin inhibitor activity and dissociation constant (K_i), PgTI was suspended in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. For the antimicrobial assays, PgTI was suspended in distilled water.

2.3. Protein concentration and trypsin inhibitor activity

Protein concentrations were estimated according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL) as the standard. Trypsin inhibitor activity was evaluated using 0.1 mg/mL bovine trypsin and the substrate *N*-benzoyl-DL-arginyl-*p*-nitroanilide (BAPNA) as described by Pontual et al. (2014). Bovine trypsin (5 µL) was incubated for 5 min at 37 °C with aliquots of PgTI (30 µL). The total volume was adjusted for 200 µL with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.02 M CaCl₂. Next, 8 mM BAPNA (5 µL), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), was added to the mixture and incubated for 30 min at 37 °C. A control (100% of substrate hydrolysis) reaction between trypsin and BAPNA was run in absence of PgTI. Substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm. Blank reactions were performed under the same conditions, without substrate or enzyme. One unit of trypsin inhibitor activity was defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance by 0.01 after 30 min at 37 °C compared to control. Specific activity was determined as the ratio between trypsin inhibitor activity (U) and protein concentration (mg).

2.4. Two-dimensional electrophoresis

PgTI (250 µg) was resuspended in rehydration buffer [8 M urea; 2% (w/v) CHAPS; 1% (v/v) IPG buffer pH 3–10; 0.002% (w/v) bromophenol blue] and taken up passively into a 7-cm Immobiline DryStrip pH 3–10 linear gradient, (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) during rehydration for 16 h at 25 °C. Isoelectric focusing was performed on the Ettan IPGPhor III at 20 °C according to the manufacturer's instructions. Next, the strip was washed three times with 50 mM Tris-HCl pH 8.8 containing 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.002% (w/v) bromophenol blue. The strip was then washed once with Tris-glycine-SDS buffer and transferred to a 12% (w/v) polyacrylamide gel containing SDS (Laemmli, 1970). Standard molecular mass markers (12–225 kDa) were electrophoresed in the same gel. The gel was stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, destained, and analyzed using the ImageMaster software (GE Healthcare).

2.5. Mass spectrometry analysis

The PgTI protein spot was excised from the 2-dimensional gel and submitted to in-gel tryptic digestion as described by Pontual et al.(2017). MS/MS analysis was performed in ESI-QUAD-TOF and the peptide spectra were compared with sequences of Viridiplantae proteins (NCBI database) using MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Peptides matching with the contaminants keratin and trypsin were excluded. The analysis was performed in triplicate.

2.6. Determination of inhibition constant (K_i)

Dixon plot analysis was employed to determine K_i for bovine trypsin (Segel, 1975). Inhibition assays were performed using two BApNA concentrations (4 and 8 mM). Dixon plots were generated using the reciprocal velocity ($1/v$) versus inhibitor concentration and the intersection of the two regression lines for each BApNA concentration yielded the K_i .

2.7. Effect of heating on trypsin inhibitor activity

PgTI samples were heated in a water bath for 15 min at different temperatures (30–60 °C). The heated PgTI samples were evaluated for trypsin inhibitor activity as described above. An unheated sample of PgTI was also evaluated.

2.8. Antimicrobial activity

Bacterial strains (*Escherichia coli* UFPEDA-1015, *Enterococcus faecalis* UFPEDA-138, *Micrococcus luteus* UFPEDA-100, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA-416, *Serratia* sp. UFPEDA-398, *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02 and *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA-833) were provided by the culture collection (WDCM 114) of the *Departamento de Antibióticos* from the *Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, Brazil. Stored cultures of *Candida albicans* (URM 5901), *Candida parapsilosis* (URM 6345), and *Candida krusei* (URM 6391) were obtained from the culture collection *University Recife Mycologia* (URM), *Departamento de Micologia*, *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil. Bacteria were cultured in Mueller Hinton Agar (MHA) overnight at 37 °C and yeasts were cultured in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) overnight at 28 °C. The densities of the microorganism

cultures were adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm (OD_{600}) to 1×10^8 or 3×10^6 colony forming units (CFU) per mL in sterile saline (0.15 M NaCl).

Broth microdilution assays were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) values. First, the sample is diluted in water serially. The culture medium [Mueller Hinton Broth (MHB) for bacteria or Sabouraud Dextrose Broth (SDB) for yeasts] was added with the same volume (40 μ L) in all wells. The first row served as a control for sterility and only contained culture medium. Next, 40 μ L of PgTI (at a concentration of 0.6 mg/mL) was added to the third well, and a two-fold serial dilution was performed until the last well in that row. Finally, the microorganism suspension (10 μ L at 10^8 CFU/mL for bacteria or 20 μ L at 3×10^6 CFU/mL for yeasts) was added to all wells except the first well. The second well, containing microorganism in the absence of PgTI, corresponded to the 100% growth control. Microplates were incubated at 37 °C or 28 °C for bacteria and yeasts, respectively. The OD_{600} was measured at time zero and after 48 h using a microplate reader. MIC was defined as the lowest PgTI concentration able to reduce the optical density $\geq 50\%$ compared with the 100% growth control.

For determination of the minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC), aliquots (10 μ L) from the wells containing PgTI concentrations higher or equal to the MIC were inoculated into petri plates containing MHA or SDA, and incubated for 24 h at 37 °C or 28 °C. The MBC and MFC corresponded to the lowest concentration able to reduce the number of CFU by 99.9% compared to the initial inoculum. Each assay was conducted in triplicate and three independent experiments were performed.

2.9. Viability analysis

The viability of microbial cells treated with PgTI was evaluated by testing membrane integrity using the Cell Viability Kit of BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Isolates were incubated as described in the previous section with PgTI at the MIC. The negative control was prepared by adding distilled water instead of PgTI. For the positive control, cells were treated with 70% (v/v) isopropyl alcohol for 1 h before analysis. Samples were centrifuged (10,000 g , 10 min, 25 °C) and the cell pellets were washed three times with 0.1 M PBS pH 7.0. Next, 42 μ M thiazole orange (TO, 5 μ L) and 4.3 mM propidium iodide (PI, 5 μ L) were added to the samples, vortexed, and incubated for 5 min at 25 °C. After this, 50 μ L of a fluorescent bead

suspension (BD Liquid Counting Beads) was added, and the mixture was vortexed for 30 s. Data was acquired on a BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences) with an SSC threshold of 200 and stopped after gating 30,000 events for each sample. Analysis was performed using the BD Accuri C6 Software. Results were presented as FL1 vs. FL3 dot plots and mean FL3 fluorescence (PI staining).

2.10. Statistical analysis

Data were expressed as replicate means $\pm$ standard deviation (SD). One-way ANOVA (significance at $p < 0.05$) was conducted using Action 2.8.29.357.515 software (Estatcamp, Brazil). Significant differences between the treatment groups were analyzed using Tukey's test (significance at $p < 0.05$).

3. Results

The saline extract showed high viscosity, preventing the determination of protein concentration and trypsin inhibitor activity. Thus, we employed gel filtration chromatography to obtain a more workable preparation for protein purification. The chromatographic profile on Sephadex G-100 showed a single protein peak, which was deemed P1 (Figure 1A). Chromatography of P1 on a DEAE FF 16/10 column resulted in a single peak of adsorbed proteins, eluted with 1.0 M NaCl (Figure 1B). Eluted fractions were pooled (PgTI) and showed a specific activity higher than P1. Table 1 summarizes the results from the purification of PgTI. The high yield (98%) following the second chromatography step indicated that most of the proteins present in P1 bound to the ion exchange matrix.

Two-dimensional electrophoresis revealed PgTI as a single spot of 37.1 kDa and isoelectric point (pI) 5.88 (Figure 1C). Tandem mass spectrometry (MS/MS) of peptides derived from the in-gel tryptic digestion of the PgTI spot yielded 25 peptide matches (Table 2), but no similarities with Viridiplantae proteins were detected. Dixon plot analysis indicated a K_i of 14 nM toward bovine trypsin. The trypsin inhibitor activity of PgTI was not significantly altered at temperatures up to 50 °C, but was abolished at 60 °C.

PgTI inhibited the growth of *E. coli*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *Serratia* sp., *S. aureus*, and *S. saprophyticus* with MIC values ranging from 7.5 to 150 μ g/mL (Table 3).

However, the inhibitor was bactericidal only against *E. coli* (MBC of 75 µg/mL). PgTI also only inhibited growth of *C. krusei* (MIC of 60 µg/mL) and no fungicidal effect was observed.

The viability of *E. coli* and *C. krusei* cells treated with PgTI at MIC was evaluated. PI staining (mean FL3 fluorescence) of *E. coli* treated with PgTI was not significantly different ($p > 0.05$) than in the negative control, indicating that cells were viable (Figure 2A). For *C. krusei*, the mean FL3 fluorescence in PgTI-treated cells was significantly higher ($p < 0.05$) than in the negative control (Figure 2B), indicating cell permeabilization due to membrane damage. The positive control had remarkably higher PI staining ($p < 0.05$) than untreated cells of both microorganisms.

4. Discussion

The plant species, *P. gounellei*, is part of the underestimated biodiversity from Caatinga and was chosen to study in order to unravel the biochemical wealth of this region. Furthermore, the recognized biotechnological potential of protease inhibitors encouraged us to look at the presence of a bioactive protein from this class in *P. gounellei*.

The high viscosity of the saline extract was most likely due to the high carbohydrate content of the plant tissue. Indeed, Nascimento et al. (2012) reported that *P. gounellei* contains 5.7 g of carbohydrate per 100 g of stem, in contrast with a protein content of 0.4 g per 100 g. Oliveira et al. (2018a) reported the presence of sugars in a saline extract from this cactus using a similar methodology employed by us. Gel filtration chromatography was effective in decreasing the viscosity, due to separation of proteins from high molecular mass polysaccharides.

PgTI was effectively isolated using chromatographic methods and the pI value demonstrated the anionic nature of this protein, corroborating with the adsorption to an anion-exchanger (DEAE) matrix. PgTI showed higher affinity for trypsin than inhibitors from *Moringa oleifera* flowers and *Tecoma stans* leaves (K_i of 2.4 µM and 43 nM, respectively) but lower than inhibitors from *Entada acaciifolia* (1.75 nM) and *Enterolobium timbouva* (0.5 nM) seeds (Oliveira et al., 2012; Pontual et al., 2014; Patriota et al., 2016; Oliveira et al., 2018b).

Neutralization of trypsin inhibitor activity upon heating at 60 °C may be due to denaturation of the PgTI domain responsible for inhibitory activity (McClements, 2004), as well as protein aggregation (Chen et al., 2014), preventing the interaction of the reactive sites with trypsin. Unlike PgTI, the activity of the trypsin inhibitor from *Senna tora* remained

unchanged until 60 °C, and inhibitors from *Poincianella pyramidalis* and *Cassia grandis* were stable up to 70 °C and 80 °C, respectively (Guimarães et al., 2014; Tripathi et al., 2014; Brandão-Costa et al., 2018). Despite this, PgTI still showed a relevant thermo-stability since its activity was not affected until temperatures ≤ 50 °C.

The bacterial species evaluated here have medical relevance since they are known to cause pneumonia, infections of the digestive and urinary tracts, as well as more severe infections, such as endocarditis and bacteremia (Menezes et al., 2004; Kawalec et al., 2007; Sartori et al., 2007; Scarpate et al., 2009; Kline et al., 2010). *C. krusei* is an emerging nosocomial pathogen primarily found in immunocompromised patients and those with cancer of hematologic-oncologic origin (Iannaccone et al., 2018). The low MIC values detected in the antimicrobial assay suggest that the inhibitor is a good bacteriostatic and fungistatic agent against all susceptible species tested, except *E. faecalis*. The MBC/MIC ratio detected for PgTI against *E. coli* was 2.0, showing the inhibitor as a bactericidal agent (Levison, 2004). Interestingly, PgTI did not damage the integrity of *E. coli* cells at the MIC, which shows that the bacteriostatic and bactericidal effects are well-differentiated regarding the inhibitor concentration.

A protease inhibitor from *Coccinia grandis* leaves showed antibacterial activity against *S. aureus* (MIC of 1.0 mg/mL), *B. subtilis* (MIC of 1.0 mg/mL) and *K. pneumoniae* (MIC of 100 µg/mL), values higher than those detected here for PgTI. This inhibitor also killed *E. coli* (MBC of 1.0 mg/mL; MIC of 0.63 mg/mL) and the authors suggested that it may have induced channel formations on the bacterial membrane resulting in out flowing of the cellular content (Satheesh and Murugan, 2011).

PgTI inhibited growth of *C. krusei*, but the MFC value (neutralization of 99.9% of fungal cells) was not detected. Despite this, damage to the cell membrane was detected at the MIC. The inhibitor from *E. timbouva* seeds was an antifungal agent against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida guilliermondii*, and also disturbed the integrity of the plasma membrane (Oliveira et al., 2018b).

5. Conclusion

The stem of *P. gounellei* contains an anionic trypsin inhibitor stable to 50 °C and active on medically important bacteria and fungus. Outcomes reported here reveal new

insights into the biochemistry of *P. gounellei*, increasing the biotechnological value of this plant.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants (446902/2014-4) and fellowships as well as to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support and graduate scholarship (IBPG-0402-2.08/14). They are also thankful for the technical assistance of Carlos Eduardo Sales da Silva, Ana Lúcia Oliveira Carvalho and Augusto Vieira.

References

- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Braz. J. Pharmacol.* 18, 472-508.
- Albuquerque, U.P., Araújo, T.A.S., Ramos, M.A., Nascimento, V.T., Lucena, R.F.P., Monteiro, J.M., Alencar, N.L., Araújo, E.L., 2009. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. *Biodivers. Conserv.* 18, 127-150.
- Andrade, C.T.S., Marques, J.G.W., Zappi, D.C., 2006. Utilização medicinal das cactáceas por sertanejos baianos. *Rev. Bras. Plant. Med.* 8, 36-42.
- Arcoverde, J.H.V., Carvalho, A.S., Neves, F.P.A., Diozínio, B.P., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S., Silva, M.V., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2014. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. *Nat. Prod. Res.* 28, 1297-1301.
- Bezerra, C.S., Oliveira, C.F.R., Machado, O.L.T., Mello, G.S.V., Pitta, M.G.R., Rêgo, M.J.B.M., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Ribeiro, S.F.F., Gomes, V.M., Silva, O.N., Maria-Neto, S., Franco, O.L., Macedo, M.L.R., 2016. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. *Process Biochem.* 51, 792-803.

- Brandão-Costa, R.M.P., Araújo, V.F., Porto, A.L.F., 2018. CgTI, a novel thermostable Kunitz trypsin-inhibitor purified from *Cassia grandis* seeds: Purification, characterization and termiticidal activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 118, 2296-2306.
- Chen, Y., Xu, Z., Zhang, C., Kong, X., Hua, Y., 2014. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. *Food Chem.* 154, 108–116.
- Guimarães, L.C., Oliveira, C.F.R., Marangoni, S., Oliveira, D.G.L., Macedo, M.L.R., 2014. Purification and characterization of a Kunitz inhibitor from *Poincianella pyramidalis* with insecticide activity against the Mediterranean flour moth. *Pest. Biochem. Physiol.* 118, 1-9.
- Iannaccone, M., Basso, P.R., Congiu, T., Cavicchio, P., Ulivi, V., Campolo, M., 2018. Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) induced by *Candida krusei* in an Aldabra giant tortoise (*Aldabrachelys gigantea*) and confirmed by electron microscopy analysis. *Med. Mycol. Case Rep.* 21, 44-48.
- Kawalec, M., Pietras, Z., Daniłowicz, E., Jakubczak, A., Gniadkowski, M., Hryniewicz, W., Willems, R.J.L., 2007. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish Hospitals: characterization of epidemic clones. *J. Clin. Microbiol.* 45, 147–153.
- Kline, K.A., Ingersoll, M.A., Nielsen, H.V., Sakinc, T., Henriques-Normark, B., Gattermann, S., Caparon, M.G., Hultgren, S.J., 2010. Characterization of a novel murine model of *Staphylococcus saprophyticus*. Urinary tract infection reveals roles for Ssp and SdrI in virulence. *Infect. Immun.* 78, 1943-1951.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Levison, M.E., 2004. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 18, 451–465.
- Li, J., Zhang, C., Xu, X., Wang, J., Yu, H., Lai, R., Gong, W., 2007. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *FASEB J.* 21, 2466-2473.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- McClements, D.V., 2004. Protein-stabilized emulsions. *Cur. Opin. Coll. Interf. Sci.* 9, 305–313.

- Menezes, E.A., Cezafar, F.C., Andrade, M.S.S., Rocha, M.V.A.P., Cunha, F.A, 2004. Frequency of *Serratia* sp in urine infections of intern patients in the Santa Casa de Misericórdia in Fortaleza. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 70-71.
- Morehead, M.S., Scarbrough, C., 2018. Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Prim Care* 45, 467-484.
- Nascimento, V.T., Vasconcelos, M.A.S., Maciel, M.I.S., Albuquerque, U.P., 2012. Famine foods of Brazil's seasonal dry forests: ethnobotanical and nutritional aspects. *Econ. Bot.* 66, 22-34.
- Oliveira, A.M., Freire, M.O.L., Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Soares, L.A.L., Medeiros, P.L., Carvalho, B.M., Napoleão T.H., 2018a. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 95, 289-297.
- Oliveira, C.F.R., Oliveira, C.T., Taveira, G.B., Mello, E.O., Gomes, V.M., Macedo, M.L.R., 2018b. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium timbouva* with activity against *Candida* species. *Int. J. Biol. Macromol.* 119, 654-653.
- Oliveira, C.F.R., Vasconcelos, I.M., Aparicio, R., Freire, M.G.M., Baldasso, P.A., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2012. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. *Process Biochem.* 47, 929–935.
- Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Coelho, L.C.B.B., Napoleão, T.H., 2013. Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens, in: Méndez-Villas, A. (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex Research Center: Badajoz, pp. 641-649.
- Patriota, L.L.S., Procópio, T.F., Souza, M.F.D., Oliveira, A.P.S., Carvalho, L.V.N., Pitta, M.G.R., Rego, M.J.B.M., Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., 2016. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Front. Microbiol.* 7, 611.
- Pontual, E.V., Napoleão, T.H., Assis, C.R.D., Bezerra, R.S., Xavier, H.S., Navarro, D.M.A.F., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 79, 135–152,
- Pontual, E.V., Pires-Neto, D.F., Fraige, K., Higino, T.M.M., Carvalho, B.E.A., Alves, N.M.P., Lima, T.A., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Bolzani, V.S., Figueiredo,

- R.C.B.Q., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2017. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. Nat. Prod. Res. doi: 10.1080/14786419.2017.1389932
- Pontual, E.V., Santos, N.D.L., Moura, M.C., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2014. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. Parasitol. Res. 113, 727-733.
- Rasouli, H., Parvane, S., Mahnam, A., Rastegari-Pouyani, M., Hoseinkhani, Z., Mansouri, K., 2017. Anti-angiogenic potential of trypsin inhibitor purified from *Cucumis melo* seeds: Homology modeling and molecular docking perspective. Int. J. Biol. Macromol. 96, 118-128.
- Sartori, L., Daniel, L.A., 2007. Microbiological quality adequation of effluents from secondary lagoons for the application of ozone in agriculture. Información Tecnológica 18, 83-92.
- Satheesh, L.S., Murugan, K., 2011. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. Indian J. Exp. Biol. 49, 366-374.
- Scarpate, E.C.B., Cossatis, J.J., 2009. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. Saúde & Ambiente em Revista 4, 1-11.
- Segel, I.H., 1975. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. Wiley-Interscience Publication: New York.
- Sousa, G.A., Oliveira, I.S., Silva-Freitas, F.V., Viana, A.F.S.C., Neto, B.P.S., Cunha, F.V.M., Gonçalves, R.L.G., Filho, A.C.M.L., Amaral, M.P.M., Oliveira, R.C.M., Fernandes, P.D., Maciel, J.K.S., Silva, T.M.S., Souza, M.F.V., Oliveira, F.A., 2018. Gastroprotective effect of ethanol extracts of cladodes and roots of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) on experimental ulcer models. J. Ethnopharmacol. 218, 100-108.
- Tripathi, V.R., Sahasrabuddhe, A.A., Kumar, S., Garg, S.K., 2014. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Senna tora* active against midgut protease of podborer. Process Biochem. 49, 347-355.

Figure captions

Figure 1. Purification of PgTI from the stem of *P. gounellei*. (A) Gel-filtration chromatography (Sephadex G-100) of *P. gounellei* stem extract in 0.15 M NaCl. (B) Ion exchange chromatography of P1 on a DEAE FF 16/10 column equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 1.0 M NaCl. The arrow indicates the addition of eluent solution.

Figure 2. Flow cytometric analysis of the cell viability of *Escherichia coli* (A) and *Candida krusei* (B) treated with PgTI at the MIC. The negative control (NC) consisted of cells incubated in the absence of inhibitor. Isopropyl alcohol (70%, v/v) was used as a positive control (PC). FL1 vs FL3 dot plots are shown (counting beads are not shown). The bar charts display mean fluorescence in the FL3 channel, which corresponds to the staining by propidium iodide. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

Figure 1

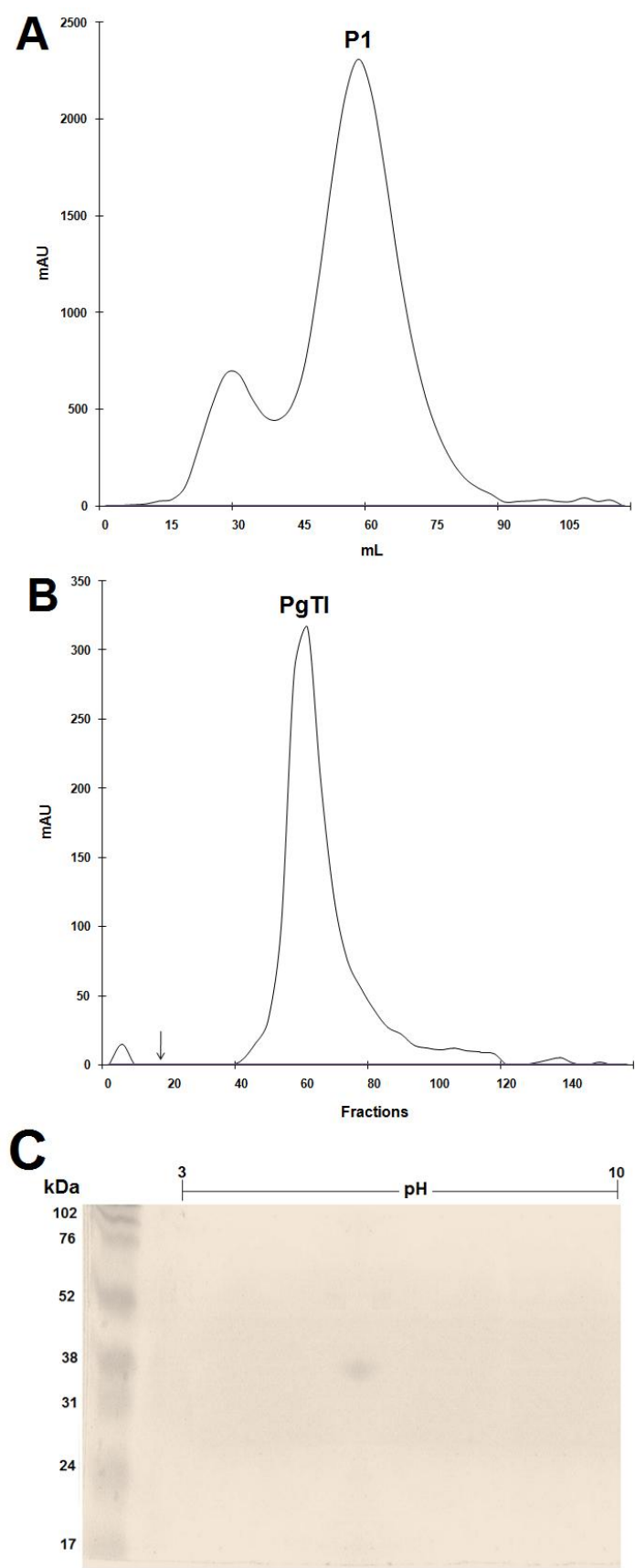
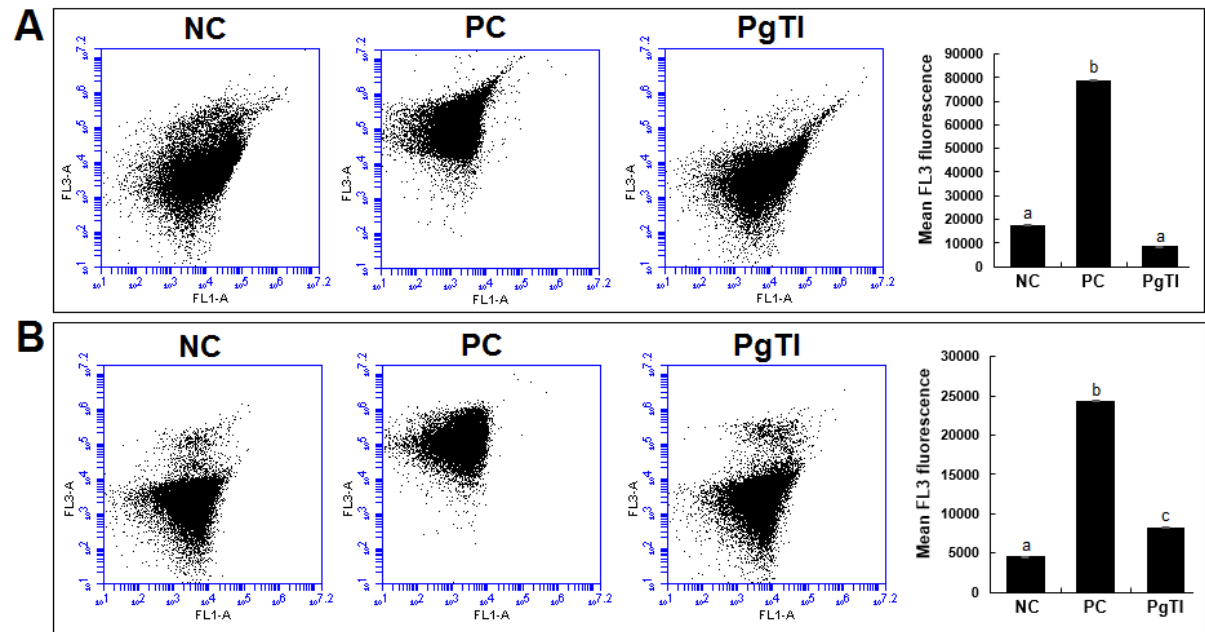


Figure 2

Table 1. Purification of the trypsin inhibitor from *P. gounellei* stem extract (PgTI).

Sample	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification factor
P1	2.0	184	100	1
PgTI	1.96	373	98.0	2.02

P1: protein peak recovered following chromatography of stem extract on Sephadex G-100. The purification corresponds to the ratio between the specific activity of PgTI and specific activity of P1.

Table 2. Peptide matches and respective amino acid sequences obtained by MS/MS analysis of PgTI after in-gel tryptic digestion.

Mass (Da)	Sequence
823.4840	VATAPLPR
855.5104	LATVSLPR
865.4484	AVASYLSR
869.5266	NGAGVSLPR
880.5050	RPGVVVVR
898.5142	GAAKGSVGPR
912.5308	GLDGVSIPR
930.5044	GSIVNINSK
1021.5052	KNMPLTYR
1032.4990	ITLESVDEK
1089.5232	TGLIEWEDK
1101.5674	QESPATLRSN
1116.5630	EFLDIDLPR
1150.5890	SVVTQAANYAK
1163.5406	QKYEELVQK
1207.6102	TQITKAAGPPPK
1221.5856	AVEENLKEYK
1235.6012	YGEEIKIEQK
1321.6554	ALGRLNPSYAMN + Oxidation (M)
1358.7164	SIGDIDSLADLK
1380.6306	ALEESNYELEGK
1421.6372	MAAFSGQLAEQNR
1437.6514	VLMARNYMEAPK + Oxidation (M)
1531.7936	FANLEKNQVAQDR
2267.0869	EYSVELDVREWASDEEVGR

Table 3. Antimicrobial activity of the trypsin inhibitor from *P. gounellei* stem extract (PgTI).

Microorganisms	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a	MBC/MFC ($\mu\text{g/mL}$) ^b
Bacteria		
<i>Escherichia coli</i>	37.5	75.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	150.0	ND
<i>Micrococcus luteus</i>	37.5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18.7	ND
<i>Serratia</i> sp.	7.5	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5	ND
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	18.7	ND
Fungi		
<i>Candida albicans</i>	ND	ND
<i>Candida krusei</i>	60.0	ND
<i>Candida parapsilosis</i>	ND	ND

MIC: minimal inhibitory concentration, MBC: minimum bactericidal concentration, MFC: minimum fungicidal concentration, ND: not detected. Concentration range used in both tests (7.5 to 150 $\mu\text{g/mL}$).

3.2 ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DO ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE INIBIDOR DE TRIPSINA DE RAMOS DE *Jacaranda rugosa*

Claudio Alberto Alves da Rocha-Filho^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Ana Patrícia Silva de Oliveira^a, Alexandre Gomes da Silva^b, Márcia Vanusa da Silva^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.*

^b*Departamento de Antibióticos, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.*

*Autor para correspondência: Patrícia Maria Guedes Paiva, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida. Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

RESUMO

Estudo anterior indicou a presença de moléculas capazes de inibir a tripsina em ramos de *Jacaranda rugosa*, uma planta endêmica da Caatinga. O presente trabalho teve como objetivos isolar, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana do inibidor de tripsina de ramos de *J. rugosa* (JrTI). JrTI foi purificado por fracionamento salino seguido de cromatografia de afinidade em coluna de Tripsina-Agarose (fator de purificação: 300). SDS-PAGE revelou uma única banda polipeptídica de aproximadamente 23 kDa. Cromatografia de gel filtração indicou um único pico proteico com massa molecular nativa de aproximadamente 27 kDa. JrTI mostrou ser uma proteína termossensível, sendo detectada uma drástica redução de sua atividade inibidora de tripsina quando incubada a 50 °C. A atividade inibidora de tripsina de JrTI foi máxima quando essa proteína foi incubada a pH 10,0 e reduzida quando em pH ácido. JrTI não demonstrou efeito bacteriostático nas bactérias testadas e apresentou atividade antifúngica somente contra *Candida krusei* com CMI de 150 µg/mL. O inibidor não apresentou atividade fungicida. JrTI causou danos à permeabilidade da parede celular do fungo. Em conclusão, o estudo confirmou a existência de um inibidor de tripsina em ramos de *J. rugosa*. Os resultados estimulam outras análises visando seu uso como antifúngico.

Palavras-chave: *Jacaranda rugosa*; inibidor de protease; atividade antifúngica.

INTRODUÇÃO

Inibidores de proteases são compostos que bloqueiam ou reduzem a atividade de enzimas proteolíticas. Muitos desses inibidores são de natureza proteica, entretanto alguns tipos de metabólitos secundários, como flavonoides, por exemplo, também podem interferir na atividade de proteases (Pontual et al., 2012). Os inibidores proteicos podem se ligar ao sítio ativo da enzima, atuando como inibidores competitivos ou podem interagir com outras regiões da molécula enzimática, atuando como inibidores não-competitivos (Napoleão et al., 2018). Em plantas, os inibidores de natureza proteica são expressos com a finalidade de controlar a atividade proteolítica endógena, bem como parte dos mecanismos de defesa contra patógenos e predadores (Li et al., 2017).

A tripsina é uma endopeptidase do grupo das serinoproteases, encontrada no sistema digestivo de vertebrados, sendo também expressa por micro-organismos, como fungos, e por invertebrados, como moluscos e insetos (Bahgat et al., 2002; Barata et al., 2002; Bhattacharyya et al., 2007). Inibidores de tripsina podem apresentar atividades antiviral, antitumoral (Fang et al., 2015), antiprotzoário (Pontual et al., 2017), antibacteriana (Bezerra et al., 2016) e antifúngica (Patriota et al., 2016), sendo fortes candidatos a agentes terapêuticos (Dang et al., 2015).

Alguns fungos e bactérias são de grande importância médica por causarem diversos tipos de infecções, principalmente em boca, olhos e mucosa genital, assim como infecções sistêmicas em pacientes imunodeprimidos, portadores do HIV ou com câncer (Papon et al., 2013). A resistência dos fungos aos quimioterápicos atualmente utilizados tem sido descrita e essa problemática estimula a busca por novos agentes antifúngicos (Sobel & Akins, 2017). *Jacaranda rugosa* A. H. Gentry, conhecida como Pindaíba-do-cerrado ou Pindaibinha, é uma árvore endêmica do Brasil, distribuída nos Estados de Pernambuco e Bahia, sendo restrita ao bioma Caatinga, onde se desenvolve em solos arenosos e pedregosos (Malafaia et al., 2018). Do ponto de vista terapêutico, uma infusão em água ou maceração em álcool das folhas de *J. rugosa* são utilizadas no tratamento contra sífilis e úlceras (Silva et al., 2014). Estudo prévio demonstrou a presença de inibidor de tripsina em ramos *J. rugosa* (Arcoverde et al., 2014). A região semiárida do estado de Pernambuco é dotada de grande número de recursos, os quais têm sido utilizados pela população, mas pouco explorados biotecnologicamente. Dessa forma, a ampliação de ações objetivando a bioprospecção bioquímica de plantas encontradas nessa região é de extrema importância.

O objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar o inibidor de tripsina presente nos ramos de *J. rugosa* (do inglês JrTI, *J. rugosa trypsin inhibitor*) e avaliar sua ação antibacteriana e antifúngica frente a espécies de importância médica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Ramos de *Jacaranda rugosa* foram coletados no município de Buíque, estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, sob autorização (número 16806) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente. O acesso foi registrado (A08E18B) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Os ramos foram secos a 28 °C por 3 dias e, em seguida, triturados em multiprocessador. Depois, o material vegetal pulverizado foi armazenado a -20° C.

Purificação de JrTI

O pó dos ramos foi homogeneizado por 16 h a 28 °C em NaCl 0,15 M, na proporção de 10% (p/v), usando um agitador magnético. O homogenato foi filtrado utilizando um papel filtro e o material filtrado foi tratado com carvão ativado (10%, p/v, Reagen, Paraná, Brasil) e, após nova filtração, o filtrado correspondeu ao extrato de ramos. A concentração de proteínas do extrato foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) utilizando curva padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL). Atividade inibidora de tripsina foi avaliada como descrito na próxima seção.

Posteriormente, o extrato foi tratado com sulfato de amônio a 40% de saturação (Green & Hughes, 1955) por 4 h a 28 °C. A fração de proteínas precipitadas (FP) e a fração sobrenadante (FS) foram coletadas após centrifugação (15 min, 8.000 g, 4°C) e dialisados em água destilada (4 h) e Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (4 h) para avaliação quanto à concentração de proteínas e atividade inibidora de tripsina. FP (1 mL; 0.1 mg de proteínas) foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Tripsina-Agarose (4.5×1.0 cm) previamente equilibrada com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo CaCl₂ 0,02 M a um fluxo de 6,0 mL/min. Após etapa de lavagem, as proteínas adsorvidas foram eluídas com KCl-HCl 0,1 M pH 2,0.

Frações de 2 mL foram coletadas em tubos de ensaio e monitoradas a uma absorbância a 280 nm utilizando o espectrofotômetro GeneQuant™ 1300 (GE Healthcare, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). As frações de proteínas adsorvidas com absorbância maior que 0,100 foram reunidas e o *pool* (JrTI) foi dialisado em água (4 h), liofilizado, ressuscitado em tampão Tris e avaliado quanto à concentração de proteínas e atividade inibidora de tripsina.

O pico de proteínas não adsorvidas e JrTI (250 µg de proteínas) foram avaliados quanto ao perfil proteico em condições desnaturantes através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sulfato sódico de dodecila, SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Atividade inibidora de tripsina

Ensaio de inibição da atividade hidrolítica da tripsina foi realizado em placa de microtitulação. Alíquota da enzima (5 µL a 0,1 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo CaCl₂ 0,02 M) foi adicionada a poço da microplaca contendo 5 µL do substrato N- α -benzoyl-DL-arginina- ρ -nitroanilida (BAPNA) e diferentes volumes da amostra a ser avaliada (20, 30 e 50 µL). O volume de cada poço foi ajustado para 200 µL com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Foram realizados controles do substrato (ausência da enzima e amostra), da amostra (1: ausência da enzima; 2: ausência da enzima e substrato) e enzima 100% (ausência da amostra). A absorbância a 405 nm foi determinada antes e após incubação do teste a 37 °C por 30 min. A inibição foi medida pela atividade residual da enzima e expressa em relação à hidrólise do substrato promovida na ausência das amostras avaliadas. Uma unidade de atividade inibidora de tripsina foi definida como a quantidade de inibidor que reduz a absorbância a 405 nm em 0,01 durante 30 min (Oliveira et al. 2012). Atividade específica foi definida pela razão entre o número de unidades e a quantidade de proteínas (mg).

Determinação da massa molecular nativa

A massa molecular nativa do inibidor foi determinada através de cromatografia de gel filtração em coluna Hiprep 16/60 Sephacryl™ S-100 HR (60 cm x 16 mm) acoplada ao sistema ÄKTA Prime (GE Healthcare) e equilibrada com NaCl 0,15 M a um fluxo de 0,5 mL/min a 24 °C. A amostra (200 µg) foi injetada e eluída (frações de 3,0 mL) com NaCl 0,15

M. Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina, 66 kDa, fetuína, 64 kDa, ovoalbumina, 45 kDa, inibidor de tripsina de clara de ovo do tipo III, 28 kDa, e tripsina, 25 kDa) foram similarmente cromatografados.

Ensaio de estabilidade em diferentes condições de temperatura e pH

Amostras de JrTI foram aquecidas em aquecedor elétrico por 30 min em diferentes temperaturas (30, 50, 70 e 90° C). Após aquecimento, as amostras foram avaliadas quanto à atividade inibidora de tripsina como descrito acima. Para avaliação da estabilidade de JrTI em diferentes condições de pH, o inibidor foi incubado por 30 min em tampões em diferentes valores de pH (tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 3,0 a 6,0, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 ou Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 ou 10,0). Após incubação, as amostras foram avaliadas quanto à atividade inibidora de tripsina.

Análises fluorimétricas

Os efeitos do pH e temperatura na conformação de JrTI foram avaliados por análise fluorimétrica usando a sonda extrínseca bis-ANS [(bis (8-anilinaftaleno-1-sulfonato))], que emite fluorescência quando se liga a regiões hidrofóbicas rodeadas por resíduos positivamente carregados. As medidas de fluorescência utilizaram as seguintes amostras de JrTI (2,0 µM): JrTI incubada em pH 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 com os mesmos tampões descritos acima e JrTI previamente incubado por 30 min a diferentes temperaturas (30 a 100 °C). As amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo (10 × 10 mm caminho da luz; Hellma GmbH & Co. KG, Alemanha) e depois incubadas com excesso molar de 50 vezes de bis-ANS no escuro. Os espectros de fluorescência bis-ANS foram registrados num espectrofluorímetro Jasco FP-6300 (Jasco Corporation, Japão) a 25 °C, definindo o comprimento de onda de excitação a 360 nm e a emissão na gama de 400 a 600 nm. A ligação de bis-ANS foi avaliada por área de intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. Os espectros exibidos nas figuras são as médias de cinco varreduras e os sinais foram corrigidos subtraindo-se o espectro da solução com água.

Ensaio de atividade antimicrobiana

Bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* UFPEDA-438, *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* UFPEDA-396, *Escherichia coli* UFPEDA-1015, *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis-UFPEDA-414) foram fornecidas pela coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. As culturas armazenadas de *Candida albicans* (URM 5901), *Candida tropicalis* (URM 6551), *Candida parapsilosis* (URM 6345) e *Candida krusei* (URM 6391) foram obtidas da coleção de culturas da Universidade Recife Mycologia (URM), Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. As bactérias foram cultivadas em Mueller Hinton Agar (MHA) durante a noite a 37 °C e leveduras foram cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) durante a noite a 28 °C. As densidades das culturas de microrganismos foram ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (OD₆₀₀) a 1×10^8 (bactérias) ou 3×10^6 (leveduras) unidades formadoras de colônia (UFC) por mL em solução salina estéril (NaCl 0,15 M).

Os ensaios de microdiluição em caldo foram realizados para determinação dos valores da concentração mínima inibitória (CMI). Primeiro, a amostra foi diluída seriadamente em água. O meio de cultura [Caldo Mueller Hinton (MHB) para bactérias ou Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) para leveduras] foi adicionado com o mesmo volume (40 µL) em todos os poços. A primeira fileira serviu de controle para esterilidade e apenas continha meio de cultura. Em seguida, 40 µL de JrTI (a uma concentração de 0,1 mg / mL) foi adicionado as placas de ambos os testes, e uma diluição em série de duas vezes foi realizada até o último poço. Finalmente, a suspensão de microrganismos ($10 \mu\text{L}$ a 10^8 UFC / mL para bactérias ou $20 \mu\text{L}$ a 3×10^6 UFC / mL para leveduras) foi adicionada a todos os poços, exceto o primeiro poço. O segundo poço, contendo microrganismo na ausência de JrTI, correspondeu ao controle de 100% do crescimento. As microplacas foram incubadas a 37 °C ou 28 °C para bactérias e leveduras, respectivamente. O OD₆₀₀ foi medido no tempo zero e após 24 h para bactérias e 48 h para fungos usando um leitor de microplacas. A CMI foi definida como a menor concentração de JrTI capaz de reduzir a densidade óptica $\geq 50\%$ em comparação com o controle de 100% do crescimento.

Para determinação da concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima de fungicida (CMF), alíquotas (10 µL) dos poços contendo concentrações de JrTI maiores ou iguais às CMI foram inoculadas em placas de petri contendo MHA ou SDA, e incubadas por

24 h a 37 °C para bactérias ou 48 h a 28 °C para leveduras. O CMB e o CMF corresponderam à menor concentração capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

Análise de morte celular

A indução de morte celular por JrTI foi avaliada utilizando o *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). *C. krusei* foi cultivada na ausência (controle) ou na presença de JrTI na CMI por 16 h. Após centrifugação (10 000 g, 10 min, 25 ° C) e rejeitando o sobrenadante, 1,0 mL de PBS foi adicionado ao precipitado. As células foram ressuspensas e novamente centrifugadas nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensão em 100 µL de um tampão de ligação (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM) e adicionou-se anexina V (AnnV) conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500) e iodeto de propídio (IP, 20 µg/mL). A citometria de fluxo foi realizada no citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences), coletando-se um mínimo de 20.000 eventos. A análise foi realizada usando o software BD Accuri C6. As células AnnV–/IP+ foram consideradas necróticas e as células AnnV+/IP– foram consideradas nos estágios iniciais da apoptose. Duplo negativos foram considerados células viáveis. As células com coloração AnnV+/PI+ podem estar no estágio final da apoptose, sofrendo necrose ou já estarem mortas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de plantas da Caatinga vem aumentando progressivamente nos últimos anos, visto que são bastante utilizadas pela população para diversos fins terapêuticos, mas a maioria das espécies ainda não é caracterizada quanto a sua constituição química e/ou atividades biológicas (Ribeiro et al., 2014). O presente trabalho visou investigar a espécie *J. rugosa* devido a escassez de estudos relativos a atividades biológicas dessa planta. Além disso, Arcoverde et al. (2014) descreveram a existência de inibidor de tripsina em ramos de *J. rugosa*, o que instigou a purificação dessa biomolécula.

Durante o processo de extração, a preparação obtida logo após a primeira etapa de filtração apresentou coloração intensa, o que impossibilitou a análise da atividade inibidora de

tripsina e dosagem da concentração de proteínas. Então, para reduzir a coloração, foi utilizado o carvão ativado, um material com a capacidade de promover clarificação de materiais vegetais. A concentração de proteínas do extrato de ramos de *J. rugosa*, obtido após o tratamento com o carvão, foi de 0,534 mg/mL. Esse extrato foi capaz de reduzir a atividade de tripsina em 41%, sendo a atividade específica de 0,4 U/mg.

A forte pigmentação na preparação obtida inicialmente a partir dos ramos de *J. rugosa* ocorreu, provavelmente, pela grande quantidade de metabólitos secundários, dentre eles taninos. O tratamento com carvão ativado foi eficiente em separar proteínas bioativas dos pigmentos, uma vez que após essa etapa foi possível determinar a concentração de proteínas e atividade inibidora de tripsina do extrato. Essa técnica também foi efetiva na clarificação de extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* visando a purificação de lectina (Gomes et al., 2013).

As proteínas presentes no extrato com ação inibidora de tripsina foram precipitadas na faixa de saturação 0-40%, uma vez que FP reduziu a atividade da tripsina em 76% e apresentou atividade específica de 48 U/mg (fator de purificação: 120). Contudo, FS não apresentou atividade inibidora de tripsina. FP foi então cromatografada em coluna de afinidade e seu perfil cromatográfico (Figura 1A) apresentou dois picos: um primeiro contendo proteínas não adsorvidas (P1) e um segundo pico (P2, frações) de proteínas adsorvidas eluídas com tampão KCl-HCl 0,1 M pH 2,0. P1 não foi capaz de reduzir a atividade da tripsina, entretanto P2 causou redução da atividade enzimática da tripsina em 70%. SDS-PAGE (Figura 1B) revelou uma série de bandas polipeptídicas em P1 enquanto P2 apresentou uma banda polipeptídica de aproximadamente 23 kDa; sendo assim, P2 foi denominado como JrTI, correspondendo ao inibidor de tripsina purificado. Cromatografia de gel filtração indicou um único pico proteico com massa molecular nativa de aproximadamente 27 kDa (Figura 1C), confirmando os resultados obtidos em SDS-PAGE. JrTI apresentou uma atividade específica de 120 U/mg, correspondendo a um fator de purificação de 300 em relação ao extrato. A Tabela 1 sumariza os resultados da purificação do inibidor. A queda de rendimento proteico observada está relacionada com a exclusão de outras proteínas que não eram de interesse ao longo do processo, tanto no fracionamento salino como na etapa cromatográfica.

JrTI mostrou ser uma proteína termossensível, sendo detectada uma drástica redução de sua atividade inibidora de tripsina quando incubada a 50 °C (Figura 2A). A atividade inibidora de tripsina foi neutralizada nas demais temperaturas avaliadas (70 e 90 °C). O

acompanhamento de alterações estruturais utilizando a sonda bis-ANS revelou que JrTI sofreu modificações estruturais provavelmente em regiões próximas ao seu sítio ativo, alteração esta evidenciada com o aumento na intensidade da fluorescência quando JrTI foi incubado a temperaturas entre 40 e 90 °C, em comparação à curva obtida para 30 °C (Figura 2B). Esses resultados indicam que JrTI não sofreu desenovelamento nessas condições, ocorrendo somente um maior fechamento dos sítios hidrofóbicos. Apesar disso, as alterações conformacionais foram suficientes para que a proteína perdesse a atividade inibidora de tripsina. Elevado grau de desenovelamento de JrTI foi observado somente na amostra incubada a 100 °C, como indicado pela grande redução da intensidade de fluorescência (Figura 2B). JrTI apresentou maior sensibilidade a temperatura comparado a outros inibidores de protease como o de *Capsicum frutescen*, estável até 60 °C, e de *Pseudostellaria heterophylla*, estável até 70 °C (Cai et al., 2018; Mohan et al., 2018).

A atividade inibidora de tripsina de JrTI foi máxima quando essa proteína foi incubada a pH 10,0 e reduzida quando em pH ácido (Figura 2C). Essas alterações provavelmente estão relacionadas a mudanças conformacionais relacionadas ao sítio ativo do inibidor ou modificações de menor repercussão na estrutura global da proteína, uma vez que a análise fluorimétrica utilizando bis-ANS não revelou alterações significativas nas curvas obtidas em pH 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 (Figura 2D). Outros inibidores de tripsina isolados de plantas demonstram estabilidade em uma ampla faixa de pH, assim como inibidores de *Entada acaciifolia* e *Catanduva* (Oliveira et al., 2012; Cruz et al., 2013).

O teste de atividade antimicrobiana com espécies de importância médica mostrou que JrTI não apresentou atividade contra nenhuma das bactérias testadas, mas inibiu o crescimento de *C. krusei* com CMI de 150 µg/mL. O inibidor não apresentou atividade fungicida. O ensaio em citometria de fluxo revelou que a incubação com JrTI causou danos à permeabilidade da parede celular do fungo, como indicado pela marcação com iodeto de propídeo, mas não induziu morte celular da *Candida* por apoptose (Figura 3).

Proteínas capazes de inibir o crescimento de microorganismos têm sido descritas (Bezerra et al., 2016). A inibição do crescimento de *C. krusei* pode ser devido à interação de JrTI com proteases fúngicas ou danos causados na membrana celular, alterando sua permeabilidade (Paiva et al., 2013; Macedo et al., 2016; Majchrzak-Gorecka et al., 2016). Macedo et al. (2016) descreveram que inibidor de tripsina de sementes de *Inga laurina* inibiu completamente o crescimento de *C. tropicalis* (CMI de 250 µg/ml) e *C. buinensis* (CMI de

250 µg/ml), provavelmente pela inibição de proteinases responsáveis pela síntese de componentes fúngicos.

CONCLUSÃO

O estudo confirmou a existência de um inibidor de tripsina em ramos de *J. rugosa*, o qual pode ser purificação por fracionamento salino e cromatografia de afinidade. Ainda, o inibidor interage de forma diferente com a tripsina quando submetido a diferentes faixas de pH e temperatura. Essas condições provavelmente atingem aminoácidos diferentes na proteína, desfazendo também interações distintas. JrTI apresentou atividade fungistática contra *C. krusei*, o que estimula outras análises visando seu uso como antifúngico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) à *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) e à *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) pelo apoio financeiro. C.A.A. Rocha-Filho agradece à FACEPE pela concessão de bolsa de doutorado (IBPG-0402-2.08/14).

REFERÊNCIAS

- Amsterdam, D. 1996. "Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media," in *Antibiotics in Laboratory Medicine*, ed. V. Loman (Baltimore:Williams and Wilkins), 52–111.
- Arcoverde, J. H. V., Carvalho, A. S., Neves, F. P. A., Dionízio, B. P., Pontual, E. V.; Paiva, P. M. G., Napoleão, T. H., Correia, M. T. S., Silva, M. V., Carneiro-da-Cunha, M. G. 2014. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. *Natural Product Research*. 28,1297-1301.
- Bahgat, M., Denhoff, M., Kirschfink, M. & Ruppel, A. 2002. Serine protease and phenoloxidase activities in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 88, 489–494.

- Barata, R. A., Andrade, M. H. G., Rodrigues, R. D. & Castro, I. M. 2002. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 94,304–308.
- Bezerra, C. S., Oliveira, C. F. R., Machado, O. L. T., Mello, G. S. V., Rocha Pitta, M. G., Melo Rêgo, M. J. B., Napoleão T.H., Paiva P. M. G., Fátima Ferreira Ribeiro S., Gomes V. M., Silva, O. N. Maria Neto, S., Franco, O. L., Macedo, M. L. R. 2016. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. Process Biochemistry. 51, 792–803.
- Bhattacharyya, A., Leighton, S. M., Babu, C. R. 2007. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 145, 669-677.
- Cai, X., Xie, X., Fu, N., Wang, S. 2018. Physico-Chemical and Antifungal Properties of a Trypsin Inhibitor from the Roots of *Pseudostellaria heterophylla*. Molecules. 23,2-13.
- Cruz, A. C. B., Massena, F. S., Migliolo, L., Macedo, L. L. P., Monteiro, N. K. V., Oliveira, A. S., Macedo, F. P., Uchoa, A. F., Grossi de Sá, M. F., Vasconcelos, I. M, Murad, A. M., Franco, O. L., Santos, E. A. 2013. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. Plant Physiol. Biochem, 70, 61–68.
- Dang, L., Van Damme, E. J. M. 2015. Toxic proteins in plants. Phytochemistry. 117, 51–64.
- Fang, E. F., Ng, T. B. 2015. A trypsin inhibitor from rambutan seeds with antitumor, anti-HIV-1 reverse transcriptase, and nitric oxide-inducing properties. Applied Biochemistry and Biotechnology. 175, 3828–3839..
- Gomes, F. S., Procópio, T. F., Napoleão, T. H., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P.M.G. 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. Journal of Applied Microbiology. 114, 672-679.
- Green, A. A., Hughes, W. L. 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: Methods in Enzymology vol. 1 (S. Colowick & N. Kaplan, eds.). Academic Press, New York, p. 67-90.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

- Li, M., Liu, Q., Cui, Y., Li, D., Wang, H., Ng, T. B. 2017. Isolation and characterization of a *Phaseolus vulgaris* trypsin inhibitor with antiproliferative activity on leukemia and lymphoma cells. *Molecules*. 22,187.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–275
- Macedo, M. L. R., Ribeiro, S. F. F., Taveira, G. B., Gomes, V. M., Barros, K. M. C. A., Maria-Neto, S. 2016. Antimicrobial activity of ILTI, a Kunitz-Type trypsin inhibitor from *Inga laurina* (SW). *Current Microbiology*. 72, 538–544.
- Majchrzak-Gorecka, M., Majewski, P., Grygier, B., Murzyn, K., Cichy, J. 2016. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 28, 79-93.
- Malafaia, C. B., Jardelino, A. C. S., Silva, A. G., Souza, E. B., Macedo, A. J., Correia, M. T. S., Silva, M. V. 2018. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Ecology*. 75, 555-561.
- Mohan, M., Kozhithodi, S., Nayarisseri, A., Elyas, K. K. 2018. Screening, Purification and Characterization of Protease Inhibitor from *Capsicum frutescens*. *Bioinformation*. 14, 285-293.
- Napoleão, T. H., Albuquerque, L. P., Santos, N. D. L., Nova, I. C. V., Lima, T. A., Pontual, E. V. 2018. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest Management Science*.
- Oliveira, C. F. R., Vasconcelos, I. M., Aparicio, R., Freire, M. G. M., Baldasso, P. A., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. 2012. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. *Process Biochemistry*. 47, 929–935.
- Paiva, P. M. G., Pontual, E. V., Coelho, L. C. B. B., Napoleão, T. H. 2013. Protease inhibitors from plants: biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens,” in *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, vol. 1, ed. A. Méndez-Villas (Badajoz: FormatexResearch Center), 641–649.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., and Bennett, R. J. 2013. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens* 9:e1003550.

- Patriota, L. L. S., Procópio, T. F., Souza, M. F. D., Oliveira, A. P. S., Carvalho, L. V. N., Pitta, M. G. R., Rego, M. J. B. M., Paiva, P. M. G., Pontual, E. V., Napoleão, T. H. 2016. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Frontiers in Microbiology*. 7, 611.
- Pontual, E. V., Napoleão, T. H., Assis, C. R. D., Bezerra, R. S., Xavier, H. S., Navarro, D. M. A. F., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P. M. G. 2012. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 79, 135-152.
- Pontual, E. V., Pires-neto, D. F., Fraige, K., Higino, T. M. M., Carvalho, B. E. A., Alves, N. M. P., Lima, T. A., Zingali, R. B., Coelho, L. C. B. B., Bolzani, V. S., Figueiredo, R. C. B. Q., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G. 2017. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. *Natural Product Research*, v. XX, p. 1-5.
- Ribeiro, D. A., Macêdo, D. G., Oliveira, L. G. S., Saraiva, M. E., Oliveira, S. F., Souza, M. M. A., Menezes, I. R. A. 2014. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 16, 912-930.
- Silva, L. N., Trentin, D. S., Zimmer, K. R., Treter, J., Brandelli, C. L. C., Frasson, A. P., Tasca, T., Silva, A. G., Silva, M. V., Macedo, A. J. 2014. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharmaceutical Biology*. 53, 464-468.
- Sobel, J. D., Akins, R. A. 2017. The role of resistance in *Candida* infections: epidemiology and treatment. In: *Antimicrobial Drug Resistance - Clinical and Epidemiological Aspects*, V. 2 (Mayeres, D., Sobel, J. D., Ouellette, M., Kaye, K. S., Marchaim, D., eds.). Springer International Publishing, 1075-1097.

Figuras

Figura 1. Purificação de inibidor de tripsina de ramos de *Jacaranda rugosa*. (A) Cromatografia da fração precipitada 0-40% em coluna de Tripsina-Agarose. (B) SDS-PAGE dos padrões de massa molecular (1), P1 (2) e JrTI (3). A seta indica uma banda polipeptídica de 23 kDa encontrada em P2. (C) Cromatografia de gel filtração em coluna Hiprep Sephacryl S-100 HR.

Figura 2. Efeitos do aquecimento e da variação de pH na estabilidade de JrTI. (A) Atividade inibidora de tripsina de JrTI incubada em diferentes temperaturas. (B) Espectros de fluorescência da sonda bis-ANS quando incubado com JrTI previamente aquecido. (C) Atividade inibidora de tripsina de JrTI incubada em diferentes valores de pH. (D) Espectros de fluorescência da sonda bis-ANS quando incubado JrTI foi incubado em pH 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0.

Figura 3. Análise por citometria de fluxo da ocorrência de apoptose ou necrose em células de *Candida krusei* tratadas ou não com JrTI na CMI. Quadrante UL: células marcadas com iodeto de propídeo (necróticas). Quadrante LR: células marcadas com anexina V (apoptóticas). Quadrante UR: células duplamente marcadas (necrose ou apoptose tardia).

Figura 1

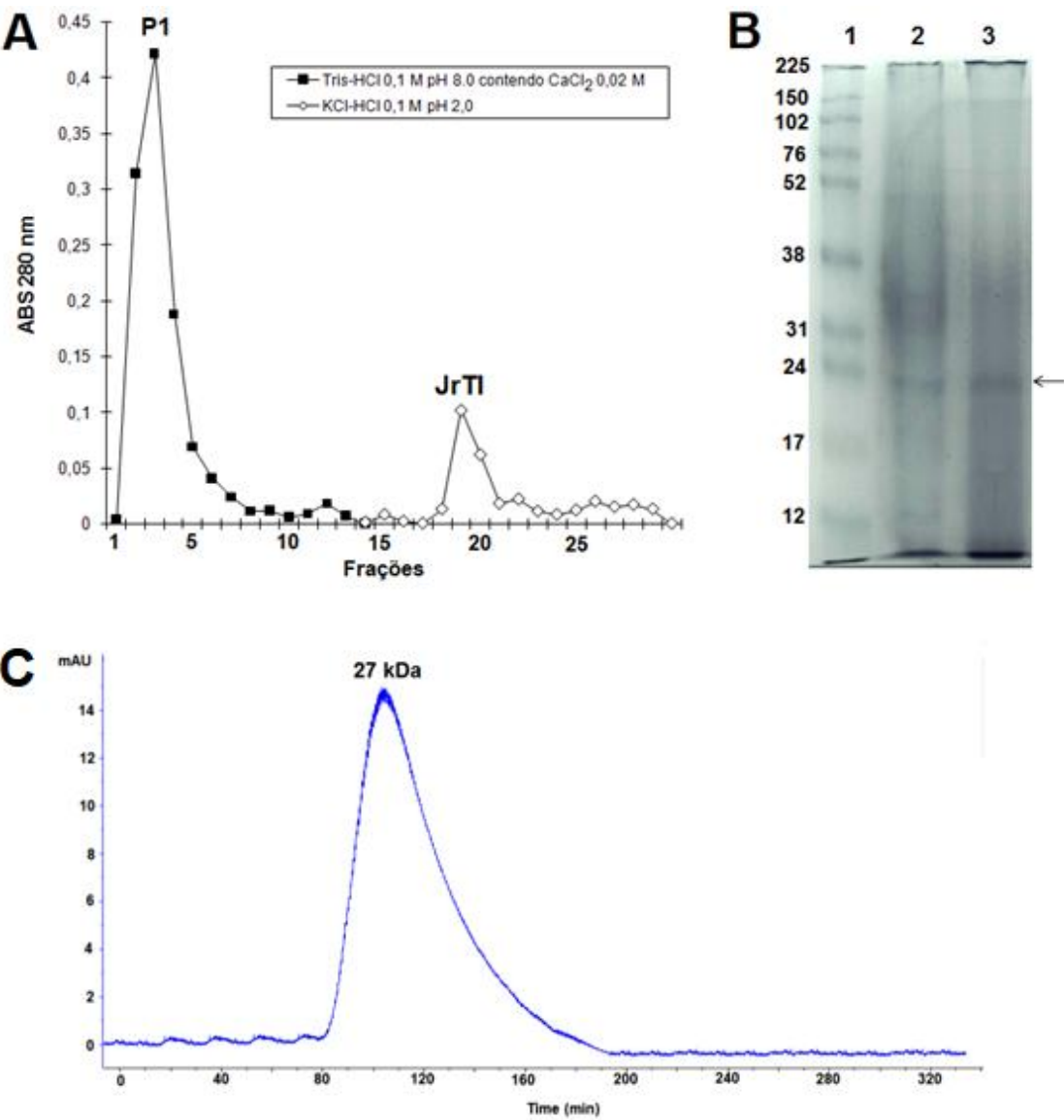


Figura 2

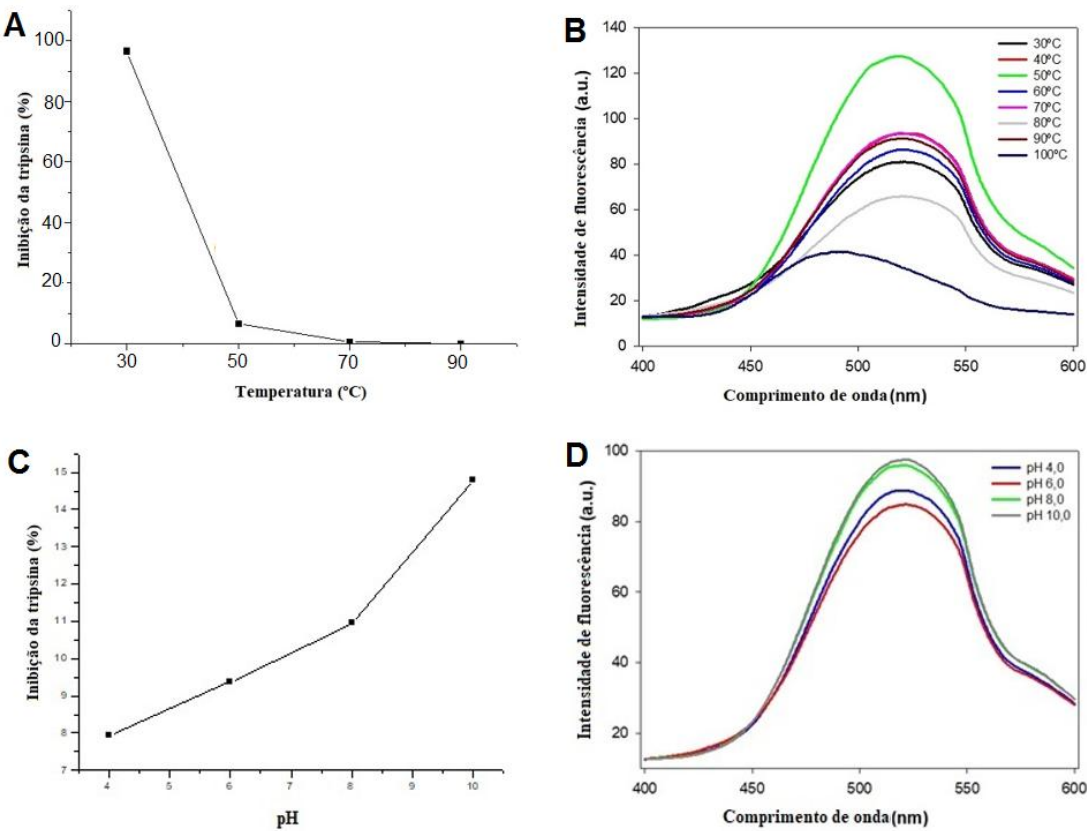


Figura 3

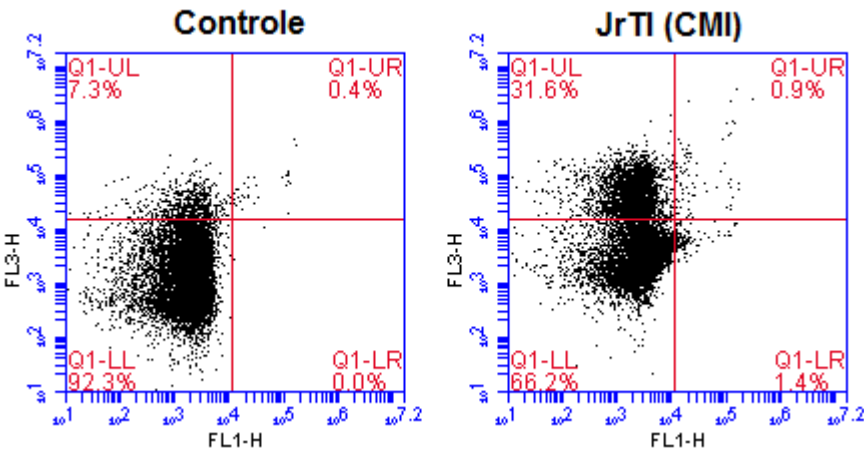


Tabela 1. Sumário da purificação do inibidor de tripsina de ramos de *J. rugosa* (JrTI).

Amostra	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)^a	Rendimento (%)^b	Fator de purificação^c
Extrato	0,534	0,4	100	1
FP	0,122	48,0	22,8	120
JrTI	0,1	120,0	18,0	300

FP corresponde à fração de proteínas precipitadas na faixa de saturação de 0-40%, JrTI corresponde ao pico de proteínas adsorvidas em coluna de tripsina-agarose. A atividade específica foi determinada como a razão entre a atividade inibidora de tripsina (U) e a quantidade de proteínas (mg). O rendimento correspondeu à quantidade de proteína do extrato recuperada após a purificação. O fator de purificação foi medido como a razão entre a atividade específica da etapa e a atividade específica do extrato.

3.3 ARTIGO 3 – AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE RAMOS E FOLHAS DE *Jacaranda rugosa*

Claudio Alberto Alves da Rocha-Filho^a, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Alexandre Gomes da Silva^b, Márcia Vanusa da Silva^a, Janaína Carla Barbosa Machado^c, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^c, Luiz Alberto Lira Soares^c, Teresinha Gonçalves da Silva^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

^bDepartamento de Antibióticos, CB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

^cDepartamento de Farmácia, CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Autor para correspondência: Patrícia Maria Guedes Paiva, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida. Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Resumo

Jacaranda rugosa (Bignoniaceae) é uma árvore endêmica do Brasil, restrita ao bioma Caatinga. O presente trabalho teve como objetivo avaliar extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa* quanto ao perfil fitoquímico (através de cromatografia de camada delgada, CCD, e cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE) e às atividades antibacteriana (método de diluição em caldo), antioxidante (contra os radicais livres DPPH e ABTS⁺) e anti-inflamatória (modelo de peritonite induzida pela carragenina em camundongos). Ainda, os extratos foram avaliados quanto à toxicidade aguda por via oral (2000 mg/kg). A análise por CCD identificou a presença de flavonoides e esteroides nos extratos de ramos e folhas. As análises por CLAE-DAD evidenciaram a presença de rutina no extrato de folhas e de rutina, quercetina e hiperosídeo no extrato de ramos. Adicionalmente, foi identificada a presença de fenilpropanoides nos extratos. O extrato de folhas apresentou atividade bacteriostática contra *Escherichia coli* (CMI: 10 mg/mL) e *Streptococcus pyogenes* (CMI: 20 mg/mL). Já o extrato de ramos inibiu o crescimento de *E. coli* (CMI: 5 mg/mL). Os extratos foram ativos contra DPPH (IC₅₀ de 17,04 e 9,37 µg/mL para ramos e folhas, respectivamente) e ABTS⁺ (IC₅₀ de

16,39 e 9,10 $\mu\text{g/mL}$ para ramos e folhas, respectivamente). No teste de toxicidade aguda, nenhuma morte e alterações em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos foram detectadas. No teste de peritonite, os extratos de ramos e folhas (200 mg/kg, via oral) reduziram significativamente a migração celular de leucócitos para o exsudato peritoneal. Os resultados obtidos valorizam a espécie *J. rugosa* como fonte de recursos farmacológicos para o homem. Estudos futuros são necessários para evidenciar quais compostos apresentam as atividades biológicas detectadas, assim como quais são os seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: jacarandá; peritonite; toxicidade aguda; radicais livres.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o homem tem dado atenção especial aos vegetais com potencial farmacológico para a cura de doenças. A descoberta de novas espécies de plantas com ação terapêutica ou a confirmação das propriedades descritas popularmente tem suma importância, visto que muitos dos medicamentos utilizados apresentaram diversos efeitos colaterais e/ou eficácia limitada (Santos-Lima et al., 2016; Silva et al., 2014). Metabólitos secundários são compostos produzidos pelos vegetais para garantir sua propagação e sobrevivência, principalmente na defesa contra herbívoros, patógenos ou competidores. Diversos estudos descrevem as mais variadas atividades biológicas de metabólitos secundários e apontam a utilização desses compostos como fármacos comerciais (Ribeiro et al., 2014).

O bioma Caatinga, localizado na região nordeste do Brasil, apresenta clima quente e seco com uma elevada diversidade de vegetação (Rodal & Nascimento, 2006). Consequentemente, há uma grande variedade de metabólitos secundários sendo produzidos por essas plantas, muitos deles com características estruturais únicas. Plantas da Caatinga têm demonstrado seu potencial em testes biológicos, como na prevenção de aderência e crescimento bacteriano (Trentin et al., 2011), redução da inflamação, lipoperoxidação e hiperalgesia em ratos (Santana et al., 2012) e na inibição de agentes oxidantes (Torres et al., 2018).

Jacaranda rugosa (Bignoniaceae) é uma árvore endêmica do Brasil, ocorrendo nos Estados de Pernambuco e Bahia, sendo restrita ao bioma Caatinga, onde se desenvolve em solos arenosos e pedregosos (Gentry, 1992). Do ponto de vista terapêutico, *J. rugosa* é utilizada popularmente contra sífilis e úlceras (Silva et al., 2014) e apresentou atividade

antibiofilme contra *Staphylococcus epidermidis* e inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (Silva et al., 2014; Otto, 2009).

O contexto descrito acima estimula a avaliação de novas atividades biológicas de *J. rugosa*. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa* quanto ao perfil fitoquímico e às atividades antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória. Adicionalmente, foi avaliada a toxicidade aguda dos extratos para camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Ramos e folhas de *J. rugosa* A. H. Gentry foram coletados no município de Buíque, Pernambuco, de acordo com autorização nº 16806 (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Ambos foram secos a 28 °C por 3 dias e, em seguida, triturados separadamente em multiprocessador. Por fim, os materiais foram estocados em pó a -20°C.

Preparo dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos foram preparados conforme descrito por Sousa et al. (2007). Álcool etílico absoluto (99,5%) foi adicionado aos materiais vegetais em pó na proporção de 5% (p/v). Após 48 h de incubação e filtração, os extratos foram obtidos e o solvente foi removido por evaporação rotativa. O rendimento dos extratos foi calculado pela expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato} / \text{massa do material vegetal}) \times 100$.

Análise por Cromatografia em Camada Delgada

Os extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa* (2,4 mg de cada) foram diluídos com 2 mL de metanol e levadas ao ultrassom durante 10 min para completa solubilização. As amostras e os padrões (1 mg/mL) foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Quadro 1). A cuba foi saturada

durante 15 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 5 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5 mm. As amostras foram aplicadas a 5 mm da origem e com término 5 mm do final da placa. Após a eluição das placas as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível, para em seguida serem digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito como mostra o Quadro 1. Por fim, as bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Quadro 1 - Sistemas, reveladores e padrões utilizados.

Classe de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	90:5:5	NEU + PEG	Ácido gálico
Taninos condensados	90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonoides	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina
Derivados Cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ácido Cafeico e Ácido Clorogênico
Terpenos e Esteroides	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β -Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	Lieberman-Burchard+ Δ	Escina
Açúcares redutores	50:20:10:10	Timol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-frutose
Alcaloides	50:6,75:5	Dragendorff	Nitrato de pilocarpina
Antraquinonas	50:6,75:5	HNO ₃ + KOH10%	Senosídeo A

Sistemas: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 – Tolueno: acetato; 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 – Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 – Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:6,75:5 – Acetato de etila: metanol: água.

Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Preparo das soluções

Para preparação das soluções estoque, as amostras (2,4 mg de cada) foram diluídas com 2 mL de metanol e levadas ao ultrassom durante 10 minutos para completa solubilização. Das soluções-estoque, foram retiradas alíquotas de 0,25 mL para um balão volumétrico de 5

mL, sendo o volume completado com água ultrapura (Purelab[®], Elga LabWater, EUA). Depois, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 µm. Os padrões de flavonoides (vitexina, rutina, quercetina e hiperosídeo) e derivado cinâmico (ácido cafeico) foram pesados e diluídos para 10 mL em metanol (grau HPLC, Tedia). Destas soluções, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com água ultrapura. Em seguida, as soluções finais foram filtradas em filtro de PVDF 0,45 µm. Também foram preparadas uma solução contendo amostras+padrões para confirmar a presença dos compostos.

Condições cromatográficas

A análise por CLAE foi realizada num sistema HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degaseificador e amostrador automático equipado com um *loop* de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm e 350 nm para a detecção de taninos hidrolisáveis e flavonoides, respectivamente. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex[®] (EUA) equipada com pré-coluna (C₁₈ de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 26 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,7 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-10 min, 5-20% de B; 10-15 min, 20-25% de B; 15-18 min, 25-40% de B; 18-25 min, 40-80% de B; 25-30 min, 80% de B; 30-34 min, 80-5% B. Para a análise e processamento dos dados, o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado.

Ensaio de atividade antibacteriana

Bactérias (*Escherichia coli* UFPEDA-1015, *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis UFPEDA-414, *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA-416, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA-07) foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os microorganismos foram cultivadas em Mueller Hinton Agar (MHA) durante a noite a 37 °C. A densidade da cultura foi ajustada

turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (OD_{600}) a 1×10^6 (bactérias) unidades formadoras de colônia (UFC) por mL em solução salina estéril (NaCl 0,15 M).

Os ensaios de microdiluição em caldo foram realizados para determinação dos valores da concentração mínima inibitória (CMI). Primeiro, a amostra foi diluída seriadamente em água. O meio de cultura [Caldo Mueller Hinton (MHB)] foi adicionado com o mesmo volume (40 μ L) em todos os poços. A primeira fileira serviu de controle para esterilidade e apenas continha meio de cultura. Em seguida, 40 μ L dos extratos de ramos e folhas de *J. rugosa* foram adicionados as placas dos testes antibacterianos separadamente, e uma diluição em série de duas vezes foi realizada até o último poço. Finalmente, a suspensão bacteriana (10 μ L a 10^8 UFC / mL) foi adicionada a todos os poços, exceto o primeiro poço. O segundo poço, contendo as bactérias na ausência dos extratos de *J. rugosa*, correspondeu ao controle de 100% do crescimento. Depois, as microplacas foram incubadas a 37 °C e o OD_{600} foi medido no tempo zero e após 24 h usando um leitor de microplacas. A CMI foi definida como a menor concentração dos extratos capaz de reduzir a densidade óptica $\geq 50\%$ em comparação com o controle de 100% do crescimento (Amsterdam, 1996).

As concentrações mínimas bactericidas (CMB) foram determinadas a partir do ensaio de microdiluição. Alíquotas dos poços correspondentes às concentrações $\geq$ CMI e do poço controle de crescimento foram transferidas para placas de petri contendo Ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 h a 37 °C. CMB correspondeu à menor concentração que reduziu o número de CFU em pelo menos 99,9% em comparação ao inóculo inicial.

Atividade antioxidante

Ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Os extratos etanólicos foram testados em concentrações variando de 15,62 a 1000 μ g/mL. Ácido ascórbico (0,3 a 5 μ g/mL) foi utilizado como padrão. Em cada ensaio, 270 μ L da solução de DPPH (23,6 μ g/mL) em etanol foi adicionada a cada amostra (em volume variáveis de acordo com a quantidade necessária para se obter a concentração-teste a partir da solução-estoque). Após 30 min, a redução do DPPH foi avaliada pela alteração na absorbância a 517 nm usando etanol como branco (Blois, 1958). A concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a quantidade de DPPH presente (CI_{50}) foi determinada.

Ensaio do ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Inicialmente, o radical ABTS^+ foi gerado através da oxidação da solução de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio a 2,45 mM por 12 h no escuro a 25°C. Para realização dos testes, a solução-estoque de ABTS^+ (1 mL) foi diluída em 60 mL de metanol para se obter uma absorbância a 734 nm de $0,70 \pm 0,02$. Em seguida, 2,7 mL dessa solução foram adicionados a diferentes volumes de uma solução-estoque de Trolox (padrão) em metanol para obter as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ ou dos extratos em metanol para obter as concentrações de 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 and 40,0 $\mu\text{g/mL}$. A absorbância foi então determinada 6 min após a adição do radical. Os testes foram realizados em triplicata e foi determinada a porcentagem de inibição do ABTS, bem como a concentração de extrato necessária para reduzir a quantidade de ABTS^+ em 50% (CI_{50}).

Avaliação da toxicidade aguda

A toxicidade aguda dos extratos etanólicos foi determinada de acordo com as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para o teste de produtos químicos, nº 423, adotada em 17 de dezembro de 2001. Camundongos fêmeas albinos suíços ($n = 3$ para cada grupo) receberam uma dose única do extrato etanólico de folhas ou ramos (2000 mg/kg, dissolvido em solução salina) por via oral ou solução salina como controle. Os animais foram observados individualmente durante a primeira hora e às 2, 12 e 24 horas após a administração para investigar possíveis efeitos tóxicos. Nos 14 dias seguintes, os animais foram observados uma vez por dia. Uma série de sinais, como atividade geral, irritabilidade, resposta ao toque, contorções, tremores, convulsões, taquicardia, piloereção, movimentos estereotipados, sonolência, defecação, diarreia e micção foram analisados. O consumo diário de água e ração, bem como o peso corporal dos animais durante o experimento também foram registrados. No 14º dia após a administração dos extratos, os animais foram anestesiados com 0,2 mL/100 g de quetamina/xilazina (2: 1), e o sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos com anticoagulante (EDTA). O índice hematológico foi determinado usando um analisador Horiba ABX Micros 60-Horiba automatizado. Os órgãos (fígado, rim e baço) foram analisados macroscopicamente, secos e pesados para calcular o índice de órgãos, o qual é dado pela seguinte fórmula: *Peso do órgão (mg) / Peso corporal (g)*.

Teste de peritonite induzida por carragenina

Os camundongos foram tratados oralmente com solução salina, extrato (200 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais receberam injeção intraperitoneal de 0,5 mL de carragenina (1%). Após quatro horas, os animais foram eutanasiados com uma dose excessiva de pentobarbital (120 mg/kg, i.p.) e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,6) contendo EDTA 2 mM. O líquido peritoneal foi coletado e a contagem total de leucócitos foi determinada no analisador de hematologia Micros 60[®]. Os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante armazenado a - 20 °C para análise de óxido nítrico.

Análise estatística

A análise da atividade antioxidante foi realizada por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey com 95% de nível de confiança para os dois testes. Para avaliação dos resultados do teste de toxicidade aguda, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet para comparação múltipla. Para a avaliação do potencial anti-inflamatório, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

Resultados

O rendimento dos extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa* foi 5% e 27% respectivamente. A análise fitoquímica por cromatografia em camada delgada identificou a presença de flavonoides e esteroides nos extratos de ramos e folhas. As análises por CLAE-DAD evidenciaram a presença de rutina (tr = 25,66 min) no extrato de folhas e de rutina (tr = 25,63 min), quercetina (tr = 27,65 min) e hiperosídeo (tr = 28,16 min) no extrato de ramos (Figura 1). Adicionalmente, foi identificada a presença de flavonoides da classe dos fenilpropanoides no extrato de folhas de *J. rugosa* nos espectros A (tr = 23,91 min) e B (tr = 25,09 min), respectivamente (Figura 2); o espectro C (tr = 25,66 min) corresponde à rutina.

A análise dos espectros de varredura dos picos na amostra de ramos demonstrou a presença de fenilpropanoides nos espectros A (tr = 23,90 min) e B (tr = 25,08 min), rutina no espectro C (tr = 25,63 min), quercetina no espectro D (tr = 27,65 min) e hiperosídeo no

espectro E ($t_r = 28,16$ min) (Figura 3). Por fim, os teores de rutina, quercetina e hiperosídeo foram determinados, sendo iguais a $0,011 \pm 0,0002$ g% (1,49%) de rutina para o extrato de folhas; e, $0,041 \pm 0,0004$ g% (1,03%), $0,020 \pm 0,0205$ g% (1,54%) e $0,010 \pm 0,0001$ g% (1,30%) para rutina, quercetina e hiperosídeo no extrato de ramos.

O extrato de folhas apresentou atividade bacteriostática contra as espécies *Escherichia coli* (CMI: 10 mg/mL) e *Streptococcus pyogenes* (CMI: 20 mg/mL). Já o extrato de ramos inibiu o crescimento apenas de *Escherichia coli* (CMI: 5 mg/mL). Não foi observado efeito bactericida dos extratos etanólicos.

Figura 1. Perfis cromatográficos da mistura de padrões (A), do extrato de ramos de *J. rugosa* (B) e do extrato de folhas de *J. rugosa* (C) observados a 350 nm. Padrões: 1'= ácido cafeico; 2'= vitexina; 3'= rutina; 4'= quercetina; 5'= hiperosídeo.

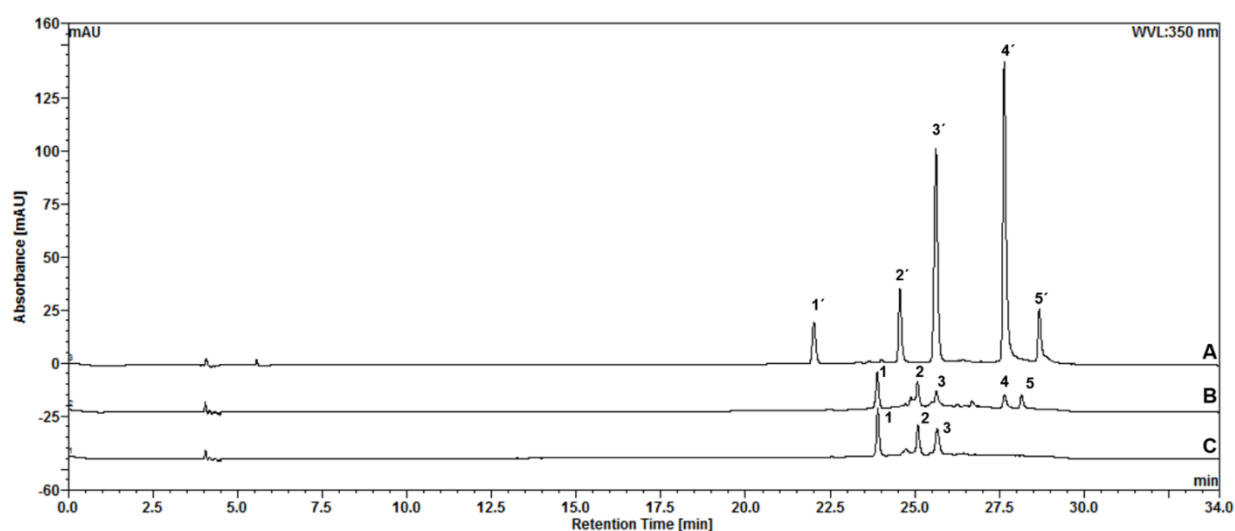


Figura 2. Espectros de varredura dos picos presentes no perfil cromatográfico do extrato de folhas de *J. rugosa* observados em 350 nm. (A) e (B) fenilpropanoides e (C) rutina.

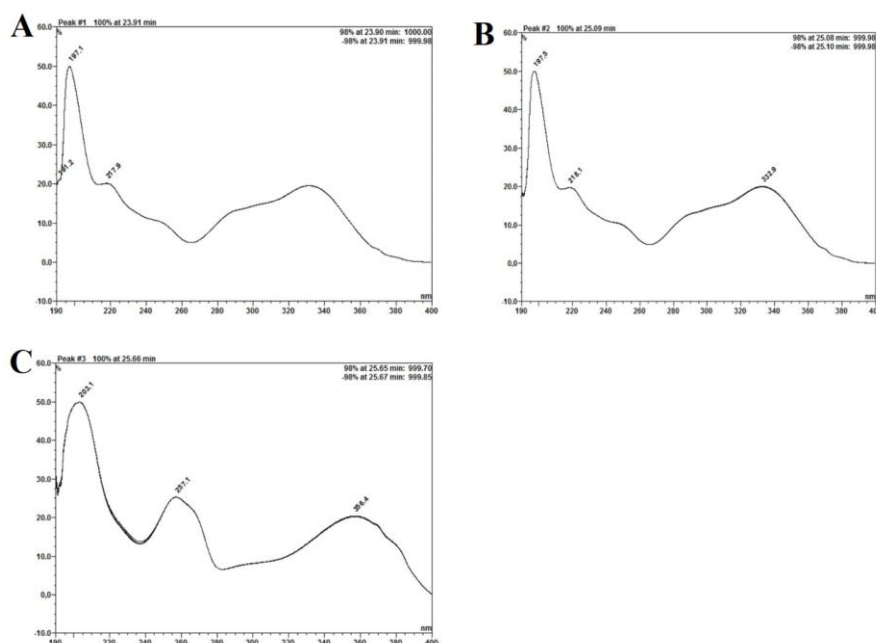
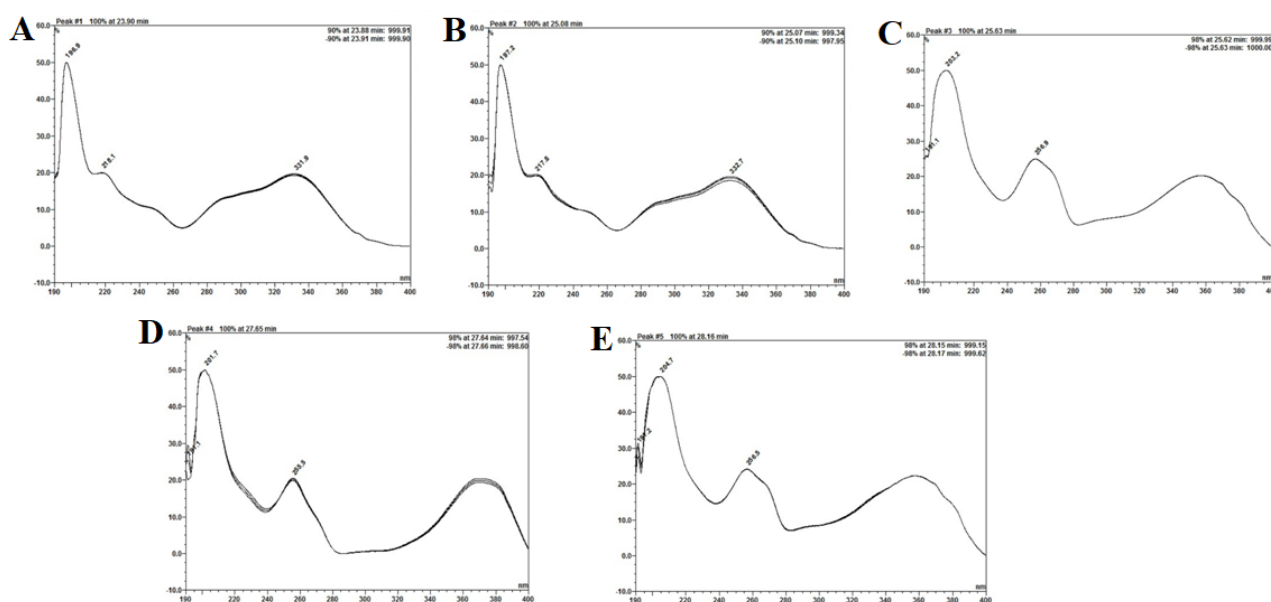


Figura 3. Espectros de varredura dos picos presentes no perfil cromatográfico do extrato de ramos de *Jacaranda rugosa* observados em 350 nm. (A) e (B) fenilpropanoides, (C) rutina, (D) quercetina e (E) hiperosídeo.



A ação antioxidante dos extratos de ramos e folhas de *J. rugosa* foi analisada pela capacidade das amostras de sequestrarem os radicais livres DPPH e ABTS. Ambos os extratos foram ativos contra o radical DPPH sendo determinados os valores de IC₅₀ de 17,04 e 9,37 µg/mL para os extratos de ramos e folhas, respectivamente. O ácido ascórbico apresentou IC₅₀ de 0,64 µg/mL. Outrossim, foi detectada a ação antioxidante dos extratos sobre o radical ABTS com IC₅₀:16,39 e 9,10 µg/mL para os extratos de ramos e folhas, respectivamente. O Trolox apresentou IC₅₀ de 2,34 µg/mL.

A administração dos extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa* (2000 mg/kg) não causou a morte dos camundongos. Durante a observação comportamental dos animais na primeira hora após a administração, observou-se que os animais tratados com ambos os extratos apresentavam boa coordenação do sistema motor e muscular (resposta ao toque e tônus do corpo) e bons reflexos. Não foram observadas diferenças significativas dos resultados entre os animais tratados e o grupo controle em todos os parâmetros fisiológicos como peso (Figura 4), ingestão de alimentos, água e função de fígado, rim e baço (Tabela 1), nos parâmetros hematológicos (glóbulos vermelhos, leucócitos, plaquetas) (Tabela 2) e nos parâmetros bioquímicos (creatinina, AST, ALT) (Tabela 3).

Figura 4. Peso corporal dos animais do grupo controle e tratados com os extratos de *J. rugosa* (2000 mg/kg) durante o ensaio de toxicidade aguda.

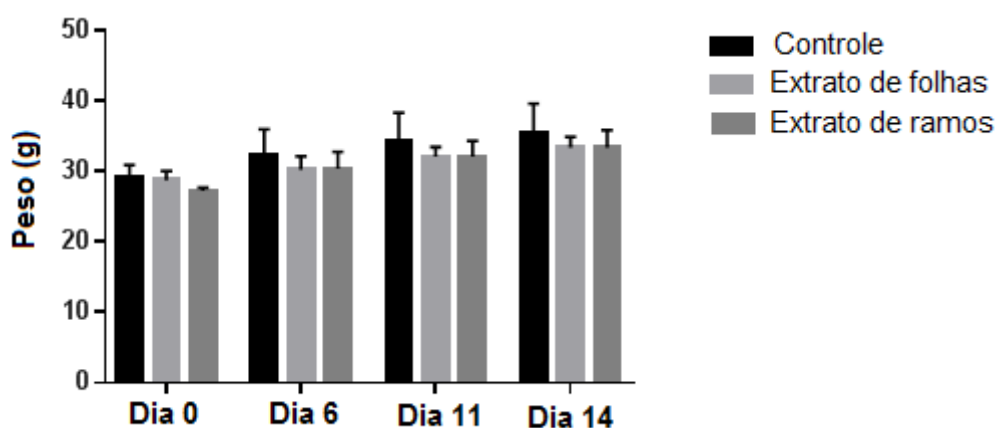


Tabela 1. Efeito de extratos de ramos e folhas de *J. rugosa* (2000 mg/kg) em parâmetros fisiológicos dos camundongos 14 dias após a administração.

Grupo	Ingestão de alimento (g)	Consumo de água (mL)	Índice de órgãos (mg/g)		
			Fígado	Rins	Baço
Controle	17.28±1.77	56.07±10.59	5.46±0.6	1.07±0.05	0.52±0.10
Folhas	18.85±1.74	54.61±9.62	5.51±0.38	1.15±0.06	0.47±0.09
Ramos	19.92±3.31	58.4±8.62	5.68±0.36	1.16±0.05	0.58±0.07

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão, sendo 3 animais por grupo e dois experimentos independentes.

Tabela 2. Efeito de extratos de ramos e folhas de *J. rugosa* (2000 mg/kg) em parâmetros hematológicos dos camundongos 14 dias após a administração.

Parâmetro	Controle	Folhas	Ramos
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	5.96±1.09	6.22±0.61	7.52±1.58
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	3.15±0.77	3.38±0.72	2.96±0.54
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	560.66±49.52	568.83±71.83	653.16±86.28
Hemoglobina (g/dL)	11.16±2.28	12.2±1.23	13.1±1.09
Hematócrito (%)	33.16±6.03	34.75±3.55	42.38±8.77

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão, sendo 3 animais por grupo e dois experimentos independentes. (*) $p < 0.05$ em comparação ao controle de acordo com ANOVA seguida do teste de Dunnet.

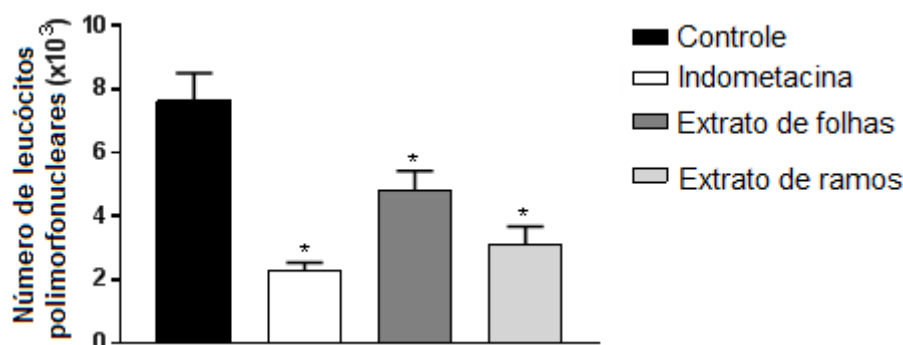
Tabela 3. Efeito de extratos de ramos e folhas de *J. rugosa* (2000 mg/kg) em parâmetros bioquímicos do sangue dos camundongos 14 dias após a administração.

Parâmetro	Controle	Folhas	Ramos
Creatinina (mg/dL)	0.42±0.08	0.36±0.05	0.50±0.09
AST (U/L)	125.4±49.13	131.28±34.1	149.72±29.35
ALT (U/L)	24.61±1.55	27.44±2.23	28.1±3.86

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão, sendo 3 animais por grupo e dois experimentos independentes.

No teste de peritonite foi avaliada a migração leucocitária para cavidade peritoneal dos camundongos após indução da inflamação. Os extratos de ramos e folhas reduziram significativamente a migração celular de leucócitos, como ilustra a Figura 5.

Figura 5. Número de leucócitos polimorfonucleares no exsudato da cavidade peritoneal após 4 h de indução de peritonite por carragenina em animais não tratados ou tratados previamente com extrato de ramos ou folhas de *J. rugosa* (200 mg/kg) ou com indometacina (25 mg/kg, controle positivo). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de grupos de 6 animais. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o controle de acordo com ANOVA seguida de teste de Tukey.



Discussão

Estudos tem revelado a eficiência de plantas da Caatinga contra doenças que afetam a população local. Nesse contexto, plantas dessa região têm sido investigadas sobre quais compostos bioativos oriundos do seu metabolismo secundário demonstram as propriedades terapêuticas relatadas (Silva et al., 2014; Bitá & Gerats, 2013). Nesse estudo, escolhemos a espécie *J. rugosa* para verificar os compostos presentes em seus ramos e folhas e avaliar atividades biológicas dos extratos etanólicos, esperando contribuir para valorizar a Caatinga como fonte de recursos para o homem.

De acordo com Mota de Mesquita et al. (2017) e Buriol et al. (2009) o álcool etílico absoluto (99,5%) é eficiente na extração de compostos como alcaloides, taninos, antocianinas e flavonoides. Nos extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa*, observamos a presença somente de flavonoides, o que pode indicar que os demais compostos mencionados na frase

anterior não estão presentes ou são encontrados em baixas concentração nos tecidos estudados.

A determinação da atividade antibacteriana dos extratos demonstrou altos valores de CMI tanto para o extrato de folhas quanto para o extrato de ramos. De acordo com uma classificação para a atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal estabelecida por Duarte et al. (2005), extratos vegetais com valores de CMI acima de 1,6 mg/mL são considerados fracos para inibição do crescimento bacteriano. Segundo Malafaia et al. (2017), o extrato aquoso de *J. rugosa* demonstrou efeito bacteriostático contra a espécie *Ralstonia solanacearum*, também em uma alta concentração (CMI: 4,0 mg/ml). Ainda, o mesmo extrato inibiu o crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* (CMI: 4,0 mg/ml). (Silva et al., 2014). Os extratos metanólicos de cascas e folhas de *Jacaranda cuspidifolia* inibiram o crescimento da espécie *Mycobacterium tuberculosis* com uma boa eficiência (CMI= 250 µg/mL) e os autores atribuíram essa atividade à presença de compostos fenólicos (Arruda et al., 2012).

A triagem fitoquímica identificou a presença de flavonoides e esteroides nas amostras de ramos e folhas de *J. rugosa*, sugerindo que esses compostos são os responsáveis pela inibição do crescimento das duas espécies bacterianas afetadas; ambas as classes apresentarem conhecido potencial antibacteriano (Arruda et al., 2012; Lôbo et al., 2010). Com relação ao mecanismo de ação desses compostos, sabe-se que eles agem em células bacterianas através da inibição da síntese da parede celular, da função da membrana celular, da síntese proteica e/ou da síntese de ácidos nucleicos (Silva, et al., 2019).

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos demonstrou que ambos sequestraram os radicais livres DPPH e ABTS. Na comparação entre as amostras, o extrato de folhas obteve maior capacidade em sequestrar radicais livres em comparação com extrato de ramos. Embora os resultados das atividades antioxidantes tenham sido melhores para o extrato etanólico de folhas, os dois extratos demonstraram forte poder antioxidante, uma vez que os valores de IC₅₀ foram menores que 50 µg/mL (Fridianny et al., 2014). Flavonoides são descritos por apresentarem forte poder antioxidante, principalmente quando o método de extração favorece o resgate de rutina em seus extratos (Torres et al., 2018; Medina et al., 2011). Com a confirmação da presença de rutina por CLAE-DAD em ambos os extratos, sugerimos ser esse o composto responsável pela forte ação antioxidante das amostras frente aos radicais livres testados. Segundo Alara et al. (2018), o extrato etanólico de folhas de *Vernonia amygdalina* demonstrou atividade antioxidante (IC₅₀ ABTS: 79,49 µg/mL)

provalvemente pela presença de compostos fenólicos. Ademais, Torres et al. (2018) confirmou que o extrato etanólico de folhas de *Cnidoscolus quercifolius* apresentou atividade antioxidante (IC₅₀ DPPH: 75,89 µg/mL) pela presença de flavonoides, especialmente de rutina na amostra. A ação desses compostos frente aos radicais livres ocorre devido as suas propriedades redutoras, que lhes conferem a capacidade de atuar como agentes redutores de hidrogênio e/ou doadores de oxigênio (Dwivedi et al., 2016; Barboza et al., 2018).

Com relação à avaliação da toxicidade, extratos etanólicos de ramos e folhas de *J. rugosa* (2000 mg/kg) não provocaram alterações comportamentais nos animais testados, diferentemente dos animais tratados com extrato salino do caule de *P. gounellei*, que numa dosagem menor (1000 mg/kg), causou irritabilidade e aumento da motilidade em 15 a 30 minutos após a administração (Oliveira et al., 2018). Ainda, o extrato hidroetanólico de casca de *Dilodendron bipinnatum*, em dose elevada (5.000 mg/kg) administrada oralmente, causou redução na motilidade, aumento da frequência respiratória e ereção da cauda nos animais tratados (Mahon et al., 2014). Como os grupos tratados com os extratos etanólicos não sofreram alterações significativas nos parâmetros fisiológicos, hematológicos e bioquímicos em relação ao grupo controle, conclui-se que os extratos não causam efeitos adversos característicos de drogas e produtos químicos (Tofovic e Jackson, 1999). Segundo Oliveira et al. (2016), a ingestão oral do extrato etanólico das folhas de *Morus alba* testada na mesma dosagem utilizada em nosso trabalho (2000 mg/kg), provocou alterações significativas na taxa da ALT, além de outras modificações nos parâmetros hematológicos. Os resultados dos parâmetros avaliados nesse trabalho para toxicidade dos extratos etanólicos de *J. rugosa* em camundongos podem ser traduzidos de forma semelhante para humanos, o que sugere segurança no uso terapêutico do vegetal (Olson et al., 2000).

O estudo da ação dos extratos etanólicos de *J. rugosa* frente a peritonite induzida em camundongos mostrou que o extrato de ramos apresentou maior poder anti-inflamatório em comparação ao extrato de folhas, provavelmente pela maior quantidade de tipos de compostos fenólicos encontrados na análise por CLAE-DAD (Muszyńska et al., 2018). Além desses, os esteroides encontrados por CCD nos dois extratos também podem ter auxiliado a ação anti-inflamatória, uma vez que são descritos por atuarem no manejo da dor e controle da inflamação (Rofel & Bilakhia, 2012). Esses compostos atuam geralmente na inibição da enzima óxido nítrico sintase tipo 2, responsável pela síntese de óxido nítrico (NO), indiretamente bloqueando as vias da cicloxigenase e/ou lipoxigenase e da proteína quinase C e L-arginina/NO. Além disso, possuem a capacidade de inibir a fosfolipase A2 e a fosfolipase

C, enzimas importantes da cascata de mediadores dos processos inflamatórios (Mota et al., 2013). O extrato etanólico da entrecasca de *Sideroxylon obtusifolium* apresentou efeito anti-inflamatório sobre lesões de pele em ratos, diminuindo o infiltrado leucocitário, após administração tópica. Apesar da presença de esteroides vegetais, a atividade anti-inflamatória foi atribuída à presença de flavonoides, taninos e saponinas (Leite et al., 2015). Adicionalmente, a atividade anti-inflamatória dos extratos das folhas de *Phyllanthus acidus* e *Bidens pilosa* também foi atribuída à presença de flavonoides (Chakraborty et al., 2012; Fotso et al., 2014).

Os resultados do presente estudo confirmam a ação bacteristática dos extratos de *J. rugosa* frente as espécies bacterianas de importância médica testadas, sugerindo o potencial antibiótico da espécie vegetal escolhida. Adicionalmente, os mesmos extratos apresentaram significativo poder antioxidante e anti-inflamatório, o que também valoriza a espécie *J. rugosa* do bioma Caatinga como fonte de recursos farmacológicos para o homem. Estudos futuros são necessários para evidenciar quais compostos apresentam as atividades biológicas detectadas, assim como quais são os seus mecanismos de ação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) à *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; Código de Financiamento 001) e à *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) pelo apoio financeiro. C.A.A. Rocha-Filho agradece à FACEPE pela concessão de bolsa de doutorado (IBPG-0402-2.08/14).

REFERÊNCIAS

- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Mudalip, S. K. A., Olalere, O. A. 2018. Characterization and effect of extraction solvents on the yield and total phenolic content from *Vernonia amygdalina* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12, 311–316.
- Amsterdam, D. 1996. “Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media,” in *Antibiotics in Laboratory Medicine*, ed. V. Loman (Baltimore:Williams and Wilkins), 52–111.

- Arruda, A. L. A., Souza, D. G., Vieira, C. J. B., Oliveira, R. F., Pavan, F. R., Fujimura, C. Q. L., Resende, U. M., Castilho, R. O. 2012. Análise fitoquímica e atividade antimicobacteriana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 14, 276–281.
- Barboza, B. R., Barros, B. R. S., Ramos, B. A., Moura, M. C., Napoleão, T. H., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Cruz-filho, I. J., Maior, A. M. S., Silva, T. D., Nerys, L. C. R., Santana, E. R. B., Lima, C. S. A., Lorena, V. M. B., Melo, C. M. L. 2018. Phytochemical bioprospecting, antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of saline extract from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray leaves. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*. 8, 245–253.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 29, 1199–1200.
- Bitá, C. E., Gerats, T. 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–18.
- Buriol, L., Finger, D., Schmidt, E. M., Santos, J. M. T., Rosa, M. R., Quinária, S. P., Torres, Y. R., Santa, H. S. D., Pessoa, C., Moraes, M. O., Costa-Lotufo, L. V., Ferreira, P. M. P., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N. 2009. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova*. 32, 296–302.
- Chakraborty, R., Biplab, D., Devanna, N., Sem, S. 2012. Atividades antiinflamatória, antinociceptiva e antioxidante de extratos de *Phyllanthus acidus* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2, 953–961.
- Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, U. M., Rehder, V. L., Delarmelina, C. 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 97, 305–311.
- Dwivedi, D., Dwivedi, M., Malviya, S., Singh, V. 2016. Evaluation of wound healing, antimicrobial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 7, 79–85.
- Fotso, A. F., Longo, F., Dzeufiet, P. D. D., Kouam, S. F., Spiteller, M., Dongmo, A. B. 2014. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). *Inflammopharmacology*. 22, 105–114.

- Fridianny, I., Darmawati, A., Sukrasno. 2014. Antioxidant capacities from different polarities extracts of Cucurbitaceae leaves using FRAP, DPPH assay and correlation with phenolic, flavonoid, carotenoid content. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6, 858–862.
- Gentry, A. H. 1992. Bignoniaceae II. Tribe Tecomeae. *Flora Neotropica*, Monograph No. 25(II). The New York Botanical Garden.
- Leite, N. S., Lima, A. P., Araújo-neto, V., Estevam, C. S., Pantaleão, S. M., Camargo, E.A., Fernandes, R. P. M., Costa, S. K. P., Muscará, M. N., Thomazzi, S. M. 2015. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17, 164–170.
- Lôbo, K. M. S. 2010. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 12, 227–233.
- Mahon, C. P. C. A. N., Colodel, E. M., Balogun, S. O., Balogun, Oliveira, R. G., Martins, D. T. O. 2014. Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *Journal of Ethnopharmacology*. 155, 665–671.
- Malafaia, C. B.; Jardelino, A. C. S.; Silva, A. G.; Souza, E. B.; Macedo, A. J.; Correia, M. T. S.; Silva, M. V. 2017. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Ecology*. 75, 555-561.
- McGaw, L. J., Lall, N., Hlokwe, T. M., Michel, A. L., Meyer, J. J., Eloff, J. N. 2008. Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31:1429–1433.
- Medina, A. L., Haas, L. I. R., Chaves, F. C., Salvador, M., Zambiasi, R. C., Da silva, W. P., Nora, L., Rombaldi, C. V. 2011. Aracá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*. 128, 916–922.
- Mota de Mesquita, M., Farias Pinto, T., Fernandes Moreira, R. 2018. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. *Revista Fitos*. 11, 216–230.

- Motta, E. V. S., Pinto, N. C. C., Duque, A. P. N., Mendes, R. F., Bellozi, P. M. Q., Scio, E. 2013. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 15, 264–272.
- Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K., Gdula-Argasińska, J. 2018. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 243, 373–381.
- Oliveira, A. M., Luna-Freire, M. O., Silva, W. A. V., Ferreira, M. R. A., Paiva, P. M. G., Soares, L. A. L., Medeiros, P. L., Melo-Carvalho, B., Napoleão, T. H. 2018. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 95, 289-297.
- Oliveira, A. M., Mesquita, M. S., Silva, G. C., Lima, E. O., Medeiros, P. L., Paiva, P. M. G., Souza, I. A., Napoleão, T. H. 2016. Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 194, 162–168.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A. 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 32, 56–67.
- Otto, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* – The ‘accidental’ pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7, 555–567.
- Ribeiro, D. A., Macêdo, D. G., Oliveira, L. G. S., Saraiva, M. E., Oliveira, S. F., Souza, M. M. A., Menezes, I. R. A. 2014. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 16, 912–930.
- Rodal, M. J. N., Nascimento, L. M. 2006. The arboreal component of a dry forest in Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 66, 479–91.
- Rofel, S., Bilakhia, G. M. 2012. Analgesic and anti-inflammatory plants: an updated review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 12, 114–119.
- Santana, D. G., Santos, C. A., Santos, A. D., Nogueira, P. C., Thomazzi, S. M., Estevam, C. S., Antonioli, A. R., Camargo, E. A. 2012. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. *Pharmaceutical biology*. 142, 445–455.

- Santos-lima, T. M., Santos, D. R. V., Souza, R. M., Bastos, N. G., Vannier-santos, M. A., Nunes, E. S., Dias-lima, A. G. 2016. Plantas medicinais com ação antiparasitária: conhecimento tradicional na etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 18, 240–247.
- Silva, J. D. F., Silva, S. P., Silva, P. M., Vieira, A. M., Araújo, L. C. C., Lima, T. A., Oliveira, A. P. S., Carvalho, L. V. N., Pitta, M. G. R., Rego, M. J. B. M., Pinheiro, I. O., Zingali, R. B., Cavalcanti, M. S. M., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G. 2019. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. *International Journal of biological macromolecules*. 126, 291–297.
- Silva, L. N., Trentin, D. S., Zimmer, K. R., Treter, J., Brandelli, C. L. C., Frasson, A. P., Tasca, T., Silva, A. G., Silva, M. V. & Macedo, A. J. 2014. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharmaceutical Biology*. 53, 464–468.
- Sousa, C. M. M., Rocha e Silva, H., Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, M. S., Chaves, M. H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 30, 351-355.
- Tofovic, S. P., Jackson, E. K. 1999. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 33, 360–366.
- Torres, D. S., Pereira, E. C. V., Sampaio, P. A., Souza, N. A. C., Ferraz, C. A. A., Oliveira, A. P., Moura, C. A., Almeida, J. R. G. S., Rolim-Neto, P. J., Oliveira-Júnior, R. G., Rolim, L. A. 2018. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* pohl (euphorbiaceae) e atividade antioxidante. *Química nova*. 41, 743-747.
- Trentin, D. S., GiordanI, R. B., Zimmer, K. R., Silva, A. G., Silva, M. V., Correia, M. T. S., Baumvol, I. J. R., Macedo, A. J. 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 327–335.

4 CONCLUSÕES

- Caule de *P. gounellei* e ramos de *J. rugosa* são fontes de inibidores de tripsina.
- O inibidor de tripsina de *P. gounellei* (PgTI) foi purificado com alto rendimento e é uma proteína aniônica, com massa molecular de 37,1 kDa e estável ao aquecimento até 50 °C.
- PgTI foi tóxico para bactérias e fungos de importância médica e os resultados sugerem seu potencial para substituição ou uso combinado com antibióticos atualmente utilizados.
- O inibidor de *J. rugosa* (JrTI) apresentou massa molecular de 27 kDa e foi estável ao aquecimento até 50 °C.
- JrTI inibiu o crescimento de *C. krusei*, o que estimula outras análises visando seu uso como antifúngico.
- Extrato etanólico de folhas de *J. rugosa* contém rutina e o extrato de ramos contém rutina, quercetina e hiperosídeo. Esteroides e fenilpropanoides foram detectados em ambos os extratos.
- O extrato etanólico de folhas de *J. rugosa* inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Streptococcus pyogenes*. Entretanto, o extrato etanólico de ramos inibiu o crescimento apenas de *E. coli*.
- Os extratos etanólicos de *J. rugosa* apresentaram efeito antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS⁺ e não foram tóxicos para camundongos quando administrados oralmente em dose única.
- Os extratos de *J. rugosa* apresentaram efeito anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472–508, 2008.
- AHMED, I. A.; MIKAIL, M. A.; BIN-IBRAHIM, M.; BIN-HAZALI, N.; RASAD, M. S. B. A.; GHANI, R. A. Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. **Food Chemistry**, v.172, p. 778–787, 2015.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; Albuquerque, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127–142, 2005.
- ALTERTHUM, F. e TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2003, 720p.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551–562, 2004.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 517–524, 2006.
- ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2008, 477p.
- ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P. A.; DIOZÍNIO, B. P.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, p. 1297-1301, 2014.
- ARRUDA, A. L. A.; SOUZA, D. G.; VIEIRA, C. J. B.; OLIVEIRA, R. F.; PAVAN, F. R. ; FUJIMURA, C. Q. L.; RESENDE, U. M.; CASTILHO, R. O. Análise fitoquímica e atividade antimicobacteriana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, p. 276–281, 2012.
- ARRUDA, E.; MELO-DE-PINNA, G. F.; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 589–601, 2005.

ASIMI, O. A.; SAHU, N. P.; PAL, A. K. Antioxidant capacity of crude water and ethylacetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 1907–1915, 2013.

BARBOSA, M.; MAYO, S.; CASTRO, A.; FREITAS, G.; PEREIRA, M.; NETO, P.; MOREIRA, H. **Checklist preliminar das angiospermas**. In: Pesquisa Botânica Nordestina - Progresso e perspectivas. (SAMPAIO, E.; MAYO, S.; BARBOSA, M. (eds.). Pesquisa SBB, Recife, 1996, p. 253–415.

BARBOZA, B. R.; BARROS, B. R. S.; RAMOS, B. A.; MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; CRUZ FILHO, I. J. ; MAIOR, A. M. S.; SILVA, T. D. ; NERY, L. C. R. ; SANTANA, E. R. B.; LIMA, C. S. A.; LORENA, V. M. B.; MELO, C. M. L. . Phytochemical bioprospecting, antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of saline extract from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray leaves. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 8, p. 245-253, 2018.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 59-70.

BATISTA, E. K. F.; TRINDADE, H. I.; LIRA, S. R. S.; MULLER, J. B. B. S.; SILVA L. L. B.; BATISTA, M. C. S. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, p.433-441, 2016.

BAYOR, M. T.; GBEDEMA, S. Y.; ANNAN, K. The antimicrobial activity of *Croton membranaceus*, a species used in formulations for measles in Ghana. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, p.47–51, 2009.

BERNHOF, A. **A brief review on bioactive compounds in plants**. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway, 2010.

BEZERRA, C. S.; OLIVEIRA, C. F. R.; MACHADO, O. L. T.; MELLO, G. S. V.; ROCHA-PITTA, M. G.; MELO-RÊGO, M. J. B.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; RIBEIRO, S. F. F.; GOMES, V. M.; SILVA, O. N.; MARIA-NETO, S.; FRANCO, O. L.; MACEDO, M. L.R. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor, **Process Biochemistry**, v.51, p. 792–803, 2016.

BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S. M.; BABU, C. R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 669–677, 2007.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CÂNDIDO, E. S.; PINTO, M. F. S. P.; PELEGRINI, P. B.; LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; POGUE, R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FRANCO, O. L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, p. 3290-3305, 2011.

CARNEIRO, A. M.; FARIAS-SINGER, R.; RAMOS, R. A.; NILSON, A. D. **Cactos do Rio Grande do Sul**, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016, 224 p.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**, fourth ed. Editora Universitária/UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2002, p. 433–450.

CAVALCANTI, N. B.; RESENDE, G. M. Consumo de xiquexique [*Pilosocereus gounellei*] (A. Weber ex K. Schum.) Byl Bahia. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 22–27, 2007.

CIPRIANI, F. A. **Aspectos quimiotaxonômicos da família Bignoniaceae**. Dissertação de Mestrado, Museu Nacional. UFRJ, 73f, 2006.

COLARES, L. F.; SANTOS-NETO, A. R.; CORDEIRO, I. H.; CASTRO, S. B. R.; VERLY, R. M.; ALVES, C. C. S.; CARLI, A. P. Detecção de inibidores de proteases em sementes de *Punica granatum*. **Química Nova**, v. 40, p. 270-274, 2017.

CORDEIRO, B. M. P. C.; LIMA-SANTOS, N. D.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJO, L. C. C.; JUNIOR, A. R. C.; CONCEIÇÃO-SANTOS, A. D.; OLIVEIRA, A. P.; SILVA, A. G.; SILVA-FALCÃO, E. P.; SANTOS-CORREIA, M. T.; SILVA-ALMEIDA, J. R. G.; SILVA, L. C. N.; SOARES, L. A. L.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA, M. V.; PAIVA, P. M.G. Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-Candida agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, p. 284, 2018.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001–1043, 2009.

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Molecular Genetics of Crassulacean Acid Metabolism. **Plant Physiology**, v. 113, p. 667–676, 1997.

DE MARINO, S.; GALA, F.; ZOLLO, F.; VITALINI, S.; FICO, G.; VISIOLI, F. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. **Molecules**, v. 13, p. 1219–1229, 2008.

DENNIS, E. A. e NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.15, p.511-23, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Product**. A biosynthetic approach. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2009, 546 p.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DppH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446–452, 2006.

DVORAKOVA, M. e LANDA, P. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. **Pharmacological Research**, v.124, p. 126-145, 2017.

FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, p. 354–368, 2007.

FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE-MONACHE, F.; DELLE-MONACHE, G.; CECHINEL-FILHO, V.; SOUZA, M. M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 235–39, 2008.

GENTRY, A. H. Flora Neotropica, *Bignoniaceae*: Part II (Tribe *Tecomeae*). **The New York Botanical Garden**, v. 25, p. 1–370, 1992.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

HARAGUCHI, S. K.; SILVA, A. A.; VIDOTTI, G. J.; SANTOS, P. V.; GARCIA, F. P.; PEDROSO, R. B. Antitrypanosomal activity of novel benzaldehyde-thiosemicarbazone derivatives from kaurenoic acid. **Molecules**, v. 16, p. 1166–80, 2011.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831–2846, 2007.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4501–4523, 2002.

HIRUMA-LIMA, C. A.; DI-STASI, L. C. Scrophulariales medicinais. In: _____. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Unesp, 2002. p. 449-452.

JOUNG, E.; GWON, W.; SHIN, T.; JUNG, B.; CHOI, J.; KIM, H. Anti-inflammatory action of the ethanolic extract from *Sargassum serratifolium* on lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages and identification of active components. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 563-573, 2017.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer, Sunderland, 2002, 576p.

KIM, J. Y.; PARK, S. C.; KIM, M. H.; LIM, H. T.; PARK, Y.; HAHM, K. S. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 921–927, 2005.

KUKULA-KOCH, W.A; WIDELSKI. J. Chapter 9 – Alkaloids. **Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies**, p. 163-198, 2017.

LI, J.; ZHANG, C.; XU, X.; WANG, J.; YU, H.; LAI, R.; GONG, W. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 2466–2473, 2007.

LIAO, H.; REN, W.; KANG, Z.; ZHAO, X. J.; DU, L. F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: Isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 653–658, 2007.

LIMA-NETO, G. A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W. T.; FERREIRA, W. R.; DIAS-SILVA, Y. S. A.; PAZIN, G.V.; VIOLANTE, I. M. P.. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, p.1069-1077, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, 2008.

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

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 146, p. 486–498, 2011.

MALAFIA, C. B.; JARDELINO, A. C. S.; SILVA, A. G.; SOUZA, E. B.; MACEDO, A. J.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. **Microbial Ecology**, v. 75, p. 555-561, 2017.

MAJCHRZAK-GORECKA, M.; MAJEWSKI, P.; GRYGIER, B.; MURZYN, K.; CICHY, J. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v.28, p. 79-93, 2016.

MAJOR, I. T.; CONSTABEL, C. P. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in popular reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. **Journal of Plant Physiology**, v. 146, p.888–903, 2008.

OLIVEIRA, A. M.; LUNA-FREIRE, M. O.; SILVA, W. A. V.; FERREIRA, M. R. A.; PAIVA, P. M. G.; SOARES, L. A. L.; MEDEIROS, P. L.; MELO-CARVALHO, B.; NAPOLEÃO, T. H. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 289-297, 2018.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.510-516, 2006.

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 381-384, 2007.

OLIVEIRA, J. P.; MAGLIARELLI, H. F.; PEREIRA, F. V.; GIANOTTI, A.; SOARES-COSTA, A.; SILVA, F. H.; WAKAMATSU, A.; SOARES, I. C.; NONOGAKI, S.; TRAVASSOS, L. R.; CARMONA, A. K.; PASCHOALIN, T. Sugarcane Cystatin Cane CPI-4 inhibits Melanoma Growth by Angiogenesis Disruption. **Journal Cancer Science & Therapy**, v. 3, p. 161-167, 2011.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – The ‘accidental’ pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 555–567, 2009.

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

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, M. A.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v.73, p.1667-1681, 2003.

PATRIOTA, L. L. S.; PROCÓPIO, T. F.; SOUZA, M. F. D.; OLIVEIRA, A. P. S.; CARVALHO, L. V. N.; PITTA, M. G. R.; REGO, M. J. B. M.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V. & NAPOLEÃO, T. H. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p. 611, 2016.

PONTUAL, E. V.; SANTOS, N. D. L.; MOURA, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology Research**, v. 113, p. 727–733, 2014.

RAUF, A.; UDDIN, G.; SIDDIQUI, B. S.; KHAN, H.; SHAH, S. U.; BEN-HADDA, T.; MABKHOT, Y. N.; FAROOQ, U.; KHAN, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 25, p. 132-138, 2016.

REGO-JÚNIOR, N. O.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; SILVA, L. C.; GUALBERTO, S. A.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, M. V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, p. 50-57, 2011.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 912-930, 2014.

ROCHA, E. A.; AGRA, M. F. Flora do pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. **Acta Botânica Brasílica**, v.16, p.15-21, 2002.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 31–42, 2010.

ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J. E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 35–48, 2011.

SILVA, A. M. P.; PAIVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, v. 7, p. 207-215, 2012

SILVA, J. D. F. ; SILVA, S. P. ; SILVA, P. M. ; VIEIRA, A. M. ; ARAÚJO, L. C. C. ; LIMA, T. A. ; OLIVEIRA, A. P. S. ; CARVALHO, L. V. N. ; PITTA, M. G. R. ; REGO, M. J. B. M. ; PINHEIRO, I. O. ; ZINGALI, R. B. ; CAVALCANTI, M. S. M. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PAIVA, P. M. G. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019.

SILVA, J. G. M.; LIMA, G. F. C.; AGUIAR, E. M.; RÊGO, M. M. T. **Xiquexique e mandacaru na alimentação animal**. (EMPARN. Série Documentos; 44), 2013, 32 p.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C. L. C.; FRASSON, A. P.; TASCA, T.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 464-468, 2014.

SILVA, L. R.; SILVA-CASTRO, M. M.; CONCEICAO, A. S. Bignoniaceae in the Raso da Catarina Ecoregion, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, 2018.

SOBRINHO, T. J. S. P.; CASTRO, V. T. A. C.; SARAIVA, A. M.; ALMEIDA, D. M.; TAVARES, E. A.; AMORIM, E. L. C. Phenolic content and antioxidant capacity of our *Cnidoscolus species* (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5 p. 2310-2316, 2011.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, p. 200-213, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2006.

TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C. In: Distribuição das espécies de Cactaceae na caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (eds.) **Vegetação e flora da caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste – APNE, 2002. p. 123-125.

TORRES, D. S.; PEREIRA, E. C. V.; SAMPAIO, P. A.; SOUZA, N. A. C.; FERRAZ, C. A. A.; OLIVEIRAA, A. P.; MOURA, C. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ROLIM-NETO, P. J.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G.; ROLIM, L. A. Influência do método extrativo no teor de flavonóides de *Cnidoscolus quercifolius* pohl (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, p. 743-747, 2018.

TUBEROSO, C. I. G.; BOBAN, M.; BIFULCO, E.; BUDIMIR, D.; PIRISI, F. M. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. **Food Chemistry**, v. 140, p. 686–691, 2013.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R.; PALAFOX-CARLOS, H.; WALL-MEDRANO, A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; CHEN, C. O.; ROBLES-SÁNCHEZ, M.; ASTIAZARAN-GARCÍA, H.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Phenolic compounds: Their journey after in-take. **Food & Function**, v. 5, p. 189–197, 2014.

VERPOORTE, R. e ALFERMANN, A. W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Kluwer Academic Publishers, 2000.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Brazilian Journal of pharmacognosy**, v. 15, p. 137-142, 2005.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p.275-295, 2004.

YOUDIM, K. A.; MC DONALD, J.; KALT, W.; JOSEPH, J. A. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 282–288, 2002.

ZHENG, W. e WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 5165–5170, 2001.

ZHU-SALZMAN, K. e ZENG, R. S. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 233-252, 2015.