



SAMARA BATISTA MONTENEGRO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITRÍPTICA DAS PROTEÍNAS DE
SEMENTES DO QUIABO (*Abelmoschus esculentus* L. MOENCH)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Pessoa – PB

2018



SAMARA BATISTA MONTENEGRO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITRÍPTICA DAS PROTEÍNAS DE
SEMENTES DO QUIABO (*Abelmoschus esculentus* L. MOENCH)

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão
de Curso) como pré-requisito para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida
Gadelha

Co-orientadora: Ms. Edilza Silva do Nascimento

João Pessoa – PB

2018

SAMARA BATISTA MONTENEGRO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITRÍPTICA DAS PROTEÍNAS DE
SEMENTES DO QUIABO (*Abelmoschus esculentus* L. MOENCH)

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas como pré-requisito para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal da Paraíba.

Data 22 de Junho de 2018

Resultado Aprovada (8,8)

Banca examinadora:



Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

Departamento de Biologia Molecular-DBM/ CCEN/UFPB Campus I



Profª Dra Rosana Sousa da Silva

Departamento de Agroindústria/Instituto Federal de Pernambuco - IFPE



Ms. Paula Perazzo de Souza Barbosa

Departamento de Biologia Molecular-DBM/ CCEN/UFPB Campus I

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M772a Montenegro, Samara Batista.
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIITRÍPICA DAS PROTEÍNAS DE
SEMENTES DO QUIABO (*Abelmoschus esculentus* L. MOENCH) /
Samara Batista Montenegro. - João Pessoa, 2018.
43 f.

Orientação: Prof Dr Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Gadelha.

Coorientação: Edilza Silva do Nascimento Nascimento.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Inibidor. 2. SDS-PAGE. 3. *Abelmoschus esculentus*. I.
Gadelha, Prof Dr Carlos Alberto de Almeida Gadelha. II.
Título.

UFPB/CCEN

Um imenso trabalho se faz por várias parcerias, nunca teria conseguido sozinha. Dedico a todos e todas que me ajudaram e me incentivaram a seguir e chegar até o fim.

AGRADECIMENTOS

Uma jornada solitária não se vale a pena seguir, porém uma jornada bem acompanhada é mais que necessário agradecer, nessa minha pequena jornada muitos estiveram ao meu lado e me fizeram seguir até o fim de mais uma etapa, de mais um sonho conquistado, por isso sou grata:

À Deus, primeiramente por todo conforto e toda força que me deu durante essa jornada.

À minha mãe e rainha Nsa, Senhora do Desterro, por sua intercessão, compreensão e amparo.

Aos meus pais Sônia e José pelo incentivo, dedicação e apoio em todos os momentos.

À minha grande amiga e companheira de longas jornadas Letícia Baroni, pela amizade, pelo carinho, apoio e incentivo à vida acadêmica e pelos momentos de felicidade que passamos juntas.

Ao meu Orientador, Prof. Carlos Alberto de Almeida Gadelha pelos seus ensinamentos proporcionados e confiança em meu trabalho, sempre com paciência em seus ensinamentos.

À minha Co-orientadora Edilza Nascimento pela paciência e incentivo em seus ensinamentos e sugestões, não seria quem sou hoje se não fosse por você.

À professora Edeltrudes de Oliveira Lima que juntamente com o mestrando Hermes Diniz Neto contribuíram também para construção desse trabalho.

Ao Professor e amigo Rubens Teixeira, pelos ensinamentos passados dentro e fora da sala de aula.

Ao Professor Pedro Pontes pelas conversas bioquímicas e filosóficas dentro e fora de sala.

À minha avó Olivia Maria, que acima de tudo esteve sempre em meu lado, dando-me apoio e incentivo para continuar sempre a seguir em frente.

Aos meus tios Loraneide e Valderir bem como minhas primas Larissa e Vanessa pela hospitalidade e acolhida em sua casa durante uma parte dessa jornada.

À Rejane Dionísio por ter me apresentado e incentivado meu interesse por biologia molecular.

As minhas grandes amigas e parceiras de longas jornadas e aventuras Flávia Monike, Micaelle Cristina e Natália Vital, pelo apoio e incentivo a continuar e conquistar meus sonhos.

A minha amiga Carla e sua família, pela ajuda e incentivo a concluir mais uma etapa de minha vida, principalmente na reta final desse trabalho..

Aos meus colegas do LaProtE e do BioGer (Paula, Namibia, Valgricia, Franciely, Aleson, Nathalia, Kamila, Júlia e Annie) pelas boas risadas no laboratório e nos corredores.

As minhas companheiras de curso que se tornaram amigas para a vida Isabella Chalegre, Laís Barbosa e Odilânea Perereia pelo companheirismo durante o curso, dentro e fora das paredes da UFPB.

Ao CNPQ pelo financiamento nos projetos de iniciação científica que participei.

A todos que me auxiliaram direta ou indiretamente na minha formação acadêmica, bem como na execução deste trabalho.

Obrigada!

“Somos as únicas criaturas na face da terra capazes de mudar nossa biologia pelo que pensamos e sentimos!”

Wambasten Lima

RESUMO

Estudos com inibidores de proteases vêm sendo alvo de contínuo interesse de pesquisadores, sobretudo devido as potenciais atividades biológicas, tais como: antioxidante, atividade inseticida, antifúngica e antimicrobiana. A presença de inibidores de tripsina em algumas plantas pode limitar seu uso na alimentação humana; sobretudo devido aos seus efeitos de redução na digestibilidade de proteínas. Em animais alimentados com sementes de soja e feijão, que apresentam inibidores de proteases, já foi demonstrada cientificamente a redução no crescimento e resposta hipertrófica do pâncreas e intestino delgado. Com base nisso, este trabalho teve como objetivo investigar e caracterizar novos inibidores de tripsina presentes nas sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). Assim, após extração feita com água, o extrato bruto (EB) proteico obtido foi precipitado com sulfato de amônio em um único fracionamento na faixa de 0-80%. A fração resultante foi submetida a ensaio de atividade inibitória e cromatografia de troca iônica visando purificar os inibidores. Os teores de proteínas solúveis nas etapas de investigação foram quantificados pelo método de Bradford e visualizados por meio de eletroforese (PAGE-SDS). A quantificação do teor de proteínas solúveis mostrou a existência de um teor considerável de proteínas, sendo estes teores semelhantes aos encontrados nas sementes de feijão. No que diz respeito à atividade antitriptica, elevados valores de inibição da enzima tripsina foram encontrados no o EB e o SF (sobrenadante da fração 0-80), com 75,8% e 97,1%, respectivamente. Na cromatografia de troca iônica do sobrenadante da fração foram obtidos, por eluição em gradiente de concentração de NaCl (0-0,4mol/L), quatro picos. A análise por eletroforese (PAGE-SDS) do extrato bruto. frações e picos cromatográficos mostrou que o EB, SF e PF (precipitado da fração 0-80%) apresenta bandas proteicas na faixa entre 38 e 12 kDa e de 76 kDa. EB, SF e PF foram positivos em teste de inibição de crescimento antimicrobiano de cepas de *Cândida sp.* os picos cromatográficos por outro lado demonstram resultado negativo para tais testes. Dessa forma, concluiu-se que sementes de quiabo apresentam um considerável teor de proteínas como também, inibidores de tripsina, que foram parcialmente purificados, justificando a continuidade da pesquisa visando à purificação desses inibidores, bem como, verificação de suas prováveis atividades biológicas.

PALAVRAS-CHAVE: inibidor, SDS-PAGE, *cândida sp.*,

ABSTRACT

Studies with protease inhibitors have been the subject of continuous interest of researchers, mainly due to potential biological activities, such as: antioxidant, insecticidal, antifungal and antimicrobial activity. The presence of trypsin inhibitors in some plants may limit their use in human food; mainly due to its effects of reduction in protein digestibility. In animals fed soybean and bean seeds that have protease inhibitors, the growth and hypertrophic response of the pancreas and small intestine has been scientifically demonstrated. Based on this, this work aimed to investigate and characterize new trypsin inhibitors present in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) seeds. Thus, after extraction with water, the crude protein extract (EB) obtained was precipitated with ammonium sulfate in a single fractionation in the range of 0-80%. The resulting fraction was subjected to inhibitory activity assay and ion exchange chromatography to purify the inhibitors. The soluble protein contents in the research steps were quantified by the Bradford method and visualized by electrophoresis (PAGE-SDS). The quantification of the soluble protein content showed a considerable protein content, being these levels similar to those found in bean seeds. Regarding the antitryptic activity, high values of inhibition of the enzyme trypsin were found in the EB and SF (supernatant of fraction 0-80), with 75.8% and 97.1%, respectively. In the ion exchange chromatography of the supernatant of the fraction, four peaks were obtained by elution in a gradient of NaCl concentration (0-0.4 mol / L). The electrophoresis analysis (PAGE-SDS) of the crude extract, fractions and chromatographic peaks showed that EB, SF and PF (0-80% fraction precipitate) presented protein bands in the range between 38 and 12 kDa and of 76 kDa. EB, SF and PF were positive in antimicrobial growth inhibition test of *Candida* sp. the chromatographic peaks on the other hand show a negative result for such tests. Thus, it was concluded that okra seeds have a high content of proteins as well as trypsin inhibitors, which were partially purified, justifying the continuity of the research in order to purify these inhibitors, as well as to verify their probable biological activities.

KEYWORDS: inhibitor, SDS-PAGE, *Candida* sp..

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Distribuição da família Malvaceae no mundo	21
Figura 2 – Flor e fruto maduro de <i>Albemoschus esculentus</i>	23
Figura 3 – Fruto imaturo, de <i>A. esculentus</i>	23
Figura 4 – Fruto tipo capsúla, maduro de <i>A. esculentus</i>	23
Figura 5 – Sementes, secas, esféricas e verdes-cinza de <i>A. esculentus</i>	25
Figura 6 - Fluxograma das etapas: extração, precipitação, atividade inibitória da enzima tripsina, cromatografia e eletroforese das proteínas de sementes de quiabo	29
Figura 7 - Eletroforese em gel de acrilamida (PAGE-SDS) do EB (2), PF (3), SF(4). PI(5), PII(6), PIII(7), PIV(8) de proteínas de sementes do quiabo com e o marcador de peso molecular (1).	42
Gráfico 1 – Cromatografia de troca iônica do SF.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tipos de frutos encontrados na família Malvaceae.....	20
Quadro 2 – Principais diferenças entre as famílias de inibidores Kunitz e Bowman-Birk.....	25
Quadro 3 – Cepas de micro-organismos utilizados para ensaio de atividade biológica	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diversidade da família Malvaceae no Brasil.....	21
Tabela 2 – Quantificação de proteínas solúveis pelo método de Bradford em amostras de <i>A. esculentus</i>	32
Tabela 3 – Ensaio de atividade inibitória e quantificação de UIT.....	36
Tabela 4 – Ensaio de atividade antitriptica com a amostra em diferentes situações; extrato bruto (EB), sobrenadante (SF) e precipitado (PF) pos fracionamento e picos cromatograficos (I, II, III e IV), quantificação de atividade inibitória e unidade inibitória de tripsina UIT.....	37
Tabela 5 – Teste para detecção de taninos nas amostras extrato bruto (EB), sobrenadante (SF) e precipitado (PF)	38
Tabela 6 – Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato bruto e das frações de <i>A. esculentus</i> contra cepas bacterianas e fúngicas.....	40

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E UNIDADES

% - Percentagem.

° C – Graus Celsius.

30' – Trinta minutos.

μL – Microlitros.

Bioger-Lab – Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia.

BSA – Albumina Sérica Bovina.

CIM – Concentração Inibitória Mínima.

DEAE – Dietilaminoetil.

EB – Extrato Bruto.

FAO – Food and Agriculture Organization

Gn – Gênero

h – Hora.

HCl – Ácido Clorídico.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IPs – Inibidores de Proteases.

KDa – KiloDalton

LaProTe – Laboratório de Proteômica Estrutural.

M – Molaridade.

m:v – Massa : volume.

mA – Milamperagem.

mg – Miligrama.

mL – Mililitros.

Mol/L – Mol/litro.

NaCl – Cloreto de Sódio.

NaOH – Hidróxido de sódio.

nm – Nanômetro.

P I – Pico I.

P II – Pico II.

P III – Pico III

P IV – Pico IV

P.A. – Pró análise.

PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

PF – Precipitado da fração.

pH – potencial Hidrogeniônico.

RPM – Rotação Por Minuto.

SDS – Sodium dodecyl sulfate.

SF – Sobrenadante da fração.

Spp – Espécie.

S-Spp – Subespécie.

TCA – Ácido Tricloacético.

Tris – Hidroximetilaminometano.

UFC – Unidade Formadora de Colônia.

UFPB – Universidade Federal da Paraíba.

UIT – Unidade Inibitória de Tripsina.

V – Volt.

Vr – Variedade.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Malvaceae	19
1.1.1 Classificação Botânica:.....	19
1.1.2 Características Gerais:	19
1.1.3 Folha	19
1.1.4 Flor	20
1.1.5 Fruto	20
1.1.6 Importância econômica.....	20
1.1.7 Distribuição mundial de Malvaceae	21
1.2 <i>Abelmoschus esculentus</i>	22
1.2.1 Origem e introdução	22
1.2.2 Produção e caracterização	22
1.3 Inibidores de Proteases	24
1.3.1 Inibidores de Tripsina.....	25
1.3.2 Outros fatores antinutricionais.....	26
1.3.3 Potencial antimicrobiano	26
2. OBJETIVOS:	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Obtenção e preparo da amostra.....	30
3.2 Precipitação por sulfato de amônio.....	30
3.3 Quantificação de proteínas solúveis	30
3.4 Atividade antitriptica	31
3.5 Teste de presença de tanino	31
3.6 Cromatografia de troca iônica.....	32
3.7 Ensaio de atividade antimicrobiana	32
3.8 Eletroforese	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Quantificação de proteínas solúveis	36
4.2 Atividade antitriptica	37
4.3 Cromatografia de troca iônica.....	38

	17
4.4 Atividade Antimicrobiana.....	39
4.5 Perfil eletroforético	41
5 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERENCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

O quiabo (*Abelmoschus esculentus*) Moench L., pertencente à família Malvaceae é originário do continente africano e foi introduzido no Brasil pelos portugueses durante a colonização. Por ser uma planta cultivada em temperaturas tropicais e temperadas, o quiabeiro mostrou excelente adaptação ao cultivo e ganhou espaço no país, tornando-se parte da cultura alimentar da população brasileira (GUIMARÃES, 2008).

Quanto as características físicas, o quiabo é um fruto do tipo capsula, alongado com muitas sementes e cor escura, é composto por 89% de água, 2,1% de proteína, 0,2% gordura e 7 % carboidratos (FAO, 2008). Suas sementes são esféricas e com aproximadamente 2 milímetros de diâmetro, ricas em substâncias de reserva. No entanto, alimentos de origem vegetal que contém proteínas em quantidades que variam entre 10% e 40% (peso seco), como certas sementes de plantas, também possuem uma elevada concentração (5-15% da proteína total) de fatores antinutricionais de origem proteica como inibidores de proteases (IPs) e lectinas (BHATTACHARYYA et al., 2006).

As lectinas possuem propriedade de ligar-se a carboidratos com alta especificidade; estas moléculas proteicas se ligam a receptores glicosilados presentes na superfície epitelial do intestino, com potenciais efeitos fisiológicos, dentre eles a interferência no processo de digestão e absorção de nutrientes (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Lectinas estão presentes em diversos seres vivos e podem auxiliar no reconhecimento celular em casos como desenvolvimento, defesa, metáfase, no armazenamento ou transporte de carboidratos, inibição de crescimento de fungos ou inseticida (SANTOS et al., 2007).

Os inibidores de proteases também são moléculas de natureza proteica, podendo variar de 10 KDa a 90 KDa, sendo capazes de reduzir a hidrólise de um substrato e também por meio da interação entre o inibidor e o sítio catalítico de enzimas proteolíticas inibem a atividade de enzimas, que por sua vez tem composição de aminoácidos diferentes para classes diferentes de inibidores o que pode determinar a especificidade de um inibidor para uma determinada classe de enzimas (OLIVEIRA et al., 2011).

A especificidade da inibição é altamente variável, alguns inibidores de proteases são capazes de inibir apenas uma ou duas proteases, estritamente relacionadas, enquanto outros são ativos contra diferentes enzimas dentro de uma mesma classe. A maioria dos inibidores de proteases são resistentes a desnaturação pelo calor, extremos de pH e à ação de algumas enzimas proteolíticas. Poucos estudos foram feitos quanto à sua localização celular, mas sabe-se que são encontrados em paredes celulares espaços intercelulares, no citossol e em vacúolos (TREMACOLDI et al., 2004).

As estruturas cristalográficas de inibidores de proteases depositadas em bancos de dados revelam que estes possuem uma estrutura terciária globular, composta por 12 folhas β -pregueadas antiparalelas interligadas por longos "loops". Os IPs podem ser classificados como sendo do tipo Kunitz ou Bowman Birk. Inibidores de proteinase serínica pertencentes a família Kunitz são proteínas de aproximadamente 20 kDa, contendo quatro resíduos de cisteína e possuindo um único sítio de reação, enquanto inibidores do tipo Bowman Birk possuem peso entre 8 a 10 KDa, contendo alta quantidade de cisteína e dois sítios de reação (BHATTACHARYYA et al., 2006). Os inibidores de proteases podem ser biofuncionais, possuindo atividade inibitória contra a tripsina e quimiotripsina, tendo assim, importante potencial inibitório contra enzimas digestivas de insetos herbívoros de plantas economicamente importantes (KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997).

Além disso, estudos sobre inibidores de proteases vem permitindo e ampliando conhecimento sobre as enzimas, particularmente a tripsina. Inibidores de tripsina vem ganhado espaço em pesquisas, pois estes estão presentes em importantes fontes proteicas como em feijões, linhaça, amendoim, ervilha, dentre outras. Alguns desses inibidores possuem resistência a desnaturação pelo calor (TREMACOLDI e PASCHOLATI, 2004).

De acordo com Santos et al. (2010), o estudo de inibidores presentes em vegetais, bem como em animais e micro-organismos, revela diversas funções destas moléculas proteicas, atuando como reguladores de proteínas de reserva, proteases endógenas e também como defensores, auxiliando no processo de defesa das plantas a herbívora e ao ataque por micro-organismo. Nos últimos anos, estudos com inibidores de tripsina vem sendo foco constante de interesse de pesquisadores, visando a descoberta e identificação destas moléculas proteicas com potenciais atividades biológicas, tais como: antioxidante, atividade inseticida, antifúngica e antimicrobiana (MUZQUIZ et al., 2004).

Além de inibidores, pesquisas mostram cada vez mais presença e influência de taninos sobre proteases como a tripsina. Os taninos são compostos fenóis que podem precipitar proteínas em soluções aquosas. De grande peso molecular variam de 500 a 3000 KDa e possuem grupos hidroxila que permitem ligações com proteínas na forma oxidada, já forma não oxidada reagem com as proteínas através de pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas. Estes compostos podem precipitar proteínas em soluções aquosas, interferindo na atividade enzimática. Os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e não hidrolisáveis. Taninos hidrolisáveis são aqueles que por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar. Já os taninos não hidrolisáveis ou condensados são polímeros dos flavonoides, formados predominantemente por unidades de catequina e leucoantocianidina. (SILVA et al., 1999)

A produção de altos níveis de fenóis pode estar relacionada com o processo de cicatrização. Os fenóis são oxidados pela polifenoloxidase a quinonas e complexos polímeros fitomelanina marrom, que são frequentemente mais tóxicos aos invasores do que os fenóis. Nesse processo os taninos podem interagir com enzimas, como a tripsina e impedir sua atividade, o que é denominada atividade antitriptica (SOARES, 2010).

Diante do exposto, a proposta do estudo se justificou pela necessidade de intensificar a investigação dos inibidores de tripsina presentes nas sementes de quiabo, bem como a influência do efeito sinérgico com outros compostos que podem influenciar no efeito anti-tríptico.

1.1 Malvaceae

1.1.1 Classificação Botânica:

Reino: Plantae /Divisão: Magnoliophyta /Classe Magnoliopsida/

Ordem: Malvales

1.1.2 Características Gerais:

A família Malvaceae é bastante diversificada, sendo constituída por exemplares de vários hábitos herbáceos, subarbustos, arbustos, árvores e lianas, com canais mucilaginosos e indumento constituído, normalmente de pelos ramificados ou escamosos. Apresentam também em seus constituintes uma característica marcante a presença de estípulas.

1.1.3 Folha

A filotaxia é alterna, simples (normalmente lobada e palminérvea) ou compostas palmada, com margens inteiras ou serrilhadas e com nervuras secundárias geralmente atingindo os dentes das folhas.









1.1.4 Flor

As flores são isoladas e posicionadas axilamente, quando inflorescência, ramosa ou, às vezes, racimosa. A flor é geralmente vistosa, bissexuadas ou raramente unissexuadas, actinomorfas, geralmente diclamídeas, ocasionalmente com androginóforo, brácteas frequentemente formando um verticilo logo abaixo do cálice (calículo ou epicálice); cálice tem 3 ou 5 sépalas, gamosépalo ou raramente dialissépalo, prefloração valvar. Corola de 3 ou 5 pétalas distintas ou ausentes, geralmente diapétala, prefloração imbricada. Os estames são em número iguais aos das pétalas ou mais, livres ou unidos em fexes ou em tubo, anteras geralmente rimosas, mono ou bitecas, às vezes, com estaminódios, pólen com exina espinhosa. O ovário é súpero, geralmente sincárpico, (1-) 2- pluricarpelar, (1-) 2- plurilocular, placentação axial, geralmente pluriovulado.

1.1.5 Fruto

Podem apresentar fruto do tipo seco como cápsula, sâmara ou esquizocarpo ou ainda frutos carnosos do tipo baga ou drupa, ilustrados no quadro 1.

Quadro 1: Diferentes tipos de frutos encontrados na família Malvaceae

Frutos carnosos	Frutos secos	Esquizocárpicos	
 Baga	 Sâmara		
 Drupa	 Capsula		

Fonte: Adaptado de Spjunt, 1994

1.1.6 Importância econômica

A família Malvaceae é uma valiosa fonte de fibras, alimentos, bebidas, farmacêuticos, madeira, além de ser bastante usada para paisagismo. Diversas Malvaceae apresentam interesse econômico, destacando-se o algodão (*Gossypium spp.*) e o cacau (*Theobroma*

cacao); já outras, menos conhecidas, também merecem referência, como o quiabo (*Abelmoschus esculentus*), o cupuaçu (*Theobroma grandiforum*) e a paineira (*Ceiba speciosa*). Entre as espécies ornamentais destaca-se o hibisco (*Hibiscus spp*). Pertencente, ainda a esta família, o baobá (*Adansonia digitata*), espécie africana considerada uma das árvores mais robustas do planeta.

1.1.7 Distribuição mundial de Malvaceae

As plantas da família Malvaceae possui distribuição predominantemente pantropical, incluindo cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies. No Brasil, ocorrem cerca de 88 gêneros e 750 espécies como mostra a tabela 1. As plantas desta família predominam principalmente em regiões tropicais, mas podem ocorrer em regiões subtropicais e temperadas de ambos hemisférios, sendo bastante abundante nos trópicos americanos como mostra a figura 1.

Tabela 1: Diversidade da família Malvaceae no Brasil.

	Aceitos	Endêmicos	Sinônimos
Gn.	88	8	12
Spp.	750	412	233
S-Spp.	3	0	5
Vr.	17	6	19

Fonte: floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora



Figura 1: Distribuição da família Malvaceae no mundo.

Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Essa família é de ocorrência frequente e persiste em vários tipos de vegetação, tais como área antrópica, caatinga, campinarana, campos de altitude, várzea, limpo, rupestre, carrasco, cerrado, floresta ciliar ou galeria, floresta de igapó, floresta de terra firme, floresta de várzea, floresta estacional decidual, floresta estacional perenifólia, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila, floresta ombrófila mista, manguezal, palmeiral, restinga, savana amazônica, vegetação aquática e vegetação sobre afloramentos rochosos.

1.2 Abelmoschus esculentus

1.2.1 Origem e introdução

O quiabo (*Abelmoschus esculentus*) Moench L., pertencente à família Malvaceae é originário do continente africano e foi introduzido no Brasil pelos portugueses durante a colonização. Por ser uma planta cultivada em temperaturas tropicais e temperadas, o quiabeiro mostrou excelente adaptação ao cultivo e ganhou espaço no país, tornando-se parte da cultura alimentar da população brasileira (GUIMARÃES, 2008).

1.2.2 Produção e caracterização

Em termos de produção mundial, em um ano são produzidas 5,4 milhões toneladas de quiabo e a Índia se destaca como o maior produtor com 65% da produção total. De acordo com os dados IBGE 2006, no Brasil foram produzidas 116.990 t, sendo que destas 37.168 no Nordeste.

Quanto as características físicas, o quiabo é um fruto do tipo capsula, alongado com muitas sementes e cor escura, é composto por 89% de água, 2,1% de proteína 0,2% gordura e 7 % carboidratos (FAO, 2008). Suas sementes são esféricas e com aproximadamente 2 milímetros de diâmetro, ricas em substâncias de reserva. No entanto, alimentos de origem vegetal que contém proteínas em quantidades que variam entre 10% e 40% (peso seco), como certas sementes de plantas, também possuem uma elevada concentração (5-15% da proteína total) de inibidores de proteases (IPs) e lectinas (BHATTACHARYYA et al., 2006).



Figura 2: Flor e fruto imaturo de *A. esculentus*

Foto: Sonia Batista



Figura 3: fruto imaturo de *A. esculentus*

Fonte: Sonia Batista



Figura 4: Fruto tipo capsúla maduro de *A. esculentus*.

Fonte: Sonia Batista



Figura 5: Sementes secas, esféricas e verde-cinza escuro de *A. esculentus*

Fonte: Samara Montenegro

1.3 Inibidores de Proteases

Inibidores de proteases são moléculas de natureza proteica, podendo variar de 10 kDa a 90 kDa, sendo capazes de reduzir a hidrólise de um substrato e também por meio da interação entre o inibidor e o sítio catalítico de enzimas proteolíticas inibem a atividade de enzimas, que por sua vez tem composição de aminoácidos diferentes para classes diferentes de inibidores o que pode determinar a especificidade de um inibidor para uma determinada classe de enzimas (OLIVEIRA et al., 2011).

Existem dois tipos principais de inibidores enzimáticos, os que causam inibição reversível da enzima, subdivididos em competitivos, não competitivos e incompetitivos, e os que causam inibição irreversível da enzima. Na inibição reversível, o inibidor estabelece com a enzima um complexo com uma ligação instável, não covalente. Como a ligação é instável, após a dissociação com o inibidor, a enzima pode retomar sua atividade. No entanto na inibição irreversível, a atividade enzimática é inativada definitivamente, nesse tipo de inibição, a substância inibidora se une à enzima por ligações covalentes, o que altera o grupo funcional da enzima necessário para sua atividade catalítica, tornando-a inativa de forma permanente (NELSON & COX. 2011)

De acordo com Tremacoldi e Pascholati (2004) a especificidade da inibição é altamente variável, alguns inibidores de proteases são capazes de inibir apenas uma ou duas proteases, estritamente relacionadas, enquanto outros são ativos contra diferentes enzimas dentro de uma mesma classe. A maioria dos inibidores de proteases são resistentes a desnaturação pelo calor, extremos de pH e à ação de algumas enzimas proteolíticas. Poucos

estudos foram feitos quanto à sua localização celular, mas sabe-se que são encontrados em paredes celulares, espaços intercelulares, no citossol e em vacúolos (

1.3.1 Inibidores de Tripsina

A partir de dados depositados em bancos de dados, sobre a estrutura cristalográfica de inibidores de tripsina especificamente, observa-se que inibidores da família Bowman-Birk, possuem uma estrutura terciária globular, composta por 12 folhas β -pregueadas antiparalelas interligadas por longos “loops”, diferentemente dos inibidores da família Kunitz (Quadro 2), que possuem massa molecular entre 8-10 kDa, bem como um alto conteúdo de cisteína, geralmente 14, formando 7 pontes dissulfeto e apresentando ainda dois sítios reativos com a capacidade de inibir simultaneamente e independentemente duas proteases distintas, como tripsina e quimiotripsina (OLIVEIRA e col.,2002).

Quadro 2: Principais diferenças entre as famílias de inibidores Kunitz e Bowman-Birk

KUNITZ	BOWMAN-BIRK
Aproximadamente 20kDa	Entre 8-10 kDa
Duas pontes dissulfeto	Sete pontes dissulfeto
Apenas um sitio reativo	Dois sítios reativos
Promove uma inibição por vez (Tripsina ou Quimiotripsina)	Pode promover duas inibições simultâneas (Tripsina e Quimiotripsina)

Fonte: adaptado de OLIVEIRA, 2011

Estudos sobre inibidores de proteases vêm permitindo e ampliando conhecimento sobre as enzimas, particularmente a tripsina. Inibidores de tripsina têm ganhado espaço em pesquisas, por serem fatores antinutricionais e possuírem resistência a desnaturação (TREMACOLDI & PASCHOLATI, 2004).

De acordo com Santos e colaboradores (2010), o estudo de inibidores presentes em vegetais, bem como em animais e micro-organismos, revela diversas funções destas moléculas proteicas, atuando como reguladores de proteínas de reserva, proteases endógenos e também como defensores, auxiliando no processo de defesa das plantas contra a herbívora e ao ataque por micro-organismo. Nos últimos anos, estudos com inibidores de tripsina vêm sendo foco constante de interesse de pesquisadores, visando a descoberta e identificação

destas moléculas proteicas com potenciais atividades biológicas, tais como: antioxidante, atividade inseticida, antifúngica e antimicrobiana.

1.3.2 Outros fatores antinutricionais

Além de inibidores, pesquisas mostram cada vez mais presença e influência de taninos sobre proteases como a tripsina. Os taninos são compostos fenólicos que podem precipitar proteínas em soluções aquosas. De grande peso molecular variam de 500 a 3000 KDa e possuem grupos hidroxila que permitem ligações com proteínas na forma oxidada, já as formas não oxidadas reagem com as proteínas através de pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas. Estes compostos podem precipitar proteínas em soluções aquosas, interferindo na atividade enzimática. Os taninos são classificados em hidrolisáveis e não hidrolisáveis. Taninos hidrolisáveis são aqueles que por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar. Já os taninos não hidrolisáveis ou condensados são polímeros dos flavonoides, formados predominantemente por unidades de catequina e leucoantocianidina (SILVA e col., 1999)

Segundo Vasconcelos e Oliveira (2004) lectinas também são fatores antinutricionais, estas porem, apresentam propriedade de ligar-se a carboidratos com alta especificidade; estas moléculas proteicas se ligam a receptores glicosilados presentes na superfície epitelial do intestino, com potenciais efeitos fisiológicos, dentre eles a interferência no processo de digestão e absorção de nutrientes. Lectinas estão presentes em diversos seres vivos e podem auxiliar no reconhecimento celular em casos como desenvolvimento, defesa, metáfase, no armazenamento ou transporte de carboidratos, inibição de crescimento de fungos ou inseticida (SANTOS & MACHADO, 2007).

1.3.3 Potencial antimicrobiano

Dentre as substâncias vegetais, algumas moléculas são capazes de inibir o crescimento ou metabolismo de muitos micro-organismos. Essas substâncias, nas plantas funcionam como defensores contra herbivória, estudos cada vez mais aprofundados mostram outras funções que essas substâncias podem exercer se isoladas. As propriedades antimicrobianas de substâncias são reconhecidas empiricamente há séculos e foram comprovadas cientificamente apenas recentemente. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na

utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (JANSEN, 1897).

Devido à resistência às drogas já existentes por parte de patógenos humanos e animais, novas substâncias naturais tem sido estudadas, dentre as quais encontram-se os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004). Estes peptídeos podem ser encontrados em todos os organismos multicelulares, tanto os animais quanto as plantas possuem peptídeos que desempenham esta atividade antimicrobiana de amplo espectro e os utilizam para defender-se de uma gama de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários (BIZIULEVIČIUS et al, 2006; BATISTA et al, 1999). Atualmente já foram identificados PAMs a partir de hidrolisados de inúmeras proteínas de origem alimentar, especialmente derivadas do leite, porém proteínas contendo essa atividade biológica são também encontradas nos ovos, na carne e em peixes, bem como em diferentes fontes vegetais de proteínas, como soja, trigo, dentre outras (GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004; AGYEI; APOSTOLOPOULOS; DANQUAH,2011).

Tendo em vista o presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, vem ganhando importância nas pesquisas científicas (DUARTE, 2006).

2. OBJETIVOS:

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antitriptica e antimicrobiana das proteínas de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus*).

2.2 Objetivos específicos

- Extrair proteínas solúveis de sementes do quiabo (*Abelmoschus esculentus*);
- Realizar precipitação do extrato proteico;
- Determinar o teor de proteínas solúveis;
- Detectar a presença de novos inibidores de tripsina no extrato e fração proteica;
- Quantificar a atividade dos novos inibidores de tripsina;
- Realizar ensaios de atividades antimicrobianas;
- Identificar o peso molecular do extrato e fração proteica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteômica Estrutural (LaProtE) e no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGer-Lab), ambos situados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) na cidade de João Pessoa – PB.

Para se atingir os objetivos propostos no plano de trabalho “Investigação de inibidores de proteases em sementes do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench)”, utilizou-se as seguintes etapas encontradas na figura 6 e descritas a seguir.

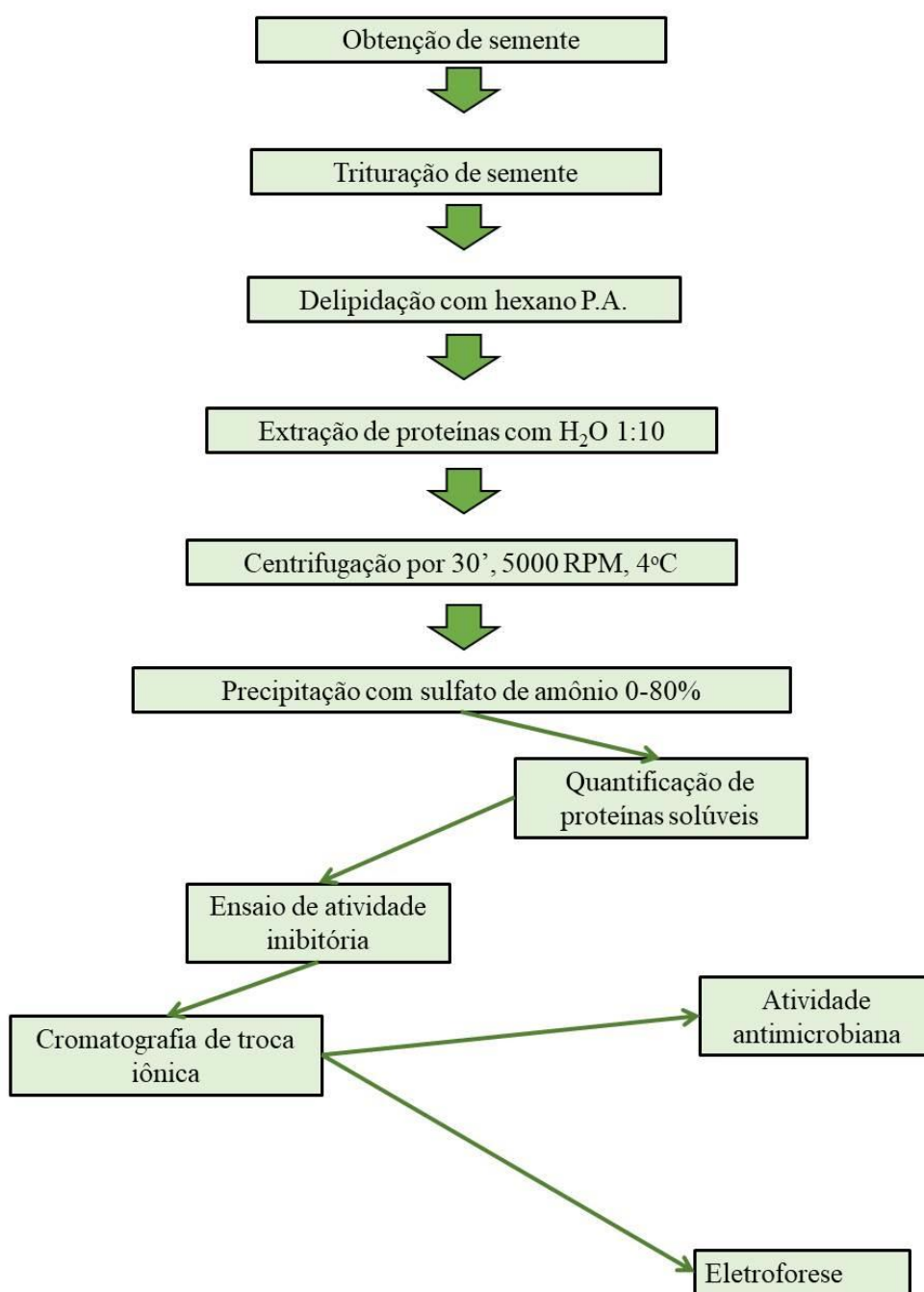


Figura 6: Fluxograma das etapas: extração, precipitação, atividade inibitória da enzima tripsina, cromatografia e eletroforese das proteínas de sementes de quiabo.

3.1 Obtenção e preparo da amostra

Sementes de quiabo obtidas no comércio local (João Pessoa-PB, Brasil) foram trituradas em moinho elétrico tipo Willey até a obtenção de farinha de fina granulação, que em seguida foi desengordurada com hexano P.A. através de sucessivas trocas do solvente em capela a cada 3 horas durante 3 dias em temperaturas ambiente (25°C). Após esse período o excesso do hexano foi retirado e a farinha deixada em temperatura ambiente até completa evaporação do solvente, obtendo-se dessa forma a farinha desengordurada de sementes de quiabo.

A farinha desengordurada foi utilizada para realização da extração proteica em diferentes soluções com diferentes pHs e molaridades (Água+ NaOH pH 9,0, NaCl 0,15mol/L; Tris-HCl 1mol/L pH 7,5, Glicina-HCl 1mol/L pH 2,6 e Glicina+NaOH 1mol/L, pH 9,0), na proporção de 1:10 (m:v) sob agitação magnética por um período 3 horas em temperatura ambiente. Em seguida os extratos centrifugados a 5000 rpm à 4°C por 30 minutos, em centrífuga refrigerada Sigma® modelo 2K15. Após a centrifugação, o precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante denominado extrato bruto (EB) foi filtrado em filtro de papel e recolhido para análises posteriores.

3.2 Precipitação por sulfato de amônio

O extrato que apresentou maior quantidade de proteínas solúveis (EB-H₂O pH9), foi submetido a fracionamento único de 0 – 80 %, para isso, adicionou-se lentamente 69,66 g de sulfato de amônio aos 135mL de EB enquanto o mesmo esteve sob agitação. Para possibilitar a dissolução completa do sulfato de amônio, após ser acrescentado, permaneceu sob agitação por 20 minutos, em seguida foi deixado em overnight por 18 horas, seguido de centrifugação à, com recuperação de precipitado e ressuspensão em tampão Tris-HCl 0,05mol/L, pH 8,0, para posterior diálise com 20 trocas de água a cada 30 minutos. O dialisado foi centrifugado à 5000 RPM, 4°C por 30 minutos, o precipitado foi denominado PF (Precipitados da fração) e o sobrenadante SF (sobrenadante da fração). Ambos foram dialisados e armazenados para análises posteriores.

3.3 Quantificação de proteínas solúveis

A determinação dos teores de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. No método 100µL da amostra sofre várias diluições de 1:2 até 1:32, após diluições é acrescentado em cada tubo 2,5mL do reagente de Bradford e aguardou-se 10 minutos para fazer a leitura dos tubos que foi feita em espectrofotômetro a 595nm.

3.4 Atividade antitriptica

O ensaio de atividade antitriptica foi realizado utilizando o método de Xavier-Filho e colaboradores (1989). A atividade inibitória realizou-se através de ensaio enzimático com tripsina suína e o substrato BAPNA (benzoyl-arginina-paranitroanilida).

No meio de pré- incubação adicionou-se, sob banho de gelo, 18 µl de tripsina 0,3 mg/mL (volume determinado a partir da curva de melhor atividade enzimática), 120 µL de HCl 0,0025mol/L, 362 µL de tampão Tris - HCl 0,05mopl/L pH 7.5 e 100 µL das amostras. Ressalta-se que nos tubos de controle negativo, acrescentou – se 100 µL do tampão e não de amostras.

A incubação ocorreu durante 10 minutos a 37°C. Após este período foi adicionado 500 µL do substrato cromogênico BAPNA aos tubos testes, prosseguindo-se a incubação por mais 15 minutos nas mesmas condições de temperatura. A reação foi interrompida pela adição de 120 µL de solução de ácido acético a 30 % (v/v), seguida da adição de 500 µL do BAPNA nos brancos. A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente a 410 nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e acompanhados com a realização dos respectivos controles negativos.

O cálculo da atividade inibitória foi realizado a partir da determinação da atividade residual da tripsina no ensaio. Os resultados foram expressos como unidades inibitórias de tripsina (UIT) por grama de proteína, sendo 1 UIT equivalente ao aumento de 0,01 da absorbância em relação ao controle.

3.5 Teste de presença de tanino

O ensaio para verificação de presença de tanino, foi realizado com o método adaptado de Bernardes e colaboradores (2011). O teste se fez utilizado como reagentes determinantes Cloreto férrico (ClFe₃) e gelatina a 2%.

Nas duplicatas de cada amostra (1mL) foram adicionadas 200µL dos reagentes em cada duplicata individualmente. Após aguardaram-se 30 minutos e observou a turgidez ou

presença de precipitação das amostras. Em caso de um dos ou ambos acontecimentos se tem resposta positiva para presença de tanino.

3.6 Cromatografia de troca iônica

O SF (sobrenadante da fração 0-80%) obtido foi aplicado em coluna de DEAE – Sephacel nas dimensões de 1,2 x 30 cm, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 8. Para retirada das proteínas que não se ligaram aos íons da coluna, foi utilizado o mesmo tampão de equilíbrio em fluxo de 60mL/h, sendo cada fração coletada a cada 1 minuto.

O gradiente para retirada do material adsorvido a coluna foi feito com solução de NaCl variando de 0 a 0,4mol/L, de acordo com de Ogata et al. (1986) com algumas modificações, com eluição dos picos I, II, III e IV. A leitura foi realizada a 280nm.

3.7 Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas presente no Centro de Ciências da Saúde localizado na Universidade Federal da Paraíba.

As amostras utilizadas foram o EB obtido em extração de farinha de semente do quiabo em solução de água (+ NaOH pH9), o sobrenadante obtido por meio de precipitação com sulfato de amônio bem como o precipitado obtido no mesmo processo e 4 picos cromatográficos, obtidos em cromatografia de troca iônica. A concentração em que as amostras se encontravam como também a concentração em que foi diluída para realização dos ensaios se encontra disponível na tabela 2. As amostras foram submetidas aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas de bactérias, fungos leveduriformes e fungos filamentosos (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

Tabela 2. EB, SF, PF, PI, PII, PIII e PIV com as concentrações utilizadas nos ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Amostras	[] protéica (µg/mL)	Faixa de concentrações utilizadas para determinação da CIM [µg/mL]
EB	2.240	1.120 a 8,75
SF	3.510	1.755 a 13.71
PF	2.970	1.485 a 11.20
P I	140	70 a 0,54
P II	200	100 a 0,78
P III	170	85 a 0,66
P IV	160	80 a 0,625

*EB (Extrato Bruto pH9), SF (Sobrenadante da fração 0-80%0, PF (Precipitado da Fração 0-80%) e PI, PII, PIII e PIV (Picos Cromatograficos).

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade biológica foram Brain Heart Infusion (BHI), Agar Sabouraud Dextrose (ASD)- adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France, para manutenção, respectivamente, das cepas de bactérias e fungos. E para os ensaios de atividade biológica, foram usados caldo Brain Heart Infusion (BHI) para as bactérias e meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato para os fungos (Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes. No quadro 3 encontram-se descritos os micro-organismos utilizados para os ensaios de atividade biológica.

Quadro 3: cepas de micro-organismos utilizados para ensaio de atividade biológica

Bactérias	Fungos leveduriformes	Fungos filamentosos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923	<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<i>Penicillium citrinum</i> IHCPS- 40011
<i>Staphylococcus aureus</i> LM- 177	<i>Candida tropicalis</i> ATCC- 13803	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC- 40640
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>Candida albicans</i> LM-05	<i>Aspergillus niger</i> LM-108
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LM-297	<i>Candida tropicalis</i> LM-18	<i>Aspergillus flavus</i> LM-714

Os micro-organismos pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em BHI/bactérias e em ASD/fungos à temperatura de 4°C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24 - 48 horas em BHI/ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubadas a 35 ± 2°C e repiques de 7 - 14 dias em ASD para fungos filamentosos, incubados a 28 ± 2°C.

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas de bactérias em meio BHI e fungos em meio ASD, foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mc Farland para obtenção de 10⁶ UFC/mL (CLSI, 2015; CLSI^a, 2008; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991; ANTUNES et al., 2006; FREIRE et al., 2014).

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland; Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das substâncias sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 μL de caldo RPMI/BHI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μL das amostras foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas diferentes faixas de concentrações para o extrato bruto e as demais frações (descritas na Tabela 1). Por fim, foi adicionado 10 μL das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (CBHI + bactérias e RPMI + leveduras ou fungo filamentosos), para comprovação da viabilidade das cepas, meio de cultura (RPMI/CBHI), para comprovação da esterilidade do meio e controle negativo com antibióticos: Gentamicina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inibição das bactérias e Anfotericina B (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras, já os fungos filamentosos foram incubados a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias.

No ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 μL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). O ensaio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 h. Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador.

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = forte atividade; 600-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = moderada atividade; > acima de 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ =fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007; NCUBE, AFOLAYAN , OKOH, 2008). Um resumo das etapas utilizadas no trabalho encontra-se na figura 6.

3.8 Eletroforese

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida na presença de SDS- Dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com o método descrito por Laemmili (1970). O gel de aplicação foi feito em concentração de 3,5 % de acrilamida e bis-acrilamida em tampão Tris-HCl 0,05mol/L, pH 6,8 e SDS a 10%. O gel de separação foi feito em concentração 12,5% de acrilamida e bis-acrilamida, em tampão Tris-HCl 3mol/L, pH 8,8 e SDS a 10%. As amostras EB, PF, SF, PI, PII, PIII e PIV, dissolvidos em tampão de amostra redutor contendo β - mercaptoethanol a 5% e SDS a 2%, foram aquecidas a 100°C por 2 minutos, centrifugadas por 5 minutos e em seguida aplicadas no gel. A corrida foi realizada em amperagem constante de (25mA) e em voltagem de 200V. Após corrida o gel foi fixado em solução de TCA 10% por 30 minutos e em seguida deixado em solução corante em overnight e descorado com solução descorante (água destilada 70%, ácido acético 20% e metanol 10%) até a revelação das bandas. Foi utilizado como padrão marcador de massa molecular AMRESCO^R, com massas de 12KDa a 225KDa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação de proteínas solúveis

A quantificação do teor de proteínas solúveis do extrato proteico de sementes do quiabo (Tab. 3), mostra que o extrato bruto em água pH9 tem um maior teor de proteínas solúveis que os demais extratos bruto com 2,24 mg de proteína/mL. Assim como também o sobrenadante (SF) e o precipitado (PF) da fração 0-80% também possuem um elevado teor proteico com 2,97 mg/mL e 3,51 mg/mL respectivamente; os picos cromatográficos obtidos por eluição por outro lado tem um teor baixo quando comparados aos demais com o PII apresentando 0,20mg/mL e os outros PI, PIII e PIV com níveis abaixo disso, apresentando, 0,14mg/mL, 0,17mg/mL e 0,16mg/L respectivamente

Tabela 3: Quantificação de proteínas solúveis pelo método de Bradford (1986). Os valores na tabela foram expressos em mg de proteína por mL de solução.

<u>Amostras</u>	<u>mg/mL ptn</u>
EB NaCl	0,27
EB TRIS	1,48
EB Glicina pH 2,6	0,36
EB Glicina pH 9,0	0,46
EB H2O pH 9; F, 0-30%	1,61
EB H2O pH 9; F,30-60%	2,66
EB H2O pH 9; F, 60-90%	2,75
EB H2O pH 9	2,24
PF	3,51
SF	2,97
PI	0,14
PII	0,20
PIII	0,17
PIV	0,16

*EB NaCl (Extrato Bruto em NaCl 0,15mol/L)/ EB TRIS(Extrato Bruto em Tris-HCl 1mol/L, pH 7,5)/ EB Glicina pH 2,6 (Extrato Bruto em Glicina-HCl 1mol/L, pH 2,6)/ EB Glicina pH 9 (Extrato Bruto em Glicina -HCl 1mol/L, pH 9)/ EB H2O pH 9; F, 0-30% (precipitado de fração 0-30% obtido de Extrato Bruto em H2O,pH 9/ EB H2O pH 9; F,30-60% (precipitado de fração 30-60% obtido de Extrato Bruto em H2O,pH 9)/ EB H2O pH 9; F, 60-90% (precipitado de fração 60-90% obtido de Extrato Bruto em H2O,pH 9)/ EB H2O pH (Extrato Bruto em H2O+NaOH, pH 9)/ SF (Sobrenadante de fração 0-80% obtido de Extrato Bruto em H2O pH 9)/ PF (Precipitado de fração 0-80% obtido de Extrato Bruto em H2O pH 9)/ PI (Pico cromatográfico)/ PII (Pico cromatográfico)/ PIII (Pico cromatográfico) e PIV (Pico cromatográfico).

Tomando-se como base os consideráveis teores de proteínas encontrados no EB e PF de 2,99mg/mL e 3,27mg/mL, respectivamente; constata-se que as sementes do quiabo apresentam teores de proteínas semelhantes ao do feijão (2,6 mg/mL), o que é um dado importante para justificar o maior uso desta planta na alimentação humana, estando de acordo com os resultados previamente encontrados por Silva (2010). Por outro lado, o baixo teor de proteínas encontrado em SF (1,53 mg/mL) pode ser explicado pelo fato desta fração ser resultante do sobrenadante proveniente do passo de precipitação com sulfato de amônio para obtenção da fração 0-80%. Dessa forma, a maior parte das proteínas do EB encontra-se no precipitado (PF) que, conforme esperado, concentra o maior teor de proteínas. Por conseguinte, como a SF é o sobrenadante da precipitação, detém as proteínas que tiveram menor interação com o sulfato de amônio, ou seja, não precipitaram até 80% de saturação com sulfato de amônio.

4.2 Atividade antitriptica

Na Tabela 4, estão descritos os resultados de inibição da enzima tripsina, destacando-se o EB e o SF, que apresentaram elevados valores de inibição da enzima tripsina, com 75,8% e 97,1%, respectivamente, valores superiores ao de Carvalho et al. (2002) em seus estudos com grãos de soja, que apresentaram 40% de atividade antitriptica. Em contrapartida ao SF, o PF apresentou a mais baixa atividade inibitória, de apenas 8,49 %. Assim o material escolhido para passagem em coluna cromatográfica foi o SF tendo em vista que se buscou a obtenção de tais inibidores para as atividades seguintes.

Tabela 4: Ensaio de atividade antitriptica com a amostra em diferentes situações; extrato bruto (EB), sobrenadante (SF) e precipitado (PF) pos fracionamento e picos cromatograficos (I, II, III e IV), quantificação de atividade inibitória e unidade inibitória de tripsina UIT.

Amostras	UITmg/mL	% Atividade inibitória
EB H ₂ O pH 9	3,42	75,8%
SF	19,7	98.7%
PF	21,7	8,49%
PI	72,8	51.4%
PII	49,5	52,9%
PIII	64,7	47,6%
PIV	53,7	59,9%

Diferentemente dos resultados de proteínas solúveis obtidos, o percentual atividade antitriptica foi maior no SF em comparação com PF. Este fato sugere que os inibidores de tripsina presentes na fração em questão não são passíveis de precipitação quando submetidos a até 80% de saturação com sulfato de amônio. Para confirmação de que a atividade antitriptica era, de fato, devido à presença de inibidores de tripsina, foi realizado teste de presença de taninos, o qual deu positivo em EB e PF, sendo no segundo em maior quantidade e negativo em SF; sugerindo, portanto, que a atividade presente em SF seria oriunda da interferência de taninos presentes. Os resultados obtidos no teste de verificação de presença de taninos se encontram descritos na Tabela 5. Onde pode se observar que em EB H₂O e PF foi encontrada resposta positiva para presença de taninos enquanto que em SF esta resposta foi negativa.

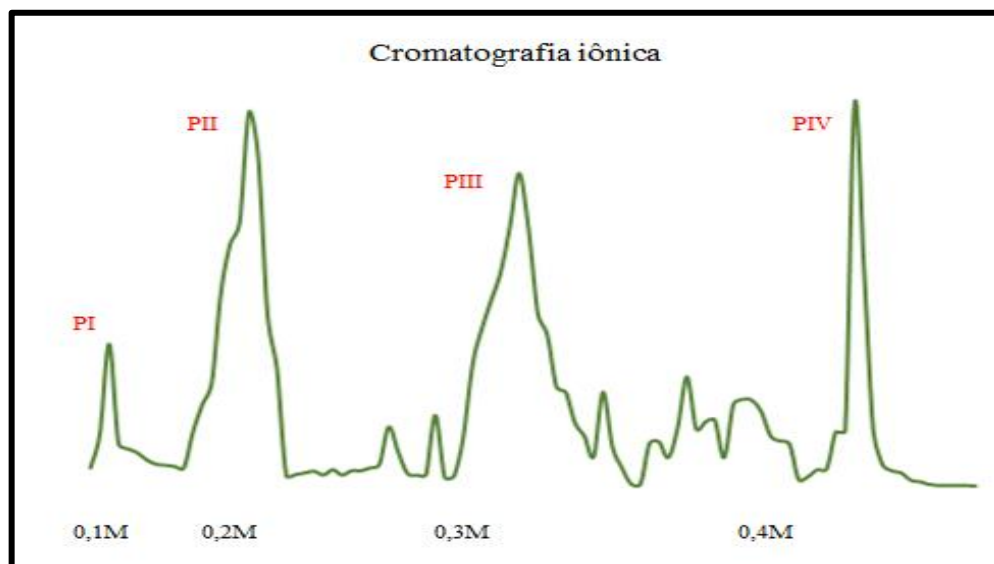
Tabela 5: Teste para detecção de taninos nas amostras extrato bruto (EB), sobrenadante (SF) e precipitado (PF).

Amostras	Gelatina 2%	CiFe ₃
EB H ₂ O pH9	-	+
SF	-	-
PF	+	+

4.3 Cromatografia de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica com o SF (Graf. 1) constata-se a presença de quatro picos, eluídos a partir de um gradiente de concentração de sal (NaCl) variando de 0 a 0,4mol/L. De acordo com o Gráfico 1 os picos surgem a partir do aumento da concentração de NaCl. Onde o ápice de absorvância do pico I se dá no minuto 16 em concentração de 0,1mol/L de NaCl, o pico II se dá no minuto 47 em concentração de 0,2mol/L de NaCl, o pico III no minuto 70 e o pico IV no minuto 123 em concentrações de 0,3mol/L e 0,4mol/L de NaCl, respectivamente. Conforme já descrito, após realização do ensaio de atividade inibitória da enzima tripsina, foi encontrada atividade inibitória em todos os picos com uma atividade maior nos picos II e IV.

Gráfico 1: Cromatografia de troca iônica do sobrenadante da fração 0-80% (SF) de proteínas de sementes do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). Os picos foram eluídos através de gradiente de concentração de NaCl (0,1-0,4mol/L).



Quando considerados os resultados obtidos a partir da cromatografia de troca iônica do SF, onde os picos obtidos apresentaram menor percentual de inibição da enzima tripsina quando comparados aos EB e SF, constata-se que mais passos cromatográficos são necessários para a purificação dos inibidores.

A realização do teste de presença de taninos também permitiu evidenciar que os possíveis inibidores presentes no EB de sementes de quiabo não foram precipitados na maior saturação com sulfato de amônio utilizada; justificando a atividade antitriptica encontrada nas amostras EB e PF. Tais resultados sugerem que a atividade antitriptica nesse caso, foi possivelmente devido a presença de taninos, que são compostos fenólicos presentes em vegetais. Os taninos apresentam peso molecular que variam de 500 a 3000 kDa e possuem grupos hidroxilas que permitem ligações com proteínas na forma oxidada, já a forma não oxidada reage com as proteínas através de pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas (SOARES, 2010). Estes compostos podem precipitar proteínas em soluções aquosas, interferindo na atividade enzimática; o que reforça os resultados obtidos.

4.4 Atividade Antimicrobiana

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos picos cromatográficos, nas diferentes concentrações testadas estão registrados na Tabela 6.

(+): Crescimento do micro-organismo (-): Não houve crescimento microbiano

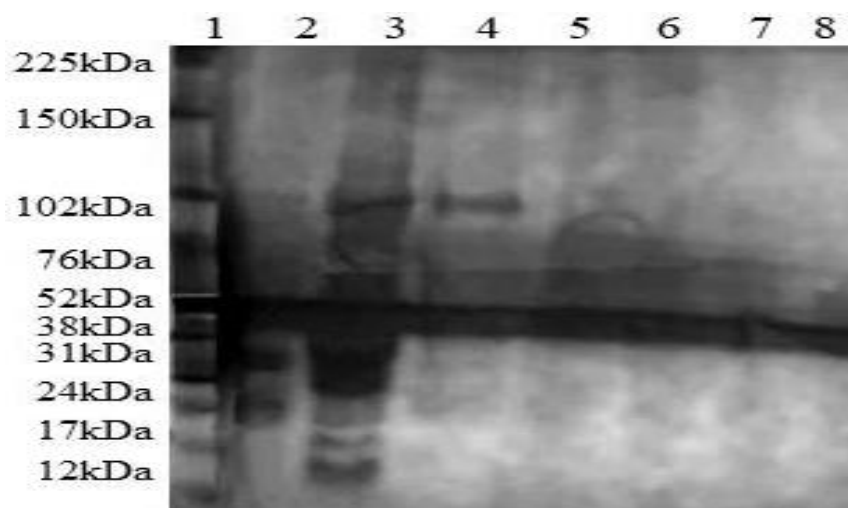
(x): Controle não usado nos ensaios.

As amostras EB, SF e PF demonstraram atividade positiva frente aos fungos leveduriformes (*Candida albicans* ATCC-76645, *Candida albicans* LM-05, *Candida tropicalis* ATCC-13803 e *Candida tropicalis* LM-18), entretanto quando avaliadas frente às bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Staphylococcus aureus* LM-177, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853 e *Pseudomonas aeruginosa* LM-297) e aos fungos filamentosos (*Penicillium citrinum* IHCP5-40011, *Aspergillus fumigatus* ATCC-40640, *Aspergillus niger* LM-108 e *Aspergillus flavus* LM-714), estas se mostraram resistentes. Por outro lado, as amostras PI, PII, PIII e PIV não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações utilizadas. Tais resultados sugerem que concentrações maiores devem ser avaliadas. Por fim, com base na análise dos resultados obtidos, atribui-se uma atividade moderada ao extrato bruto e ao precipitado e baixa atividade antimicrobiana por parte do sobrenadante conforme os critérios de Holetz et al., 2002; Sartoratto et al., 2004; Houghton et al., 2007.

4.5 Perfil eletroforético

A partir da eletroforese, figura 7, verifica-se que o EB apresenta bandas proteicas na faixa entre 38 e 12 kDa e de 76 kDa, observa-se nos picos cromatográficos, quase que imperceptível bandas proteicas de massas em torno de 24 kDa.

Figura 7: Eletroforese em gel de acrilamida (PAGE-SDS) do EB (2), PF (3), SF(4). PI(5), PII(6), PIII(7), PIV(8) de proteínas de sementes do quiabo com e o marcador de peso molecular (1).



Segundo Ogata e colaboradores (1986) os inibidores de tripsina presentes em sementes de quiabo apresentam peso molecular de 20k Da. No gel de eletroforese é possível ver bandas proteicas na faixa de 24 kDa; o que evidencia a presença de inibidores proteicos, mesmo tendo sido constatado atividade de taninos em duas das três amostras. Taninos podem dar falsos resultados em relação à presença de inibidores de tripsina devido a sua interação com enzimas e inibição das mesmas (SOARES, 2010).

Os inibidores estão em maior quantidade na fração I, aquela que apresenta menor teor de proteína nas análises realizadas. Ainda segundo Ogata e colaboradores (1986), estes inibidores podem ser considerados fatores antinutricionais, pois são estáveis em temperaturas acima 80°C e não têm qualquer efeito em relação à pepsina suína. Todavia, há de se considerar que em seus estudos, Ogata e colaboradores (1986) utilizaram sementes não amadurecidas de vagens jovens comestíveis, o que difere deste trabalho, onde foram utilizadas sementes de plantas adultas e secas naturalmente, diferença essa, que influencia os resultados, precisamente, no que diz respeito ao teor de proteínas.

Outro fato relevante sobre estes inibidores, é que eles poderiam estar ligados a defesas do quiabeiro. Segundo Oliveira (2011), os mecanismos de resistência apresentados pelas diferentes espécies de insetos-praga, faz justificável a presença desses inibidores uma vez que estes aumentam de modo ainda desconhecido, a atividade inseticida da planta.

Assim, frente aos resultados obtidos, constatou-se que um novo passo de cromatografia seria necessário, para continuidade da purificação do (s) possível (eis) inibidor (es) presente (s) no extrato bruto (EB) de proteínas de semente do quiabo.

5 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sementes de quiabo apresentam um considerável teor de proteínas, o que motiva a realização de novos estudos, sobretudo devido à constatação da presença atividade antitriptica em seus extratos, que uma vez purificados, servirão para uma avaliação mais detalhadas de suas possíveis atividades biológicas.

No que diz respeito à atividade antitriptica, elevados valores de inibição da enzima tripsina foram encontrados no SF da precipitação com 98,7%, em contrapartida o PF apresentou apenas 8,49% mostrando a não precipitação dos inibidores.

Na cromatografia de troca iônica do extrato bruto de proteínas de sementes do quiabo foram obtidos, quatro picos, todos com atividade inibitória da enzima tripsina destacando o PII e PIV com 52,9% e 59,9% de atividade.

A análise por eletroforese (PAGE-SDS) do extrato bruto e frações mostrou que o EB, SF e PF apresentam bandas proteicas na faixa entre 38 e 12 kDa e de 76 kDa. Em PI, PII, PIII e PIV foi detectada presença quase imperceptível das bandas proteicas de entorno de 24 kDa. Diante desses resultados constatou-se a necessidade de mais etapas cromatográficas para completa purificação dos inibidores de tripsina presentes em sementes do quiabo.

A partir da análise da atividade antimicrobiana e antifúngica observou-se que o extrato bruto, o sobrenadante e o precipitado da fração 0-80%, demonstraram atividade positiva frente diferentes linhagens e cepas de *Candida* sp.

Dessa forma, concluiu-se que sementes de quiabo apresentam um considerável teor de proteínas como também, de inibidores de tripsina, que necessitam serem purificados, para continuidade da pesquisa visando uma análise mais detalhadas de suas possíveis atividades biológicas.

REFERÊNCIAS:

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, n. 4, p. 517-524, 2006.

BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; NUNES, C. R.; PESSANHA, F. F.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. Quantification of the levels of tannins and total phenols and evaluation of the antioxidant activity of fruits of pepper tree. **VÉRTICES**, Campos dos Goytacazes/RJ, v. 13, n. 3, p. 117-128, set./dez. 2011.

BENJAKUL S, VISESSANGUAN W., THUMMARATWASIK P. **Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds**. *Journal of Food Biochemistry*. 24, 107–127, 2000.

BHATTACHARYYA, A., MAZUMDAR, S., LEIGHON, S. M., BABU, C. A **Kunitz proteinase inhibitor from Archidendron ellipticum seeds: Purification, characterization, and kinetic properties**. *Phytochemistry* 67: 232-241, 2006.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, M. R. B. ; KIRSCHNIK, P. G; PAIVA, K. C.; AIURA, F. S. **Evaluation of trypsin inhibitors activity after enzymatic digestion in heat-treated soybean**. *Nutr.*, vol.15, n.3, p.267-272. 2002.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^a. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A3. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^b. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Approved standard M38-A2. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^c. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. Simpósio internacional acav-embrapa sobre nutrição de aves, v.1, p.118-132. 1999.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, 2005.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplatemethod to determine the Minimal Inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FAO, 2008. **Food Composition Tables**. Disponível em www.fao.org/faostat. Acesso em 07/05/2015.

FELIZ, M A. **Análise química e sensorial de grãos de soja (*Glycine Max. (L) Merril*) tostados por diferentes tratamentos**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós –Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de São Paulo; Piracicaba, 2005.

FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L. ; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. **Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus***. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.16 n.2, 2014.

GUIMARÃES, A. F. R. Rendimento agrônômico de quiabo e cebola em consórcio e monocultivo. 2008.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R., ABDULAMIR, A. S., VERN, L. S., BAKAR, F. A., ABAS, F., JAHANSHIRI, F. AND SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

IBGE, **Censo Agropecuário 2006 Brasil**, Grandes Regiões e Unidades da Federação, Censo agropec. Rio de Janeiro, p.1-777, 2006.

KARP, G. **Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments** - 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2013.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; OSAKO, K.; TANAKA, M. **A heat stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics.** *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 163–169, 2010.

KOIWA, H., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M. **Regulation of protease inhibitors and plant defense.** *Trends in Plant Science* 2: 379-384, 1997.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, v.227, n.5259, p.680-685. 1970.

MALVACEAE in **Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB156> . Acesso em: 07 Nov. 2017.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, v.84, p.538-544, 1998.

MORRISON, S. C.; SAVAGE, G. P.; MORTON, J. D.; RUSSEL, A. C. **Identification and stability of trypsin inhibitor isoforms in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grown in New Zealand.** *Food Chemistry*, 100, 1 –7. 2007.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. P. O.; JÚNIOR, A. M. B., TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

NELSON, David L; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 1274 p. 2011.

OGATA, F.; H. IMAMURA; K. HIRAYAMA; S. MAKISUMI ; . **Purification and Characterization of Four Trypsin Inhibitors from Seeds of Okra, *Abelmoschus esculentus* L.** *Agricultural and Biological* v.50 p.2325-2333. 1986.

OLIVEIRA, C. F. R. ; M. L. R. MACEDO. **Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas.** *Biológicas & Saúde*, v.1, n.1. 2011.

OLIVEIRA, L. G. D.; A. J. GOZZO; V. A. NUNES; I. CRUZ-SILVA; M. U. SAMPAIO; C. A. M. SAMPAIO ; M. D. S. ARAÚJO. **Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil)–isolamento e caracterização do inibidor de tripsina.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, 2002.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2014.

SAMAIN, M. S.; MATHIEU, G.; WANKE, S.; NEINHUIS, C. & GOETGHEBEUR, P. **Verhuellia resited – unraveling its intricate taxonomic history and a new subfamilial classification of Piperaceae**. *Taxon*. Vol. 57. 2008.

SANTOS, M. R.; M. A. SEDIYAMA ; S. M. VIDIGAL. **Desenvolvimento de mudas de quiabeiro em função da qualidade do substrato**. *Hortic. bras*, v.28, n.2. 2010.

SANTOS, S. A. M. ; O. L. T. MACHADO. **Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio**. *Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas*, v.1, n.1, p.10. 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SILVA, M. R. ; M. A. A. P. SILVA. Nutritional aspects of phytates and tannins. v.9, p.5-19. 1999.

SILVA, R. G. V. **Caracterização físico-química de farinha de batata-doce para produtos de panificação** /. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2010.

SOARES, G. D. S. F., **Estudo da qualidade nutricional de sementes de quiabo**, 2010.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ª ed. Instituto Plantarum, São Paulo. 2012.

TREMACOLDI, C. R. ; S. F. PASCHOLATI. **Inibidor de tripsina em raízes de Eucaliptus**. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.135-140. 2004.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. **Antinutritional Properties of plant lectins**. *Toxicon*. Oxford, v.44, n.4, p.385-403, 2004.

VISSER, E. M.; OLIVEIRA FILHO, D.; MARTINS, M. A.; STEWARD, B. L. **Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products**. *Biomass and Bioenergy*, Amsterdam, Vol. 35. 2011.

XAVIER-FILHO, J.; F. CAMPOS; M. B. ARY; C. P. SILVA; M. M. CARVALHO; M. L. R. MACEDO; F. LEMOS ; G. GRANT. **Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus***. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.37, n.4, p.1139-1143. 1989.