

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ALBUMINAS 2S DE SEMENTES DE  
CRAMBE (*Crambe abyssinica* Hochst) E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
ALERGÊNICAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

**JUCÉLIA DA SILVA ARAUJO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
MAIO - 2019

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ALBUMINAS 2S DE SEMENTES DE  
CRAMBE (*Crambe abyssinica* Hochst) E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
ALERGÊNICAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

**JUCÉLIA DA SILVA ARAUJO**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências  
para obtenção do título de Doutor em  
Biociências e Biotecnologia.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Maio – 2019

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A663 Araujo, Jucelia da Silva.

Isolamento e caracterização de albuminas 2S de sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) e avaliação das propriedades alergênicas e potencial biotecnológico / Jucelia da Silva Araujo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

116 f. : il.

Bibliografia: 103 - 116.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.  
Orientadora: Olga Lima Tavares Machado.

1. Proteínas tóxicas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Leveduras patogênicas. 4. Inibidores de proteinase. 5. Alérgenos de planta. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ALBUMINAS 2S DE SEMENTES DE  
CRAMBE (*CRAMBE ABYSSINICA* HOCHST) E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
ALERGÊNICAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

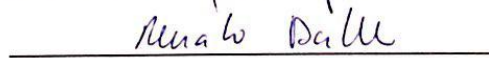
JUCÉLIA DA SILVA ARAUJO

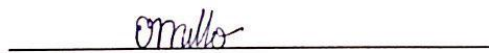
Tese de Doutorado apresentada ao  
Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências  
para obtenção do título de Doutor em  
Biociências e Biotecnologia.

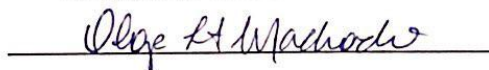
Aprovada em 28/05/2019

Comissão examinadora:

  
Dr. Salvatore Giovanni de Simone - FIOCRUZ

  
Dr. Renato Augusto DaMatta - UENF

  
Dr.ª Erica de Oliveira Mello - UENF

  
Dr.ª Olga Lima Tavares Machado – UENF

(Orientadora)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP); Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT); Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob a orientação da Professora Dr<sup>a</sup>. Olga Lima Tavares Machado.

Financiamentos:

- FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
- CNPq (Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e tecnológico)

“Mesmo se eu soubesse que amanhã o mundo se partiria em pedaços, eu ainda plantaria a minha macieira”.

*Martin Luther King*

Aos meus pais (*in memoriam*), estariam orgulhosos.  
Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e incentivo.  
Aos meus filhos, meus maiores torcedores.  
À “universidade pública” sem a qual não haveria um início.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Expresso minha gratidão e apreço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a construção deste trabalho. Não foi fácil sintetizar todas essas contribuições sem as quais não haveria êxito.

Primeiramente a Deus pelo novo fôlego de vida que me permitiu viver essa conquista.

Meu agradecimento a Dr<sup>a</sup> Olga L. T. Machado não só pela orientação, mas também pela inspiração, estímulo, confiança e pela amizade construída nestes quase 20 anos de convivência.

À Dr<sup>a</sup> Katia V. S. Fernandes pela preciosa contribuição na revisão deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, doutores Érica de Oliveira Mello, Renato Augusto DaMatta e Salvatore Giovanni de Simone, pela dedicada avaliação deste trabalho.

Aos professores do LQFPP pela liberação que me permitiu fazer o doutorado.

Aos professores doutores Edésio J. T. de Mello, Katia V. S. Fernandes, Valdirene M. Gomes e Antonia Elenir A. de Oliveira, Maurício Verícimo (UFF) por permitir a realização de muitos experimentos que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A todos que contribuíram nas etapas experimentais com dedicação e empenho, sem falar na transmissão de conhecimentos. Doutores Lais Carvalho (garota prodígio), Gabriela Bard, Viviane Nascimento, Gabriel Taveira, Giliane Souza, Gustavo Rocha, Thais Pacheco. Mestres Kayan Ventury, Tatiana Moraes, Marciele Souza, Débora Mothé e Francisnei P. da Silva.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por me permitir esse avanço profissional.

Aos órgãos de fomento FAPERJ, CAPES e CNPq.

Aos técnicos, Cristovão pelo suporte e Isabela pela amizade e pão fresco toda manhã.

Agradeço a minha família pelo apoio mesmo estando distante: meus pais (*in memoriam*) que são minha base. Obrigada irmãs pelas intercessões.

Aos meus filhos Rebeca Sally e Davi Guilherme, meus amores, minha inspiração.

Ao pessoal da Koinonia por fazerem parte do meu percurso.

Para as meninas do laboratório meu especial agradecimento, obrigada pelo apoio, incentivo, troca de conhecimento, companheirismo nos momentos difíceis, boas risadas nos momentos de descontração, foram tantas experiências juntas que só me enriqueceram. Vocês são muito especiais, amigas para a vida.

Agradeço também pelo suporte recebido junto à Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia diante do seu coordenador e secretárias.



## RESUMO

Na busca por fontes alternativas de energia a cultura do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) surge como uma alternativa para a produção de óleo. Crambe é uma oleaginosa em expansão e pouco se sabe do conteúdo proteico dessas sementes. Assim, no presente estudo, isolamos, identificamos e caracterizamos albuminas 2S, proteínas de reserva relacionadas à defesa de plantas. Também investigamos possíveis aplicações biotecnológicas dessas proteínas visando agregar valores ao coproduto da extração do óleo e possível potencial alergênico na busca de medidas de proteção à saúde. A extração das proteínas foi em tampão fosfato e a fração de interesse foi isolada por métodos cromatográficos. A albumina 2S foi caracterizada por SDS-PAGE, técnicas de western blot, dicroísmo circular, espectrometria de massas e degradação de Edman. A atividade antitripanossoma foi avaliada por incubação dos parasitas e das células hospedeiras com a fração proteica rica em albuminas 2S, para posterior contagem das células e análise estrutural por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. A fração proteica induziu eliminação de *Trypanosoma cruzi* nas formas epimastigota e amastigota, mas não à célula hospedeira. Para os ensaios de atividades antifúngicas, as leveduras *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*, foram incubadas na presença das albuminas 2S as quais foram capazes de inibir o crescimento, permeabilizar as membranas e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas. Para avaliação da capacidade de inibição enzimática da albumina 2S foram realizados ensaios colorimétricos dirigidos a proteases cisteínicas, serínicas e para a  $\alpha$ -amilases. As albuminas 2S inibiram acima de 70% a atividade das enzimas testadas. O potencial alergênico das albuminas 2S isoladas foi avaliado após sensibilização de camundongos. Ensaio de ELISA mostraram níveis de IgG, IgG1 e IgE no soro coletado dos animais. Teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA) mostrou que estes alérgenos provocaram desgranulação de mastócitos *in vivo*, o que confirma a alergenicidade da albumina 2S isolada. Estes alérgenos apresentam reatividade cruzada com alérgenos de outras oleaginosas como: mamona, amendoim e pinhão-manso, fato este verificado por ensaios de ELISA e desgranulação de mastócitos *in vitro*.

**Palavras-chave:** Proteínas tóxicas, *Trypanosoma cruzi*, leveduras patogênicas, inibidores de proteinase, alérgenos de planta.

## ABSTRACT

In the search for alternative sources of energy, crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) culture emerges as an alternative for oil production. Crambe is an expanding oilseed and little is known about the protein content of these seeds. Thus, in the present study, we isolated, identified and characterized 2S albumin, reserve proteins related to plant defense. We also investigate possible biotechnological applications of these proteins in order to add value to the oil extraction co-product and allergenic potential in the search for health protection measures. Proteins were extracted in phosphate buffer and the fraction of interest was isolated by chromatographic methods. 2S albumin was characterized by SDS-PAGE, western blot techniques, circular dichroism, mass spectrometry and Edman degradation. The antitrypanosomal activity was evaluated by incubation of parasites and of host cells with protein fraction rich in 2S albumin, followed by cell counting and structural analysis by optical and transmission electron microscopy. The protein fraction induced the elimination of *Trypanosoma cruzi* in the epimastigote and amastigote forms, but not to the host cell. For the antifungal activity assays, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts were incubated in the presence of 2S albumin which were able to inhibit growth, permeabilize the membranes and induce the production of reactive oxygen species in fungi cells. In order to analyse the enzymatic inhibition capacity of 2S albumins, colorimetric assays were performed for cysteine and serine proteases, and  $\alpha$ -amylases. 2S albumins inhibited the activity of the enzymes tested above 70%. The allergenic potential of isolated 2S albumin was evaluated after sensitization of mouse. ELISA assays showed levels of IgG, IgG1 and IgE in serum collected from the animals. Passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) showed that these allergens provoked in vivo degranulation of mast cells, which confirms the allergenicity of 2S albumin isolated. These allergens showed cross-reactivity with allergens from other species of oleaginous such as: castor seeds, peanut and jatropha, as verified by ELISA and in vitro mast cell degranulation.

**Keywords:** Toxic proteins, *Trypanosoma cruzi*, pathogenic yeasts, protease inhibitors, plant allergens.

## LISTA DE FIGURAS/TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Lista de peptídeos, identificados pela análise MS e Edman.....	64
<b>Tabela 2:</b> Epitopos lineares da proteína preditos pelo Bepipred.....	81
<b>Tabela 3:</b> Epitopos lineares de célula B preditos pelo ABCpred .....	90
<b>Tabela 4:</b> Regiões de epitopos conformacionais preditos por CBTOPE.....	91
<b>Figura 1:</b> Representação da estrutura da albumina 2S mamona.....	26
<b>Figura 2:</b> Ilustração do mecanismo de reações alérgicas .....	34
<b>Figura 3:</b> Etapas realizadas para extração das proteínas de sementes de crambe.....	40
<b>Figura 4:</b> Etapas realizadas para investigação da atividade inibitória da fração proteica rica em albuminas 2S sobre o protozoário <i>Trypanossoma cruzi</i> .....	40
<b>Figura 5:</b> Etapas realizadas para investigação da atividade inibitória das albuminas 2S sobre o crescimento de leveduras .....	41
<b>Figura 6:</b> Etapas realizadas para investigação da atividade inibitória das albuminas 2S sobre a atividade enzimática e viabilidade de larvas de insetos .....	41
<b>Figura 7:</b> Etapas realizadas para investigar as propriedades alergênicas das albuminas 2S purificadas a partir da imunização dos animais .....	42
<b>Figura 8:</b> Perfil de eluição do extrato proteico de sementes de crambe e visualização eletroforética .....	60
<b>Figura 9:</b> Sequência dos peptídeos identificados por espectrometria de massas .....	61
<b>Figura 10:</b> Alinhamento da sequência N-terminal parcial .....	62
<b>Figura 11:</b> Perfil cromatográfico de exclusão molecular e visualização eletroforética.....	63
<b>Figura 12:</b> Análise estrutural da banda extirpada do gel de tricina por espectrometria de massas .....	63
<b>Figura 13:</b> Espectro obtido por Dicroísmo circular.....	65
<b>Figura 14:</b> Efeito da fração (FCrF5-20) na viabilidade de células LLC-MK2.....	66
<b>Figura 15:</b> Análise estrutural e ultraestrutural das células hospedeiras tratadas com a fração FCrF5-	

20.....	67
<b>Figura 16:</b> Efeitos citotóxicos da fração FCrF5-20 em diferentes concentrações sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	68
<b>Figura 17:</b> Microscopia óptica e eletrônica de transmissão.....	69
<b>Figura 18:</b> Efeitos das diferentes concentrações (50, 100, 500, 1000 µg/mL) da fração FCrF5-20 em células LLC-MK2 infectadas tratadas.....	71
<b>Figura 19:</b> Microscopia óptica de células hospedeiras infectadas.....	72
<b>Figura 20:</b> Análises dos efeitos ultraestruturais da fração FCrF5-20 nas formas intracelulares do <i>T. cruzi</i> .....	73
<b>Figura 21:</b> Efeitos citotóxicos da albumina 2S após purificação sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i> durante 24 e 48 h.....	74
<b>Figura 22:</b> Efeito sobre o crescimento das leveduras na presença das frações de albuminas 2S (P1 e P2).....	75
<b>Figura 23:</b> Efeito das albuminas 2S (F1') sobre o desenvolvimento das leveduras.....	76
<b>Figura 24:</b> Microscopia confocal das células ( <i>C. albicans</i> e <i>K. marxianus</i> ) .....	77
<b>Figura 25:</b> Microscopia confocal das células ( <i>C. tropicalis</i> e <i>S. cerevisiae</i> ) .....	78
<b>Figura 26:</b> Microscopia confocal das células tratadas com Sytox Green após 24 h de incubação com as albuminas 2S, fração (F1').....	79
<b>Figura 27:</b> Estresse oxidativo por microscopia das células de leveduras.....	81
<b>Figura 28:</b> Desenvolvimento de larvas alimentadas com sementes artificiais contendo albuminas 2S de sementes de crambe .....	82
<b>Figura 29:</b> Efeito das frações de albuminas 2S (P1 e P2) sobre a atividade da enzima $\alpha$ -amilase .....	83
<b>Figura 30:</b> Dosagem da atividade inibitória da albumina 2S sobre a atividade da papaína .....	84
<b>Figura 31:</b> Dosagem da atividade inibitória da albumina 2S sobre a atividade da tripsina .....	85
<b>Figura 32:</b> Perfil de anticorpos produzidos em resposta à imunização.....	86
<b>Figura 33:</b> Ensaio de ELISA e reação de PCA (anafilaxia cutânea passiva).....	87

<b>Figura 34:</b> Ensaio de desgranulação de mastócitos.....	88
<b>Figura 35:</b> Avaliação da resposta cruzada por ensaio de ELISA.....	89
<b>Figura 36:</b> <i>Score</i> de probabilidade de ser uma região epitópica.....	90

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
Al <sub>2</sub> OH <sub>3</sub>	Hidróxido de alumínio
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AZT	Tiazolinona
BAPNA	N-benzoil- DL-arginil-p-nitroanilida
BSA	<i>Albumina</i> sérica bovina
CB-1A	Fração alergênica <i>Castor-bean</i>
CD	Dicroísmo circular
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DIA	Aquisição independente de dados
DIC	Diclorofluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	3,5 ácido dinitrossalicílico
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima)
ESI	Ionização por electrospray
FCS	Soro fetal bovino
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
H2DCFDA	2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IL-4	Interleucina-4
IPs	Inibidores de proteases
Jat c1	Alérgeno 1 de <i>Jatropha curcas</i>
LC	Cromatografia líquida
LIT	Hepática de triptose
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal de classe II

MS	Espectrometria de massas
nsLTP	Proteínas transportadoras de lipídeos não específica
OPD	o-Fenilenodiamina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	PBS contendo Tween
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
PITC	Fenilisotiocianato
PR	Proteínas relacionadas à patogênese
PTH	Fenil-tioidantoína
PTH-AA	Aminoácido-fenilhidantoína
Ric c 1, Ric c 3	Alérgeno 1 e 3 de <i>Ricinus communis</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloro acético
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TFA	Ácido trifluoroacético
Th1	Linfócitos T auxiliares 1
Th2	Linfócitos T auxiliares 2
TOF	Time of flight
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tween 20	Polioxietileno sorbitano monolaurato
UPLC	Cromatógrafo líquido de ultra performance acquity
WRK	<i>Woodward's reagent K</i>

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	22
2.1	Crambe, origem e característica .....	22
2.2	Proteínas de sementes.....	23
2.3	Albuminas 2S.....	24
2.3.1	A função protetora das albuminas 2S em plantas.....	27
2.3.1.1	Atividade antimicrobiana das albuminas 2S.....	28
2.3.1.2	Ação das albuminas 2S sobre atividades enzimáticas.....	29
2.3.2	Alergia e o potencial alergênico das albuminas 2S.....	31
2.3.2.1	O processo alergênico.....	33
2.3.2.2	Alergenicidade das albuminas 2S.....	36
2.3.2.3	Alergenicidade das albuminas 2S de mamona ( <i>Ricinus communis</i> ).....	36
2.3.2.4	Alergenicidade das albuminas 2S de pinhão-manso ( <i>Jatropha curcas</i> L).....	37
3.	OBJETIVO.....	39
4.	ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	40
5.	MATERIAL E MÉTODOS .....	43
5.1	Isolamento e caracterização das proteínas do grupo das albuminas 2S .....	43
5.1.1	Obtenção das sementes.....	43
5.1.2	Extração das proteínas da semente de crambe.....	43
5.1.3	Cromatografia de exclusão molecular.....	43
5.1.4	Cromatografia de fase reversa em sistema de alta eficiência (HPLC).....	43
5.1.5	Dosagem de proteínas .....	44
5.1.6	Eletroforese em gel Laemmli SDS-PAGE e Tricina-SDS-PAGE.....	44
5.1.7	Determinação da sequência N terminal de aminoácidos (Método de Edman).....	44
5.1.8	Identificação de proteínas por espectrometria de massa método Shotgun.....	45
5.1.8.1	Preparação de amostra e digestão.....	45
5.1.8.2	Análise por espectrometria de massas.....	46
5.1.8.3	Análise de dados.....	46
5.1.9	Identificação por espectrometria de massas das proteínas separadas por eletroforese.....	47
5.1.9.1	Preparação de amostra e digestão em gel.....	47
5.1.9.2	Análise por espectrometria de massas.....	47



5.1.9.3	Análise dos dados.....	48
5.1.10	Caracterização da estrutura secundária por difracção circular (CD).....	48
5.2	Atividade sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	49
5.2.1	Manutenção da célula hospedeira.....	49
5.2.2	Manutenção dos parasitas.....	49
5.2.3	Determinação da atividade citotóxica (albumina 2S) em células LLC-MK2	49
5.2.4	Atividade das frações sobre amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	50
5.2.5	Análise morfológica de epimastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> por microscopia óptica.....	50
5.2.6	Microscopia eletrónica de transmissão.....	51
5.3	Propriedade antifúngica.....	51
5.3.1	Ação das albuminas 2S de sementes de crame sobre o crescimento de leveduras.....	52
5.3.2	Ensaio de permeabilização da membrana plasmática.....	52
5.3.3	Estresse oxidativo.....	53
5.4	Ensaio de inibição da atividade enzimática e crescimento de larvas de insetos	53
5.4.1	Material biológico.....	53
5.4.2	Ensaio biológico com sementes artificiais.....	54
5.4.3	Ensaio de inibição da atividade da $\alpha$ -amilase <i>in vitro</i> .....	54
5.4.4	Ensaio de inibição da atividade da protease cisteínica papaína <i>in vitro</i> .....	55
5.4.5	Ensaio de inibição da atividade da protease serínica tripsina <i>in vitro</i> .....	55
5.5	Caracterização imunológica .....	56
5.5.1	Obtenção do soro antialbumina 2S.....	56
5.5.2	Detecção de subclasses imunoglobulinas por ensaio de ELISA.....	57
5.5.3	Teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	57
5.5.4	Ensaio de desgranulação de mastócito.....	58
5.5.4.1	Obtenção de mastócitos por lavagem peritoneal.....	58
5.5.4.2	Ensaio de desgranulação de mastócitos e reatividade cruzada.....	58
5.5.5	Predição de epitopos lineares e conformacionais de célula B.....	59
6.	RESULTADOS .....	60
6.1	Extração, purificação e identificação das albuminas 2S de sementes de crame	60
6.1.1	Perfil cromatográfico do fracionamento em Sephadex G-50, Fase reversa C18 e Eletroforese.....	60

6.1.2	Identificação das frações proteicas por espectrometria de massas (MS) e sequenciamento N-terminal.....	61
6.1.3	Perfil cromatográfico do fracionamento em Sephadex G25 e eletroforese em gel de tricina-SDS-PAGE.....	62
6.1.4	Caracterização estrutural por dicroísmo circular.....	64
6.2	Atividade sobre <i>T. cruzi</i> .....	66
6.2.1	A atividade citotóxica da fração FCrF5-20 sobre as células hospedeiras LLC-MK2.....	66
6.2.2	Atividade citotóxica da fração FCrF5-20 sobre epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	68
6.2.3	Atividade citotóxica da fração FCrF5-20 sobre amastigota de <i>T. cruzi</i> .....	70
6.2.4	Atividade citotóxica da fração (FCr5-20) sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , após separação das bandas proteicas.....	73
6.3	Caracterização da atividade antifúngica de albuminas 2S .....	74
6.3.1	Atividade antimicrobiana das albuminas 2S de sementes de crambe sobre o crescimento de leveduras.....	74
6.3.2	Efeito das albuminas 2S de sementes de crambe sobre a permeabilização de membranas das leveduras.....	76
6.3.3	Efeito das albuminas 2S de sementes de crambe sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de leveduras.....	80
6.4	Caracterização da atividade inibitória de albuminas 2S sobre atividade enzimática e crescimento de larvas de insetos .....	81
6.4.1	Ensaio <i>in vivo</i> com sementes artificiais.....	81
6.4.2	Ensaio de inibição da atividade da $\alpha$ -amilase salivar e da $\alpha$ -amilase dos insetos <i>C. maculatus</i> .....	83
6.4.3	Ensaio de inibição da atividade da protease cisteínica papaína <i>in vitro</i> .....	84
6.4.4	Ensaio de inibição da atividade da protease serínica tripsina <i>in vitro</i> .....	84
6.5	Caracterização imunológica .....	85
6.5.1	Avaliação da imunorreatividade por ensaio de ELISA e PCA. Monitoramento da produção de anticorpos (IgG, IgG1, IgE).....	86
6.5.2	Reatividade cruzada avaliada por ensaio de desgranulação de mastócitos e imunorreatividade de IgE por ELISA.....	87
6.5.3	Predição de epitopos lineares e conformacionais de célula B.....	89
7.	DISCUSSÃO .....	92
8.	CONCLUSÃO .....	102

9.	REFERÊNCIAS.....	103
----	------------------	-----

## 1. INTRODUÇÃO

Vivemos em um mundo moderno em constante crescimento tecnológico, industrial e populacional; a demanda por energia é progressiva, já que a energia está em toda parte e transforma tudo. No entanto, as fontes de energia mais utilizadas são escassas, não-renováveis e prejudiciais ao meio ambiente, como é o caso dos combustíveis fósseis. Em todo o mundo existem esforços para diminuir a dependência desse elemento e o desafio é buscar fontes de energia que sejam renováveis e que causem o mínimo impacto ambiental. Diante disso, muitos cientistas têm direcionado suas pesquisas a diferentes espécies de plantas que possuam capacidade para serem utilizadas como combustível alternativo (biodiesel), principalmente devido a sua importância no desenvolvimento sustentável. O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais através de uma reação conhecida como transesterificação, resultado da reação de um mol de triglicerídeo com três moles de álcool na presença de um álcali (Dmytryshyn *et al.*, 2004). Como resultado da sua origem, o biodiesel quando comparado com o combustível fóssil apresenta uma degradabilidade muito superior no meio ambiente, e conseqüentemente é susceptível à degradação oxidativa e microbiana (Monyem, & Gerpen, 2001).

Sabe-se que a produção de biomassa para fins energéticos a partir de óleos vegetais é uma realidade global. No entanto, a produção de energia a partir de culturas vegetais deve ocorrer sem afetar a produção de alimentos, já que a demanda mundial por alimentos é muito grande e também está em crescimento. Por conseguinte, muitos esforços têm sido feitos para encontrar oleaginosas não alimentares com o objetivo de produzir energia. Segundo Silva e colaboradores (2012), os principais materiais utilizados para a produção de biodiesel são os óleos vegetais (soja, girassol, canola, entre outros).

O Brasil devido à sua diversidade climática e edáfica, apresenta grande capacidade para produzir diferentes tipos de vegetais entre elas as oleaginosas. Isto significa que a tendência a um aumento nos parâmetros de produção de biodiesel é uma realidade no país podendo o Brasil chegar ao topo em relação a outros países produtores (Nietiedt *et al.*, 2011). Com a implantação em 2004 do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel que determinou a adição de biodiesel ao diesel, a agroenergia no Brasil vem assumindo um papel de destaque e o cultivo de oleaginosas para a produção de biodiesel constitui uma alternativa econômica

bastante importante, principalmente incluindo regiões que estão à margem do processo de desenvolvimento econômico.

Entre as espécies de culturas com potencial para produção de biodiesel, não voltadas para produção de alimentos, o crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) aparece como uma alternativa promissora (Bassegio *et al.*, 2016). O crambe, como é popularmente conhecido, pertence à família Brassicacea, é originário da região do Mediterrâneo e foi introduzida no Brasil nos anos 90 pela Fundação MS em Maracaju, estado do Mato Grosso do Sul. Esta cultura tem despertado o interesse maior de produtores brasileiros como uma alternativa para cultura de rotação, devido a algumas características tais como: ter baixo custo e facilidade de produção, caracterizar-se por produção no inverno, cultivo mecanizado e de ciclo rápido de produção (Panno & Prior, 2009). Além disso, as plantas apresentam boa adaptação a solos quentes e frios, são resistentes a pragas, doenças e seca e suas sementes contêm cerca de 40% de óleo (Falasca *et al.*, 2010; Atabani *et al.*, 2013).

As sementes apresentam em sua composição proteínas que são armazenadas e mobilizadas durante a germinação para fornecer aminoácidos para o crescimento das plântulas. Estas proteínas foram classificadas por sua solubilidade de acordo com Osborne (1924), como globulinas, albuminas, glutelinas e prolaminas. Entre as albuminas, encontra-se uma família de proteínas denominadas albuminas 2S, que constituem uma importante classe multifuncional pertencente à família das prolaminas. Elas apresentam baixo peso molecular, são proteínas de reserva presentes em sementes de várias plantas tais como mamona, pinhão-manso, girassol, gergelim, rabanete, e apresentam, além desta função, outros papéis, como proteção da planta (Youle & Huang, 1981; Terras *et al.*, 1992; Shewry, & Napier, 1995; Genov *et al.*, 1997; Nascimento *et al.*, 2011). A função de proteção da planta pelas albuminas 2S tem sido descrita nas últimas décadas. Este papel a inclui na grande família de proteínas de defesa como uma molécula com potencial para o controle de patógenos e pestes, desempenhando atividades antifúngicas, inibição de proteinases serínicas e  $\alpha$ -amilase (Genov *et al.*, 1997; Regente *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2013).

Prévios estudos descrevem as albuminas 2S como principais alérgenos em muitas espécies de plantas oleaginosas, sendo suas sementes associadas a problemas médicos resultantes de respostas alérgicas desencadeadas por estas proteínas. Algumas espécies como a mamona (*Ricinus comunnis*) (Machado & Silva,

1991; Machado *et al.*, 2003), pinhão-manso (*Jatropha curcas*) (Maciel, *et al.*, 2009), gergelim (*Sesamum indicum*), (Pastorello, *et al.*, 2001), mostarda branca (*Sinapis alba*) e mostarda-da-Índia (*Brassica juncea*) (Monsalve, *et al.*, 2001) já tiveram estes alérgenos caracterizados. Sabe-se que eles têm uma ampla distribuição em frutos, nozes, sementes, bem como no pólen (Breiteneder & Mills, 2005). Estas proteínas podem provocar crises alérgicas, que podem ser fatais aos que cultivam a planta ou residem próximo às plantações, ou mesmo às pessoas que manipulam os resíduos resultantes da extração do óleo. É de extrema importância se obter o conhecimento não só da presença destas proteínas, mas também da sua natureza química e estrutural, e sobre o processo pelo qual a alergia é desencadeada, pois assim medidas de prevenção poderão ser desenvolvidas.

Diante das características citadas acima o crambe é uma cultura em expansão no Brasil e, muitas pesquisas têm sido realizadas em torno da qualidade do óleo de suas sementes (Lazzeri, *et al.*, 1994; Bassegio *et al.*, 2016). Porém poucas informações se têm a respeito do seu qualitativo proteico. As proteínas representam 25–35% do conteúdo das sementes de crambe e conseqüentemente estão presentes no subproduto resultante da extração do óleo. Estes subprodutos não passam por processos que agregam valor, já que ainda não há conhecimento sobre suas potencialidades nutricionais e econômicas como ocorre em culturas já estabelecidas tais como soja e algodão.

Caracterizar as albuminas 2S amplamente presentes nas sementes de crambe mostra-se ser de grande relevância, uma vez que esta espécie está sendo introduzida em nosso país, tendo em vista a sua aplicabilidade na produção de combustível alternativo, além de outros setores industriais e potencial de geração de renda populacional. Neste trabalho de caracterização de albuminas 2S em sementes de crambe, além de avaliar a presença dessas proteínas e sua característica estrutural, objetivam-se duas metas distintas: determinar o potencial alergênico e suas propriedades no processo que resulta na resposta alérgica; e verificar o potencial biotecnológico das albuminas 2S no controle de pragas e patógenos, com aplicabilidades tanto na medicina como na agricultura.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Crambe, origem e característica

Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é uma oleaginosa evolutivamente relacionada à canola e à mostarda, pertencente à família Brassicacea. Ela é nativa do mediterrâneo, da região entre a Etiópia e Tanzânia, porém se adapta bem a climas frios e secos (Leppik & White, 1975; Lazzeri *et al.*, 1994). Seu cultivo provavelmente se iniciou na Rússia; evidência disso aparece é achada em trabalhos de investigação experimental tanto na Rússia, Suécia e Polônia, após a 2ª Guerra Mundial (Mastebroek, 1994; Falasca *et al.* 2010). Suas sementes são esféricas com diâmetro que varia entre 0,8 a 2,6 mm e possuem um teor de óleo em torno de 38% (Carlsson, 2009). Crambe é uma leguminosa que, embora não seja uma cultura alimentar, agrega grande valor industrial devido à qualidade do óleo contido em suas sementes.

O óleo extraído das sementes de crambe possui um potencial industrial adicional devido ao alto teor de ácido erúico (50-60%), um ácido graxo monoinsaturado com muitas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, de lubrificantes, borracha sintética e plásticos, entre outras (Lara-Fiozeze *et al.*, 2013). Por isso, também tem sido considerado um substituto potencial ao óleo de colza (*Brassica napus*), até então a principal fonte para obtenção de ácido erúico. Alguns países como os Estados Unidos, têm cultivado crambe para substituir a importação de colza. Outros derivados do óleo podem ser usados na produção de novos tipos de nylon, base para pinturas e revestimentos, líquidos hidráulicos de alta temperatura, adesivos e isolantes elétricos. O óleo de semente de crambe apresenta características físico-químicas importantes que se enquadram nos padrões nacionais de produção e comercialização de biodiesel. A sua conversão em biodiesel é uma transformação que se mostra viável devido a boa porcentagem de ácido graxo que se converte em éster metílico, sendo esta reação (transesterificação) o principal processo na conversão do óleo a biodiesel; além disso, seu já mencionado alto teor de ácido erúico contribui para uma maior estabilidade do biodiesel a altas temperaturas (Wazilewski *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2014).

O crambe é uma planta de ciclo anual e apresenta como principal característica além da elevada concentração de óleo, alta concentração de proteína. A partir da extração do óleo das sementes são gerados coprodutos. As tortas são obtidas após a extração mecânica do óleo e os farelos, após a extração por solventes. Estes coprodutos não passam por processos que agregam valor, já que ainda há carência de conhecimento sobre suas propriedades nutricionais e econômicas. Apesar de poucos conhecimentos, esse coproduto tem sido utilizado como complemento na alimentação de ruminantes, ou como fonte alternativa de adubação orgânica (Abdalla *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2014).

## 2.2 Proteínas de sementes

As sementes, além de serem órgãos de propagação e dispersão das plantas, são um dos principais órgãos vegetais alvo dos processos de colheita, em práticas agrícolas. Elas representam a principal fonte de proteínas da dieta para seres humanos e animais. Além da sua importância nutritiva, as proteínas da semente devem também influenciar na qualidade funcional e nas propriedades de uso final do grão em alimentos processados. A análise das proteínas vegetais tem uma longa e distinta história, trabalho que remonta quase três séculos; grande parte deste trabalho se concentra nas proteínas de sementes, que são importantes na alimentação dos animais e processamento de alimentos (Bojórquez-Velázquez *et al.*, 2016).

Uma variedade de critérios tem sido utilizada para classificar proteínas vegetais. Osborne (1924), Shewry *et al.* (1995) e outros pioneiros basearam suas classificações de acordo com a extração e solubilidade em uma série de solventes, como água (albuminas), solução salina (globulinas), soluções de água/álcool (prolaminas) e ácidos ou álcalis diluídos (glutelinas). No entanto, os avanços em técnicas laboratoriais como sequenciamento de aminoácidos, espectrometria de massa, entre outras, têm promovido um aumento na produção de informações sobre estas biomoléculas, levando assim a dados mais precisos de classificação, caracterização e função biológica destas sequências identificadas. Pode-se citar o uso de aplicação de algoritmos de máquina usando sequências específicas disponíveis em bases de dados públicas como um método atual de classificação (Radhika & Rao, 2015).



Aproximadamente entre 80-90% de proteínas presentes nas sementes maduras são proteínas de armazenamento, acumuladas em vesículas específicas e que servem como fonte de aminoácidos para a germinação e o crescimento inicial das plântulas (Chua *et al.*, 2008). Entre as proteínas de reserva encontradas nas sementes estão albuminas, globulinas e prolaminas (Shewry *et al.*, 1995; Ibl & Stoger, 2012). As proteínas de armazenamento de sementes compreendem uma parte importante do teor proteico da semente e têm um papel importante na qualidade das sementes. Devido à sua abundância e valor econômico, estas proteínas têm sido extensivamente estudadas ao nível molecular; em aspectos concernentes à sua estrutura, à regulação da sua síntese, mecanismos de segmentação e deposição e, principalmente, propriedades funcionais e potenciais aplicações na área da engenharia genética (Shewry *et al.*; 1995, Chua *et al.*; 2008; Bojórquez-Velázquez *et al.*, 2016). As proteínas de reserva podem apresentar atividades relacionadas à defesa das sementes, antes e durante o processo de germinação de sementes. Esta proteção está relacionada contra os ataques de espécies de pragas e pragas que podem acarretar cerca de 40% de perda da produção agrícola mundial. Estes compostos, uma vez isolados, podem ser dirigidos para aplicações biotecnológicas para atuarem, por exemplo, como agentes de defesa natural no manejo integrado de pragas, ou mesmo como fitoterápicos (Haq *et al.*, 2004; Sabotič & Kos, 2012, Tomar *et al.*, 2014). Neste estudo damos destaque as proteínas pertencentes à super-família da prolaminas que são as albuminas 2S.

### **2.3 Albuminas 2S**

As albuminas 2S de reserva de sementes constituem uma importante classe de proteínas multifuncionais de baixa massa molecular, que geralmente constituem 20-50% do conteúdo total de proteínas das sementes (Guéguen *et al.*, 1996). O termo albumina foi inicialmente aplicado a proteínas vegetais que se assemelharam a albumina de ovo de galinha ao ser coagulável, mas foi subsequentemente restrito a proteínas que eram solúveis em água e coaguláveis a altas temperaturas (Osborne, 1924). Posteriormente, Youle e Huang (1978 e 1981) adicionaram o componente 2S para definir albuminas que possuem solubilidade em água e valores de coeficiente de ultracentrifugação entre 1,7 a 2,2S; assim concluíram que as albuminas 2S formavam um grande grupo de proteínas de reserva presente em

muitas espécies de plantas. A composição em aminoácidos das albuminas 2S de muitas espécies de plantas revela um teor de cisteína constante, que contribuem para um padrão de enovelamento característico destas proteínas. Caracteristicamente, albuminas 2S mostram 8 resíduos de cisteína. Em alguns casos, o conteúdo de enxofre é aumentado, devido ao alto teor de metionina, como ocorre com as proteínas albuminas 2S de castanha-do-pará (Youle & Huang, 1981; Moreno & Clemente, 2008).

Como ocorrem com outros grupos de proteínas de reserva, as albuminas 2S mostram um elevado grau de variação polimórfica. Elas são codificadas por uma família de multigenes que conduz a numerosas isoformas sujeitas a modificações pós-traducionais derivadas principalmente do processamento proteolítico. As isoformas podem mostrar diferenças consideráveis em suas estruturas e propriedades biológicas; contudo, é possível definir uma estrutura típica para albumina 2S (Krebbes *et al.*, 1988; Moreno & Clemente, 2008). Essas proteínas são sintetizadas como um único grande polipeptídeo precursor de 18 a 30 kDa que é co-traducionalmente transportado para o lúmen do retículo endoplasmático. Estes peptídeos são submetidos a um extenso processamento proteolítico pós traducional, incluindo: a clivagem do peptídeo sinal, a remoção de um fragmento amino terminal adicional, bem como um segmento interno e eliminação de alguns resíduos carboxi terminal (Youle & Huang, 1981; De Clercq *et al.*, 1990; Shewry & Pandya, 1999; Moreno & Clemente, 2008; Hummel *et al.*, 2015).

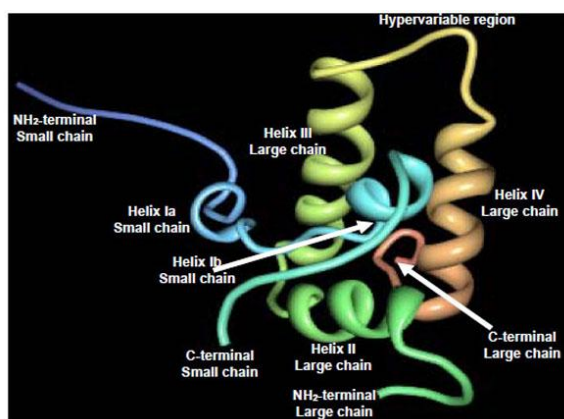
Estruturalmente as albuminas 2S são consideradas homólogas entre si, são globulares, tipicamente heterodiméricas e possuem um esqueleto conservado de 8 cisteínas (CX<sub>n</sub>CX<sub>n</sub>-CCX<sub>n</sub>CXCX<sub>n</sub>CX<sub>n</sub>C). Após um rearranjo tridimensional formado por quatro ligações dissulfeto intracadeia, envolvendo oito resíduos de cisteínas conservadas a proteína enovelada é transportada para o vacúolo, onde é subsequentemente processada a um polipeptídeo de 12 a 14 kDa e, novamente clivada gerando duas subunidades, uma pesada e uma leve de 8 a 10 e de 3 a 4 kDa, respectivamente (Shewry & Pandya, 1999; Pantoja-Uceda *et al.*, 2004; Moreno & Clemente, 2008).

Algumas proteínas, em contraste com a maioria das albuminas 2S, são constituídas de uma única cadeia polipeptídica. São sintetizadas como uma cadeia polipeptídica única e o processamento pós-translacional parece limitar-se à remoção do peptídeo sinal, sem mais clivagem proteolítica da cadeia polipeptídica em

subunidades (Kortt & Caldwell, 1990; Lehmann *et al.*, 2006). São exemplos a proteína alergênica Ara h 2, que ocorre em sementes de amendoim, e a albumina 2S de girassol.

Após o processamento final do precursor das albuminas 2S, as subunidades leve e pesada permanecem associadas por duas ligações de enxofre intermoleculares devido ao esqueleto conservado de cisteínas, sendo que outras duas ligações dissulfeto intra-cadeia estão presentes dentro da subunidade pesada. As ligações dissulfeto inter-cadeias são aquelas formadas entre os resíduos de cisteína 1-5 e 2-3 enquanto que as pontes intra-cadeia são formadas pelos resíduos de cisteína 4-7 e 6-8. (Shewry *et al.*, 2002; Moreno & Clemente, 2008).

Experimentos utilizando técnicas como espectroscopia de infravermelho, dicroísmo circular e outras, têm demonstrado que albuminas 2S de várias espécies de plantas, como mostarda amarela, colza, rabanete, girassol e castanha-do-Pará, são ricas em  $\alpha$ -hélices, conteúdo esse que varia entre 20 a 50% (Moreno & Clemente, 2008; Nascimento *et al.*, 2011). O esqueleto tridimensional das albuminas 2S adota uma estrutura comum e compacta que compreende um feixe de cinco hélices exibidas em diferentes regiões (hélices Ia, Ib, II, III e IV) e um *loop* de C terminal rearranjado em uma super-hélice estabilizada por quatro ligações dissulfeto conservadas (figura 1). Conectado às  $\alpha$ -hélices III e IV existe um segmento relativamente curto, exposto, conhecido como região antigênica mais importante das albuminas 2S. No entanto, a sua variabilidade no comprimento e composição de aminoácidos, observada em albuminas 2S de diferentes espécies de plantas, sugere que ele não desempenha qualquer papel na determinação do enovelamento da estrutura (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003; Pantoja-Uceda *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Representação da estrutura da albumina 2S mamona, alérgeno Ric c 3 (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003)

O rearranjo estrutural global das albuminas 2S, associado ao esqueleto conservado de resíduos de cisteína, demonstra semelhança ao de outras proteínas ricas em enxofre, pertencentes à superfamília das prolaminas. À esta família pertencem membros como proteínas transportadoras de lipídeos não específicas (nsLTP) e os inibidores bifuncionais de  $\alpha$ -amilase/tripsina (Gincel *et al.*, 1994; Strobl *et al.*, 1995; Radauer & Breiteneder, 2007). O padrão de oito cisteínas na ordem específica demonstra ser um esqueleto estrutural das regiões helicoidais conservadas, que formam uma rede de pontes dissulfeto necessária para a manutenção da estrutura terciária. Esta estrutura rígida e compacta provavelmente deve ser responsável pela refratariedade das albuminas 2S aos ataques proteolíticos e por sua estabilidade térmica (Moreno & Clemente, 2008; Sirvent *et al.*, 2012).

As albuminas 2S apresentam algumas funções de defesa que estão relacionadas com a proteção da semente antes e durante o processo de germinação (Shewry & Pandya, 1999; Regente & de La Canal, 2001; Agizzio *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2013). Adicionalmente, albuminas 2S foram descritas como principais alérgenos de várias espécies de oleaginosas, tal como mostarda, gergelim, castanha de caju, castanha-do-Pará, mamona, pinhão-manso, colza (Menéndez-Arias *et al.*, 1988; Monsalve *et al.*, 1993; Nordlee *et al.*, 1996, Bashir *et al.*, 1997; Pastorello *et al.*, 2001; Puumalainen *et al.*, 2006, Maciel *et al.*, 2009).

### **2.3.1 A função protetora das albuminas 2S em plantas**

Ao longo de todo o seu ciclo de vida, as plantas são desafiadas por muitos tipos de estresses, estes podem ser bióticos e abióticos (Mithöfer & Boland, 2012). Estresse biótico é representado, em particular, pelos organismos heterotróficos, incluindo herbívoros e patógenos, que usam as plantas como fonte de alimentos e são responsáveis por consideráveis perdas econômicas na agricultura. Como organismos sésseis, as plantas não têm nenhuma chance de escapar aos ataques de organismos, assim elas devem empregar outras estratégias para se defender. Numerosas estratégias são baseadas na enorme diversidade química da planta, por exemplo, a capacidade de sintetizar muitos compostos, estimados em mais de

200.000, referidos como metabólitos especializados que evoluíram em resposta a desafios ecológicos particulares (Mithöfer & Boland, 2012; Ballaré, 2014).

As defesas químicas de plantas podem ser constitutivas ou induzidas, as induzidas são desenvolvidas apenas quando são submetidas a algum fator de estresse, promovido por agentes bióticos ou abióticos. As constitutivas são mecanismos de defesa intrínsecos, que fazem parte do programa de desenvolvimento normal da planta e são característicos de cada genótipo (Chen, 2008; Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013). Muitas dessas defesas são de natureza proteica. Estas proteínas atuam diretamente no metabolismo do agente agressor impedindo seu desenvolvimento. Dentre estas, podem-se citar as albuminas 2S que já foram relatadas em virtude de suas propriedades inseticidas e antimicrobianas (Agizzio *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2011; Rocha, *et al.*, 2015).

### **2.3.1.1 Atividade antimicrobiana das albuminas 2S**

A função na defesa de plantas das albuminas 2S vem sendo atribuída devido a sua habilidade de inibir o crescimento de fungos e bactérias. Tal é o caso das albuminas 2S de sementes de rabanete que apresentam alta atividade inibitória sobre fungos e bactérias e mostram sinergia de ação com defensinas de origem de outras sementes (Terras *et al.*, 1993; de Souza Cândido *et al.*, 2011).

Albuminas 2S de sementes de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) inibem crescimento de fungos *Fusarium oxysporum*, promovendo permeabilização da membrana plasmática (Agizzio *et al.*, 2003). Uma albumina de *Brassica chinensis*, semelhante à napina, mostrou atividade contra bactérias gram-positivas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por casos de infecções respiratórias; *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*, responsáveis por casos de intoxicação alimentar; e *Bacillus megaterium*. Existe sugestão da utilização deste polipeptídeo como ingrediente ativo na produção biotecnológica de antibiótico. Uma proteína com atividade antimicrobiana, pertencente à família albumina 2S, foi isolada a partir de sementes de gergelim (Maria-Neto *et al.*, 2011) e outra isoforma desta proteína apresentou atividade contra bactérias patogênicas humanas *Klebsiella pneumoniae*, (Costa *et al.*, 2007).

Algumas proteínas extraídas a partir de extratos de sementes de pimenta, com uma sequência semelhante aos membros da família da albumina 2S, foram identificados. Estas proteínas apresentaram atividade inibitória contra uma leveduras do gênero *Candida*, incluindo *Candida albicans*, que é responsável por infecção oral e vaginal, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*. A partir deste conhecimento se pode pesquisar a utilização destas proteínas para tratar ou ajudar a controlar as doenças infecciosas causadas pelos agentes patogênicos citados acima, bem como para a produção de fármacos mais eficazes, que não tenham efeitos tóxicos e que tenham efeitos colaterais mínimos (Ribeiro *et al.*, 2007).

Odintsova *et al.*, (2010) caracterizaram novas proteínas com atividade antifúngicas a partir de sementes de dente-de-leão (*Taraxacum officinale* Wigg). Essas proteínas apresentaram homologia de sequências com a albumina 2S de girassol e demonstraram atividade inibitória contra fungos fitopatogênicos e o oomiceto *Phytophthora infestans* em concentrações micromolares.

Através de processos cromatográficos, Fardin *et al.* (2016) isolaram uma fração proteica rica em albuminas 2S com atividade antiprotozoária. Essa fração obtida de *Bertholletia excelsa* em uma concentração de 150 µg/mL foi capaz de eliminar 100% dos parasitas *Leishmania amazonensis*, causando danos estruturais. Um novo inibidor de tripsina identificado em torta de mamona, com características semelhantes a albuminas 2S, apresentou atividade inibitória contra germinação de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Silva *et al.*, 2015). Tais dados são relevantes ao desenvolvimento de novas estratégias de proteção de plantas contra fungos fitopatogênicos.

Essa múltipla função das albuminas 2S tem sido reportada para muitas outras sementes: *Brassica napus* (napins), *Arachis hypogaea* L. (Duan *et al.*, 2013), *Cucurbita* sp. (Tomar *et al.*, 2014) e *Leonurus japonicus* (Yang *et al.*, 2007). Assim, devido ao seu papel fisiológico nas plantas, essas pequenas proteínas globulares têm despertado crescente interesse em campos de estudos clínicos e nutricionais.

### **2.3.1.2 Ação das albuminas 2S sobre atividades enzimáticas**

As plantas são atacadas por uma grande diversidade de insetos herbívoros, que consomem não só suas superfícies fotossintetizantes, mas também seus órgãos

de reservas e/ou suas estruturas reprodutivas, causando grandes prejuízos econômicos na produção de grãos em todo o mundo (Franco *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2006).

Algumas pequenas proteínas, geralmente presentes em alta concentração nos tecidos de reserva, possuem a função de inibir a ação de proteases e outras enzimas de eventuais predadores. Tais inibidores de proteases (IPs) formam um complexo com as enzimas proteolíticas reduzindo parcial ou totalmente sua atividade catalítica; alguns atuam diretamente no intestino do inseto, promovendo a redução da digestibilidade.

Proteases e amilases são, portanto, alvos potenciais para o controle de pragas na agricultura. Os inibidores de proteases e de alfa-amilases são considerados componentes significantes na defesa natural da planta contra insetos (Zhu-Salzman & Zeng, 2015). Os IPs são classificados de acordo com o mecanismo da classe proteolítica, com base no domínio inibitório do aminoácido localizado no sítio catalítico, são denominados inibidores, serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases ou metalo-proteases.

Nos últimos anos, um grande número de inibidores de proteases tem sido isolado de sementes, e mostrados como capazes de exercer atividade antimicrobiana. Ribeiro e colaboradores (2012) isolaram inibidor de proteínases serínicas de sementes de *Capsicum annuum* que mostrou atividade inibitória potente contra tripsina e quimotripsina e sobre o crescimento de células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Kluyveromyces marxianus*. Estudos relacionando papéis antimicrobianos dos inibidores de proteases também foram desenvolvidos por Yang *et al.* (2007), Lopes *et al.* (2009) e Macedo *et al.* (2016). Soares *et al.* (2015) reportaram a identificação de um inibidor de proteases cisteínicas obtido a partir de sementes de *J. curcas* com atividade tóxica sobre o parasita de grande importância tanto para a medicina humana quanto para a veterinária, o *Toxoplasma gondii*.

Genov *et al.* (1997) identificaram uma albumina 2S termoestável, isolada de sementes de *Brassica nigra* com potente atividade inibitória sobre proteases serínicas (tripsina e subtilisina). Uma albumina 2S purificada de torta de *Ricinus communis* apresentou atividade inibitória sobre tripsina pancreática bovina, mesmo após aquecimento a 100°C. Essa mesma proteína também foi capaz de inibir em

91% a atividade de uma das proteases do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* (Silva *et al.*, 2015).

Vários insetos se alimentam de amido de sementes durante a fase larval e/ou adulta, e, portanto, dependem das  $\alpha$ -amilases para sua sobrevivência. Assim, pesquisas sobre a digestão do amido como um alvo para o controle de insetos dependentes de amido têm sido estimuladas depois que relatos mostraram que os inibidores de alfa-amilase de sementes de *Phaseolus vulgaris* são prejudiciais para o desenvolvimento dos gorgulhos de feijão *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis* (Ishimoto, & Kitamura, 1989; Shade *et al.*, 1994; Franco *et al.*, 2002).

As albuminas 2S podem se comportar como inibidores de alfa-amilase. Nascimento e colaboradores (2011) demonstraram que as albuminas 2S de *R. communis* eram inibidores de enzimas digestivas de insetos. Estes autores observaram que as isoformas de albuminas 2S de *R. communis* inibiam a atividade  $\alpha$ -amilásica de larvas de *C. maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Tenebrio molitor*, bem como  $\alpha$ -amilase de mamífero. A toxicidade de albumina 2S foi determinada através da sua incorporação em dieta fornecida às larvas de *C. maculatus*, em sistema de sementes artificiais. Estes estudos serviram como base para investigar o potencial inibitório das albuminas 2S de crambe sobre a atividade enzimática.

### **2.3.2 Alergia e o potencial alergênico das albuminas 2S**

As plantas estão entre as principais fontes de alérgenos que induzem respostas alergênicas mediadas por imunoglobulina E (IgE), (Marsh *et al.*, 1972; Sinha *et al.*, 2014). Estes alérgenos podem se difundir para o corpo a partir do trato respiratório superior ou entrar através da ingestão de uma vasta gama de alimentos oriundos de planta ou podem ainda causar irritações externas na pele (Sinha *et al.*, 2014). Os alérgenos podem estar presentes predominantemente no pólen, esporos ou em outro produto associado à planta e podem causar sintomas como rinoconjuntivite, asma, edema, urticária e anafilaxia. Estes alérgenos quando ingeridos como alimentos podem causar sintomas que variam de prurido, inchaço dos lábios e, muitas vezes acompanhados de sintomas laríngeos leves como, coceira e tosse. Também pode-se observar sintomas gastrointestinais, rinite, asma,



reações cutâneas e anafilaxia sistêmica mais grave (Hoffmann-Sommergruber, 2000; Ciardiello *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2014).

Os grupos mais comuns de alérgenos de plantas já relatados pertencem à classe de proteínas de reserva de sementes, proteínas estruturais e proteínas relacionadas à patogênese (PR). Podem ser integrados em famílias e superfamílias, com base na homologia de sequência, propriedades estruturais tridimensionais e possível função (Breiteneder e Radauer, 2004; Hauser *et al.*, 2008). A maioria dos alérgenos alimentares de plantas podem ser agrupados em apenas quatro famílias de proteínas (Breiteneder & Radauer, 2004; Radauer & Breiteneder, 2007):

- **Superfamília das Cupinas:** A família cupina compreende um grupo de proteínas que possui em comum uma estrutura conservada em forma de barril (*cupa* em latim = barril). O núcleo cupina proporciona a essas proteínas alta estabilidade a variações extremas, alta temperatura, por exemplo (Radauer & Breiteneder, 2007). Este grupo abrange majoritariamente proteínas de reserva globulares, principalmente de leguminosas e nozes, as chamadas leguminas (globulinas 11S) e vicilinas (globulinas 7S). Estas proteínas apresentam grande diversidade funcional. As globulinas mostraram-se ser alérgenos altamente relevantes em várias espécies de sementes incluindo amendoim, soja, lentilha, entre outras (Breiteneder & Radauer, 2004; Breiteneder & Mills, 2005).

- **Superfamília Prolamina:** Dentre as características da superfamília prolamina, anteriormente mencionadas, esta superfamília compreende três principais grupos de alérgenos de plantas: proteínas transportadoras de lipídeos não específicas (nsLTP), os inibidores bifuncionais de  $\alpha$ -amilase/tripsina e as albuminas 2S. São proteínas de baixa massa molecular, ricas em glutamina e prolina, que possuem em comum um esqueleto conservado de cisteínas e uma estrutura tridimensional rica em  $\alpha$ -hélice (Breiteneder & Mills, 2005; Hummel *et al.*, 2015).

- **Superfamília Bet v 1:** As proteínas pertencentes a este grupo compartilham uma estrutura altamente conservada e mostram bastante homologia com proteínas da família PR 10. Em geral, Bet v 1, atua como o agente de sensibilização primária do indivíduo e são reconhecidas homologias entre alérgenos de bétula e da família *Rosaceae* (maçã, cereja, damasco, pêra), família *Apiaceae* (aipo, cenoura) e família *Fabacea* (soja, feijão e amendoim). Os níveis elevados de resíduos de superfície conservados entre os membros da família Bet v 1 desempenham um papel importante na conservação de epitopos de ligação à IgE. Alérgenos do tipo Bet v 1

são bastante instáveis ao aquecimento e digestão, conseqüentemente a reação a estes alérgenos são na sua maioria restritas à cavidade oral (Breiteneder & Mills, 2005; Radauer *et al.*, 2008).

- **Profilinas:** São pan-alérgenos encontrados principalmente em pólen e frutas, são proteínas citosólicas que se ligam à actina, com massa molecular que varia de 12 a 15 kDa. Proteínas pertencentes a este grupo são consideradas alergênicas devido à sua alta similaridade de sequência e por estarem presentes em diferentes fontes alergênicas. Estas proteínas sensibilizam os indivíduos por várias rotas diferentes, possuem uma estrutura tridimensional altamente conservada que favorece a ocorrência de fenômenos de reação cruzada com alérgenos de outras diversas fontes. Todas as profilinas têm uma estrutura globular compacta que consiste de um centro de folhas  $\beta$  de sete cadeias antiparalelas, delimitado por  $\alpha$ -hélices. Devido a esta estrutura, elas são quase sempre sensíveis à desnaturação pelo calor e digestão gástrica (Radauer & Breiteneder, 2007; Santos & Van Ree, 2011).

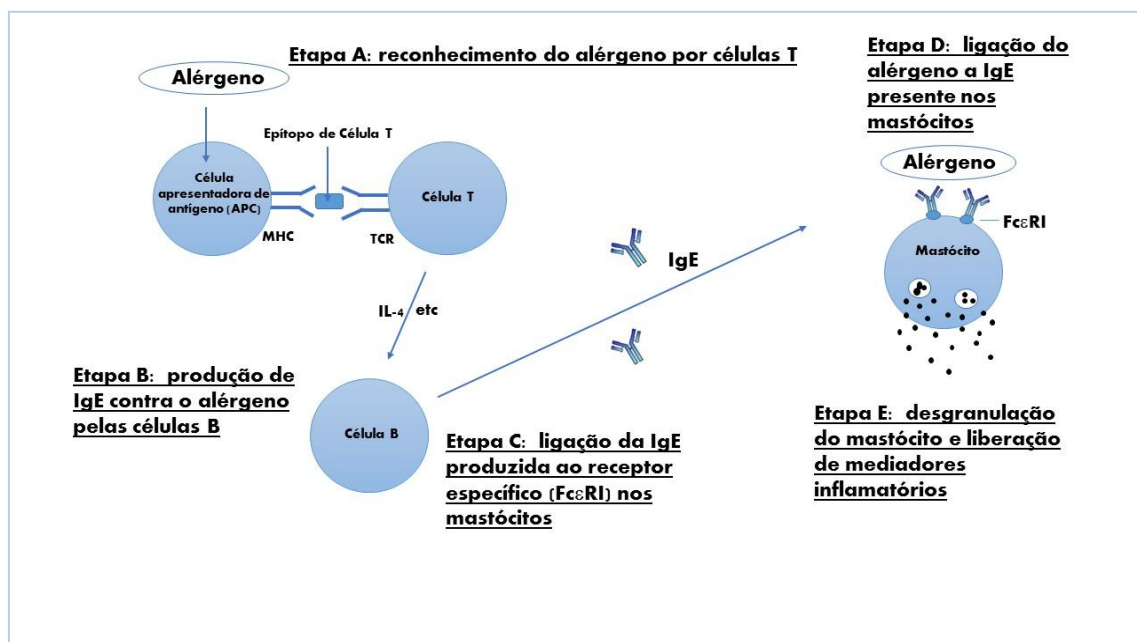
De acordo com as reações cruzadas, proteínas com estruturas semelhantes estão frequentemente presentes em espécies relacionadas estrutural e biologicamente. Os anticorpos IgE específicos para tais proteínas podem ligar-se a estruturas semelhantes oriundas de espécies diferentes, promovendo reação cruzada. Neste tipo de reação, a IgE específica contra uma proteína alérgênica é capaz de reconhecer uma outra proteína homóloga de outra espécie. Assim dependendo da família de proteínas, será possível distinguir alérgenos genuínos, espécie-específica ou marcadores de reação cruzada (Bublin & Breiteneder, 2014; Van Hoeyveld & De Swert, 2014).

### 2.3.2.1 O processo alergênico

As doenças alérgicas são consideradas um problema de saúde importante em nossa sociedade. A alergia é uma reação de hipersensibilidade assistida pelo sistema imunitário, classificada como imediata ou do tipo I, mediada por anticorpos conhecidos como imunoglobulina E (IgE) dirigidos contra os componentes alergênicos (antígeno) geralmente uma proteína (Hoffmann-Sommergruber, 2016).

A hipersensibilidade imediata inicia com o primeiro contato do organismo ao antígeno e envolve a cooperação entre as células apresentadoras de antígenos

(APCs), as populações de linfócitos T e linfócitos B. Na etapa de sensibilização o antígeno é inicialmente internalizado pelas APCs, como macrófagos, células dendríticas ou linfócitos B e então é fragmentado por proteases, gerando peptídeos contendo os chamados epítopos (figura 2A). Os epítopos são expostos na membrana externa das APCs pelo complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) e posteriormente podem ser reconhecidos pelos linfócitos T auxiliares (Th1 e/ou Th2) que, juntamente com os linfócitos B, iniciarão a resposta imunológica (Shakib *et al.*, 2008; Valenta *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Ilustração do mecanismo de reações alérgicas, traduzido de Tanabe (2007)

Os linfócitos T alérgeno-específicos que produzem citocinas características do perfil Th2 têm o papel principal no disparo e progressão da doença. A mais importante citocina produzida por essas células no padrão Th2 é a interleucina-4 (IL-4), que dirige a biossíntese e secreção de IgE por células B (figura 2B) estimuladas pelos alérgenos (Tanabe, 2007). As IgEs se ligam com elevada afinidade aos seus receptores (FcεRI) localizados na superfície dos mastócitos teciduais e basófilos sanguíneos (figura 2C). Os mastócitos desempenham um papel central nas reações alérgicas inflamatórias. Num segundo contato com o alérgeno, a ligação multivalente do antígeno às IgEs pré-fixadas ao receptor e, a subsequente agregação dos FcεRI, proporcionam o gatilho para a ativação do mastócito (figura 2D). Após agregação do FcεRI mediada pela IgE sucede a liberação de mediadores inflamatórios a partir de

grânulos de secreção, que contêm mediadores pré-formados como a histamina e prostaglandinas (figura 2E) (Tanabe, 2007; Valenta *et al.*, 2015). Quando o indivíduo sensibilizado é novamente exposto ao mesmo antígeno uma ligação cruzada ocorrerá entre os epítopos ligantes de IgE e duas moléculas de IgE pré-ligadas nos mastócitos e basófilos. Com essa interação entre o epítipo e duas IgEs, uma cascata envolvendo algumas enzimas induzirá a desgranulação dos mastócitos. Mudanças anatômicas e fisiológicas desencadearão o rompimento da membrana destas células, liberando mediadores inflamatórios que levarão aos sintomas da alergia (Tanabe, 2007; Ozdemir *et al.*, 2016).

A região de interação do antígeno com as IgEs é chamada epítipo, a qual consiste numa sequência de aminoácidos reconhecida pelo anticorpo e que é muito menor do que a macromolécula imunogênica. Estes epítopos podem ser classificados em conformacionais e contínuos. Para os epítopos conformacionais, os resíduos envolvidos estão distantemente separados na sequência, porém se aproximam devido ao rearranjo tridimensional da proteína, ficando justapostos. Para epítopos contínuos, a sequência primária é alergênica, ou seja, o trecho contínuo dentro da proteína é que reage com o anticorpo (Tanabe, 2007).

Os epítopos conformacionais são inativados após desnaturação e perdem sua atividade alergênica, assim exigem maiores esforços para sua elucidação. Os epítopos contínuos desempenham um papel importante para o diagnóstico de alergia, sendo o seu esclarecimento um passo importante para estudar as interações antígeno-anticorpo contribuindo para diagnóstico e terapia. Inúmeras técnicas podem ser utilizadas na identificação de epítopos de células B e T; entre elas, as ferramentas computacionais em particular, têm sido sugeridas para representar uma abordagem rápida e promissora. Nas últimas décadas potenciais sítios de reconhecimentos do anticorpo e epítopos têm sido previstos, com sucesso, utilizando ferramentas *in silico* (Chen *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2016).

Após a identificação da região de interação do antígeno com as IgEs, a alergenicidade de um alérgeno pode ser reduzida por modificação destes epítopos de células B. O conhecimento destes epítopos pode ser aplicado no diagnóstico, terapia ou desenvolvimento de vacinas eficazes para imunoterapia. As proteínas alergênicas variantes podem ser produzidas por alteração dos epítopos de ligação a IgE, quer por modificação química ou engenharia genética (Sharma *et al.*, 2013; Crespo *et al.*, 2016).

### 2.3.2.2 Alergenicidade das albuminas 2S

Nas últimas décadas, muitos membros da família de proteínas albuminas 2S têm sido descritas como principais alérgenos encontrados em sementes alimentares ou não, por demonstrar capacidade de se ligar a IgE de soros de pacientes alérgicos. Ao realizar pesquisas em uma fração proteica alergênica de mamona (*Ricinus communis*), as albuminas 2S foram isoladas pela primeira vez. Este grupo as denominou CB-1A (“Castor-bean allergen”) (Spies e Coulson, 1943). Em 1978, Youle e Huang concluíram que a fração CB 1A isolada por Spies e Coulson tratava-se de uma albumina de reserva 2S. A estrutura primária de um dos componentes no pool CB-1A, denominada Ric c 1, foi determinada por Sharief e Li em 1982. Desde a descoberta da sua natureza alergênica, as albuminas 2S têm despertado particular interesse, inúmeras pesquisas têm sido realizadas para caracterizá-las em uma grande variedade de sementes, sendo possível encontrar numerosas publicações relatando o caráter alergênico das albuminas 2S em muitas espécies de plantas (Moreno & Clemente, 2008; Verma *et al.*, 2013).

### 2.3.2.3 Alergenicidade das albuminas 2S de mamona (*Ricinus communis*)

Alérgenos de *R. communis* vêm sendo fonte de pesquisas visando uma total caracterização com base em sua estrutura e função biológica, com o propósito de desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas. Machado e Silva (1992) e da Silva Jr (1996) identificaram uma proteína de baixa massa molecular com caráter alergênico com alto teor de glutamina, que foi denominada inicialmente ASP-Ib, e é hoje conhecida como Ric c 3. Assim como Ric c 1 identificada anteriormente, Ric c 3 apresenta duas cadeias polipeptídicas, uma leve com 41 resíduos de aminoácidos e a pesada com 67 resíduos, ligadas por duas pontes dissulfeto.

Outras proteínas alergênicas caracterizadas como albuminas 2S de mamona foram identificadas por Machado *et al.* (2003). Estas frações apresentaram uma composição similar de aminoácidos, com alta quantidade de glutamina, além de similaridade na sequência N-terminal. Com informações sobre a estrutura primária desses alérgenos, deu-se início a estudos para identificação dos epitopos ligantes de IgE. Mayerhoffer, em 2004, caracterizou um epitopo, cuja sequência peptídica se mostrou homóloga a presente em outros alérgenos. Felix (2008), na busca de

melhor entendimento do processo alergênico e do papel funcional dos alérgenos de mamona, monitorou propriedades alergênicas através de ensaios de desgranulação dos mastócitos; como resultado, epitopos contínuos foram identificados, dois em Ric c 1 e quatro em Ric c 3.

Com a identificação de epitopos ligantes de IgE nas isoformas das albuminas 2S de mamona, observou-se que pelo menos dois resíduos de aminoácidos dicarboxílicos (ácido glutâmico e/ou aspártico) estavam presentes em cada epitopo. Diante desta informação, foi levantada a hipótese de que esses aminoácidos seriam importantes na interação epitopo/IgE. A comprovação desta participação foi obtida por modificações químicas nos epitopos utilizando, inicialmente, o reagente Woodward's Reagent K (WRK - N-etil-5-fenilsoxazolium-3`-sulfonato), específico para ácidos (Carriello-Gama, 2006; Deus-de-Oliveira, 2011). Outra proposta visando inativar epitopos alergênicos por tratamento químico foi realizada por Deus-de-Oliveira (2011), tratando as albuminas 2S com compostos de cálcio, e através de ensaios biológicos foi possível observar o êxito na modificação das proteínas e a desativação dos epitopos, resultando na redução da alergenicidade. A confirmação do envolvimento dos resíduos de ácido glutâmico foi também realizada por síntese de peptídeos, mimetizando os epitopos, substituindo os resíduos de ácido glutâmico por leucina (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011).

#### **2.3.2.4 Alergenicidade das albuminas 2S de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L)**

*Jatropha curcas* é uma oleaginosa que assim como a mamona tem o seu óleo considerado como um combustível substituto ao diesel derivado do petróleo. Com sua introdução em nosso país, questões sobre a presença de alérgenos em suas sementes foram levantadas. Maciel e colaboradores (2009), descreveram a presença de uma albumina 2S alergênica (12 kDa), chamada Jat c 1, isolada a partir de sementes de *J. curcas* L. cuja sequência parcial foi determinada. A sequência N-terminal parcial desta proteína mostrou homologia com albumina 2S de *R. communis*, e de outras sementes. Jat c 1 desenvolveu resposta alérgica cruzada com os principais alérgenos de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3 (Maciel *et al.*, 2009). Os epitopos de albuminas Jat c 1 foram identificados e, assim, como no caso dos epitopos alergênicos de mamona (Ric c 1 e Ric c 3) resíduos de ácido glutâmico estão também envolvidos na interação com as moléculas IgEs. A confirmação foi

feita por modificações químicas com o reagentge WRK e pela substituição dos aminoácidos ácidos por leucina (Crespo *et al.*, 2016).

Proteínas albuminas 2S de oleaginosas, de um modo geral, apresentam natureza alergênica. Dentro desta linha de pesquisa, caracterizar alérgenos de sementes de crambe, tem como propósito adquirir conhecimentos e responder questionamentos dos próprios produtores quanto ao caráter alergênico de uma cultura em expansão no Brasil e a partir desses conhecimentos desenvolver propostas terapêuticas.

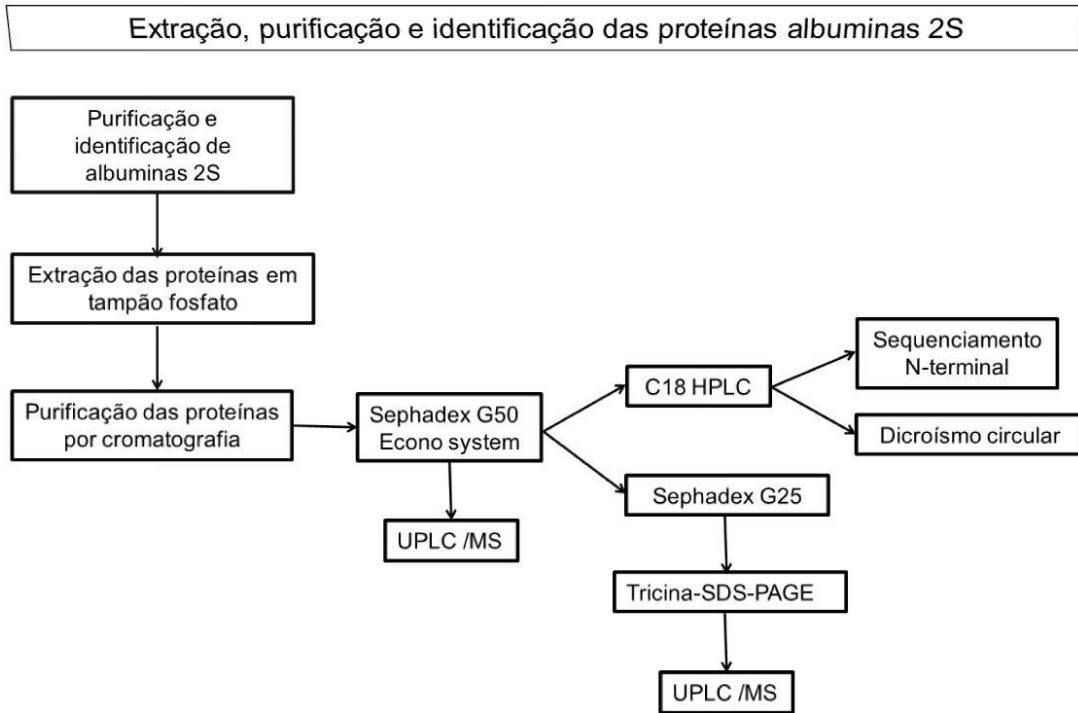
### 3. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo purificar, identificar e caracterizar bioquimicamente e imunologicamente proteínas do grupo das albuminas 2S de sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst).

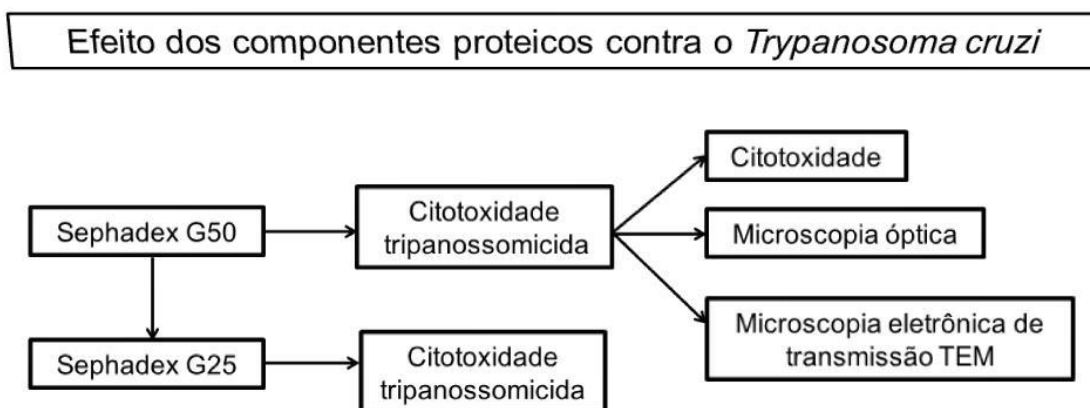


#### 4. ESTRATÉGIA DE TRABALHO

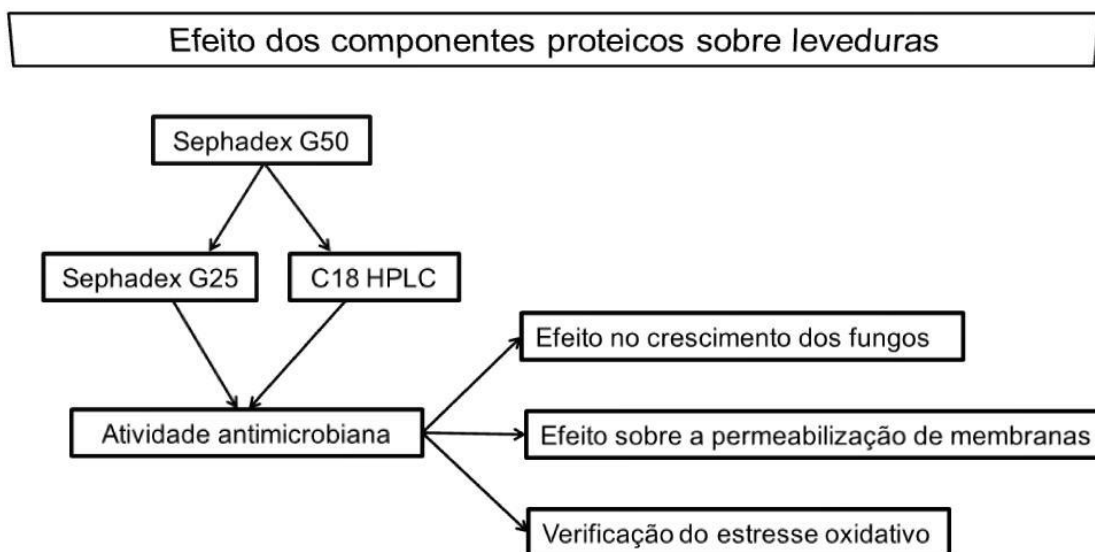
O estudo foi conduzido em etapas conforme apresentado nos diagramas das Figuras 3, 4, 5, 6, 7.



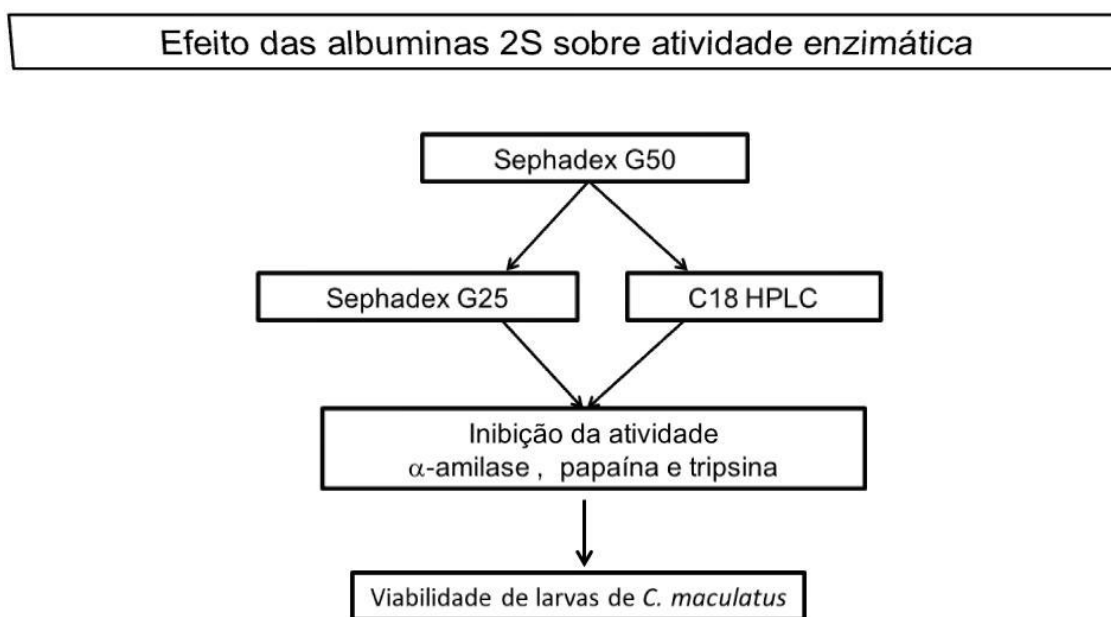
**Figura 3:** Etapas realizadas para extração das proteínas de sementes de crambe, processos cromatográficos para purificação e posterior identificação da estrutura primária e secundária.



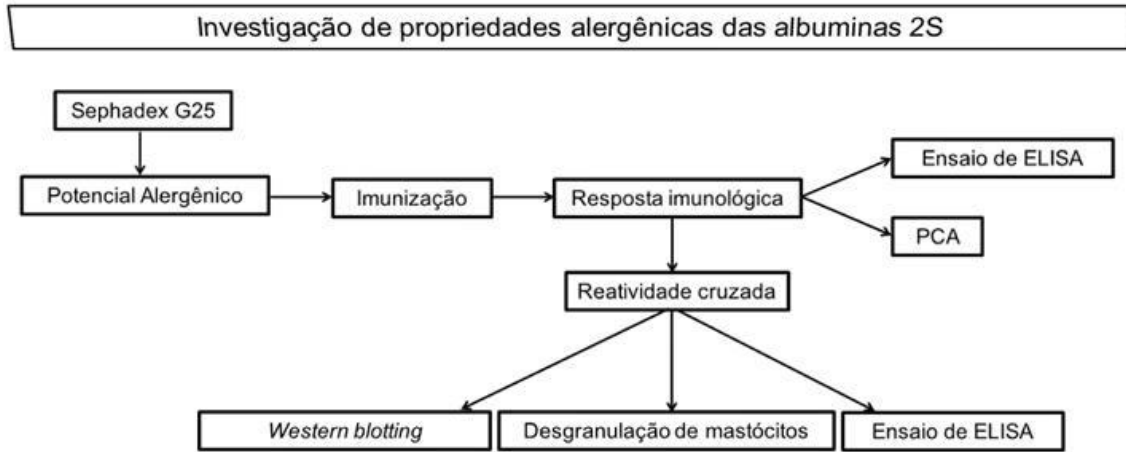
**Figura 4:** Etapas realizadas para investigação da atividade inibitória da fração proteica rica em albuminas 2S sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi*.



**Figura 5:** Etapas realizadas para investigação da atividade inibitória das albuminas 2S sobre o crescimento de leveduras.



**Figura 6:** Etapas realizadas para investigação da atividade inibitória das albuminas 2S sobre a atividade enzimática e viabilidade de larvas de insetos.



**Figura 7:** Etapas realizadas para investigar as propriedades alergênicas das albuminas 2S purificadas a partir da imunização dos animais.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Isolamento e caracterização das proteínas do grupo das albuminas 2S**

#### **5.1.1 Obtenção das sementes**

Os experimentos foram realizados a partir de sementes de crambe fornecidas pela “Fundação MS para a Pesquisa e Difusão de Tecnologias Agropecuárias” - Maracaju, Mato Grosso do Sul.

#### **5.1.2 Extração das proteínas da semente de crambe**

As sementes de crambe foram trituradas em processador e as proteínas extraídas em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0, na proporção 1:5 (1g/5mL) por 3 h sob agitação em temperatura ambiente como proposto por Maciel et al. (2009). Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 15.000 x g por 10 min a 4°C, o sedimento descartado e o sobrenadante obtido (S1) foi novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores obtendo o sobrenadante (S2) rico em albuminas 2S.

#### **5.1.3 Cromatografia de exclusão molecular**

A fração S2 foi fracionado em coluna (75/1,5 cm) de Sephadex G-50, utilizando ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, como fase móvel, em um fluxo constante de 1 mL/min. O volume coletado foi de 1 mL por tubo e o monitoramento foi realizado a 280 nm. A fração correspondente às albuminas, (de acordo com as frações de separação por massa molecular) obtida nessa etapa, foi fracionada em Sephadex G-25 (coluna 50/1,0 cm) nas mesmas condições anteriores ou em coluna de fase reversa, sistema HPLC-C18. As frações de interesse foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.

#### **5.1.4 Cromatografia de fase reversa em sistema de alta eficiência (HPLC)**

A fração contendo o “pool” de albuminas 2S obtida na cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G50 foi submetida à cromatografia de fase

reversa em coluna C18 (250/4,6 mm), sob um fluxo constante de 0,7 mL/min em sistema de alta performance HPLC (High Performance Liquid Chromatography) da Shimadzu®, modelo LC-10AD (estação de trabalho “Class-LC10”). Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por TFA 0,1% em água (solução A) e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O perfil de eluição foi monitorado por medição da absorvância a 220 nm. Os espectros de UV (ultravioleta) foram obtidos utilizando um detector foto-diodo e as frações de interesse foram coletadas, secas em concentradores centrífugos tipo Speed-Vac e armazenadas a -20°C.

### 5.1.5 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada a 595 nm pelo método de BCA (Smith *et al.*, 1985), usando-se BSA (albumina sérica bovina) como padrão.

### 5.1.6 Eletroforese em gel Laemmli SDS-PAGE e Tricina-SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) foi realizada utilizando as condições descritas por Laemmli (1970) e a eletroforese-tricina como descrito por Schagger & Von Jagow (1987).

### 5.1.7 Determinação da sequência N terminal de aminoácidos (Método de Edman)

Uma alíquota da fração obtida do processo cromatográfico em fase reversa foi utilizada para determinar a sequência parcial de aminoácidos; para isso foi utilizado o processo de sequenciamento automático de aminoácidos (PPSQ-33, Shimadzu), empregando a metodologia desenvolvida por Edman (1950). A degradação de Edman é um processo cíclico onde os resíduos de aminoácidos são clivados um a um (a cada ciclo) a partir da região N-terminal da proteína, sendo identificados como derivativos fenil-tiohidantoínas (PTH-AA). Cada ciclo é realizado em três etapas: **acoplamento** do fenil-isotiocianato (PITC) com o resíduo N-terminal, **clivagem** do resíduo N-terminal via ciclização em meio ácido, e **conversão** do derivado tiazolinona (AZT) formado em um derivado mais estável, a fenil-tiohidantoína (PTH),

o qual pode ser identificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18, usando um sistema isocrático de acetonitrila.

### **5.1.8 Identificação de proteínas por espectrometria de massa método Shotgun**

Os métodos de preparo da amostra utilizados para análise foram os mesmos para proteômica shotgun padrão; a metodologia utilizada foi como descrito anteriormente (Calderan-Rodrigues *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2016).

#### **5.1.8.1 Preparação de amostra e digestão**

Para digestão de proteínas, alíquotas da amostra (fração obtida da Shephadex G50) contendo 100 µg de proteínas foram dessalinizadas em membranas 5000 MWCO *Vivaspin* 500 (GE Healthcare, UK) usando como tampão 50 mM bicarbonato de amônio (Sigma-Aldrich) pH 8,5. As membranas foram preenchidas até a capacidade máxima com bicarbonato de amônio e centrifugadas a 15.000 x g por 20 min a 8°C. Este procedimento foi repetido pelo menos três vezes para a concentração de proteína e limpeza, para obter aproximadamente 50 µL de amostra. Para a digestão, foram adicionados 25 µL de RapiGest® a 0,2% (v/v) (Waters, Milford, CT, EUA), na amostra, rapidamente agitados em vórtex e incubados em termobloco (Eppendorf Thermomixer®) a 80° C por 15 min. Em seguida, 2,5 µL de DTT 100 mM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) foram adicionados, e os tubos foram agitados em vortex e incubados a 60°C por 30 min sob agitação. Os tubos foram colocados em gelo (30 s) e 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM foram adicionados, seguidos por agitação em vortex durante 5 s e incubação no escuro por 30 min em temperatura ambiente. Após, 20 µL (50 ng/µL) de tripsina (Promega, EUA) foram adicionados e o tubo colocado em um termobloco a 37°C durante aproximadamente 17 h. Após esse tempo, 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 5% v/v foram adicionados para precipitar o surfactante RapiGest®, agitado por 5 s, incubado a 37°C por 90 min e centrifugado a 4000 x g por 30 min a 8°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para frascos *total Recovery Vial* (Waters, EUA) para posterior análise por espectrometria de massa.

### 5.1.8.2 Análise por espectrometria de massas

A separação dos peptídeos tripticos foi obtida através de um UPLC *nanoAcquidade* ligado a um espectrômetro de massas modelo *Synapt G2-Si HDMS* (Waters, Manchester, Reino Unido), sendo utilizado para análise de ESI-LC-MS/MS. O passo de cromatografia foi realizado para separar os peptídeos e melhorar a resolução. Durante a separação, a amostra foi carregada na coluna nanoAcquity UPLC 5  $\mu\text{m}$  C18 (180  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm) a 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante 3 min e depois na coluna de fase reversa analítica nanoAcquity HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$  (100  $\mu\text{m}$   $\times$  100 mm ) a 600 nL/min, a uma temperatura de coluna de 60°C. Utilizou-se gradiente binário para eluição, com fase móvel (solução A) consistindo de ácido fórmico a 0,1% (Sigma-Aldrich) em água (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e fase móvel (solução B) contendo 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Sigma-Aldrich ). Um gradiente de eluição foi iniciado a 7% (solução B) e mantida por 3 min, passando para 40% (solução B) até 90,09 min, e de 40% (solução B) para 85% (solução B) até 94,09 min, sendo mantida em 85% até 98,09 min, depois diminuindo para 7% (solução B) até 100,09 min e mantendo 7% B até o final do experimento a 108,09 min.

A espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e de resolução (modo V), 35.000 FWHM, com mobilidade iônica e em modo de aquisição independente de dados (DIA); A velocidade da onda do IMS foi ajustada para 600 m/s; a energia de colisão de transferência aumentou de 19 V para 45 V no modo de alta energia; tensões cone e capilar de 30 V e 2800 V, respectivamente; e uma temperatura de fonte de 70°C. Nos parâmetros TOF (Time of flight), o tempo de varredura foi definido em 0,5 s no modo contínuo com um intervalo de massa de 50 a 2000 Da. O [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 fmol/ $\mu\text{L}$  foi utilizado como um calibrador externo e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30 s.

### 5.1.8.3 Análise de dados

Os dados de MS que foram obtidos a partir de LC-MS<sup>E</sup> foram processados e pesquisados no *Progenesis Q1 for Proteomics Software V.2.0* (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). A análise foi realizada utilizando os parâmetros como relatados (Reis *et al.*, 2016). Para a identificação da proteína, foi utilizado o banco de dados de

sequências de proteínas (*Brassica napus*) disponível no *UniProt* (<http://www.uniprot.org>) e a análise de enriquecimento da classificação foi então realizada no programa *Blast* (National Center for Biotechnology Information).

### **5.1.9 Identificação por espectrometria de massas das proteínas separadas por eletroforese**

Para MS a partir do gel, as bandas proteicas obtidas do gel tricina-SDS-PAGE foram excisadas do gel e foram realizados procedimentos de descoloração, digestão para obtenção dos peptídeos e análise para identificação por espectrometria de massas, segundo protocolo anteriormente descrito (dos Santos *et al.*, 2017).

#### **5.1.9.1 Preparação de amostra e digestão em gel**

As bandas proteicas foram excisadas do gel, descoradas e, posteriormente, secas a vácuo a 30<sup>o</sup> C usando um *Speed-Vac* (Labcomo, Kansas, MO, EUA). As bandas de proteínas foram digeridas adicionando 15 µL de solução de tripsina (33 ng/mL; V5111, Promega, Madison, WI, EUA) preparada em 50 mM bicarbonato de amônio e a suspensão foi incubada por 37<sup>o</sup> C por 16 h, em termobloco (Bioer Technology, China). Em seguida, foram adicionados, por bandas, 25-50 µL de ácido trifluoroacético a 5% (TFA) (Sigma-Aldrich) e acetonitrila a 50% (v/v) (ACN) (Tedia), seguindo-se uma agitação suave por 30-60 min. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo limpo e este procedimento foi repetido duas vezes. Os dois extratos combinados foram concentrados a 10 µL usando um *Speed-Vac*, dessalinizados em C18 *Zip Tip* (Millipore, Billerico, MA, EUA) e transferidos para frascos *total Recovery Vial* (Waters, EUA).

#### **5.1.9.2 Análise por espectrometria de massas**

Para análise espectrométrica de massas, utilizou-se um *NanoAcquity* UPLC conectado a um espectrômetro de massas *Synapt G2-Si* HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido). Durante a separação, as amostras foram inseridas na coluna *trap* C18 *nanoAcquity* UPLC 5 mm (180 µm 20 mm) a 5 mL/min por 3 min e,



em seguida, no *nanoAcquity* HSS T3 coluna analítica de fase reversa de 1,8 mm (100 µm x 100 mm) a uma taxa de fluxo de 500 nl/min.

Para eluição dos peptídeos, foi utilizado um gradiente binário, com fase móvel (solução A) água grau MS (Tedia) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e fase móvel (solução B) consistindo de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich). O gradiente iniciado a 7-40% (solução B) em 0-33 por 21 min; 40-85% (solução B) em 33,21-37,21 min; 85-85% de (solução B) em 37,21-41,21 min; 85-7% (solução B) em 41,21-43,21 min. A espectrometria de massas foi realizada em resolução modo V, e na aquisição independente de dados (DIA), transferência de energia de colisão aumentada de 20 V para 35 V em modo de alta energia, tensão cone e capilar de 30 V e 2800 V, respectivamente, e temperatura da fonte de 60<sup>0</sup> C. Espectral taxas de varredura de aquisição foram definidas para 0,5. O [Glu1] -fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 mol/mL foi utilizado como calibrador externo.

### 5.1.9.3 Análise dos dados

O processamento de espectros e pesquisa de banco de dados foram realizados através do *Protein Lynx Global Service* v.3.02 (PLGS, Waters) usando o banco de dados de proteínas (*Brassica napus*) disponível no *UniProt* (<http://www.uniprot.org>) e a análise de enriquecimento da classificação foi então realizada no programa *Blast* (at National Center for Biotechnology Information).

### 5.1.10 Caracterização da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)

Para determinação da estrutura secundária, a fração contendo o “pool” de albuminas 2S oriunda do fracionamento em HPLC, foi submetida ao dicroísmo circular (CD), em espectropolarímetro modelo JASCO J815 CD (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra foi dissolvida em água destilada, colocada em cubeta de quartzo com caminho ótico de 0,1 cm e os espectros foram obtidos a 20°C, a um fluxo constante de nitrogênio. Os espectros foram obtidos a uma velocidade média de 50 nm/min, o espectro da água foi subtraído. Cinco varreduras para cada amostra foram realizadas por espectro a uma velocidade de 10 nm / min. As análises foram realizadas na faixa de (185–300 nm).

## **5.2 Atividade sobre *Trypanosoma cruzi***

### **5.2.1 Manutenção da célula hospedeira**

As células LLC-MK2 (célula epitelial de rim de Macaca mulatta) foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de FBS (soro bovino fetal) em frascos de plástico estéreis. As garrafas foram mantidas a 37<sup>0</sup> C em 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura foi trocado a cada 48 h. As culturas de células em monocamada foram lavadas três vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfato) e tratadas com tripsina. As células suspensas foram transferidas para frascos novos ou colocadas em placas de 24 poços esterilizadas (3 x 10<sup>4</sup> células por poço) contendo lamínulas durante 24 h para adesão antes da infecção com parasitas.

### **5.2.2 Manutenção dos parasitas**

Os epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa DM28) foram cultivados em 5 mL de meio de infusão hepática de triptose (LIT) suplementado com 10% de FCS (soro fetal bovino, Gibco) e 4% de hemina a 28 ° C (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – LBCT da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil). Uma alíquota de 1 mL do parasita na fase exponencial foi transferida para um novo meio a cada 5 dias e o volume médio foi completado para 5 mL. Os tripomastigotas foram obtidos com a aclimatização de epimastigotas com meio RPMI 1650 (Gibco) durante 72 h a 37° C.

### **5.2.3 Determinação da atividade citotóxica (albumina 2S) em células LLC-MK2**

As células LLC-MK2 revestidas foram incubadas com diferentes concentrações (50, 100, 500, 1000 µg/mL) da fração FCrF5-20 e mantidas a 37<sup>0</sup> C durante 24 h numa atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% para determinar o seu efeito citotóxico. As células foram então contadas por campo visual, sob microscopia óptica, usando uma objetiva de 40 x. Os controles sem a fração proteica foram tratados nas mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas (Carvalho *et al.*, 2010). A reversibilidade foi feita Após o tempo de incubação por 24h, o meio com

a proteína foi removido da cultura e substituído por meio sem a proteína, após 24 as células foram observadas por microscopia óptica.

#### **5.2.4 Atividade das frações sobre amastigotas de *T. cruzi***

Os ensaios foram realizados segundo Carvalho *et al.* (2010). As células hospedeiras foram plaqueadas em lamínulas ou frascos de cultura como descrito acima durante 24 h e foram infectadas a uma proporção de 10 parasitas (tripomastigotas) por célula e incubadas a 37° C, durante 48 h, para permitir o estabelecimento da infecção. A fração proteica (50, 100, 500 e 1000 µg/mL) foi adicionada às células, então incubadas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

#### **5.2.5 Análise morfológica de epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* por microscopia óptica**

As amostras infectadas de LLC-MK2 foram lavadas três vezes com PBS, fixadas em solução de Bouin (19:1 ácido pícrico:ácido acético, v/v) durante 5 min e lavadas quatro vezes com PBS. As células foram então coradas com Giemsa (10%, v/v) à temperatura ambiente por 6 h. As lamínulas contendo as células foram desidratadas em soluções de concentrações decrescentes de acetona-xileno (100, 90, 70, 30% de acetona) e montadas em lâminas histológicas utilizando meio de montagem Entellan.

Para os epimastigotas, após o período de incubação, eles foram centrifugados a 900 xg por 10 min e lavados com PBS, pH 7,2, à temperatura ambiente. Eles foram então fixados em uma solução contendo 4% de paraformaldeído em PBS e corados com corante Giemsa (10% v/v) à temperatura ambiente por 2 h. Alíquotas de 100 µL foram espalhadas em lâminas de microscópio, secas a 37° C e examinadas sob um microscópio de luz equipado com uma objetiva de 40 x (Zeiss Axioinvert 135). As imagens foram obtidas usando uma câmera Olympus DP72 e processadas usando software cell<sup>^</sup>F (Mello *et al.*, 2011).

### 5.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Células LLC-MK2 não infectadas e infectadas com *T. cruzi* em frascos de cultura e epimastigotas foram tratadas com albuminas 2S na concentração de 500 µg/mL durante 24 h e depois processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Os epimastigotas foram centrifugados a 900 xg por 10 min, lavados em PBS por 10 min e recentrifugados sob as mesmas condições. Células LLC-MK2 não infectadas e infectadas foram removidas mecanicamente com um raspador de células e centrifugadas como acima. O sedimento das células foi fixado com 4% de formaldeído, 1% de glutaraldeído, 0,2 M de tampão de cacodilato de sódio e 5% de sacarose à temperatura ambiente por 1 h. As células foram lavadas e pós-fixadas com solução de OsO<sub>4</sub> a 2%, ferrocianeto de potássio a 0,8% e 5 mM de CaCl<sub>2</sub> em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram lavadas em tampão de cacodilato de sódio e desidratadas em uma série crescente de concentrações (50, 70, 90, 100%) de acetona. As amostras desidratadas foram incubadas em solução de resina 100% acetona-EPON nas proporções de 2:1, 1:1, 1:2 e resina EPON pura por 6 h, em cada etapa. As amostras foram então embebidas em resina EPON e polimerizadas a 60 °C por 48 h. Secções ultrafinas foram obtidas utilizando um ultramicrótomo (Reichert Ultracuts Leica Instruments®). As secções foram coradas no escuro com acetato de uranila a 5% durante 20 min, citrato de chumbo durante 5 min, e subsequentemente observadas e fotografadas com um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1400 Plus operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV (Mello *et al.*, 2011, 2014).

### 5.3 Propriedade antifúngica

As leveduras *Candida tropicalis* (CE017), *Candida albicans* (CE022), *Saccharomyces cerevisiae* (1038) e *Kluyveromyces marxianus* (CE025) foram mantidas em ágar Sabouraud, com glicose a 2% (Merck) no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

### 5.3.1 Ação das albuminas 2S de sementes de crambe sobre o crescimento de leveduras

As culturas de células de leveduras foram preparadas a partir da transferência de inóculo do estoque para placas de Petri contendo ágar Sabouraud e submetidas a crescimento a 30° C; após 48 h uma alíquota foi transferida para 10 mL de meio de cultura estéril. Células de levedura foram quantificadas em uma câmara de Neubauer para o cálculo de diluições apropriadas. Em seguida  $1 \times 10^9$  células /mL foram incubadas com 100 a 200 µg/mL em placas de 96 poços a 30° C, a atividade antifúngica das albuminas 2S foi analisada em placas de microtitulação de 96 poços, a 30° C, ou seja, as amostras controle e tratadas foram colocadas na presença de 100 e 200 µg/mL da proteína ( $1 \times 10^4$  células/mL de ágar Sabouraud, totalizando 200 µL). As leituras foram feitas a cada 6 horas em um leitor de microplacas, a 620 nm por 24 h. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em fluxo laminar, utilizando métodos adaptados de Broekaert *et al.* (1990).

### 5.3.2 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática

Para avaliar a permeabilização da membrana utilizou-se o corante *SYTOX Green*, o qual penetra nas células quando a membrana plasmática está estruturalmente comprometida. A detecção qualitativa da captação de *SYTOX Green* nas células das diferentes espécies de leveduras foi realizada por microscopia de fluorescência. Após 24 h, as células crescidas na presença ou ausência da fração contendo albuminas 2S, como descrito acima no ensaio de inibição, foram incubadas com 0,2 µL *SYTOX green* em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL durante 15 min a 25°C, sob agitação constante. As células foram observadas sob um microscópio óptico (Axioplan A2, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros de para a detecção de fluorescência (comprimento de onda de excitação 450-490 nm; comprimento de onda de emissão 500 nm). Controles negativos (ausência de fração albumina 2S) também foram analisados para avaliar a permeabilidade da membrana basal (Thevissen *et al.*, 1999). Todas as imagens foram adquiridas com o mesmo tempo de exposição.

### 5.3.3 Estresse oxidativo

Para determinar se o mecanismo de ação das albuminas 2S envolve a indução de estresse oxidativo, foi utilizada a sonda 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Calbiochem - EMD), que é um corante que indica a presença de espécies reativas de oxigênio. A indução da produção endógena de ROS foi medida em diferentes leveduras tratadas com 100 e 200 µg/mL da fração de albuminas 2S após o ensaio de inibição do crescimento utilizando H<sub>2</sub>DCFDA como descrito por Mello *et al.* (2011). Após 24 h, as células crescidas na presença ou ausência da proteína, como descrito acima no ensaio de inibição, foram incubadas com corante H<sub>2</sub>DCFDA (20 µM) com agitação constante durante 2 h conforme as instruções do fabricante. Após este período, as células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e analisadas em um microscópio de fluorescência (Axioplan.A2, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros de fluorescência para detecção de fluoresceína (comprimento de onda de excitação 450 - 490 nm; comprimento de onda de emissão 500 nm). Todas as imagens foram adquiridas com o mesmo tempo de exposição.

## 5.4 Ensaio de inibição da atividade enzimática e crescimento de larvas de insetos

### 5.4.1 Material biológico

Os insetos *C. maculatus* foram obtidos a partir de colônia mantida sob umidade relativa de 60 a 80%, em um ciclo de 12 h claro/escuro no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos goytacazes RJ.

As sementes de *Vigna unguiculata* (susceptíveis ao gorgulho), foram obtidas comercialmente no mercado Central, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

#### 5.4.2 Ensaio biológico com sementes artificiais

A fim de verificar o efeito das albuminas 2S provenientes de sementes de crambe sobre a viabilidade de larvas de *C. maculatus*, ensaios biológicos foram realizados utilizando sementes artificiais. As sementes de 400 mg foram preparadas, com o auxílio de um molde cilíndrico, com farinha de feijão fradinho (*V. unguiculata*). Albuminas 2S foram diluídas em água, misturadas à farinha de feijão, e após homogeneização e liofilização as sementes artificiais foram modeladas. As sementes contendo diferentes quantidades (1 e 2%) de albuminas 2S de crambe foram infestadas com fêmeas do inseto *C. maculatus* de 2 dias de idade por um período de 48 h a 28 °C para ovipositar sobre a semente. Após um período de 24 h, as sementes foram desinfestadas e o excesso de ovos postos removido com o auxílio de uma agulha fina, de forma a restarem apenas 3 ovos por semente. As sementes foram incubadas a 28° C em estufa incubadora e, após 20 dias, desfeitas para a retirada, contagem e pesagem das larvas. Ensaio controle foi realizado, em paralelo, com sementes preparadas com farinha de *V. unguiculata* isenta de albuminas 2S (de Sá *et al.*, 2014 com modificações).

#### 5.4.3 Ensaio de inibição da atividade da $\alpha$ -amilase *in vitro*

O método usado para realizar o ensaio de atividade da  $\alpha$ -amilase foi descrito por Bernfeld (1955) e revisto por Nascimento *et al.* (2011). Enzimas salivar humana e de larvas de *C. maculatos* (25  $\mu$ g/mL) foram testadas usando solução 1% de amido (Sigma-Aldrich) como substrato. Após a adição de 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS, hidróxido de sódio a 4,5%, ácido 3,5-dinitrosalicílico a 1% e 45 g de tartarato de sódio e potássio), a reação foi parada a 100° C e monitorada a 540 nm. Uma unidade de atividade de  $\alpha$ -amilase foi definida como a quantidade da enzima que aumentou a absorbância a 540 nm em 0,1 unidade ao longo de 30 min do ensaio. A inibição da alfa-amilase foi avaliada como descrito acima, após um pré-tratamento de enzima salivar humana (10 U) e de homogenatos intestinais de *C. maculatus*, com albuminas 2S (50, 100, 105, 200, 250  $\mu$ g/mL) por 15 min a 37° C antes da adição do solução de 25  $\mu$ L de substrato a 1%. A mistura reacional foi incubada durante 15 min (para a reação de enzima-substrato, no caso da amilase humana) ou 30 min (para a reação enzima-substrato, no caso das amilases do inseto). Após

esse tempo, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS), o material foi fervido por 5 min e 400  $\mu\text{L}$  de água foram adicionados a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **5.4.4 Ensaio de inibição da atividade da protease cisteínica papaína *in vitro***

A atividade inibitória sobre a papaína foi determinada utilizando azocaseína como substrato. A azocaseína foi preparada como solução a 1% em tampão citrato-fosfato contendo 100 mM de citrato de sódio, 100 mM de fosfato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 1,5 mM de 1,4-ditioeritritol (DTT), pH 5,6, mantida a 37<sup>0</sup> C. Para o experimento, diferentes concentrações de albuminas 2S (20,50,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram incubadas com a papaína (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) totalizando 20  $\mu\text{L}$  por 15 min a 37<sup>0</sup> C utilizando tubos de ensaio. Após esse período, foram adicionados, à mistura, 40  $\mu\text{L}$  da solução de azocaseína e as suspensões foram mantidas em banho-maria por 1 h a 37<sup>0</sup> C. Após a reação, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de uma solução 10% TCA e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min; 175  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para outro tubo e acrescidos de 150  $\mu\text{L}$  de 1 M de NaOH. A absorbância foi monitorada a 440 nm e a atividade da cisteíno protease foi calculada de acordo com uma curva padrão derivada de papaína pura (Sigma) (0,5 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e azocaseína como substrato. A curva padrão também foi utilizada para determinar a concentração ideal da papaína a ser utilizada nos ensaios. O experimento foi realizado em triplicata e em paralelo foi realizado o ensaio utilizando inibidor padrão de protease cisteínica E-64 (Sigma) e ácido iodoacético (Sigma) ambos na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . O ensaio foi baseado na metodologia desenvolvida por Michaud *et al.* (1994).

#### **5.4.5 Ensaio de inibição da atividade da protease serínica tripsina *in vitro***

Para a realização do ensaio, foi utilizado como substrato o BApNA (N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida), dissolvido em DMSO. Uma curva de atividade da enzima tripsina foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal de enzima a ser utilizada no ensaio. A atividade inibitória enzimática das albuminas 2S foi



determinada pela quantificação da atividade hidrolítica residual da tripsina sobre o substrato. Para verificar a atividade proteolítica foi utilizado um tampão Tris/HCl 50 mM, com  $\text{CaCl}_2$  0,02%, pH 8,0 contendo NaCl 150 mM, num volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Após 30 min de incubação a 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorbância de p-nitroanilida liberada a 405 nm. Para o ensaio de inibição, uma solução de 10  $\mu\text{L}$  enzima (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foi incubada com diferentes concentrações das albuminas 2S (20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 25  $\mu\text{L}$  do substrato BApNA (5 mM) totalizando 200  $\mu\text{L}$  com o tampão. Após 30 min a 37 °C, a reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético 30%, e a hidrólise do substrato foi acompanhada por leitura da absorbância a 405 nm. O ensaio foi realizado de acordo com protocolo publicado por Macedo *et al.* (2007).

## 5.5 Caracterização imunológica

### 5.5.1 Obtenção do soro antialbumina 2S

Os animais da linhagem BALB/c foram obtidos na unidade de criação de animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-UENF), protocolo n<sup>o</sup> 297. Os grupos três de camundongos foram imunizados (de acordo com protocolo publicado por Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011 com modificações) por injeção intraperitoneal de 100  $\mu\text{L}$  de solução salina fosfatada contendo 5, 10 e 20  $\mu\text{g}$  de albuminas 2S para cada grupo, respectivamente, na presença de 5 mg de  $\text{Al}_2\text{OH}_3$  como adjuvante. Após 7 dias, os animais receberam um reforço com o antígeno na mesma concentração na presença de 2,5 mg de adjuvante. Este procedimento foi repetido mais uma vez, sem uso de adjuvante. Sete dias depois, os animais foram anestesiados e sangrados; as técnicas de sangramento foram por plexo retro-orbital. Alternativamente, este procedimento foi também realizado, com intervalos de imunização de 30 dias e aplicação de 5  $\mu\text{g}$  da fração proteica. O sangue retirado foi deixado a coagular a temperatura ambiente e centrifugadas a 1000 xg durante 10-20 min a 4° C. As amostras de soro foram armazenadas a -20° C.

### 5.5.2 Detecção de subclasses imunoglobulinas por ensaio de ELISA

O ensaio ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foi realizado de acordo com Deus-de-Oliveira *et al.*, (2011) com modificações; e utilizado para a detecção de anticorpos séricos específicos para cada classe (IgG, IgG1, IgE). Utilizando placas de 96 poços de poliestireno (Nunc-Immuno Plate I F), os poços foram sensibilizados (revestidos) com albuminas 2S purificadas, 60 µl/poço (1 µg/µL) de tampão carbonato-bicarbonato de sódio 50 mM pH 9,6 a 4° C durante a noite (18 h). Após a lavagem com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), os poços foram bloqueados com PBS-T contendo 1% de gelatina durante 1 h a temperatura ambiente, e então lavados com PBS-T e incubados com as amostras de soro (anticorpo primário) diluídas em tampão bloqueador a 37° C por 1 h. Depois, os poços foram lavados com PBS-T e tratados com anticorpos secundários (SouthernBiotech), IgE, IgG, IgG1 conjugados a peroxidase, diluídos de acordo com as instruções do fabricante (1:2000, 1/1000, 1/5000 respectivamente) em PBS-T gelatina 0,1% e mantidos por 1 h a 37° C. Após novas etapas de lavagem foi iniciada a revelação do ensaio. Foi adicionada uma solução reveladora, contendo 10 mg de OPD, 10 µL de peróxido de hidrogênio 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 6,5 mL de ácido cítrico 0,1 M, 7,0 mL de fosfato de sódio monobásico 0,2 M e 11,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada, por 10 min na ausência de luz. A reação foi interrompida adicionando-se 60 µL de ácido sulfúrico 3N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por poço. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (Thermo Plate Reader). Este ensaio foi também realizado sensibilizando-se as placas com albuminas 2S de outras oleaginosas (amendoim, gergelim, mamona e pinhão-manso) a fim de verificar possível reatividade de IgEs cruzadas.

### 5.5.3 Teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA)

O ensaio de PCA com albumina 2S obtidas a partir de sementes de crambe foi realizado conforme descrito por Mota (1964) e revisado por Maciel *et al.*, (2009), em colaboração com o Dr. Maurício Verícimo, na Universidade Federal Fluminense. Para isso, ratos Lou-M foram sensibilizados com 0,1 mL da amostra do soro (diluída 1:20 em PBS) antialbuminas 2S de crambe. Após um período de sensibilização de 24 h, as reações de PCA foram desafiadas por via intravenosa (veia caudal ou

peniana) com 1 mL de corante azul Evans a 0,25% em solução salina a 0,85% (NaCl) contendo 5 mg de antígeno. Trinta min após a injeção do antígeno, os ratos foram mortos e a pele dorsal foi removida e invertida para medir o diâmetro da lesão cutânea (área do pigmento) na superfície interna da pele com uma régua transparente.

#### **5.5.4 Ensaio de desgranulação de mastócito**

##### **5.5.4.1 Obtenção de mastócitos por lavagem peritoneal**

O ensaio de desgranulação foi realizado como descrito anteriormente (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011). Os animais da linhagem *Wistar* foram obtidos na unidade de criação de animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-UENF), protocolo nº 297. Para a obtenção de mastócitos peritoneais, três ratos (cerca de 250 g) foram eutanasiados individualmente com CO<sub>2</sub>. Os abdomens foram massageados suavemente por aproximadamente 90 s e depois as cavidades peritoneais cortadas longitudinalmente (5 cm de comprimento), e cuidadosamente abertas para lavagem peritoneal por injeção de 20 mL de DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) contendo 12 U/mL de heparina. O abdômen foi suavemente massageado por cerca de 90 s e o líquido contendo as células peritoneais foi aspirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur; o fluido do primeiro rato foi usado para lavar o segundo e assim por diante, para enriquecer o conteúdo da lavagem com mastócitos. O conteúdo final do fluido peritoneal recolhido foi transferido para placa de Petri e incubado durante 30 min a 37° C para separar os mastócitos dos macrófagos. Dois terços da camada superior foram então aspirados e descartados, o sobrenadante (aproximadamente 4-5 mL) enriquecido com mastócitos (~1,8×10<sup>5</sup> mastócitos/mL) foi aliqotado em volumes de 100 µL, transferidos a microtubos.

##### **5.5.4.2 Ensaio de desgranulação de mastócitos e reatividade cruzada**

Os mastócitos obtidos anteriormente (100 µL) foram inicialmente sensibilizados por incubação com 1 µL (as amostras foram preparadas para uma

concentração final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do soro anti albumina 2S de sementes de mamona e pinhão-manso obtidos dos camundongos Balb/c por 1 h a 37° C. Após a sensibilização, os mastócitos foram lavados duas vezes com DMEM e incubados com 100 ng de proteína albumina 2S de *C. abyssinica*, por 1 h a 37 ° C. Após esse período as células foram incubadas, durante 15 min com 10  $\mu\text{L}$  uma solução uma contendo 0,1% de azul de toluidina, 10% de formaldeído e 1% de ácido acético, pH 2,8. Os mastócitos granulados e desgranulados foram contados em câmara de Neubauer, com alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra, sob microscópio de luz óptico Zeiss Axioplan, utilizando-se objetiva de 40 X (Deus-de-Oliveira *et al.*, 2011)

### **5.5.5 Predição de epitopos lineares e conformacionais de célula B**

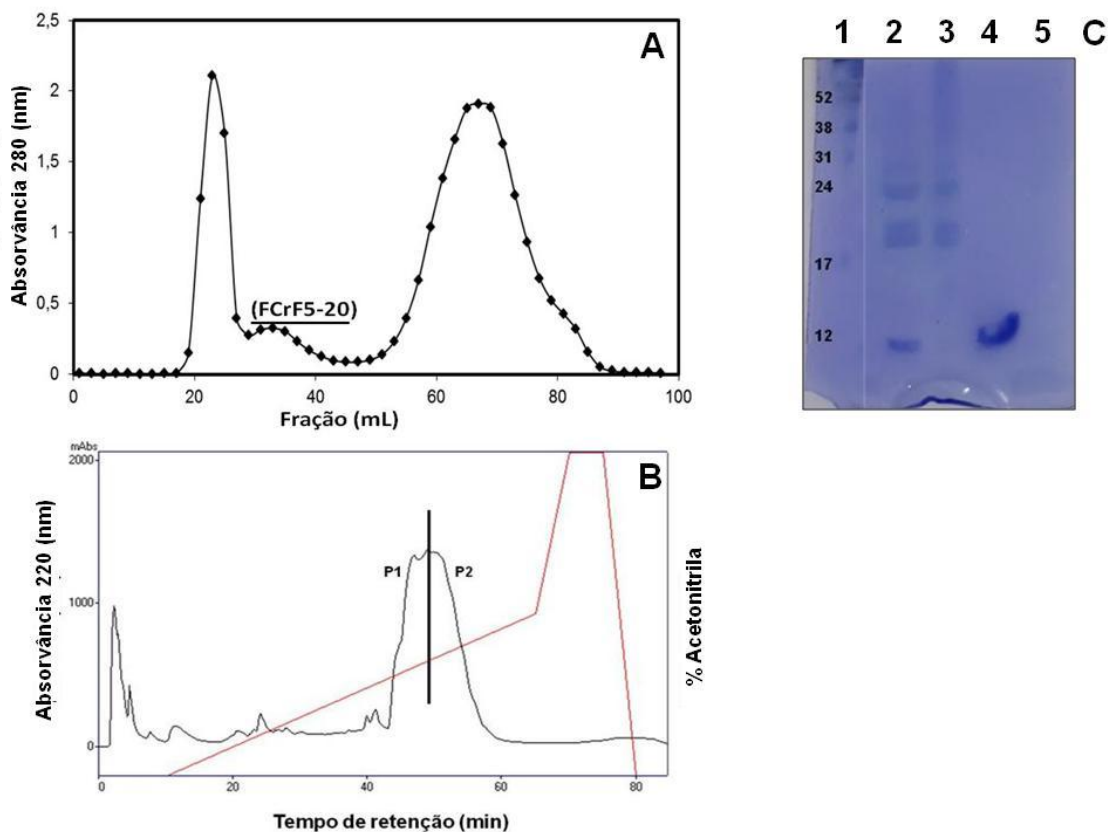
A predição foi realizada a partir da sequência de aminoácidos, combinando as propriedades físico-químicas dos aminoácidos, incluindo a hidrofiliicidade, flexibilidade, acessibilidade, *turns* e acessibilidade ao solvente, de acordo com a especificidade de cada servidor. A predição dos epitopos lineares foi realizada com o auxílio dos softwares: BepiPred (Larsen *et al.*, 2006), ABCpred (Singh *et al.*, 2013). Para a predição dos epitopos conformacionais foi utilizado o servidor CBtope (Sanchez-Trincado *et al.*, 2017).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Extração, purificação e identificação das albuminas 2S de sementes de crambe

#### 6.1.1 Perfil cromatográfico do fracionamento em Sephadex G-50, Fase reversa C18 e Eletroforese

As albuminas 2S de sementes de crambe foram isoladas após serem extraídas com tampão fosfato em cromatografia em coluna Sephadex G-50 e fase reversa C18. Foram obtidas três frações na cromatografia de exclusão molecular em G-50 (Fig. 8A) visualizadas por SDS-PAGE (Fig. 8C).



**Figura 8:** (A) Perfil de eluição do extrato proteico de sementes de crambe. Cromatografia de exclusão molecular do extrato proteico em matriz Sephadex G50, eluída por ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% a fluxo de 1 mL/min. (B) Cromatograma da fração (FCr5-20) em coluna de fase reversa C18. Para eluição foi empregado um gradiente com (TFA) 0,1% (solução A), e acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O fluxo de eluição 0,7 mL/min. (C) Visualização eletroforética, SDS-PAGE 15%. Coluna: 1- marcador de massa molecular (kDa); 2- (extrato proteico); 3- (F1); 4- (FCr5-20); 5- (F3).

A fração eluída com massa molecular entre 5 e 20 kDa (região de massa molecular das albuminas 2S) denominada FCr 5-20 (Fig. 8A) foi coletada e fracionada através de uma matriz C18 utilizando HPLC. A cromatografia de fase reversa em coluna C18 mostrou a presença de um pico cromatográfico majoritário. Apesar das alterações de método e concentração de amostra, não houve êxito no alcance de uma melhor resolução, ou seja, melhor separação das isoformas contidas na amostra aplicada; assim, o pico foi coletado em duas etapas separadamente e denominado P1 e P2, (Fig. 8B).

### 6.1.2 Identificação das frações proteicas por espectrometria de massas (MS) e sequenciamento N-terminal

Para a identificação das proteínas, uma alíquota da fração proteica obtida da cromatografia de exclusão molecular com massa molecular entre 5 e 20 kDa (FCr5-20) (Fig. 9) foi sequenciada por espectrometria de massas. O sistema de nanocromatografia em interface com o espectrômetro de massas contendo uma fonte de nano-electrospray constituíram os equipamentos utilizados para a detecção e fragmentação dos peptídeos. Obtiveram-se espectros ESI-MS/MS e os peptídeos encontrados foram submetidos a uma busca de identidade nos bancos NCBI. O alinhamento das sequências dos peptídeos é mostrado na figura 9. A sequência de aminoácidos desses peptídeos obtida, revelou a presença de três proteínas principais: duas mostraram semelhança com a albumina 2S de *Brassica napus* e outra à proteína antifúngica defensina, também de *B. napus*.

<p>1. MASQQEK/KQLDER/AK/K/<b>GETVVQGGTGGKSF</b>EAQQHLAEGRSR/GGTTR/<b>KEQLGTEGYQQMG</b>  <b>RK/GGAR/TGK/ADDEDEGEEMDEPTSR</b>TR/T// BnaC03g22490D [<i>Brassica napus</i>]</p> <p>2. <b>PQSPQQR</b>PPLLQCCNELHQEEPLCVCPTLK<b>GASKAVKQQV</b>R/<b>QQGQQGQQGQQ</b>LQQV<b>ISRIYQT</b>  <b>ATHLPRVCNIRQVSICPFQ</b>KTTTPGPY Napin large chain L2B=calmodulin [<i>Brassica napus</i>]</p>
<p>QK<b>L</b>CERPSGTW<b>S</b>GVCGN<b>N</b>ACK<b>NQCINLEK</b>ARHGSCNYV<b>FPAHK</b>L<b>CERPSGTW</b>SGVCGN<b>NA</b>  <b>CKNQCINLEK</b> Antifungal protein [<i>Brassica napus</i>]</p>

**Figura 9:** Sequência dos peptídeos identificados por espectrometria de massas da fração (FCr5-20) obtida da exclusão molecular (Sephadex G-50). Para o alinhamento foi utilizada a ferramenta NCBI (Blast P): cada cor representa um peptídeo identificado por nano LC-MS<sup>E</sup>.

Uma alíquota da fração correspondente aos picos obtidos do fracionamento em fase reversa C18 foi submetida ao sequenciamento de Edman. A sequência N-terminal parcial obtida foi alinhada com a sequência de outras proteínas a partir de pesquisa

no banco de dados do NCBI (Blast P) e os resultados são apresentados na figura 10. Podemos observar uma identidade com albuminas 2S e a presença conservada de duas cisteínas consecutivas no início da sequência, padrão comum a albuminas 2S.

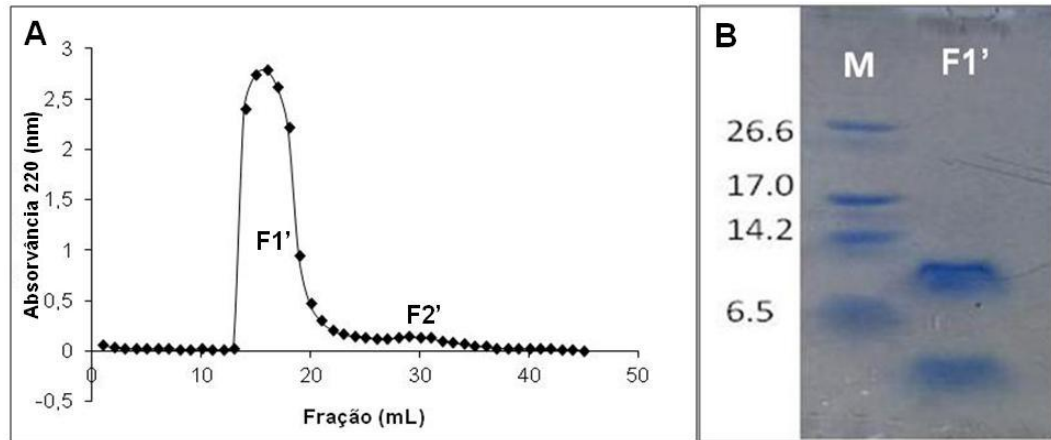
1	-	PQGPQQ-I PLLQQCCNALHQAPLLVV
2	-	PQGPQQRPPLLQQCCNELHQEEPL--
3	-	PQGPQQRPPLLQQCCNELHQEEPL--
4	-	PQGPQQRPPLLQQCCNELHQEEPL--
5	-	PQGPQQRPPLLQQCCNELHQEEPL--
6	-	-QGPQQRPPLLQQCCNELHQEEPL--
7	-	-QGPQQRPPLLQQCCNELHQEEAL--
8	-	-QGPQQEPPLLQQCCNELHQEEPL--

**Figura 10:** Alinhamento da sequência N-terminal parcial da fração proteica isolada das sementes de crambe com albuminas 2S de outras fontes. 1 –proteína isolada das sementes de Crambe isoladas em fase reversa C18, 2 - alérgeno de *Sinapis alba*, 3 - inibidor da tripsina de *Sinapis arvensis*, 4 - cadeia pesada Bra j IE de *Brassica juncea*, 5 - cadeia pesada da napina de *Brassica napus*, 6 - proteína de reserva de sementes de *Raphanus sativus*, 7 - proteína de reserva de *Brassica nigra*, 8 - proteína de reserva de *Brassica rapa*. As cisteínas pareadas estão destacadas em amarelo.

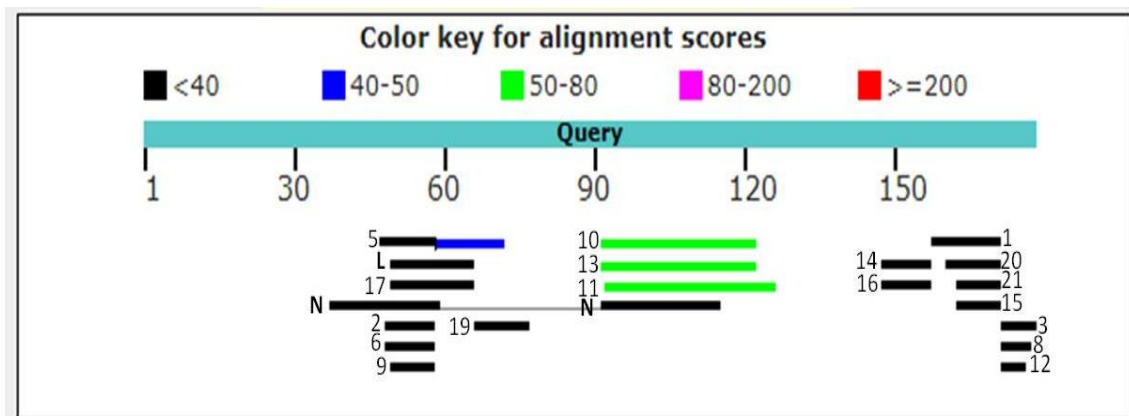
### 6.1.3 Perfil cromatográfico do fracionamento em Sephadex G25 e eletroforese em gel de tricina-SDS-PAGE

Para a purificação da albumina 2S a fração (FCr5-20) foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G25, o perfil cromatográfico mostrou duas frações proteicas que foram denominadas F1' e F2' (Fig. 11 A), as quais foram coletadas separadamente. A fração F1' provavelmente contendo as albuminas 2S após submissão a tricina SDS-PAGE (Fig. 11B) mostrou um perfil proteico de duas bandas entre 10-3 kDa no gel de acordo com o padrão de marcadores moleculares. Estas bandas de proteínas foram retiradas do gel, descoradas, os peptídeos foram tripsinizados e após o sequenciamento por espectrometria de massa mostraram similaridade de sequência de aminoácidos com a proteína albumina 2S. Os peptídeos identificados por Espectrometria de massas e sequenciamento N-terminal foram alinhados através da ferramenta NCBI (Blast P) tendo como proteína de referencia albuminas 2S de *Brassica napus*. O alinhamento

de sequência é mostrado na figura 12 e a sequência de cada peptídeo identificado na tabela 1.



**Figura 11:** (A) Perfil cromatográfico de exclusão molecular (Sephadex G-25) da fração proteica (FCr5-20) obtida da separação em Sephadex G50 durante a purificação da albumina 2S. Eluente: ácido trifluoroacético 0,1%; Fluxo: 1mL/min. (B) Visualização eletroforética, em gel de tricina na presença de SDS, da fração F1' obtida da cromatografia em Sephadex G-25. O gel foi corado com azul coomassie. A amostra foi tratada com  $\beta$ -mercaptoetanol e fervida por 5 min em tampão de amostra. M- Marcador de massa molecular em kDa.



**Figura 12:** Análise estrutural da banda extirpada do gel de tricina por espectrometria de massas. Os traços identificados com número ou letra representam os peptídeos identificados pelo espectrômetro de massas ou por sequenciamento de Edman (indicados pela letra N) que alinharam à sequência de aminoácidos da proteína de referência albumina 2S de *Brassica napus*. A sequência de aminoácidos dos peptídeos correspondentes aos números ou letra está listada na tabela 1.



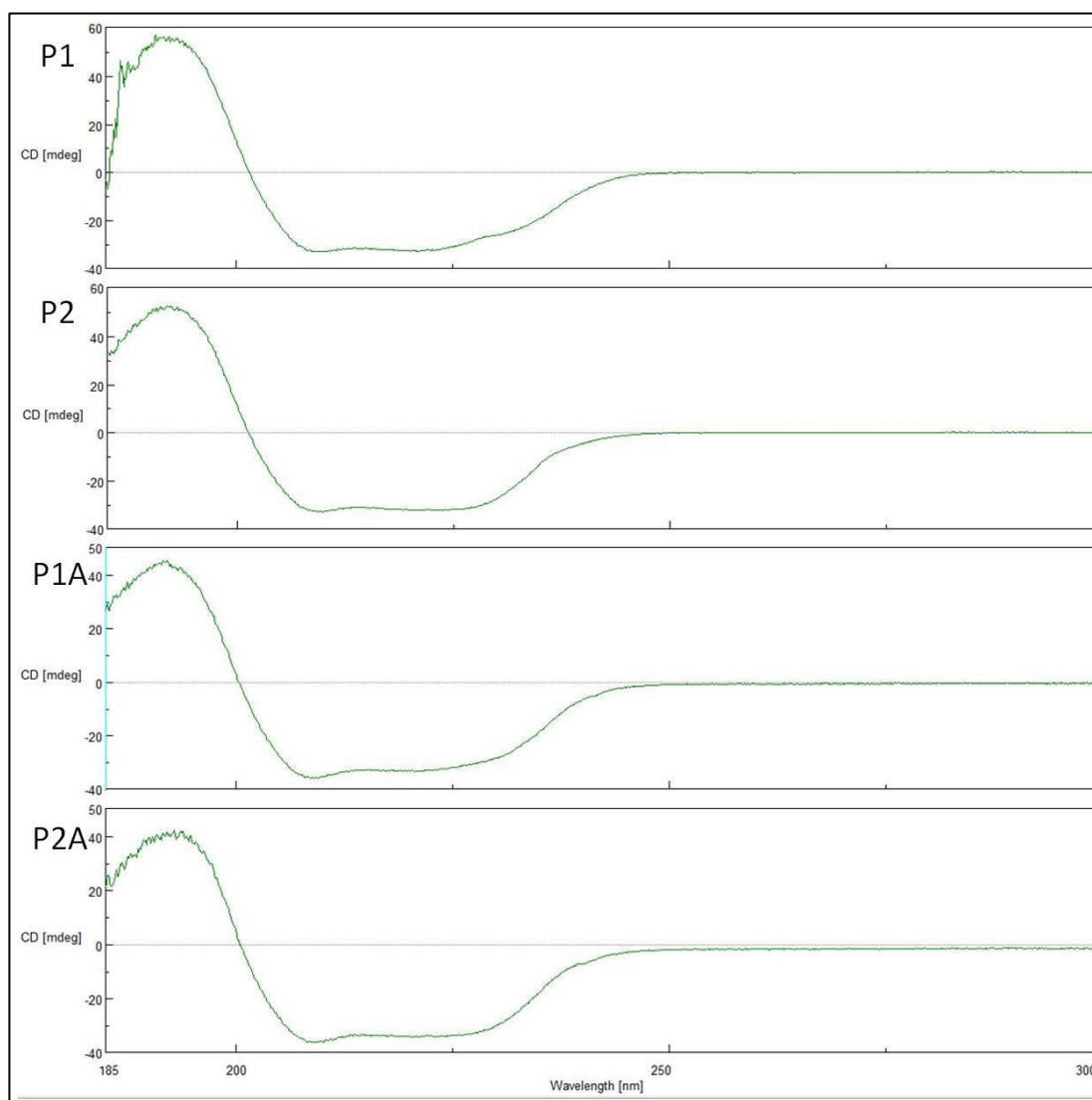
**Tabela 1:** Relação dos peptídeos, identificados pela análise MS e Edman

Identificação	Sequência	Identificação	Sequência
1	VCNIPQVSVCPFQK	13	PQSPQQRPELLQCCNE LHQEELCVCPTLK
2	KEFQQAQHLR	14	IYQTATHLPR
3	TPMGPSY	15	QVSICPFQK
5	EFQQAQHLRACQQWLHKKEFQQAQH LK	16	VYQTATHLPR
6	KEFQQAQHLK	17	EFQQAQHLRACQQWLHK
7	QAMQSGSGPQGPQQRPELLQCCNE LHQEELCVCPTLK	19	QAMQSGSGPSW
8	TMPGPS	20	IPQVSVCPFQK
9	EFQQAQHLK	21	QVSICPFQK
10	PQGPQQRPELLQCCNELHQEELCV CPTLK	N-terminal	PQGPQQIPLLQQFCNAL HQXAPL
11	QGPQQRPPHQQYCNELQQEELCV CPTLRGASK	Cadeia leve	EFQQAQHLRACQQWLHK
12	TTPGPY		

>XP\_013688210.1 napin-2 [*Brassica napus*]  
MANKLFLVSATLAFFLLTNASIYRTVVEFDEDDATNSAGPFRIPKCRKEFQQAQHLRACQQWLHKQA  
MQSGGGPSWTLDFEFDFFEDDMENPQGPQQRPELLQCCNELHQEELCVCPTLKGASKAVKQQIQ  
QQGQQGKQQMVSRIYQTATHLPKVCNIPQVSVCPFQKTMGPSY

#### 6.1.4 Caracterização estrutural por dicroísmo circular

A figura 13 mostra o comportamento estrutural por dicroísmo circular das albuminas 2S obtidas após cromatografia em fase reversa C18. Os espectros mostraram a predominância de alfa-hélice, estrutura padrão predominante para as albuminas 2S. O dicroísmo circular pode ser utilizado para monitorar alterações conformacionais resultante de alterações como, entre outras variáveis, temperatura ou tempo. Para tanto as amostras foram submetidas a temperatura de 100<sup>0</sup> C e analisadas, tendo sido observado que as estruturas foram mantidas mesmo após desnaturação por aquecimento. Esses dados confirmam a alta estabilidade térmica das albuminas 2S de sementes de crambe.



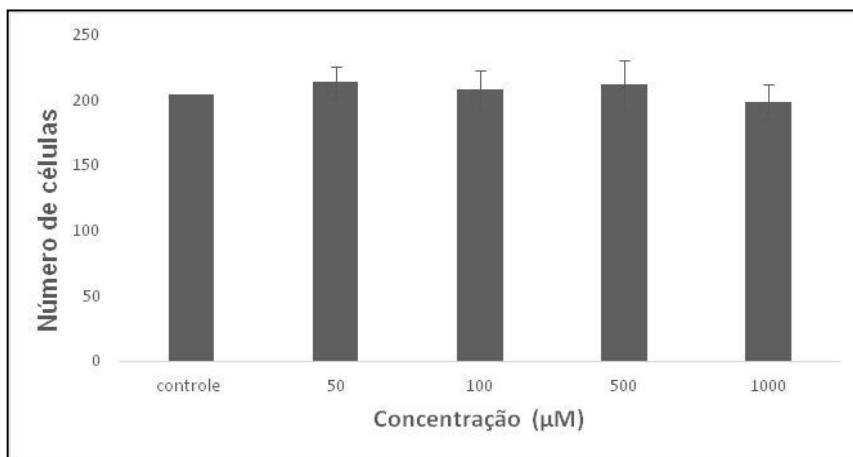
**Figura 13:** Espectro obtido por Dicroísmo circular, frações nativas obtidas após fracionamento em coluna de fase reversa C18 (P1 e P2), das frações após desnaturação por aquecimento a 100<sup>0</sup> C no peltier do equipamento (P1A e P2A).

Os espectros (P1 e P2) exibiram um máximo positivo entre 190 e 200 nm, o que é atribuído às contribuições das pontes dissulfeto da cadeia lateral; e um mínimo a 208 e 220 nm. Tais características espectrais estimam uma predominância da estrutura secundária  $\alpha$ -hélice, e a manutenção da configuração estrutural mesmo após o aquecimento.

## 6.2 Atividade sobre *T. cruzi*

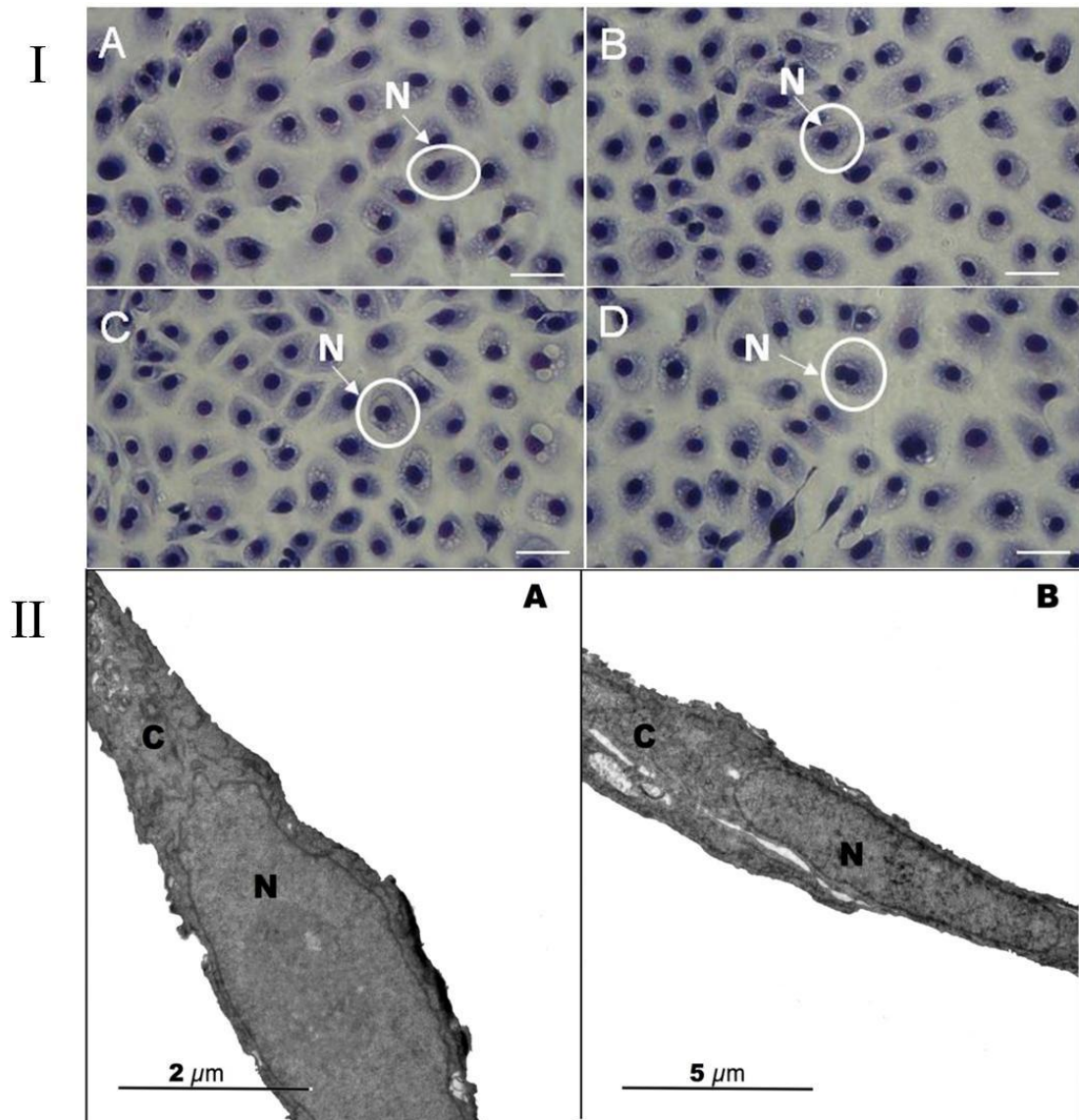
### 6.2.1 A atividade citotóxica da fração FCrF5-20 sobre as células hospedeiras LLC-MK2

Para avaliar se a fração FCrF5-20 tem um efeito tóxico para as células hospedeiras, as células LLC-MK2 foram incubadas com diferentes concentrações desta fração proteica (50, 100, 500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Fig.14). Antes das incubações, as células hospedeiras estavam aderidas ao substrato e o citoplasma não vacuolarizado. Os ensaios de citotoxicidade mostraram que a fração não eliminou as células hospedeiras até a concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . No entanto, à esta concentração, FCrF5-20 promoveu pequenas alterações morfológicas (Fig. 15).



**Figura 14:** Efeito da fração (FCrF5-20) na viabilidade de células LLC-MK2 após 24 h de incubação. Controle: células não tratadas; Teste: células LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações da fração proteica. Número medio de células por mL. Barras verticais representam desvio padrão.

Como a concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  levou a alterações morfológicas nas células hospedeiras, foi realizado um ensaio de reversibilidade para verificar se as células hospedeiras eram capazes de recuperar sua morfologia e viabilidade típica. Para isso as células LLC-MK2 foram incubadas com 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da fração durante 24 h, sendo o meio então substituído por um isento da substância testada; a cultura foi ali mantida por mais 24 h. Nesta situação, 30% das células foram eliminadas (dados não mostrados), sugerindo que o efeito tóxico não é reversível e as células não foram capazes de se multiplicar.



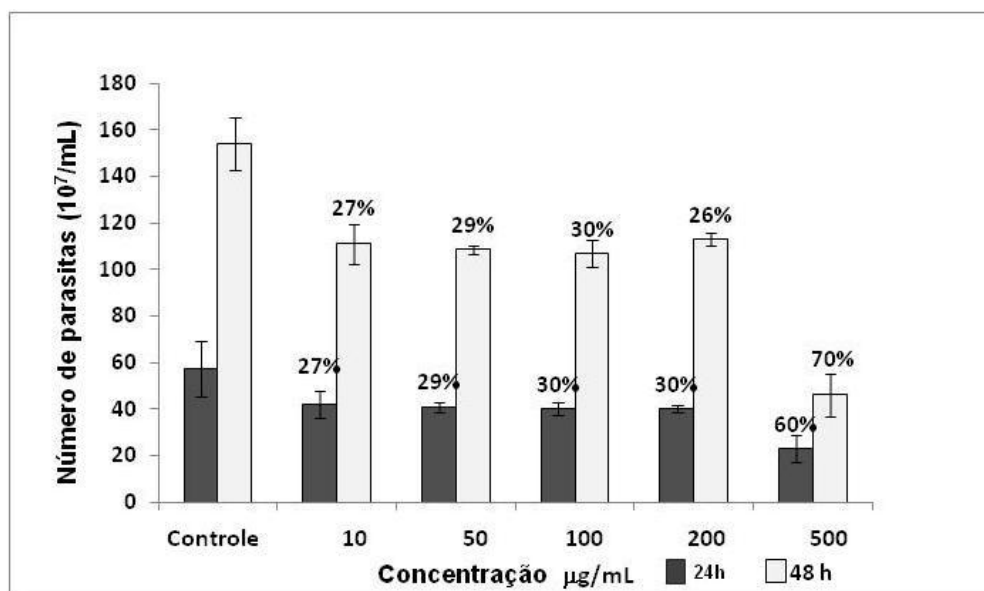
**Figura 15:** Análise estrutural e ultraestrutural das células hospedeiras tratadas fração FCrF5-20: (I) Aspectos morfológicos das células tratadas com FCrF5-20 durante 24 h: (A) células não tratadas, (B) células tratadas com 100 µg/mL, (C) células tratadas com 500 µg/mL, (D) células tratadas com 1000 µg/mL. Setas apontam: citoplasma e núcleo; N= núcleo. Barras 80 µm. (II) Análise ultraestrutural de LLC-MK2 após tratamento com fração FCrF5-20 por 24 h. (A) Células não tratadas, (B) Células tratadas com 500 µg/mL durante 24 h. C= citoplasma, N= núcleo.

Os aspectos morfológicos das células LLC-MK2 foram observados por microscopia óptica. As células não tratadas (Fig.15 I A) ou tratadas com 100-500 µM de FCrF5-20 (Fig.15 I B-C) mostraram a sua morfologia típica com citoplasma espalhado e não vacuolado. No entanto, após 1000 µM (Fig.15 I D) algumas células

apresentaram morfologia deformada, formato alongado, citoplasma condensado e núcleo retraído.

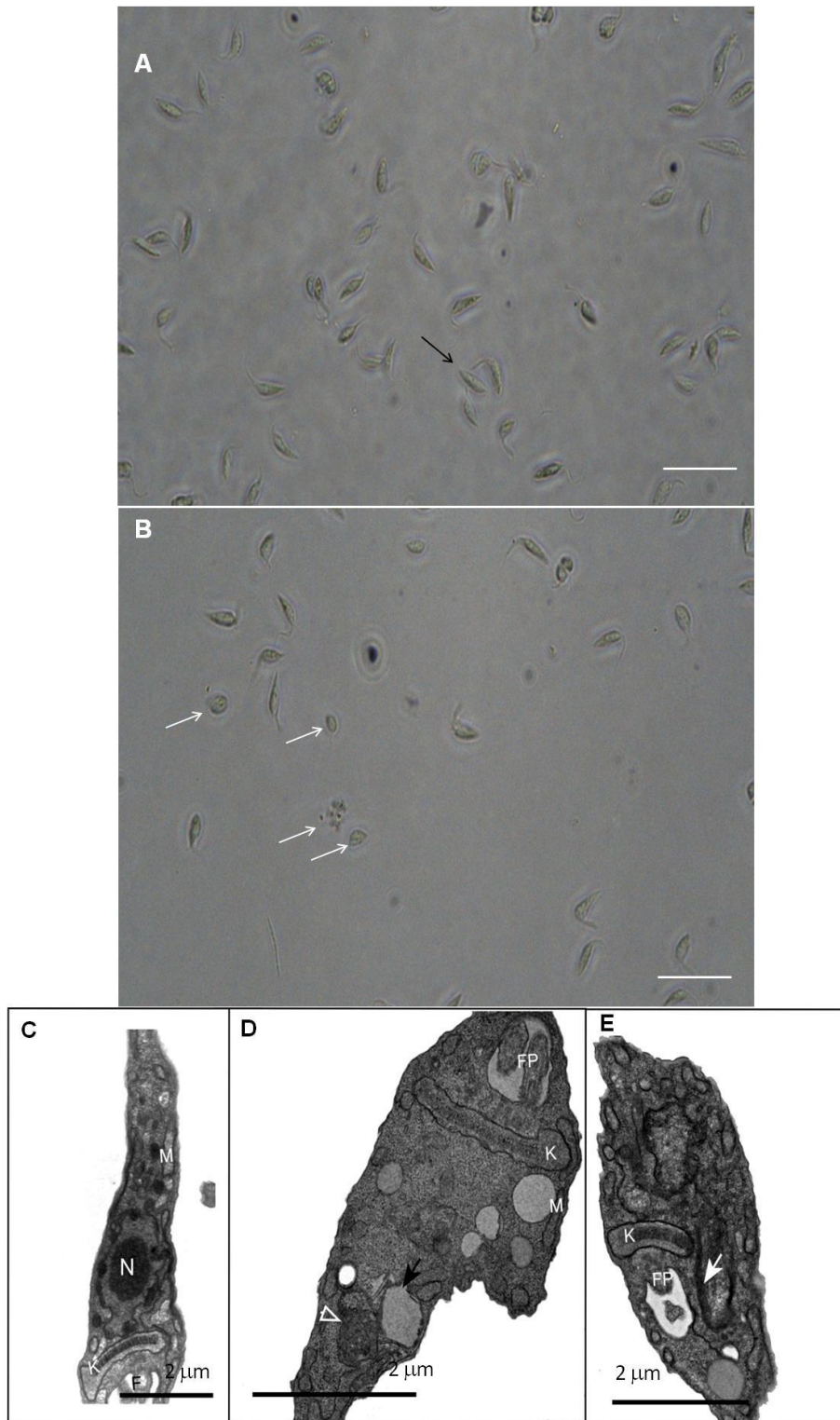
Para investigar a ultraestrutura das células, as análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas nas células não tratadas e tratadas com 500  $\mu\text{g/mL}$  após 24 h de incubação. Em ambos os casos, (sem tratamento: figura 15 IIA e tratada: figura 15 IIB), as células exibiram integridade de membrana e organização intracelular normal, confirmando que este tratamento não foi tóxico para as células hospedeiras e não causou alterações morfológicas e estruturais.

### 6.2.2 Atividade citotóxica da fração FCrF5-20 sobre epimastigota de *T. cruzi*



**Figura 16:** Efeitos da fração FCrF5-20 no crescimento em diferentes concentrações sobre epimastigotas de *T. cruzi* durante 24 e 48 h. A porcentagem acima das barras indicam redução do crescimento dos parasitas em relação ao controle. Barras verticais representam desvio padrão.

Com base nos resultados obtidos com os ensaios das células hospedeiras, o foco foi investigar o efeito tóxico do FCrF5-20 na proliferação de epimastigotas de *T. cruzi*. A citotoxicidade da fração sobre a viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* foi avaliada em diferentes concentrações (10, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 e 48 h. Os efeitos tóxicos foram os mesmos entre 10-200  $\mu\text{g/mL}$  a 24 e 48 hs (30% de eliminação do parasita). No entanto, a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  inibiu 60% do crescimento do parasita após 24 h de incubação e 70% após 48 h (Figura 16).



**Figura 17:** Microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Morfologia dos epimastigotas não tratados (A); dos epimastigotas de *T. cruzi* tratados com a fração proteica 500 µg/mL por 24 h (B). Setas pretas indicam: parasitas viáveis; setas brancas indicam: alterações morfológicas no parasita. Barras de escala = 20 µm. Efeitos ultraestruturais da albumina 2S sobre epimastigotas de *T. cruzi*. (C) epimastigotas não tratadas. (D, E) epimastigotas tratadas com 500 µg/mL por 24 h. A seta preta indica grandes vesículas metabólicas e a seta branca indica corpos multivesiculares. N= núcleo; FP= bolso flagelar; M= mitocôndria; K= cinetoplasto.

Através da microscopia óptica, análises da morfologia dos parasitas foram feitas para observar possíveis desorganizações estruturais em consequência do tratamento. Essas análises foram realizadas para as amostras tratadas com FCrF5-20 a 500 µg/mL durante 24 h. As análises revelaram que os parasitas não tratados mostraram sua morfologia típica com corpo alongado e flagelo íntegro (Figura 17A); no entanto, foram observadas alterações morfológicas nos epimastigotas tratados, tais como: fenótipo arredondado, condensação citoplasmática e perda flagelar (Figura 17B).

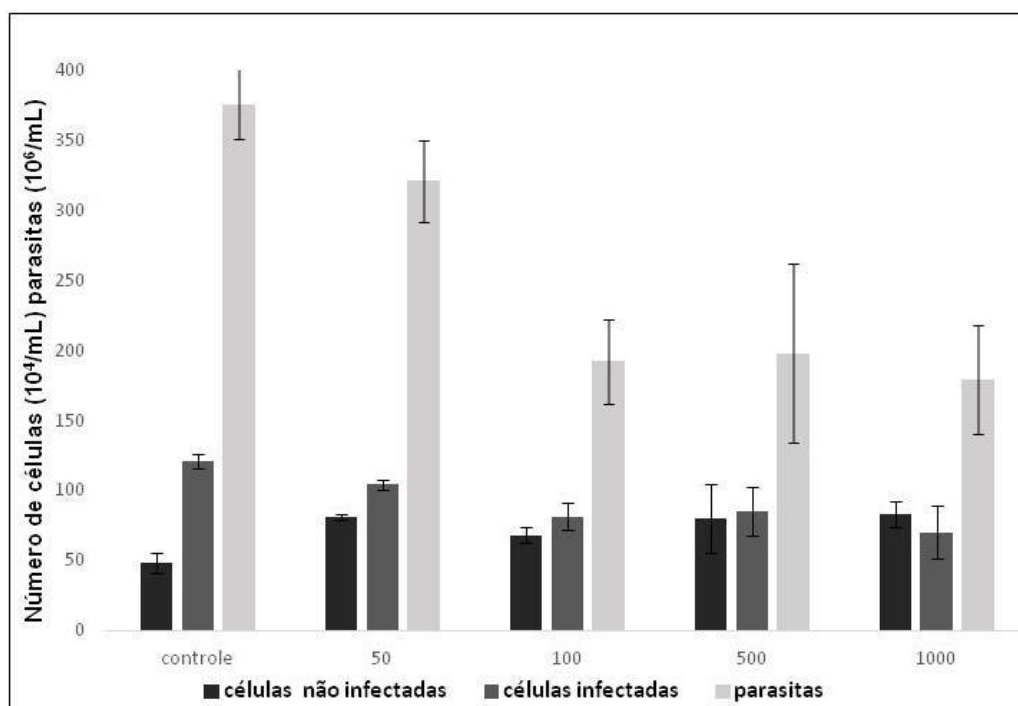
Para avaliar alterações ultraestruturais resultante do tratamento com a fração proteica sobre os parasitas, microscopia eletrônica de transmissão foi realizada. Epimastigotas controle apresentaram ultraestrutura normal com corpo alongado com núcleos, mitocôndrias, bolsas flagelares e cinetoplastos típicos (Fig. 17C). Entretanto os epimastigotas tratadas com 500 µg/mL por 24 h apresentaram cinetoplasto alterada, grandes vesículas metabólicas, corpos multivesiculares (indícios de vacúolos autofágicos) (Fig. 17D), edema mitocondrial intenso e multinucleação (Fig. 17E).

### **6.2.3 Atividade citotóxica da fração FCrF5-20 sobre amastigota de *T. cruzi***

Após estudar o efeito da fração proteica sobre os parasitas na forma epimastigota, o próximo passo foi avaliar o efeito tóxico no crescimento *in vitro* de formas intracelulares amastigotas, nas concentrações variando de 50 a 1000 µg/mL (Fig. 18). Não foram observados efeitos tóxicos para as células hospedeiras após as incubações com a proteína. No entanto, foi observada uma redução no número médio de células infectadas (barras cinzentas) e no número de parasitas (de 376 para 179), enquanto o número médio de células não infectadas aumentou (de 48 para 83).

Os efeitos morfológicos e ultraestruturais da fração proteica nas formas intracelulares do *T. cruzi* também foram estudados. Os materiais parasitados, tratados com albuminas 2S ou não, foram processados para microscopia óptica para verificar seu aspecto morfológico. Nas células infectadas não tratadas é visível número elevado de amastigotas e ambas as células e parasitas apresentaram morfologia típica preservada (Fig. 19A). Em contraste, a morfologia dos parasitas nas células infectadas tratadas com a fração mudou (Fig. 19B), e os parasitas

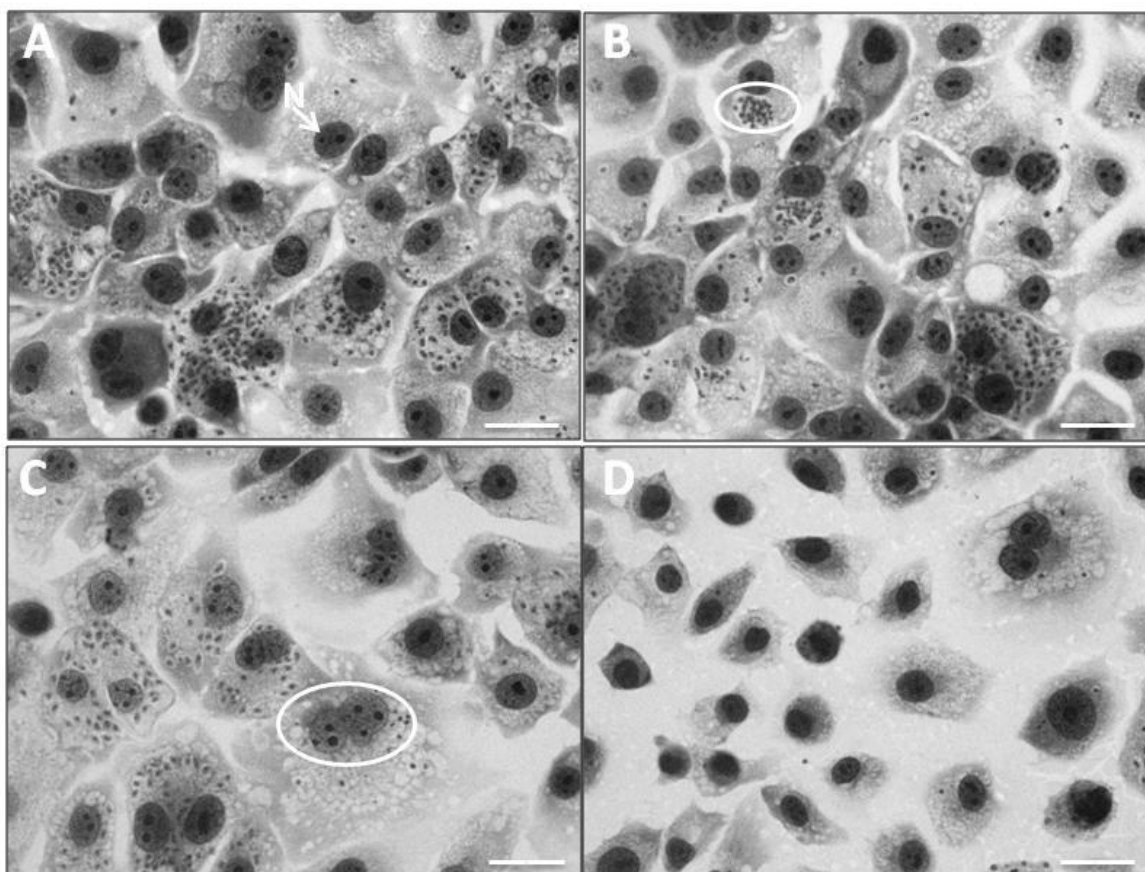
intracelulares mostraram alterações, tais como forma arredondada e tamanho celular reduzido.



**Figura 18:** Efeitos das diferentes concentrações (50, 100, 500, 1000 µg/mL) da fração FCrF5-20 em células LLC-MK2 infectadas tratadas durante 24 h. Barras verticais representam desvio padrão.

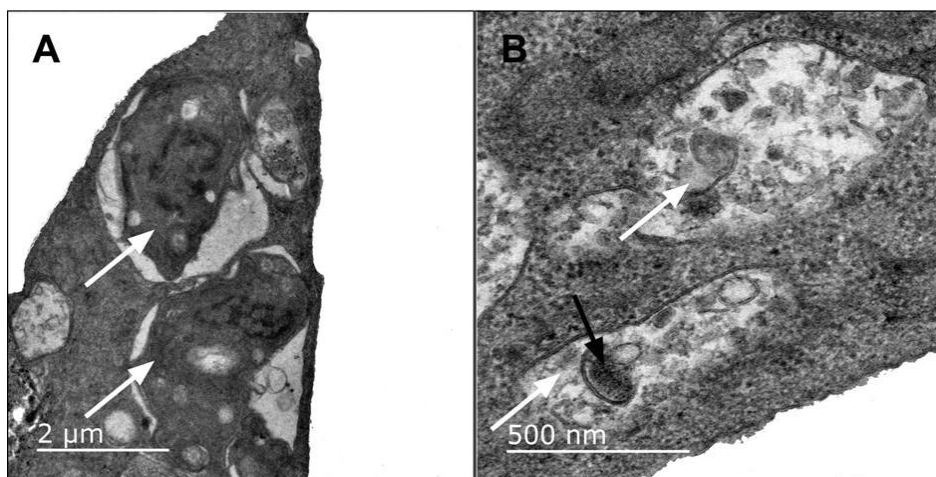
Foi possível notar uma redução no número de células infectadas com o aumento da concentração, sugerindo a eliminação de parasitas intracelulares (Figura 19 B-D). Os parasitas parecem estar reunidos em uma estrutura citoplasmática para facilitar sua eliminação pela célula hospedeira (Figura 19B). Adicionalmente foi possível notar que o tratamento usado não causou efeitos citotóxicos drásticos para a célula hospedeira.





**Figura 19:** Microscopia óptica de células hospedeiras infectadas, após tratamento com diferentes concentrações da fração proteica FCrF5-20. (A) Controle. (B) Células tratadas com 50 µg/mL. (C) Células tratadas com 500 µg/mL. (D) Células tratadas com 1000 µg/mL. As formas ovais brancas indicam aglomeração dos amastigotas. N= núcleo. Barras de escala = 110 µm.

Os resultados mostrados acima nos levaram a avaliar os efeitos ultraestruturais do FCrF5-20 no *T. cruzi* intracelular, através da microscopia eletrônica de transmissão. As células infectadas não tratadas exibiram uma arquitetura preservada e os amastigotas intracelulares, estrutura típica (Fig. 20 A). A intensa vacuolização com a presença de material degradado nas células infectadas tratadas (Fig. 20 B) indicou a destruição do parasita, não sendo mais percebido no citoplasma do hospedeiro, demonstrando o alto grau de atividade antiparasitária da fração proteica.

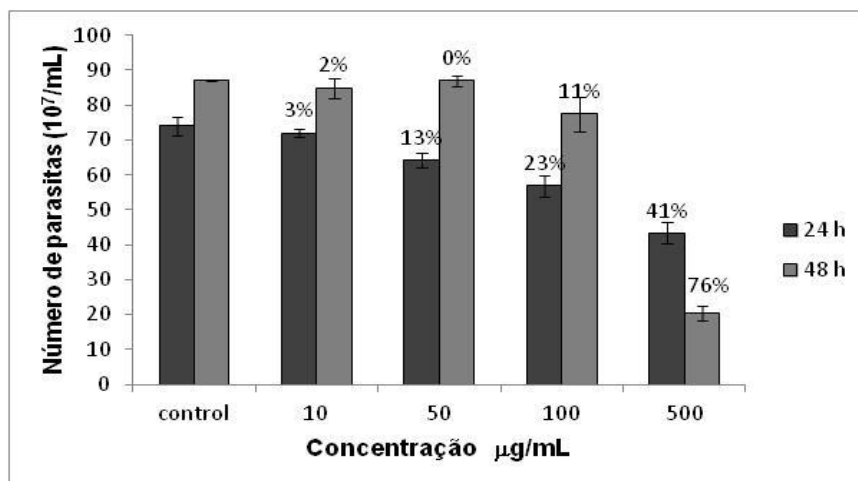


**Figura 20:** Análises dos efeitos ultraestruturais da fração FCr5-20 nas formas intracelulares do *T. cruzi*. (A) Controle. (B) Células infectadas tratadas com 500 µg/mL durante 24 h. Setas pretas= cinetoplasto ainda preservado; setas brancas= parasita intracelular.

#### 6.2.4 Atividade citotóxica da fração (FCr5-20) sobre epimastigotas de *T. cruzi*, após separação das bandas proteicas

De acordo com os dados obtidos por espectrometria de massas, a fração FCr5-20 contém proteínas albuminas 2S e uma defensina. Diante disto, essa fração foi purificada em Sephadex G25 e a fração de albumina 2S foi isolada (Fig.11).

A citotoxicidade dessas proteínas após separação sobre a viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* foi avaliada em diferentes concentrações (10, 50, 100, 500 µg/mL) durante 24 e 48 h. O ensaio antiparasitário mostrou que só a fração contendo albumina 2S tem atividade tóxica contra *T. cruzi* (Fig. 21); a fração contendo a defensina não apresentou qualquer dano na viabilidade dos parasitas (dados não mostrados). A proteína albumina 2S purificada promoveu eliminação de 41 e 76% dos parasitas em 24 e 48 h, respectivamente, na concentração de 500 µg/mL.



**Figura 21:** Efeitos citotóxicos da albumina 2S após purificação sobre epimastigotas de *T. cruzi* durante 24 e 48 h. A porcentagem acima das barras indicam o grau de eliminação dos parasitas em relação ao controle. Barras verticais representam desvio padrão.

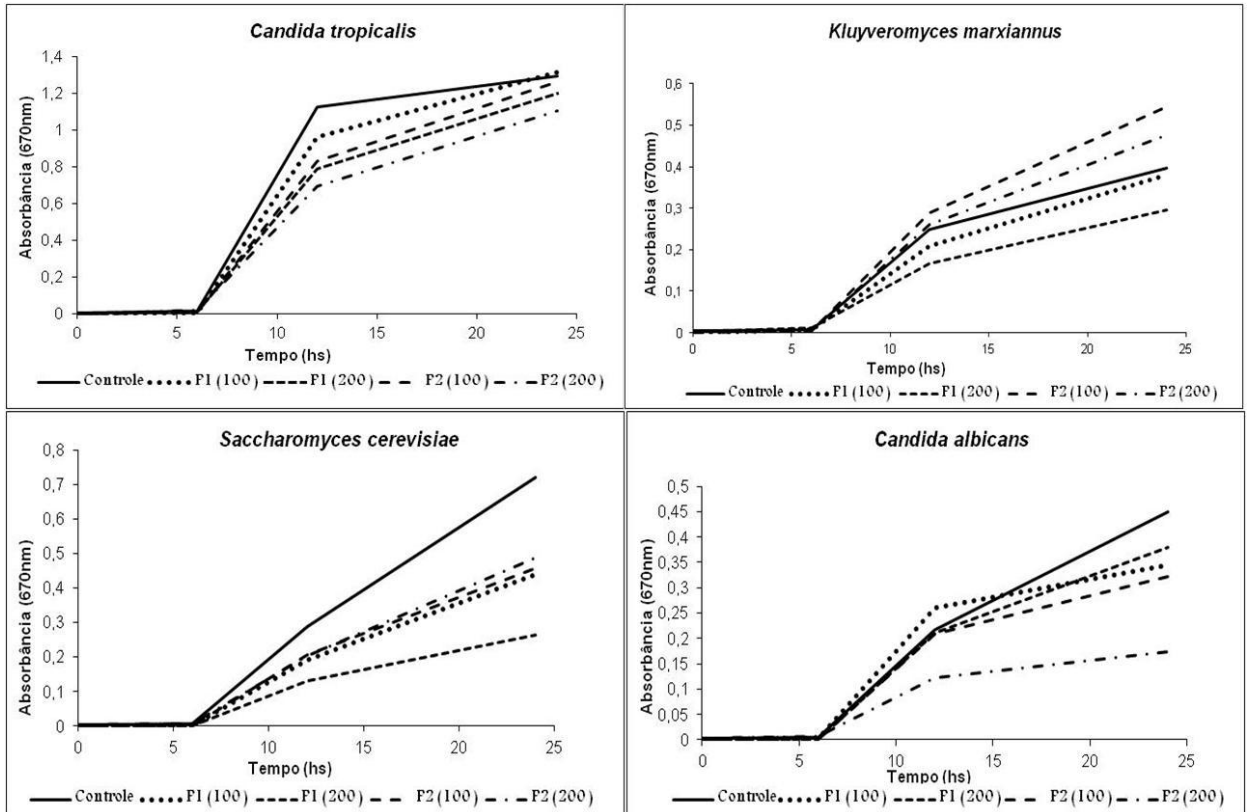
### 6.3 Caracterização da atividade antifúngica de albuminas 2S

#### 6.3.1 Atividade antimicrobiana das albuminas 2S de sementes de crambe sobre o crescimento de leveduras

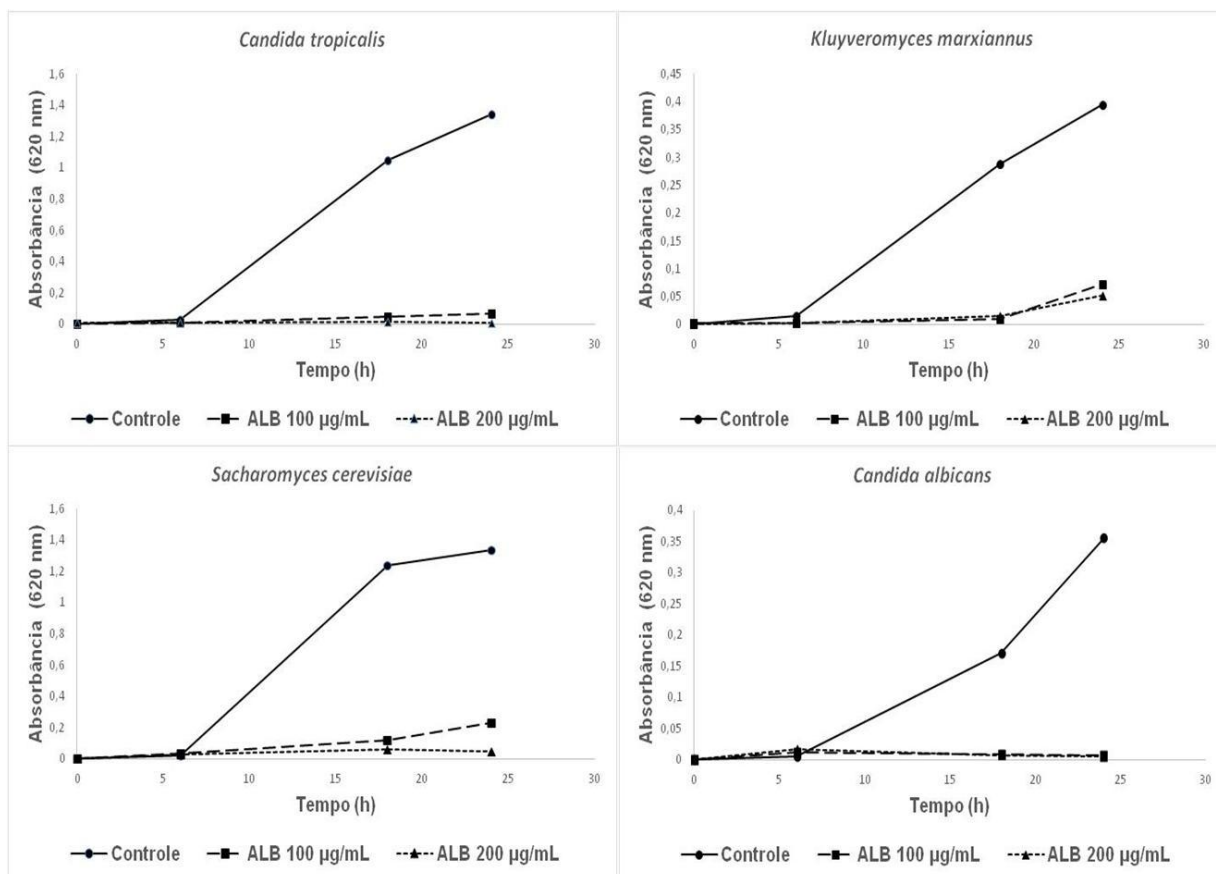
Um ensaio de crescimento de leveduras foi realizado para analisar os efeitos das frações de albumina 2S (P1-P2) obtidas após cromatografia de fase reversa, e fração F1' obtida após cromatografia em Sephadex G25, sobre o crescimento de diferentes espécies de leveduras, na presença de 100 e 200 µg/mL das frações. As frações P1 e P2, P1 apresentou efeito inibitório no crescimento das leveduras testadas (Fig. 22), a saber, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *K. marxianus* com exceção de *C. tropicalis*, já P2 não inibiu o crescimento somente da espécie *K. marxianus*. Destaque-se que P1 e P2 (200 µg/mL) causaram inibição de cerca de 70% no crescimento de *S. cerevisiae* e *C. albicans* em relação ao controle respectivamente.

A figura 23 mostra as curvas de crescimento das leveduras na presença da fração correspondente às albuminas 2S de sementes crambe após fracionamento em exclusão molecular G25. Foi verificado o desenvolvimento das leveduras *C. tropicalis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*. A fração de albuminas 2S inibiu o crescimento das leveduras em mais de 95% quando comparado ao controle. Nota-

se atividade semelhante para ambas as concentrações de albuminas 2S usadas (100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ), sobre todas as espécies.



**Figura 22:** Efeito sobre o crescimento das leveduras na presença das frações de albuminas 2S (P1 e P2) isoladas após cromatografia de fase reversa. Concentrações em  $\mu\text{g/mL}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata.



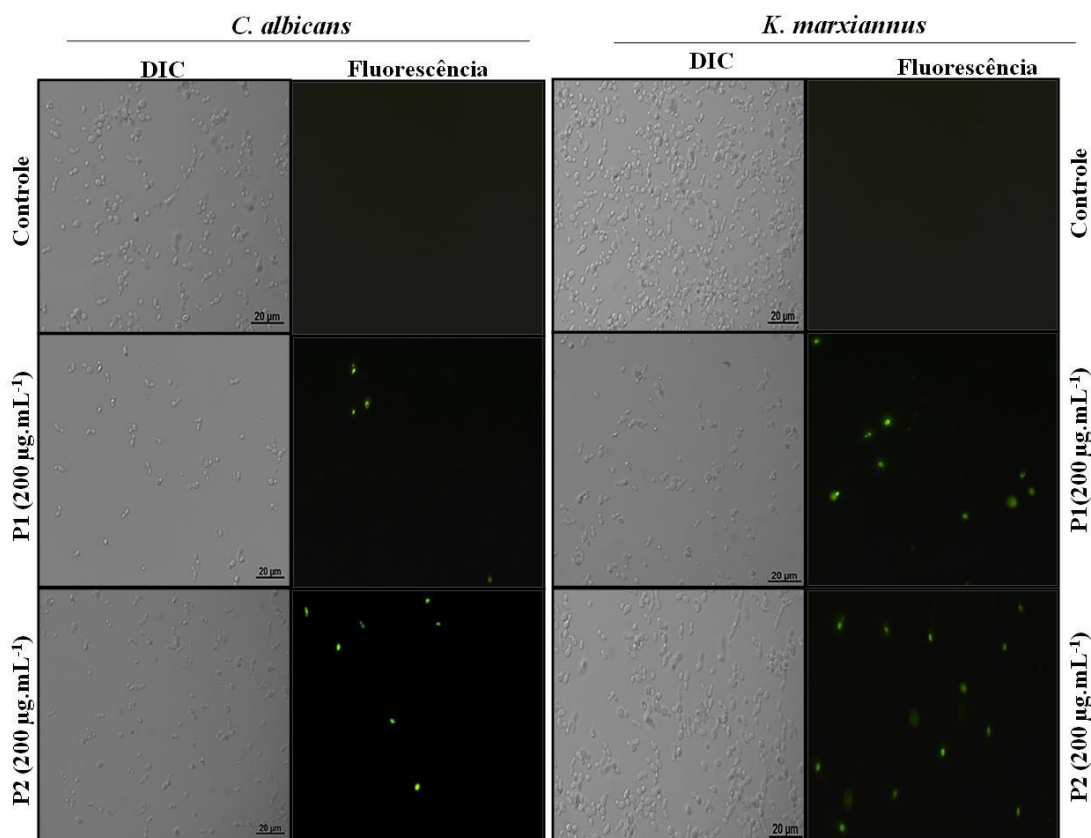
**Figura 23:** Efeito das albuminas 2s (F1') sobre o desenvolvimento das leveduras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 6.3.2 Efeito das albuminas 2S de sementes de crambe sobre a permeabilização de membranas das leveduras

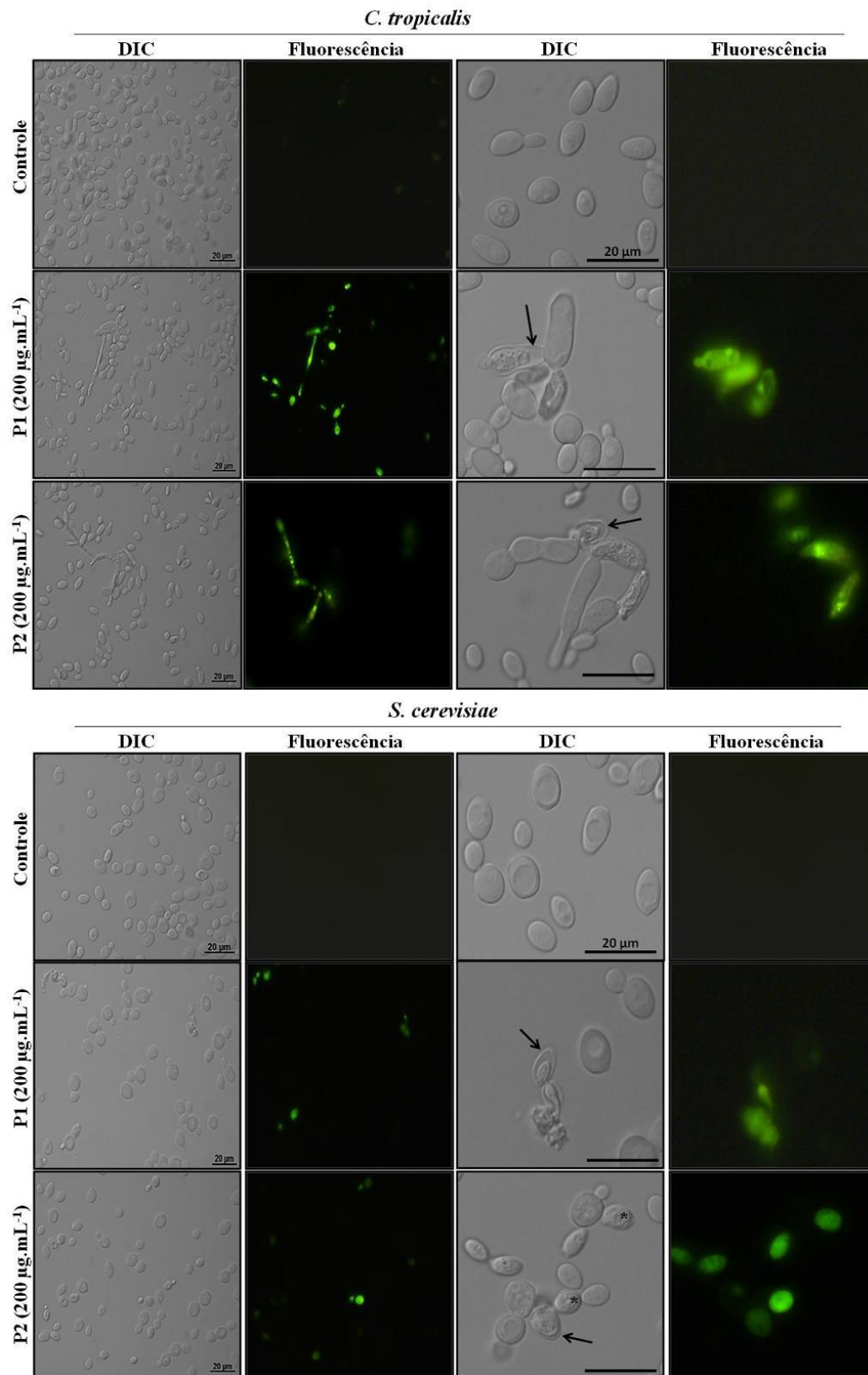
O efeito das frações de albuminas 2S isoladas de sementes de crambe sobre a permeabilização de membrana das leveduras testadas no ensaio de inibição foi avaliado utilizando o corante *Sytox green* para verificar possível comprometimento na membrana dos microrganismos resultante da incubação com a proteína. O dano é comprovado pela penetração do corante na célula, já que este se liga ao DNA e emite fluorescência.

As Figuras 24 e 25 mostram os dados obtidos por microscopia de fluorescência. Nenhuma fluorescência é observada para as amostras controles, ou seja, na ausência das albuminas 2S. Porém observou-se que as frações (P1 e P2), na concentração testada, foram capazes de permeabilizar a membrana das quatro espécies de leveduras testadas quando comparado ao controle. Observa-se com um

maior aumento da visualização indicado pelas setas, alterações morfológicas nas células *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* após tratamento (Fig. 25).

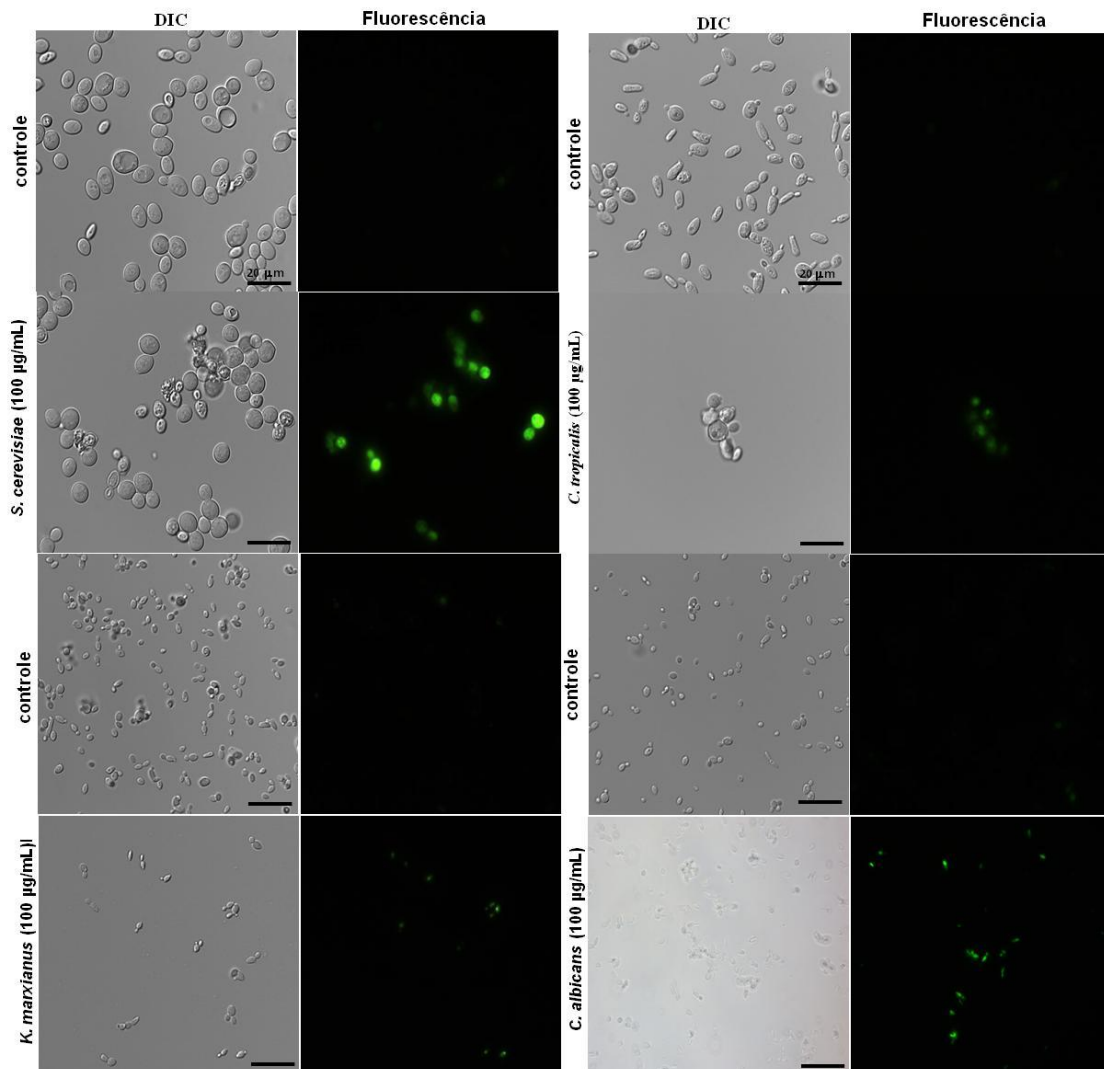


**Figura 24:** Microscopia confocal das células (*C. albicans* e *K. marxianus*) tratadas com Sytox Green após 24 h de incubação com as frações (P1 e P2) e visualizadas em microscopia óptica DIC e de fluorescência. Aumento 630X.



**Figura 25:** Microscopia confocal das células (*C. tropicalis* e *S. cerevisiae*) tratadas com *Sytox Green* após 24 h de incubação com as frações (P1 e P2) e visualizadas em microscopia óptica de DIC e de fluorescência. Aumento 630X. As setas indicam alterações morfológicas visíveis com recorte da imagem original.

Foi realizado um ensaio de permeabilização de membrana para as leveduras: *C. tropicalis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, após incubação com as albuminas 2S purificadas obtida após cromatografia de gel filtração em Sephadex G25. Os resultados foram semelhantes aos obtidos no ensaio com as frações proteicas obtidas após cromatografia de fase reversa (P1 e P2). Observou-se que essas proteínas causaram danos nas membranas uma vez que houve captação do corante gerando a marcação fluorescente (Fig. 26). Através dos resultados de permeabilização de membranas pode se constatar que essas proteínas provavelmente agem por esse mecanismo de ação.



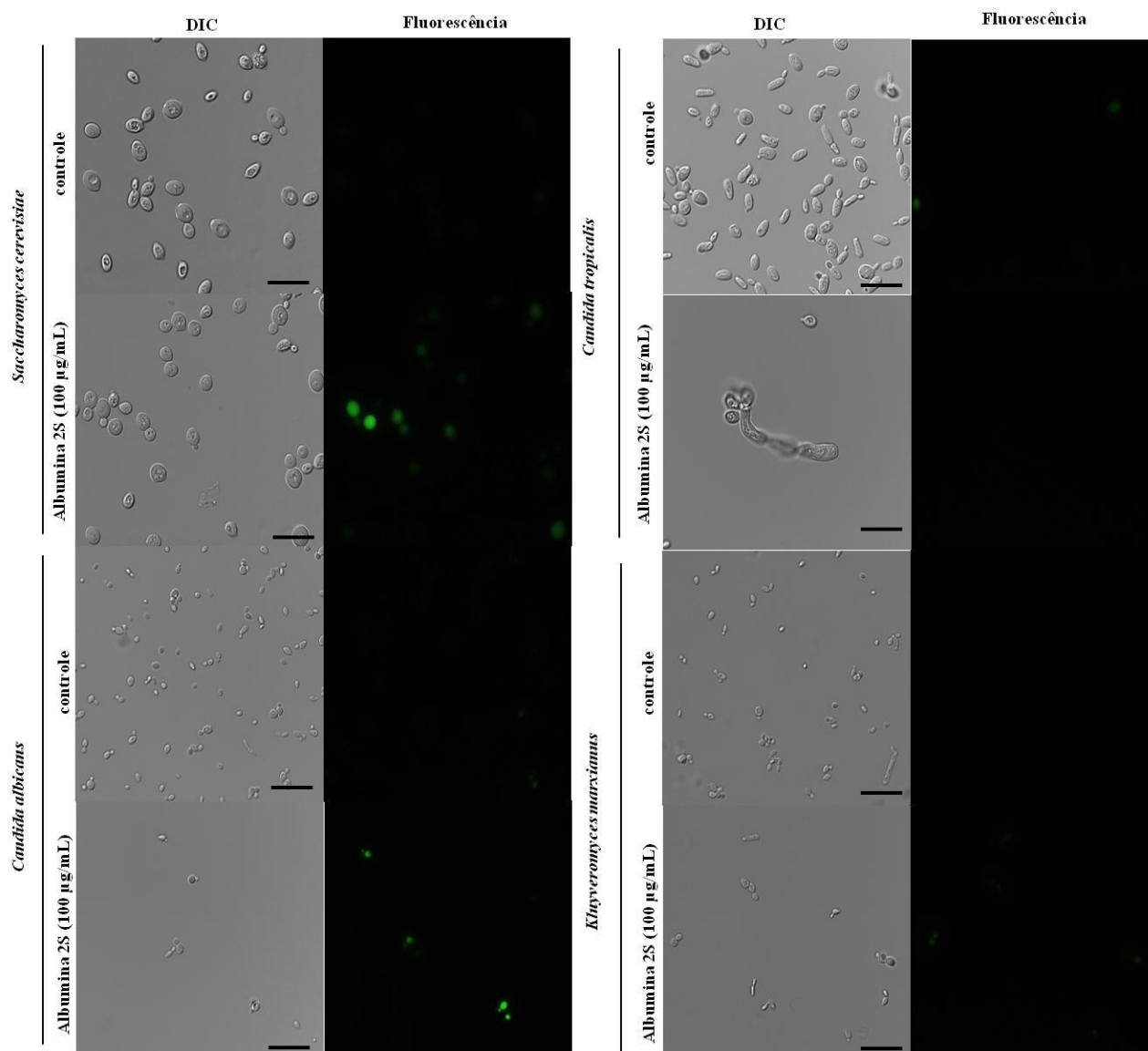
**Figura 26:** Microscopia confocal das células tratadas com *Sytox Green* após 24 h de incubação com as albuminas 2S, fração (F1') isolada em Sephadex G25 e visualizadas em microscopia óptica DIC e fluorescência. Aumento 630X.



### **6.3.3 Efeito das albuminas 2S de sementes de crambe sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de leveduras**

Para verificar a indução da produção endógena de ROS em células das leveduras *C. tropicalis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, as amostras controles e tratadas foram incubadas com corante DIC e visualizadas por microscopia óptica de campo claro e de fluorescência.

Pode se observar na figura 27 que a amostras controle as células aparecem bem separadas e não é visível nenhuma fluorescência. Resultado semelhante ao controle foi observado para as células de *C. tropicalis* e *K. marxianus*, porém para as células de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, observa-se nitidamente marcação fluorescente, indicando assim que a albumina 2S provocou danos nas células induzindo a produção de ROS e a marcação pelo corante utilizado. A não marcação fluorescente indicando resultado negativo para as amostras tratadas (*C. tropicalis* e *K. marxianus*) indica que possivelmente esse mecanismo de indução de ROS já pode ter ocorrido antes do momento do ensaio para essas espécies testadas.



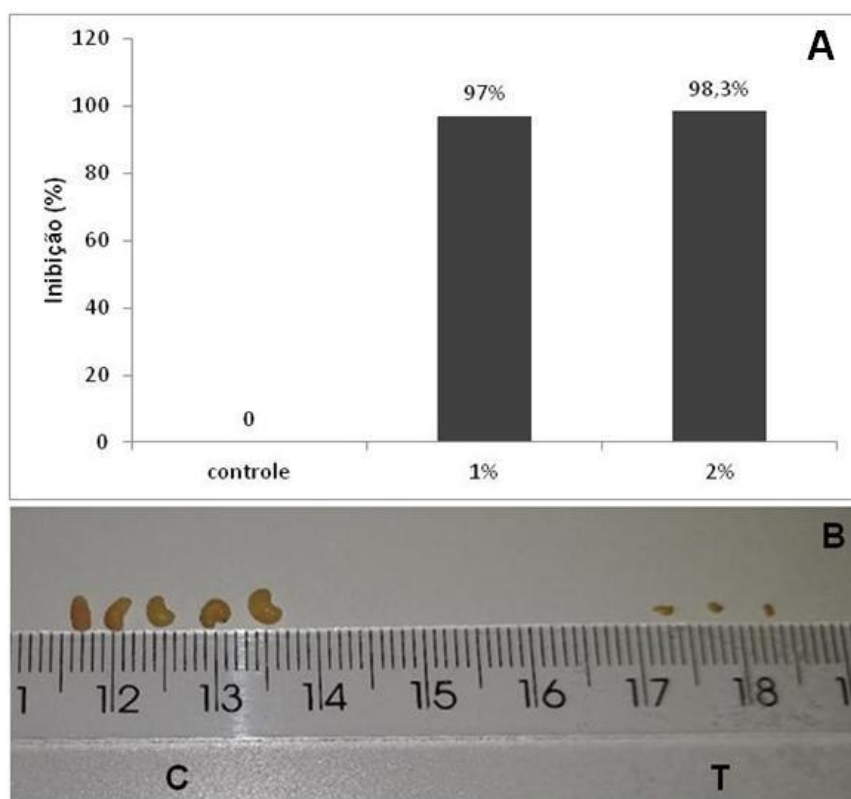
**Figura 27:** Estresse oxidativo por microscopia das células de leveduras tratadas e não tratadas e incubadas com o corante 2',7' diclorofluoresceína diacetato (DIC após 24 h de incubação com as albuminas 2S, fração (F1') isolada em Sephadex G25. Microscopia óptica DIC e de fluorescência. Aumento 630X. Barra 20 µm.

## 6.4 Caracterização da atividade inibitória de albuminas 2S sobre atividade enzimática e crescimento de larvas de insetos

### 6.4.1 Ensaios *in vivo* com sementes artificiais

Para se testar o potencial bioinseticida das proteínas albuminas 2S de sementes de crambe, utilizamos como modelo o inseto *C. maculatus*. Para isso foi

realizado um ensaio biológico utilizando sementes artificiais, com diferentes concentrações da proteína albuminas 2S após purificação em Saphadex G25 (1 e 2%).

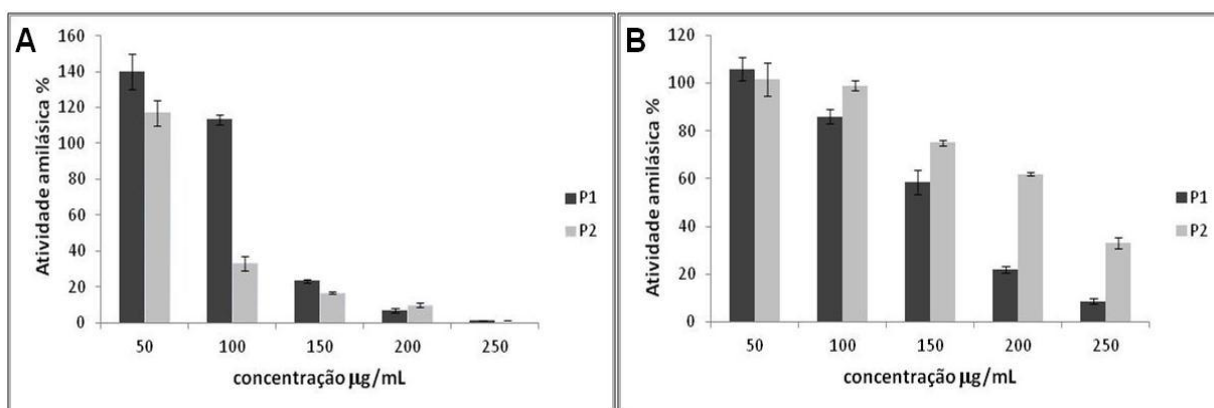


**Figura 28:** Desenvolvimento de larvas alimentadas com sementes artificiais contendo albuminas 2S de sementes de crambe, após purificação em Saphadex G25. (A) Porcentagem de inibição considerando a massa do total de larvas das triplicatas em relação ao controle. (B) Imagens das larvas. (C) controle; (T) tratada.

As larvas controle, ou seja, as alimentadas com a semente sem a proteína testada se desenvolveram normalmente, apresentando tamanho e massa equivalentes para a idade. As larvas alimentadas com as sementes contendo as albuminas 2S sofreram uma perda significativa de massa e tamanho, quando comparadas às do controle. Para a concentração de 1% ocorreu alto nível de mortalidade, restando apenas uma sobrevivente, de nove, com massa de 3,04 mg; para a concentração de 2% sobreviveram quatro larvas, porém minúsculas, com massa total (4 larvas) de 2,7 mg. Assim ambas as concentrações foram letais para a maioria das larvas do ensaio, ou afetaram drasticamente o desenvolvimento das sobreviventes.

### 6.4.2 Ensaio de inibição da atividade da $\alpha$ -amilase salivar e da $\alpha$ -amilase dos insetos *C. maculatus*

Neste estudo analisamos a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase salivar e de larvas de insetos *C. maculatus* após incubação com a fração da albumina 2S. O ensaio foi realizado para verificar possível atividade inibitória das albuminas 2S à atividade dessas enzimas. Para esse ensaio foram utilizadas as frações obtidas após purificação em cromatografia de fase reversa (Fig. 8B) em diferentes concentrações (50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{g/mL}$ ).

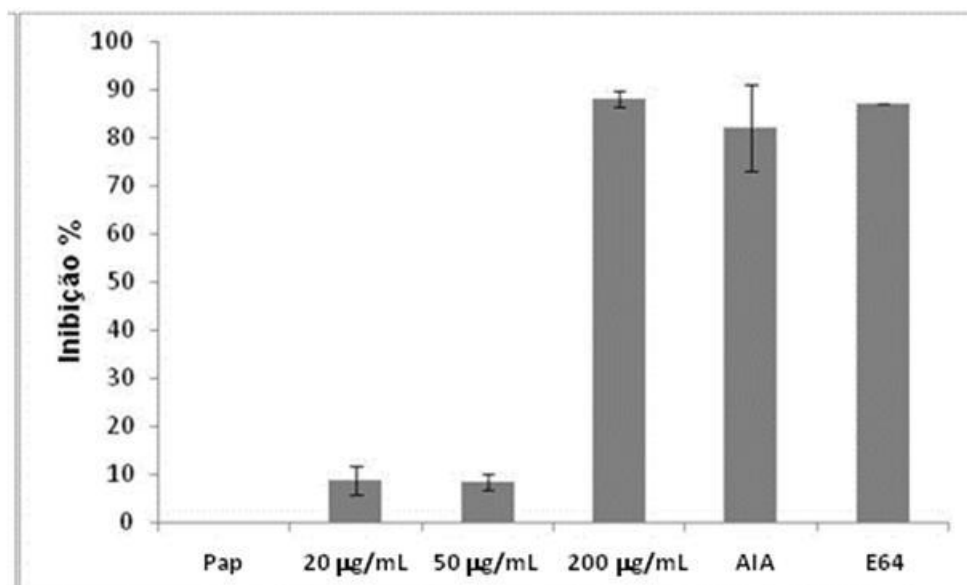


**Figura 29:** Efeito das frações de albuminas 2S (P1 e P2) sobre a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase salivar humana (A) e larval do inseto *C. maculatus* (B). Os experimentos foram realizados em triplicata. Barras verticais representam desvio padrão.

De acordo com o resultado obtido (figura 29) a atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana sofreu uma redução que aumenta com o aumento da concentração da proteína, a partir de 150  $\mu\text{g/mL}$  a queda da atividade já é acentuada e reduz quase que completamente para ambas as frações (P1 e P2). Observa-se também atividade inibitória das frações sobre as  $\alpha$ -amilases de larvas de *C. maculatus*, a partir da concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , que aumenta com a concentração. A amostra P1 mostrou maior eficiência inibitória quando comparado a P2.

#### 6.4.3 Ensaio de inibição da atividade da protease cisteínica papaína *in vitro*

A atividade de proteinases cisteínicas do tipo papaína foi avaliada após incubação da enzima adquirida comercialmente com a albumina 2S purificada em uma Sephadex G25. Diferentes concentrações da proteína isolada foram utilizadas para o ensaio de inibição (20,50 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ), (Fig. 30).



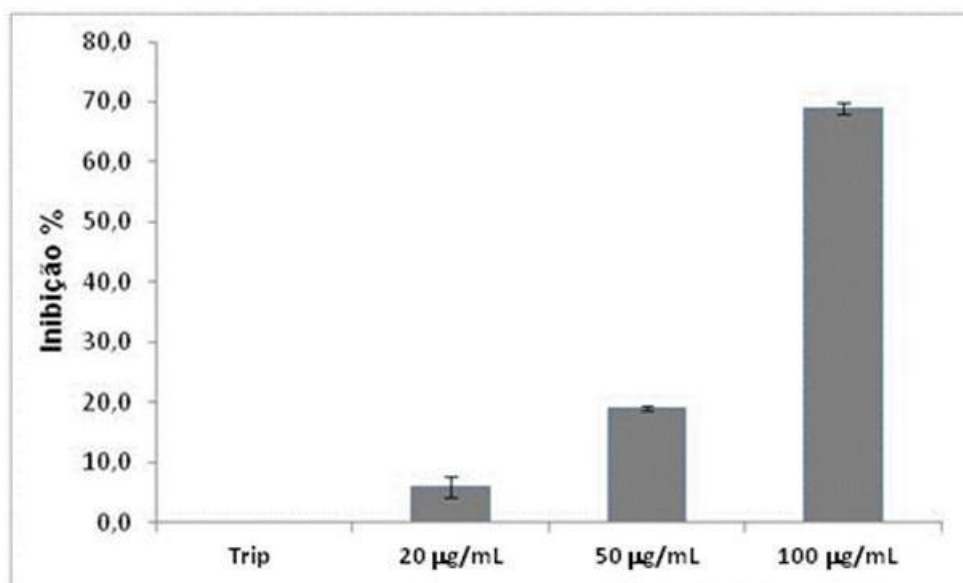
**Figura 30:** Dosagem da atividade inibitória da albumina 2S sobre a atividade da papaína. % de inibição comparada com a atividade da enzima sem o inibidor. AIA (ácido iodo acético) e E64: inibidores padrão da enzima papaína (10  $\mu\text{M}$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata. Barras verticais representam desvio padrão.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição sobre a enzima papaína foram expressos em porcentagem. Para as concentrações iniciais a inibição não foi acentuada, porém com 200  $\mu\text{g/mL}$  a inibição chegou a aproximadamente 90%, valor esse próximo ao dos inibidores padrão adquiridos comercialmente. Esse resultado demonstra o potencial das albuminas 2S de sementes de crambe em inibir protease cisteínica do tipo papaína

#### 6.4.4 Ensaio de inibição da atividade da protease serínica tripsina *in vitro*

Dando sequência ao estudo de caracterização da atividade inibitória das albuminas 2S de sementes de crambe sobre atividade enzimática, a atividade da

enzima tripsina foi avaliada. Após etapa de incubação com diferentes concentrações da proteína teste, albumina 2S, a atividade da enzima foi avaliada.



**Figura 31:** Dosagem da atividade inibitória da albumina 2S sobre a atividade da tripsina. % de inibição comparada com a atividade da enzima sem o inibidor. Os experimentos foram realizados em triplicata. Barras verticais representam desvio padrão.

Para realização do ensaio a enzima foi incubada com albumina 2S isolada pelo fracionamento em Sephadex G25 nas concentrações de 20, 50 e 100 µg/mL (Fig. 31). De acordo com os resultados obtidos a inibição iniciou baixa, porém foi crescente com o aumento da concentração da proteína, chegando a 70% para a maior concentração. A porcentagem foi calculada referente à amostra controle, ou seja, atividade da enzima sem a presença do inibidor.

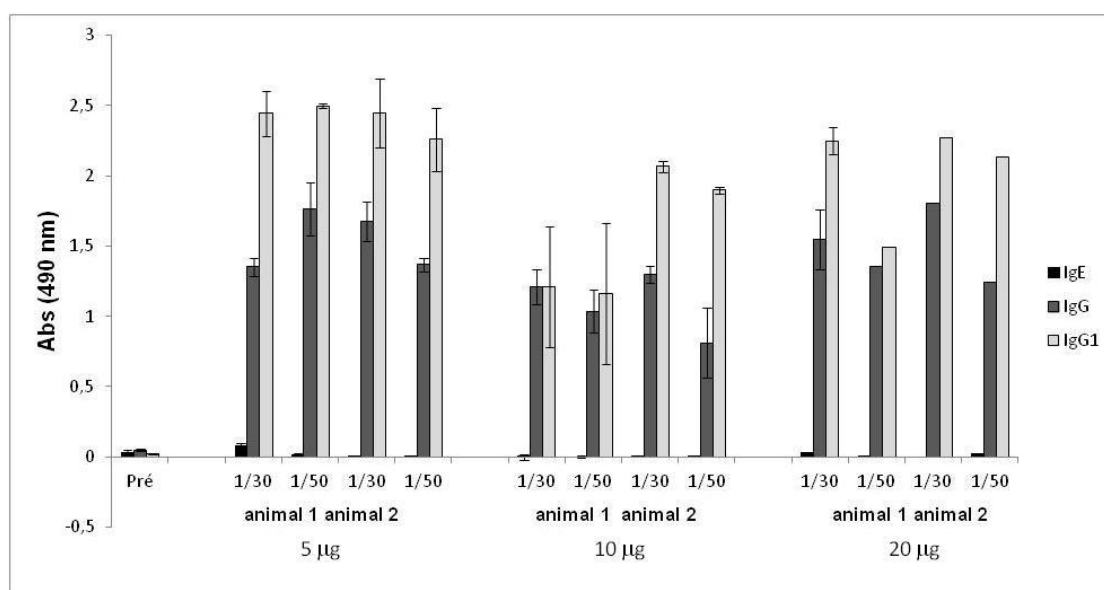
## 6.5 Caracterização imunológica

O perfil alergênico das albuminas 2S de sementes de crambe foi analisado a partir da proteína isolada do último processo de purificação em Sephadex G25 (Fig.11). Camundongos do tipo BALB/C foram imunizados com a proteína purificada e o soro obtido da sangria foi analisado por ELISA e ensaio de anafilaxia cutânea passiva (PCA) *in vivo*.

### 6.5.1 Avaliação da imunorreatividade por ensaio de ELISA e PCA. Monitoramento da produção de anticorpos (IgG, IgG1, IgE)

O ensaio de ELISA foi realizado individualmente a partir do soro obtido de cada animal imunizado seguindo o protocolo de sete dias, com aplicação de diferentes quantidades de proteína (5, 10 e 20  $\mu\text{g}$ ).

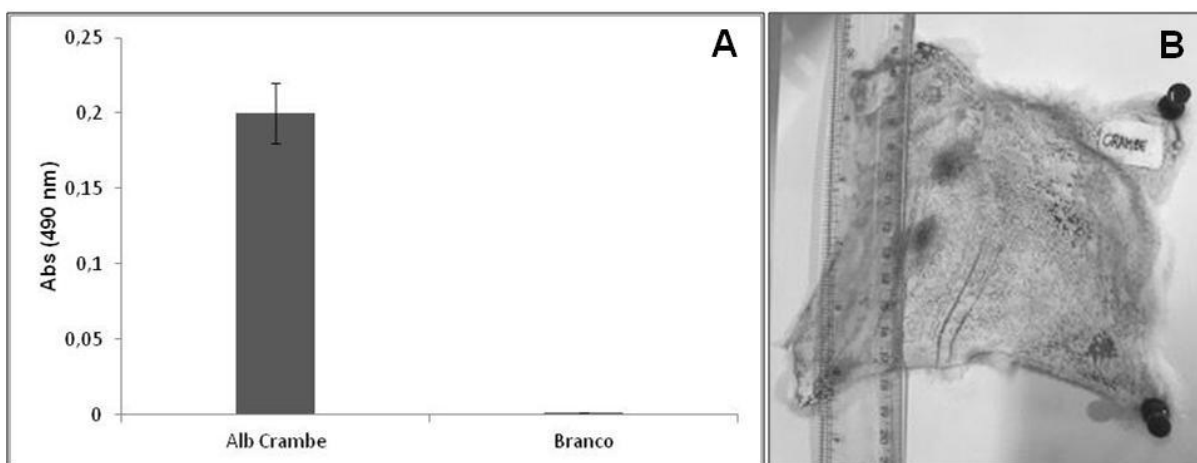
A presença de anticorpos IgG e IgG1 contra albuminas 2S foi detectada em todos os animais analisados, porém a presença de anticorpos IgE específico não foi detectável para as condições do ensaio (Fig. 32). Os animais exibiram resposta imunológica semelhante, no que tange aos níveis de anticorpos IgG e IgG1, para diferentes quantidades de proteína aplicada. Assim 5  $\mu\text{g}$  da proteína isolada foram utilizados para injeções no segundo grupo de animais, mas com intervalo de imunização mais longo, 30 dias; o pool do soro obtido de três animais foi analisado por ELISA para detecção de IgE e PCA.



**Figura 32:** Perfil de anticorpos produzidos em resposta à imunização. Pré: soro coletado pré-imunização. A legenda horizontal logo abaixo representa a diluição do soro. Os experimentos foram realizados em duplicata. Barras verticais representam desvio padrão.

Uma proteína para ser considerada um alérgeno deve: i) induzir uma resposta Th2, onde os níveis de interleucinas específicas como IL4 e anticorpos do tipo IgE devem ser produzidos; ii) deve ser reconhecidas pelas IgE pré-fixadas aos mastócitos e iii) devem, em um segundo contato, induzir a desgranulação dos

mastócitos. O teste de anafilaxia cutânea passiva, PCA, é um teste realizado *in vivo* que avalia esta resposta. Para o segundo grupo de animais imunizados foram detectados anticorpos tipo IgE no pool do soro dos animais, indicando que esta proteína apresenta uma das características descritas para um alérgeno (Fig. 33 A). A capacidade das albuminas 2S de sementes de crambe em deflagrar a resposta alérgica, avaliada pelo teste PCA realizado em ratos, é apresentada na figura 33 B. O anti-soro contendo anticorpos IgE, obtido da imunização dos camundongos (protocolo de imunização de trinta dias), foi injetado na pele dorsal de um rato, o animal foi desafiado em vários momentos posteriores com excesso de antígeno mais corante. As lesões foram detectadas na pele indicando reações de PCA; portanto, albuminas 2S de sementes de crambe induzem desgranulação de mastócitos *in vivo*.



**Figura 33:** Ensaio de ELISA e reação de PCA (anafilaxia cutânea passiva). (A) Detecção de IgE anti-albuminas 2S sementes de crambe. Os experimentos foram realizados em triplicata. Barras verticais representam desvio padrão (B) Reação de PCA *in vivo*, disparada em ratos Lou-M sensibilizados com o pool do soro anti-albumina 2S obtido dos camundongos Balb/c, e desafiados com o alérgeno albuminas 2S. Barra de escala em mm.

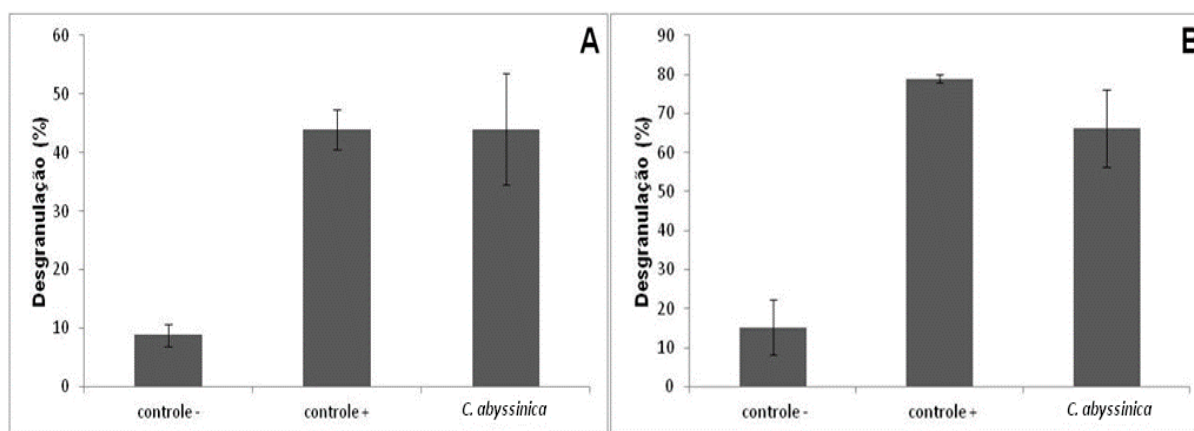
### 6.5.2 Reatividade cruzada avaliada por ensaio de desgranulação de mastócitos e imunorreatividade de IgE por ELISA

Os mastócitos desempenham papéis proeminentes nas respostas alérgicas. A reação de hipersensibilidade é causada pela desgranulação dos mastócitos dependente de IgE. Foi utilizado um ensaio de desgranulação de mastócitos *in vitro* e ELISA, para determinar possíveis reações cruzadas entre alérgenos do tipo



albuminas 2S de sementes de crambe com os alérgenos do tipo albuminas 2S de sementes de outras oleaginosas: mamona (*R. communis*), pinhão-manso (*J. curcas*), amendoim (*A. hypogaea*), gergelim (*S. indicum*).

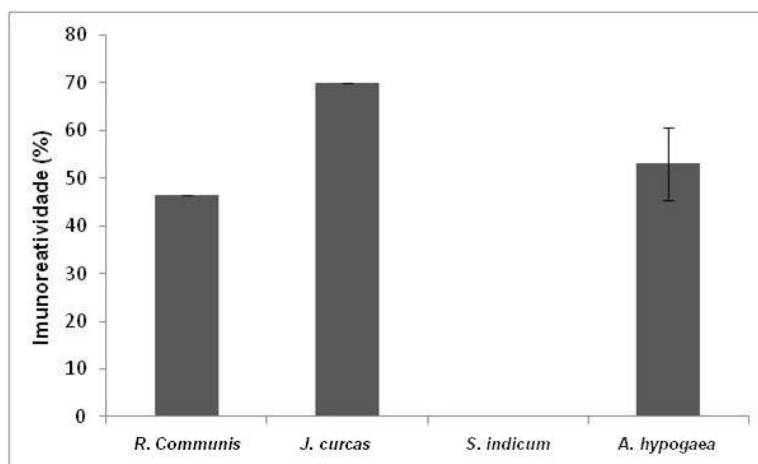
Alérgenos de sementes de pinhão-manso e mamona tiveram sua atividade alergênica testada através da avaliação dos efeitos sobre a desgranulação dos mastócitos sensibilizados com soro rico em IgE ante estes alérgenos e sensibilizadas com alérgenos de sementes de crambe. Alérgenos de crambe promoveram desgranulação nas células sensibilizadas com IgEs ante os alérgenos de ambas as sementes, mamona e pinhão-manso. A porcentagem de desgranulação é mostrada na figura 34, sendo 66 e 44% para alérgenos de crambe e para o controle positivo 44 e 79%, para mamona e pinhão-manso, respectivamente. Esses resultados indicam que existe reatividade cruzada entre estes alérgenos. Portanto, indivíduos IgE-reativos à alérgenos albuminas 2S de mamona e pinhão-manso poderão apresentar reações alérgicas ao entrar em contato com a albumina 2S de crambe.



**Figura 34:** Ensaio de desgranulação de mastócitos. Porcentagem de desgranulação promovida por albuminas 2S de sementes de crambe sobre células: (A) sensibilizadas com soro anti albuminas 2S de sementes de *R. communis*; (B) sensibilizadas com soro anti albuminas 2S de sementes de *J. curcas*. Os experimentos foram realizados em triplicata. Barras verticais representam desvio padrão. Controle negativo: Células sensibilizadas; controle positivo: Células sensibilizadas com as IgEs e incubadas com os respectivos antígenos.

O teste de ELISA foi utilizado para verificar reatividade cruzada entre albuminas 2S alergênicas de sementes de crambe e albuminas 2S alergênicas de *R. communis*, *J. curcas*, *A. hypogaea* e *S. indicum*. Para tanto, foi utilizado o soro rico em IgE anti-albuminas 2S de crambe e albuminas 2S das sementes a serem

testadas. Ocorreu imunorreatividade para os alérgenos de *R. communis*, *J. curcas* e *A. hypogaea*, expressa em porcentagem na figura 35 (46, 70 e 53%, respectivamente) em relação a imunorreatividade do controle positivo (crambe). Não ocorreu reação para os alérgenos de gergelim.



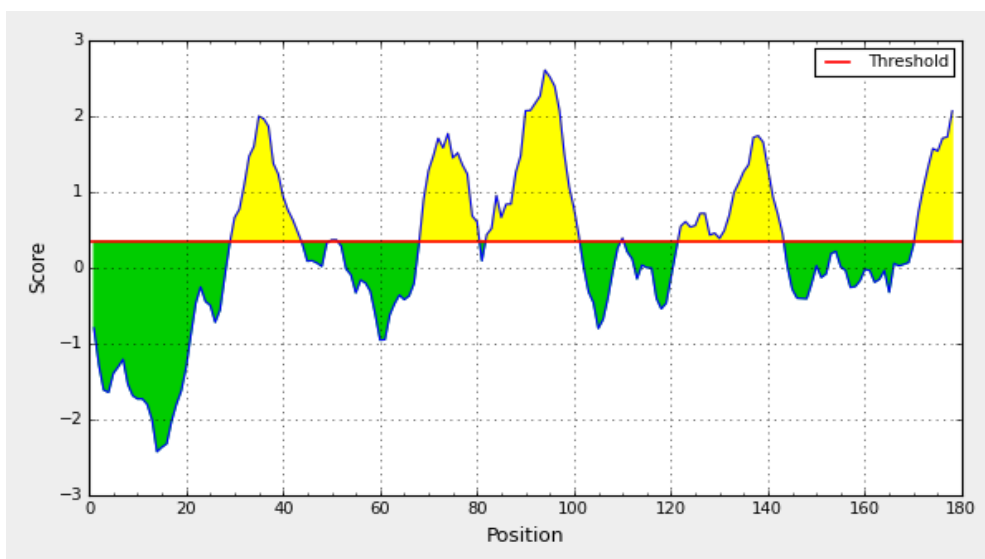
**Figura 35:** Avaliação da resposta cruzada por ensaio de Elisa. Porcentagem de reatividade entre IgE anti-albumina 2S de sementes de crambe e albumina 2s de sementes de: mamona (*R. communis*), pinhão-mansão (*J. curcas*), gergelim (*S. indicum*), amendoim (*A. hypogaea*).

### 6.5.3 Predição de epítopos lineares e conformacionais de célula B

Utilizando os programas de predição Bepipred e ABCpred epítopos de células B foram previstos e classificados de acordo com o *score* obtido. A sequência submetida foi (1 napina-2 [*Brassica napus*]) (tabela 1). A figura 36 mostra prováveis regiões epitópicas baseado no *score* de cada resíduo de aminoácido da sequência submetida no servidor Bepipred Linear Epitope, o qual foram preditos 4 epítopos lineares (tabela 2).

**Tabela 2:** Epítopos lineares de célula B da proteína preditos pelo Bepipred *Linear Epitope Prediction*.

INÍCIO	FIM	SEQUÊNCIA
30	43	FDEDDATNSAGPFR
69	80	MQSGGGPSWTLD
82	101	EFD FEDDMENPQGPQQRPL
122	143	KGASKAVKQQIQQQGQQGKQQ



**Figura 36:** Score de probabilidade de ser uma região epitopica.

**Tabela 3:** Epitopos lineares de célula B preditos pelo ABCpred *Prediction Server*

RANK	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO INICIAL	SCORE
1	GPSWTLDGFEFDDM	74	0,95
2	QGQQRPPLLQCCNE	93	0,92
3	VSRIYQTATHLPKVCN	145	0,89
4	ASIYRTVVEFDEDDAT	21	0,88
5	DGEFDFEDDMENPQGP	80	0,86
6	QGQQQGKQQMVSRIYQ	135	0,85
7	QCCNELHQEEPLCVCP	104	0,84
8	CQQWLHKQAMQSGGGP	60	0,78
8	LFLVSATLAFFLLTN	5	0,78
8	THLPKVCNIPQVSVCP	153	0,78
9	FDEDDATNSAGPFRIP	30	0,75
9	CVCPTLKGASKAVKQQ	116	0,75
10	AQHLRACQQWLHKQAM	54	0,69
10	KQQIQQQGQQQGKQQM	129	0,69
11	RKEFQQAQHLRACQQW	48	0,68
12	AGPFRIPKCRKEFQQA	39	0,59
12	CNIPQVSVCPFQKTMP	159	0,59

Através dos servidores Bepipred e ABCpred, foram preditos 21 epitopos lineares para proteína submetida, 17 e 4 respectivamente, ocorrendo somente uma sobreposição parcial do resíduo 30 a 41 (tabelas 2 e 3).

No programa CBtope foram preditos regiões de epitopos conformacionais de célula B da proteína submetida (tabela 4). Entre as regiões de epitopos somente dois não contem de forma total ou parcial, resíduos de aminoácidos de epitopos lineares.

**Tabela 4:** Regiões de epitopos conformacionais preditos por CBTOPE- *Conformational B-cell Epitope Prediction*

RESÍDUO	SEQUÊNCIA	RESÍDUO	SEQUÊNCIA
1-10	MANKLFLVSA	91-100	NP <u>QGP</u> QQRPP
11-20	TLAFFLLTN	101-110	LLQQCCNELH
21-30	ASIYRTV <u>VEF</u> *	11-120	QEE <u>PLCVCPT</u>
31-40	D <u>ED</u> DATN <u>SAG</u>	121-130	<u>L</u> KGASKAVKQ
41-50	<u>P</u> FRIPKCRKE	131-140	QIQQQGQQQG
51-60	FQQAQHLRAC	141-150	KQQMVS <u>RIYQ</u>
61-70	QQWLHKQAMQ	151-160	<u>TATHLPKVCN</u>
71-80	<u>SGGG</u> PSW <u>TLD</u>	161-170	IPQVSVC <u>PFQ</u>
81-90	GE <u>FD</u> FEDD <u>ME</u>	171-178	KTMP <u>GPSY</u>

\* Em uma escala de probabilidade (0-9) para cada aminoácidos, todos que estão em destaque apresentaram 4 [valores acima de 4 pode ser considerada como resíduo de epítopo]

## 7. DISCUSSÃO

A demanda por fontes de energia alternativa tem sido uma realidade no mundo atual, principalmente devido à preocupação com o meio ambiente e por nossas fontes de energia atuais serem poluentes e escassas. O setor agroindustrial tem respondido com empenho, investindo na variedade de fontes oleaginosas e em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas e viáveis matrizes naturais. Neste contexto, crambe surge como uma alternativa promissora com potencial para suprir a demanda de óleo, tanto para a produção de biodiesel, como para outros setores industriais. Os estudos sobre oleaginosas têm se concentrado em duas vertentes: o beneficiamento do óleo e o aproveitamento do coproduto resultante dessa industrialização. Para o crambe existe uma insuficiência de informações sobre a composição e qualidade proteica de suas sementes, um dos fatores que levou ao desenvolvimento deste trabalho. Em particular, investigamos a presença de albuminas 2S, as quais são descritas como os principais alérgenos de sementes.

Este trabalho, utilizando-se de metodologias tradicionais de purificação de proteínas por cromatografia e eletroforese, em conjunto com o método de Edman e espectrometria de massas, permitiu o isolamento e caracterização de uma albuminas 2S de sementes de crambe. A partir da obtenção dessa proteína isolada em uma colaboração multidisciplinar foi possível determinar suas características, tanto relacionadas ao potencial alergênico quanto a potenciais de aplicação biotecnológica.

A primeira etapa de purificação em matriz G-50 mostrou êxito na separação das frações de acordo com a massa molecular das proteínas contidas na amostra (Fig. 8A). Essas frações foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE (Fig. 8B). As sementes de crambe são enriquecidas em proteínas com massa molecular menor que 30 kDa (Massoura *et al.*, 1998), e em nossos resultados vimos predominância de proteínas na faixa de 10-24 kDa, sendo visível somente uma banda para a fração denominada FCr5-20 (Fig. 8A e C), região de massa molecular das albuminas 2S (Shewry, & Pandya, 1999). A fração aqui denominada FCr5-20 foi analisada por espectrometria de massas e, em paralelo, foi novamente fracionada em uma coluna de fase reversa C18, gerando um pico que, ao ser analisado por degradação de Edman, forneceu uma sequência parcial de aminoácidos, alinhada a algumas proteínas albuminas 2S de outras espécies de plantas, por Blast. Assim, confirmamos a presença de

albuminas 2S nesta semente. Os picos obtidos após a segunda etapa de purificação por cromatografia de fase reversa, P1 e P2, também confirmados como isoformas de albuminas 2S, foram analisados por dicroísmo circular (DC). A figura 13 mostra espectros característicos que indicam o predomínio de elementos de estrutura secundária em alfa-hélice. Este padrão se mantém mesmo após aquecimento. A prevalência de estruturas em alfa-hélice e a resistência ao aquecimento são peculiares às albuminas 2S e essa estabilidade intrínseca é, provavelmente, devida ao esqueleto bem conservado de resíduos de cisteína. (Moreno & Clemente, 2008; Sirvent *et al.*, 2012). O padrão de ligação dissulfeto entre cadeias das duas subunidades é também responsável pela resistência à protólise, observada em albuminas 2S (Moreno *et al.*, 2004).

O perfil eletroforético, SDS-PAGE -15%, da fração FCr5-20 indicou a presença de apenas uma banda proteica. No entanto, quando esta fração foi analisada por espectrometria de massas pelo método de Shotgun, detectamos duas isoformas de albuminas 2S e uma defensina. Esta fração foi submetida à uma cromatografia em coluna Sephadex G25 e dois picos proteicos foram isolados (Fig. 11A). A fração de maior massa molecular continha as isoformas de albuminas 2S e a de menor massa molecular, a defensina. A homogeneidade dos picos foi visualizada por SDS-Tricina PAGE e por análise em LC-MS/MS das proteínas extraídas do gel (figura 12; tabela 1).

As albuminas 2S têm sido relatadas como proteínas com propriedades tóxicas contra predadores fitófagos e microrganismos patogênicos como bactérias, protozoários e fungos (De Souza Cândido *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2011; Fardin *et al.*, 2016). Com o objetivo de investigar a ação das albuminas 2S de sementes de crambe sobre protozoários parasitas, escolhemos como modelo o *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Sabemos que doenças negligenciadas, como a doença de Chagas, afetam os países em desenvolvimento, sendo necessário o desenvolvimento de novos fármacos de baixo custo e eficientes. O reino vegetal é uma fonte valiosa de novos agentes medicinais, incluindo fármacos antiparasitários, como drogas com atividade tripanocida (Croft, 2003; Hemaiswarya *et al.*, 2008; Izumi *et al.*, 2011; de Souza *et al.*, 2017). A fração FCr5-20 não foi tóxica para as células LLC-MK2, quando estas foram incubadas com a proteína até a concentração de 500 µg/mL a (Fig. 14). As células LLC-MK2 tratadas apresentavam morfologia e ultraestrutura celular normal (Fig. 15); no entanto,

quando as células foram incubadas com 1000 µg/mL da FCrF5-20, uma pequena diminuição no número de células e a perda da integridade da membrana foi observada. As células não se recuperaram quando o estímulo foi removido, causando morte celular por necrose ou apoptose. Assim, testes com *T. cruzi* na concentração até 500 µg/mL intracelular foram realizados e cerca de 65% da população epimastigota tratada foi eliminada em 24 e 48 h (Fig. 16). Verificamos ainda que a FCrF5-20 induziu uma mudança na morfologia das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Estes parasitas apresentaram citoplasma muito condensado, e em seguida sofreram fragmentação e morte. A análise ultraestrutural de epimastigotas (Fig. 17) indicou alterações vesiculares, nucleares, cinetoplásticas, edema mitocondrial e multinucleação (Fig. 17). Foi também avaliada a toxicidade da fração FCrF5-20 contra formas amastigotas de *T. cruzi*, em várias concentrações. O número de células infectadas pelo *T. cruzi* diminuiu substancialmente, com um conseqüente aumento no número de células não infectadas (Fig. 18). Nenhuma toxicidade para as células do hospedeiro foi registrada. Esses resultados sugerem que essas proteínas podem estar atuando durante um estágio específico de desenvolvimento da infecção: na interação entre parasitas e as células hospedeiras, na capacidade do parasita se transformar na forma proliferativa, na sua divisão, na sua capacidade de infectar outras células hospedeiras ou na sua competência para evitar os mecanismos defensivos das células hospedeiras. Esses processos provavelmente envolvem diferentes receptores que estão presentes nas membranas de ambos os tipos celulares, dos parasitas e das células hospedeiras, bem como diferentes classes de proteínas, enzimas e cofatores enzimáticos (Epting *et al.*, 2010; de Carvalho & de Melo, 2017). Células não tratadas apresentaram altos níveis de infecção com amastigotas intracelulares (Fig. 19). Após o tratamento, a microscopia óptica mostrou que os parasitas passaram a apresentar formato arredondado, semelhante a inclusões citoplasmáticas, e também formaram agrupamentos. Foram observadas mudanças na forma e aparência dos parasitas intravasculares, sugerindo um efeito antiparasitário contra os amastigotas levando à lise do parasita (Fig. 19).

Efeitos deletérios contra *Leishmania amazonensis*, atribuído às proteínas pertencentes à classe das defensinas isoladas de *Phaseolus vulgaris*, foram reportados por Nascimento *et al.* (2015). Defensinas eliminaram 70% da proliferação dos parasitas em 24 h de incubação. Estas proteínas promoveram a perda de

material citoplasmático, fragmentação e a formação de múltiplos vacúolos citoplasmáticos. Fardin e colaboradores (2016) demonstraram que albuminas 2S isoladas de *Bertholletia excelsa* também induzem permeabilização de membranas celulares e causam eliminação de 91% dos parasitas *L. amazonensis* após 48 h de incubação. Como a fração FCrF5-20, do presente trabalho, continha albuminas 2S e defensinas, os efeitos sobre *T. cruzi* foram reavaliados usando-se as frações isoladas. Verificamos que a toxicidade sobre o *T. cruzi* se deve somente às albuminas 2S. Novas drogas com potencial tripanocida têm sido pesquisadas entre compostos naturais (Schinor *et al.*, 2007; Alexandrino, *et al.*, 2016; da Silva Souza *et al.*, 2018). Os tratamentos da doença de Chagas, com os fármacos antiparasitários existentes, geralmente têm ação na fase aguda da infecção, mas produzem efeitos adversos severos e demandam longos períodos de administração. Além disso, o benefício não foi comprovado para a fase crônica da doença (Rassi, *et al.*, 2010; Tarleton, *et al.*, 2010). Nossos resultados apontam a possibilidade de uso das albuminas 2S isoladas de crambe, para o desenvolvimento de novas drogas com potencial terapêutico para o tratamento da doença de Chagas humana; no entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer seus mecanismos de ação.

As albuminas 2S inibiram significativamente o crescimento das leveduras (Fig. 22 e 23), sendo que a ação foi mais efetiva para a amostra purificada em Sephadex G25, onde 100 µg/mL teve um efeito inibitório praticamente de 100%, em menos de 20 h. A atividade antimicrobiana da albumina 2S pode estar relacionada à sua capacidade de permeabilizar a membrana, interferir com o transporte de prótons nas células e induzir o estresse oxidativo, levando a alterações morfológicas e ultraestruturais nas células fúngicas (Agizzio *et al.*, 2003; Agizzio *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2012; Fardin *et al.*, 2016). Em nossos estudos foram realizados ensaios de toxicidade sobre as leveduras patogênicas *C. tropicalis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*. Essa atividade antimicrobiana das albuminas 2S é reflexo da habilidade das plantas em expressar uma variedade de proteínas tóxicas que conferem resistência contra herbívoros e patógenos (Dang & Van Damme, 2015). A maioria dessas proteínas tende a se acumular nas partes vulneráveis da planta, estando em geral concentradas nas sementes, que são os veículos de propagação e sobrevivência das espécies (Carlini & Grossi-de Sa, 2002). A habilidade das albuminas 2S de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos foi vista para a espécie *Passiflora edulis f. flavicarpa* contra as leveduras *K. marxianus*, *C.*



*albicans* e *C. parapsilosis*, onde foram observados danos à membrana citoplasmática (Ribeiro et al., 2012). Albuminas 2S isoladas de sementes de *Capsicum annuum* promoveram danos semelhantes às leveduras *K. marxianus*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. A permeabilização de membranas é um dos possíveis mecanismos de ação das albuminas 2S sobre as diferentes leveduras testadas (Agizzio et al., 2006; Regente et al., 2005; Mello et al., 2011; Dracatos et al., 2014). A perda de integridade da membrana das leveduras, após incubação com albuminas 2S de sementes de crambe, foi comprovada pelo uso do corante SYTOX Green, um agente que pode se ligar ao DNA nuclear quando a membrana está comprometida (Fig. 24-26). A parede celular de leveduras e outros fungos filamentosos determina a forma e a integridade do organismo durante o crescimento e divisão celular. A integridade da parede celular determina a sobrevivência dos fungos diante de desafios ambientais incluindo alterações osmóticas, estresse oxidativo, choque térmico, alterações de pH, limitações de nutrientes e outros desafios químicos (Fuchs & Mylonakis 2009). Assim, a parede celular representa um alvo para novos agentes antifúngicos; porém, é necessário investigar como ocorre a interação da proteína com estruturas da parede celular e membrana plasmática. A permeabilização de membrana causada por albuminas 2S pode ser um alvo para o desenho de novas drogas, especialmente contra leveduras patogênicas.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um aspecto inevitável da vida em condições aeróbicas. As ROS são continuamente produzidas como produtos secundários de certas vias metabólicas e por alguns sistemas específicos, sob um fino controle celular de produção e eliminação, que normalmente as mantêm em níveis estacionários. Em algumas circunstâncias, o equilíbrio entre a geração e a eliminação de ROS é perturbado, levando a um aumento do nível de ROS chamado “estresse oxidativo” (Lushchak, 2011). A modificação da permeabilidade da membrana pode estar relacionada na regulação da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido externamente (Leiter et al., 2005). A formação de ROS tem sido sugerida como sendo um dos mecanismos fungicidas de vários peptídeos antimicrobianos (Pathak, & Chauhan 2011). A permeabilização de membrana e geração de ROS também foi a estratégia de mecanismo observado em células de do gênero *Candida*, quando estas foram tratadas com uma defensina *Phaseolus vulgaris* (P<sub>v</sub>D<sub>1</sub>) para uma defensina identificada por Mello e colaboradores (2011),

em sementes de *P. vulgaris*. Demonstramos que as albuminas 2S de sementes de crambe promoveram danos na membrana causando a permeabilidade a íons e moléculas orgânicas, como o SYTOX Green, em todas as leveduras testadas. Porém, quando as amostras tratadas foram incubadas com o corante específico para ROS, verificou-se marcação fluorescente somente para as espécies *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Para *K. marxianus* e *C. tropicalis*, de forma semelhante ao controle, nenhuma marcação foi observada, indicando a não produção endógena de ROS para a concentração usada e no tempo em que o ensaio foi realizado, isto é, o burst oxidativo pode ter ocorrido nos períodos iniciais do contato entre os organismos e a proteína. Ao que parece, albuminas 2S exercem sua ação antifúngica através da ativação de uma cascata de sinalização, envolvendo ou não a produção de ROS, resultando em permeabilização da membrana. A não geração de ROS, no caso das últimas duas leveduras citadas, pode indicar que essas proteínas podem agir por mecanismos diferentes, embora possam atravessar a membrana plasmática e induzir a morte celular. Para tal, o mecanismo espécie específico necessita de estudos mais aprofundados.

Os inibidores de proteases (IPs) desempenham papéis essenciais em muitos sistemas biológicos, pois regulam processos proteolíticos e participam de mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de um grande número de insetos e microrganismos patogênicos. As albuminas 2S de crambe inibiram as enzimas  $\alpha$ -amilase humana e de larvas do inseto *C. maculatus*, bem como tripsina e papaína comerciais (Fig. 29-31), enzimas essas essencialmente indispensáveis para a manutenção e sobrevivência de organismos que as hospedam, pois desempenham papéis-chave em muitos processos biológicos e necessitam ter sua atividade rigorosamente controlada. (Habib & Fazili 2007). Esta expressiva inibição por albuminas 2S pode estar diretamente associada à inviabilidade dos microrganismos após incubação com a proteína.

As albuminas 2S de sementes de crambe inibiram o crescimento de larvas do inseto *C. maculatus* crescidas em sementes artificiais de farinha de *V. unguiculata* contendo 1 e 2% da proteína repurificada em Sephadex-G25. As poucas larvas que sobreviveram apresentaram massa e tamanhos bem menores dos que as crescidas nas sementes controle, isentas da proteína (Fig. 28). A porcentagem de inibição de crescimento foi muito próxima a 100%. Semelhante resultado foi visto no ensaio de Nascimento e colaboradores (2011) para larvas *C. maculatus* crescidas em

sementes contendo 2% de albuminas 2S obtidas de sementes de mamona. Ambos resultados podem ser associados à inibição das atividades de  $\alpha$ -amilases, afetando negativamente o desenvolvimento das larvas e instalando, provavelmente, um quadro de inanição.

Além de seu papel fisiológico nas plantas, as albuminas 2S são conhecidas por serem intrinsecamente alergênicas e sua capacidade de se ligar a IgE de soros de pacientes alérgicos tem sido demonstrada (Breiteneder & Radauer, 2004; Moreno & Clemente, 2008). Sabe-se que a alergia é um problema de saúde mundial, e que a cultura de crambe tende a um grande avanço em vários países, inclusive o Brasil; avaliar o caráter alergênico das albuminas 2S de suas sementes se faz necessário.

Em nosso estudo purificamos e caracterizamos a primeira proteína alergênica de sementes de crambe, a qual pertence à classe albuminas 2S. O nosso modelo de estudo foi em camundongos do tipo BALB/c, a linhagem mais utilizada em estudos de asma (KUMAR *et al.*, 2008). O primeiro protocolo de sensibilização foi realizado com aplicação da proteína com intervalos de sete dias. Observamos a produção das imunoglobulinas IgG e IgG1 no soro dos animais imunizados. A produção de IgG1 é uma característica de perfil Th2 indicando, portanto, sensibilização alérgica. Altos níveis de IgE, também esperados para respostas alérgicas, não foram detectados. No entanto, quando o intervalo de imunização foi alongado para trinta dias, os animais foram estimulados para a produção de IgEs (Fig. 33). Uma vez que o indivíduo seja sensibilizado, a reação alérgica pode acontecer imediatamente após novo contato com o alérgeno (Tabane, 2007). Para avaliar a deflagração da resposta alérgica pela proteína isolada, testes “*in vivo*”, do tipo PCA, onde os animais receberam soro contendo IgE e foram expostos à proteína em análise, foram realizados. Os resultados do PCA (Fig.33) mostraram que as albuminas 2S de crambe promoveram a desgranulação de mastócitos *in vivo*. O ensaio de PCA tem várias vantagens, incluindo alta sensibilidade, alta especificidade e permite medição da consequência biológica da interação alérgeno-IgE, sendo um método padrão para determinação da alergenicidade de proteínas por interação alérgeno-IgE específicos, para modelos de ratos (Birmingham *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos confirmam que a albumina 2S das sementes de crambe é uma proteína alergênica, pois induz resposta Th2, observada pela produção de IgG1 e IgE e deflagra a resposta alérgica, como observado por PCA. Obedecendo à

Comissão Internacional de alergia, esta proteína deve ser identificada como “Cra a 1”.

A presença de alérgenos em sementes de crambe é preocupante, visto que essa planta é utilizada para fins industriais e a exposição a essas proteínas vai desde a manipulação no plantio até o seu beneficiamento. Sabe-se que esses alérgenos podem estar presentes predominantemente em outras partes da planta como no pólen. A cultura de oleaginosas é amplamente utilizada na agricultura; o pólen dessas espécies pode ser dissipado através do ar e chegar à população circunvizinha, promovendo inalação desses aeroalérgenos e causando sensibilização. Considerando que os alérgenos de plantas possuem padrões conservados de estrutura, os quais os agrupam em famílias (Breiteneder & Radauer 2004), a sensibilização por exposição a alérgenos ou aeroalérgenos, ou mesmo a ingestão de alérgenos alimentares, desperta para um importante ponto: a reatividade cruzada. A alergenicidade cruzada é capacidade de uma substância provocar uma resposta alérgica em um indivíduo sensibilizado com outra substância (Ahlroth *et al.*, 1995).

Em nossos estudos a reatividade cruzada entre antígenos associados às albuminas 2S de espécies oleaginosas foi verificada. Através do ensaio de desgranulação de mastócitos *in vitro*, a capacidade da albumina 2S de sementes de crambe se ligar a mastócitos sensibilizados com IgEs anti albuminas 2S de sementes de mamona e pinhão-mansão foi confirmada, já que as células sensibilizadas após a incubação com a proteínas sofreram danos, identificados pela desgranulação. Neste ensaio os mastócitos isolados da cavidade peritoneal de ratos foram empregados para avaliação da alergenicidade. A porcentagem de desgranulação (Fig. 34) promovida por alérgenos de crambe indica que indivíduos sensibilizadas com alérgenos de mamona e pinhão-mansão poderão, ao entrar em contato com alérgenos de crambe, apresentar reações alérgicas; isto é, um indivíduo sensibilizado por esses alérgenos pode tornar-se sensível à albumina 2S de sementes de crambe. A condição inversa também pode ser possível. Semelhante evento de reatividade cruzada do tipo IgE foi verificado entre alérgenos de mamona e pinhão-mansão após teste de PCA (Maciel *et al.*, 2009). A problemática dessas interações deve ser pensada já que a cultura de todas essas oleaginosas não comestíveis tende a aumentar, devido à grande importância para a indústria em geral e para a produção de biodiesel.

A reatividade cruzada entre alérgenos de crambe e alimentares foi também um passo importante deste trabalho, posto que as sensibilizações assintomáticas a alimentos são relativamente frequentes. Muitos alérgenos alimentares de plantas pertencem a poucas famílias de proteínas, incluindo a família das albuminas 2S (Breiteneder & Radauer 2004). As sementes e nozes estão entre os principais grupos de alimentos com maior reatividade cruzada e as associações entre componentes alergênicos e a reatividade cruzada de alérgenos alimentares, aeroalérgenos e outros são de grande importância para os especialistas em alergia. Em nossos estudos verificamos, através de ensaio de ELISA, que albuminas 2S alergênicas de sementes de amendoim tem capacidade de se ligar a IgEs antialérgenos de crambe. Essa ocorrência porém não aconteceu para alérgenos de gergelim (Fig. 34). O ensaio de ELISA para esse fim foi realizado utilizando o soro rico em IgE anti albuminas 2S de sementes de crambe e as albuminas 2S das sementes de amendoim, gergelim, mamona e pinhão-manso extraídas em nosso laboratório. A imunorreatividade está expressa em porcentagem de reação (Fig. 34), e mostra que esta foi maior para alérgenos de pinhão-manso, amendoim e mamona. Em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, Lodi (2018) mostrou, através de ensaios de ELISA e *Western blotting*, que alérgenos de amendoim e gergelim apresentam reatividade cruzada com alérgenos de mamona. Foi mostrado também neste trabalho que os alérgenos apresentavam similaridade em suas estruturas primárias. Esse resultado do ELISA também confirma que alérgenos de pinhão-manso e mamona são capazes de se ligar às IgE antialbuminas 2S de crambe.

A reatividade cruzada é importante como sua base imunológica, particularmente em relação à regulação da sensibilização alérgica. A reatividade cruzada da IgE frequentemente ocorre entre moléculas alergênicas em espécies estreitamente relacionadas ou moléculas bem preservadas com função similar, presentes em espécies diferentes, pertencentes à mesma família de proteínas (Popescu, 2015). Para ocorrer reação cruzada entre tipos diferentes de alérgenos é preciso haver a presença de epitopos idênticos ou similares, pois precisam ser reconhecidos pela mesma IgE (Mendes *et al.*, 2016); provavelmente esse fato não ocorre para as albuminas 2S de gergelim. Para melhores esclarecimentos de nossos resultados se faz necessário o conhecimento dos epitopos ligantes de IgE para os alérgenos de crambe. A futura investigação desses epitopos (células B e T) e suas

características representará um avanço na caracterização da proteína e, em decorrência, na proposição de uma terapia específica.

A identificação de epitopos a partir de programas de bioinformática tem sido utilizada e vários algoritmos têm sido desenvolvidos para prever epitopos lineares ou não de células B (Singh *et al.*, 2013). A predição de epítomos de células B se tornou fundamental, especialmente quando novas proteínas isoladas. O conhecimento sobre epitopos de células B é importante para a identificação ou desenho de anticorpos terapêuticos, imunoterapia, imunodiagnóstico, desenvolvimento de vacinas ou mesmo para obter a compreensão sobre a efetividade da vacina desenvolvida (Irving *et al.*, 2001 ). Nós empregamos programas de predição Bepipred, ABCpred e CBtope predição de epitopos lineares e conformacionais de célula B das proteínas albuminas 2S aqui estudada. Os candidatos a epitopos lineares de células B foram identificados alguns com mais outros com menos probabilidade (Fig. 36 e tabelas 2 e 3) regiões de epitopos conformacionais também foram preditas (tabela 4). Os parâmetros para identificação destes epítomos variam de programa para programa, a combinação de metodologias de diferentes é a ideal. Essas informações são adicionais em nosso estudo, a acurácia dos resultados obtidos precisa ser verificada por abordagens experimentais, porém esses dados já são um avanço para avaliar a similaridade de estrutura através do alinhamento com epitopos já conhecidos das outras oliaginosas que apresentaram reatividade cruzada com alérgenos de crambe.

O conhecimento da presença de alérgenos nessas sementes já é um passo de alta relevância, já que pode evitar exposição direta aos manipuladores da planta, evitando assim danos à saúde, relacionados à alergia.

## 8. CONCLUSÃO

- Através das metodologias aplicadas de extração, purificação e identificação por espectrometria de massas, degradação de Edman e dicroísmo circular, foi possível confirmar que as proteínas da classe albuminas 2S estão presentes em sementes de crambe.
- Albuminas 2S de sementes de crambe apresentam efeito tripanocida *in vitro*, causando alterações morfológicas e ultraestruturais às formas epimastigota e amastigota, sem causar danos às células hospedeiras.
- Albuminas 2S de sementes de crambe foram capazes de inibir o crescimento das leveduras *C. tropicalis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, promovendo permeabilização na membrana e, para algumas espécies, o aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS).
- Em ensaios realizados *in vitro*, albuminas 2S de sementes de crambe inibiram a atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase salivar humana,  $\alpha$ -amilase larval dos insetos *C. maculatus*, papaína e tripsina.
- Albuminas 2S de sementes de crambe se mostraram tóxicas às larvas de *C. maculatus*, reduzindo drasticamente a massa e o número de larvas.
- Albuminas 2S de sementes de crambe possuem propriedades alergênicas, sendo capazes de induzir a produção de IgE e desencadear a desgranulação de mastócitos *in vivo*.
- Alérgenos do tipo albuminas 2S de sementes de crambe apresentam imunorreatividade com albuminas 2S de sementes de outras oleaginosas como mamona, amendoim e pinhão-manso.

## 9. REFERÊNCIAS

- Abdalla, A. L., Silva Filho, J. C. D., Godoi, A. R. D., Carmo, C. D. A., & Eduardo, J. L. D. P. (2008). Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(SPE), 260-268.
- Agizzio, A. P., Carvalho, A. O., Suzanna de Fátima, F. R., Machado, O. L., Alves, E. W., Okorokov, L. A., ... & Gomes, V. M. (2003). A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416(2), 188-195.
- Agizzio, A. P., Da Cunha, M., Carvalho, A. O., Oliveira, M. A., Ribeiro, S. F., & Gomes, V. M. (2006). The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Science*, 171(4), 515-522.
- Ahlroth, M., Alenius, H., Turjanmaa, K., Mäkinen-Kiljunen, S., Reunala, T., & Palosuo, T. (1995). Cross-reacting allergens in natural rubber latex and avocado. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 96(2), 167-173.
- Alexandrino, C. R., de Carvalho, L. P., de Melo, E. J. T., de Oliveira, É., Mello, V. M. G., Callado, C. H., & Da Cunha, M. (2016). Bioactivity of leaf extracts from species of palicourea (rubiaceae) on *Trypanosoma cruzi*, *Candida* sp. and *Fusarium solani* *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 3, 489-496
- Atabani, A. E., Silitonga, A. S., Ong, H. C., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H., Badruddin, I. A., & Fayaz, H. (2013). Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, 211-245.
- Ballaré, C. L. (2014). Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 335-363. Apud Abdalla, A. L., Silva Filho, J. C. D., Godoi, A. R. D., Carmo, C. D. A., & Eduardo, J. L. D. P. (2008). Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(SPE), 260-268.
- Bashir, M. E. H., Hubatsch, I., Leinenbach, H. P., Zeppezauer, M., Panzani, R. C., & Hussein, I. H. (1997). Ric c 1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: complete primary structures and phylogenetic relationships. *International Archives of Allergy and Immunology*, 115(1), 73-82.
- Bassegio, D., Zanotto, M. D., Santos, R. F., Werncke, I., Dias, P. P., & Olivo, M. (2016). Oilseed crop crambe as a source of renewable energy in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 311-321.
- Birmingham, N., Payankulam, S., Thanavorakul, S., Stefura, B., HayGlass, K., & Gangur, V. (2003). An ELISA-based method for measurement of food-specific IgE



antibody in mouse serum: an alternative to the passive cutaneous anaphylaxis assay. *Journal of Immunological Methods*, 275(1-2), 89-98.

Bojórquez-Velázquez, E., Lino-López, G. J., Huerta-Ocampo, J. A., Barrera-Pacheco, A., de la Rosa, A. P. B., Moreno, A., ... & Osuna-Castro, J. A. (2016). Purification and biochemical characterization of 11S globulin from chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit) seeds. *Food Chemistry*, 192, 203-211.

Breiteneder, H., & Mills, E. C. (2005). Plant food allergens—structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23(6), 395-399.

Breiteneder, H., & Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 821-830.

Breiteneder, H., & Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*, 113(5), 821-830.

Bublin, M., & Breiteneder, H. (2014). Cross-reactivity of peanut allergens. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(4), 1-12.

Carlini, C. R., & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11), 1515-1539.

Carlsson, A. S. (2009). Plant oils as feedstock alternatives to petroleum—A short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie*, 91(6), 665-670.

Carrielo-Gama, C. (2006) Desenvolvimento de uma tecnologia para desativar epitopos alergênicos de *Ricinus communis* (mamona). **Monografia** - Centro de Bociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil,

Chen, H., Gonzales-Vigil, E., Wilkerson, C. G., & Howe, G. A. (2007). Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiology*, 143(4), 1954-1967.

Chen, H., Yang, H. W., Wei, J. F., & Tao, A. L. (2014). *In silico* prediction of the T-cell and IgE-binding epitopes of Per a 6 and Bla g 6 allergens in cockroaches. *Molecular Medicine Reports*, 10(4), 2130-2136.

Chen, M. S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 15(2), 101-114.

Chua, A. C., Hsiao, E. S., Yang, Y. C., Lin, L. J., Chou, W. M., & Tzen, J. T. (2008). Gene families encoding 11S globulin and 2S albumin isoforms of jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(2), 506-513.

Ciardiello, M. A., Tamburrini, M., Liso, M., Crescenzo, R., Rafaianni, C., & Mari, A. (2013). Food allergen profiling: A big challenge. *Food Research International*, 54(1), 1033-1041.

- Costa, F. T., Neto, S. M., Bloch Jr, C., & Franco, O. L. (2007). Susceptibility of human pathogenic bacteria to antimicrobial peptides from sesame kernels. *Current Microbiology*, 55(2), 162-166.
- Crespo, L. M., Oliveira, N. D., Damatta, R. A., Nascimento, V. V., Soares, T. P., & Machado, O. L. T. (2016). Identification of IgE-binding peptide and critical amino acids of *Jatropha curcas* allergen involved in allergenic response. *SpringerPlus*, 5(1), 1-9.
- Da Silva Souza, R. O., Sousa, P. L., Sampaio, T. L., Tessarolo, L. D., Silva, F. C. O., Pereira, M. G., & Martins, A. M. C. (2018). Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 311-317.
- Da Silva Jr, J. G., Machado, O. L., Izumi, C., Padovan, J. C., Chait, B. T., Mirza, U. A., & Greene, L. J. (1996). Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 10-18.
- De Carvalho, L. P., & de Melo, E. J. T. (2017). Life and death of *Trypanosoma cruzi* in presence of metals. *Biometals*, 30(6), 955-974.
- De Clercq, A., Vandewiele, M., Van Damme, J., Guerche, P., Van Montagu, M., Vandekerckhove, J., & Krebbers, E. (1990). Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. *Plant Physiology*, 94(3), 970-979.
- De Souza Cândido, E., Pinto, M. F. S., Pelegrini, P. B., Lima, T. B., Silva, O. N., Pogue, R., ... & Franco, O. L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*, 25(10), 3290-3305.
- de Souza Cândido, E., Sousa, D. A., Viana, J. C., de Oliveira-Júnior, N. G., Miranda, V., & Franco, O. L. (2014). The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides*, 55, 65-78.
- De Souza, C. E. S., da Silva, A. R. P., Gomez, M. C. V., Rolóm, M., Coronel, C., da Costa, J. G. M.,... & Coutinho, H. D. M. (2017). Anti-*Trypanosoma*, anti-*Leishmania* and cytotoxic activities of natural products from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. and *Psidium guajava* var. *Pomifera* analysed by LC-MS. *Acta Tropica*, 176, 380-384.
- Deus-de-Oliveira, N., Felix, S. P., Carrielo-Gama, C., Fernandes, K. V., DaMatta, R. A., & Machado, O. L. (2011). Identification of critical amino acids in the IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of glutamic acid as an IgE blocker. *PLoS One*, 6(6), e21455.
- Dmytryshyn, S. L., Dalai, A. K., Chaudhari, S. T., Mishra, H. K., & Reaney, M. J. (2004). Synthesis and characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties. *Bioresource Technology*, 92(1), 55-64.

- Dracatos, P. M., Van der Weerden, N. L., Carroll, K. T., Johnson, E. D., Plummer, K. M., & Anderson, M. A. (2014). Inhibition of cereal rust fungi by both class I and II defensins derived from the flowers of *Nicotiana glauca*. *Molecular Plant Pathology*, 15(1), 67-79.
- Duan, X. H., Jiang, R., Wen, Y. J., & Bin, J. H. (2013). Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 84-90.
- Edman, P. (1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta chem. scand*, 4(7), 283-293.
- Epting, C. L., Coates, B. M., & Engman, D. M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 126(3), 283-291.
- Falasca, S. L., Flores, N., Lamas, M. C., Carballo, S. M., & Anschau, A. (2010). Crambe abyssinica: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11), 5808-5812.
- Fardin, J. M., Carvalho, L. P., do Nascimento, V. V., Melo, E. J. T., Gomes, V. M., & Machado, O. L. T. (2016). Biochemical purification of proteins from *Bertholletia excelsa* seeds and their antileishmanial action in vitro. *World Journal of Pharmaceuthical Research*, 5, 273-300.
- Felix, S. P., Mayerhoffer, R. O., Damatta, R. A., Verícimo, M. A., Nascimento, V. V., & Machado, O. L. T. (2008). Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. *Peptides*, 29(4), 497-504.
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases: Structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*, 269(2), 397-412.
- Fuchs, B. B., & Mylonakis, E. (2009). Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1616-1625.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10242-10297.
- Genov, N., Goshev, I., Nikolova, D., Giorggieva, D. N., Filippi, B., Svendsen, I. (1997). A novel thermostable inhibitor of trypsin and subtilisin from the seeds of *Brassica nigra*: amino acid sequence, inhibitory and spectroscopic properties and thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1341:157-164.
- Gincel, E., Simorre, J. P., Caille, A., Marion, D., Ptak, M., & Vovelle, F. (1994). Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. *European Journal of Biochemistry*, 226(2), 413-422.

- Guéguen, J., Popineau, Y., Anisimova, I. N., Fido, R. J., Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1996). Functionality of the 2S albumin seed storage proteins from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, *44*(5), 1184-1189.
- Habib, H., & Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, *2*(3), 68-85.
- Haq, S. K., Atif, S. M., & Khan, R. H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *431*(1), 145-159.
- Hauser, M., Egger, M., Wallner, M., Wopfner, N., Schmidt, G., & Ferreira, F. (2008). Molecular properties of plant food allergens: a current classification into protein families. *The Open Immunology Journal*, *1*, 1-12.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, *15*(8), 639-652
- Hoffmann-Sommergruber, K. (2000). Plant allergens and pathogenesis-related proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, *122*(3), 155-166.
- Hoffmann-Sommergruber, K. (2016). Proteomics and its impact on food allergy diagnosis. *EuPA Open Proteomics*.
- Hossain, M. A., Maiti, M. K., Basu, A., Sen, S., Ghosh, A. K., & Sen, S. K. (2006). Transgenic expression of onion leaf lectin gene in Indian mustard offers protection against aphid colonization. *Crop Science*, *46*(5), 2022-2032.
- Hummel, M., Wigger, T., Höper, T., Westkamp, I., & Brockmeyer, J. (2015). Simple, rapid, and selective isolation of 2S albumins from allergenic seeds and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(26), 6035-6040.
- Ibl, V., & Stoger, E. (2012). The formation, function and fate of protein storage compartments in seeds. *Protoplasma*, *249*(2), 379-392.
- Irving, M. B., Pan, O., & Scott, J. K. (2001). Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Current Opinion in Chemical Biology*, *5*(3), 314-324.
- Ishimoto, M., & Kitamura, K. (1989). Growth inhibitory effects of an ALPHA.-amylase inhibitor from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Entomology and Zoology*, *24*(3), 281-286.
- Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Júnior, V. F. V., & Nakamura, C. V. (2011). Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Product Reports*, *28*(4), 809-823.
- Kayser, O., Kiderlen, A. F., & Croft, S. L. (2003). Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, *90*(2), S55-S62.

Kortt, A. A., & Caldwell, J. B. (1990). Sunflower 11S globulin, susceptibility to proteolytic cleavage of the subunits of native helianthinin during isolation: HPLC fractionation of the subunits. *Phytochemistry*, 29(5), 1389-1396.

Krebbes, E., Herdies, L., De Clercq, A., Seurinck, J., Leemans, J., Van Damme, J., ... & Vandekerckhove, J. (1988). Determination of the processing sites of an Arabidopsis 2S albumin and characterization of the complete gene family. *Plant Physiology*, 87(4), 859-866.

Kumar, R. K., Herbert, C., & Foster, P. S. (2008). The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current Drug Targets*, 9(6), 485-494.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.

Lara-Fioreze, A. C. C., Tomaz, C. A., Fioreze, S. L., Pilon, C., & Zanotto, M. D. (2013). Genetic diversity among progenies of *Crambe abyssinica* Hochst for seed traits. *Industrial Crops and Products*, 50, 771-775.

Larsen, J. E. P., Lund, O., & Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*, 2(1), 2.

Lazzeri, L., Leoni, O., Conte, L. S., & Palmieri, S. (1994). Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. *Industrial Crops and Products*, 3(1-2), 103-112..

Lehmann, K., Schweimer, K., Reese, G., Randow, S., Suhr, M., Becker, W. M., ... & Rösch, P. (2006). Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochemical Journal*, 395(3), 463-472.

Leiter, É., Szappanos, H., Oberparleiter, C., Kaiserer, L., Csernoch, L., Pusztahelyi, T., ... & Marx, F. (2005). Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2445-2453.

Leppik, E. E., & White, G. A. (1975). Preliminary assessment of crambe germplasm resources. *Euphytica*, 24(3), 681-689.

Lodi, T.M. (2018). Identificação de Epitopos ligantes de IgE em alérgenos de amendoim e gergelim, imunorreatividade com alérgenos de mamona e avaliação de bloqueadores de IgE. **Dissertação** de mestrado apresentada ao centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

Lopes, J. L. S., Valadares, N. F., Moraes, D. I., Rosa, J. C., Araújo, H. S. S., & Beltramini, L. M. (2009). Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. *Phytochemistry*, 70(7), 871-879.

Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative biochemistry and physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(2), 175-190.

Macedo, M. L. R., Ribeiro, S. F., Taveira, G. B., Gomes, V. M., de Barros, K. M., & Maria-Neto, S. (2016). Antimicrobial activity of ILTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Inga laurina* (SW.) Willd. *Current Microbiology*, 72(5), 538-544.

Macedo, M. L., Garcia, V. A., Freire, M. G., Richardson, M. (2007) Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104 -1111.

Machado, O. L. T., Marcondes, J. A., Souza-Silva, F. D., Hansen, E., Ribeiro, P. D., Vericimo, M., ... & Costa-e-Silva, M. C. (2003). Characterization of of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. *Allergologie*, 26(2), 45-51.

Machado, O. L., & Silva, J. J. (1991). An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is a part of the 2S albumin precursor predicted by c-DNA data. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]*, 25(6), 567-582.

Maciel, F. M., Laberty, M. A., Oliveira, N. D., Felix, S. P., dos Santos Soares, A. M., Vericimo, M. A., & Machado, O. L. T. (2009). A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. *Peptides*, 30(12), 2103-2107.

Maria-Neto, S., Honorato, R. V., Costa, F. T., Almeida, R. G., Amaro, D. S., Oliveira, J. T., ... & Franco, O. L. (2011). Bactericidal activity identified in 2S albumin from sesame seeds and in silico studies of structure–function relations. *The protein journal*, 30(5), 340-350.

Marsh, D. G., Lichtenstein, L. M., & Norman, P. S. (1972). Induction of IgE-mediated immediate hypersensitivity to group I rye grass pollen allergen and allergoids in non-allergic man. *Immunology*, 22(6), 1013.

Massoura, E., Vereijken, J.M., Kolster, P., Derksen, J.T.P., 1998. Proteins from crambe abyssinica oilseed. II. Biochemical and functional properties. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 329–335.

Mastebroek, H. D., Wallenburg, S. C., & Van Soest, L. J. M. (1994). Variation for agronomic characteristics in crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex Fries). *Industrial Crops and Products*, 2(2), 129-136.

Mayerhoffer, R.D.O. (2004) Identificação de peptídeos alergênicos de Albumina 2S de *Ricinus communis* (Mamona). **Dissertação** de mestrado apresentada ao centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

- Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Saadati, F., & Mahmudvand, M. (2011).  $\alpha$ -Amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(20), 1173-1182.
- Mello, E. O., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Santos, I. S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., & Gomes, V. M. (2011). Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Current Microbiology*, 62(4), 1209-1217.
- Mendes, C., Costa, J., Vicente, A. A., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2016). Cashew nut allergy: clinical relevance and allergen characterisation. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 1-22.
- Menéndez-Arias, L., Moneo, I., Domínguez, J., & Rodríguez, R. (1988). Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *European Journal of Biochemistry*, 177(1), 159-166.
- Michalski, A., Cox, J., & Mann, M. (2011). More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1785-1793.
- Mishra, A., Jain, A., & Arora, N. (2016). Mapping B-cell epitopes of major and minor peanut allergens and identifying residues contributing to IgE binding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 539-547
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431-450.
- Monsalve, R. I., de la Pena, M. G., Menendez-Arias, L., Lopez-Otin, C., Villalba, M., & Rodriguez, R. (1993). Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *Biochemical Journal*, 293(3), 625-632.
- Monsalve, R. I., Villalba, M., & Rodriguez, R. (2001). Allergy to mustard seeds: the importance of 2S albumins as food allergens. In *Internet Symp. Food Allergens*. 3, 2.
- Monyem, A., & Van Gerpen, J. H. (2001). The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biomass and Bioenergy*, 20(4), 317-325.
- Moreno, F. J., & Clemente, A. (2008). 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens?. *The open Biochemistry Journal*, 2(1).
- Moreno, F. J., Jenkins, J. A., Mellon, F. A., Rigby, N. M., Robertson, J. A., Wellner, N., & Mills, E. C. (2004). Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1698(2), 175-186.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S., Bottrill, A. R., & Mills, E. C. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *The FEBS journal*, 272(2), 341-352.

- Nascimento, V. V. D., Castro, H. C., Abreu, P. A., Oliveira, A. E. A., Fernandez, J. H., Araújo, J. D. S., & Machado, O. L. T. (2011). In silico structural characteristics and  $\alpha$ -amylase inhibitory properties of Ric c 1 and Ric c 3, allergenic 2S albumins from *Ricinus communis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4814-4821.
- Nietiedt, G. H., Schlosser, J. F., Ribas, R. L., Frantz, U. G., & Russini, A. (2011). Desempenho de motor de injeção direta sob misturas de biodiesel metílico de soja. *Ciência Rural*, 41(7), 1177-1182.
- Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomas, L. A., & Bush, R. K. (1996). Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New England Journal of Medicine*, 334(11), 688-692.
- Odintsova, T. I., Rogozhin, E. A., Sklyar, I. V., Musolyamov, A. K., Kudryavtsev, A. M., Pukhalsky, V. A., ... & Egorov, T. A. (2010). Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. *Protein and Peptide Letters*, 17(4), 522-529.
- Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins.
- Ozdemir, C., Kucuksezer, U. C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2016). Mechanisms of aeroallergen immunotherapy: subcutaneous immunotherapy and sublingual immunotherapy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 36(1), 71-86.
- Pacheco-Soares, T., de Oliveira Carvalho, A., da Silva Araújo, J., de Souza, G. D. S., & Machado, O. L. (2018). A modified, hypoallergenic variant of the *Ricinus communis* Ric c1 protein retains biological activity. *Bioscience Reports*, 38(2), BSR20171245.
- Panno, G., & Prior, M. (2009). Avaliação de substratos para a germinação de *Crambe abyssinica*. *Cultivando o Saber*, 2(2), 151-157.
- Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Giménez-Gallego, G., Rico, M., & Santoro, J. (2003). Solution structure of RicC3, a 2S albumin storage protein from *Ricinus communis*. *Biochemistry*, 42(47), 13839-13847.
- Pantoja-Uceda, D., Shewry, P. R., Bruix, M., Tatham, A. S., Santoro, J., & Rico, M. (2004). Solution structure of a methionine-rich 2S albumin from sunflower seeds: relationship to its allergenic and emulsifying properties. *Biochemistry*, 43(22), 6976-6986.
- Pastorello Radauer, C., Lackner, P., & Breiteneder, H. (2008). The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1.
- Pastorello, E. A., Varin, E., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Trambaioli, C.,... & Calamari, A. M. (2001). The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1), 85-93.



- Pathak, S., & Chauhan, V. S. (2011). Rationale-based, de novo design of dehydrophenylalanine-containing antibiotic peptides and systematic modification in sequence for enhanced potency. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(5), 2178-2188.
- Pereira, N., Viecelli, C. A., Gai, V. F., Berdusco, V. M., & Santos, F. S. (2014). Application of crambe cake on the early growth of sunflowers. *Acta Iguazu*, *3*(3), 74-81.
- Popescu, F. D. (2015). Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World journal of Methodology*, *5*(2), 31.
- Puumalainen, T. J., Poikonen, S., Kotovuori, A., Vaali, K., Kalkkinen, N., Reunala, T., ... & Palosuo, T. (2006). Napins, 2S albumins, are major allergens in oilseed rape and turnip rape. *Journal of allergy and clinical immunology*, *117*(2), 426-432.
- Radauer, C., & Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *120*(3), 518-525.
- Radauer, C., Lackner, P., & Breiteneder, H. (2008). The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology*, *8*(1), 1.
- Radhika, V., & Rao, V. S. H. (2015). Computational approaches for the classification of seed storage proteins. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(7), 4246-4255.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, *375*(9723), 1388-1402.
- Regente, M. C., Giudici, A. M., Villalaín, J., & De la Canal, L. (2005). The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology*, *40*(3), 183-189.
- Regente, M., & de la Canal, L. (2001). Do sunflower 2S albumins play a role in resistance to fungi?. *Plant Physiology and Biochemistry*, *39*(5), 407-413.
- Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Cruz, L. P., Melo, V. M., ... & Gomes, V. M. (2007). Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*, *50*(5), 600-611.
- Ribeiro, S. F., Taveira, G. B., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., ... & Gomes, V. M. (2012). Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. *The Protein Journal*, *31*(1), 59-67.
- Rocha, R. O., Morais, J. K., Oliveira, J. T., Oliveira, H. D., Sousa, D. O., Souza, C. E. A., ... & Vasconcelos, I. M. (2015). Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode

Meloidogyne incognita. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), 5335-5343.

Rosa, H. A., Wazilewski, W. T., Secco, D., Chaves, L. I., Veloso, G., de Souza, S. N. M., ... & Santos, R. F. (2014). Biodiesel produced from crambe oil in Brazil—A study of performance and emissions in a diesel cycle engine generator. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 651-655.

Sabotič, J., & Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(4), 1351-1375.

Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction. *Journal of Immunology research*, 2017.

Santos, A., & Van Ree, R. (2011). Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens?. *International Archives of Allergy and Immunology*, 155(3), 191-204.

Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.

Schinor, E. C., Salvador, M. J., Pral, E. M. F., Alfieri, S. C., Albuquerque, S., & Dias, D. A. (2007). Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2), 295-300.

Shade, R. E., Schroeder, H. E., Pueyo, J. J., Tabe, L. M., Murdock, L. L., Higgins, T. J. V., & Chrispeels, M. J. (1994). Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/technology*, 12(8), 793-796.

Shakib, F., Ghaemmaghami, A. M., Sewell, H. F. (2008). The molecular basis of allergenicity. *Trends Immunol.* 29 (12): 633-642.

Sharief, F. S., Li, S. S. (1982). Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *J. Biol. Chem.* 257: 4753-14759.

Sharma, P., Gaur, S. N., & Arora, N. (2013). In silico identification of IgE-binding epitopes of osmotin protein. *PLoS One*, 8(1), e 54755.

Shewry, P. R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S., Mills, E. N. C. (2002). Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (6): 906-910

Shewry, P. R., Napier, J. A., & Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The plant cell*, 7(7), 945. Oplinger, E. S., Oelke, E. A., Kaminski, A. R., Putnam, D. H., Teynor, T. M., Doll, J. D., ... & Noetzel, D. M. (1991).

Shewry, P.R. & M.J. Pandya, 1999. The 2S albumins storage proteins. In: P.R. Shewry & R. Casey (Eds.), *Seed Proteins*, pp. 619–664. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.

Silva, R. G., Vasconcelos, I. M., Acrísio Filho, J. U. B., Carvalho, A. F., Souza, T. M., Gondim, D. M., ... & Oliveira, J. T. (2015). Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. *Industrial Crops and Products*, 70, 48-55.

Silva, T. R. B., de Souza Reis, A. C., & de Góes Maciel, C. D. (2012). Relationship between chlorophyll meter readings and total N in crambe leaves as affected by nitrogen topdressing. *Industrial Crops and Products*, 39, 135-138.

Sinha, M., Singh, R. P., Kushwaha, G. S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S. & Singh, T. P. (2014). Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal*, 2014.

Singh, H., Ansari, H. R., & Raghava, G. P. (2013). Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. *PloS one*, 8(5), e62216.

Sirvent, S., Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Villalba, M., & Rodríguez, R. (2012). Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 6011-6018.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.

Soares, A. M. S., Carvalho, L. P., Melo, E. J. T., Costa, H. P. S., Vasconcelos, I. M., & Oliveira, J. T. A. (2015). A protein extract and a cysteine protease inhibitor enriched fraction from *Jatropha curcas* seed cake have in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. *Experimental Parasitology*, 153, 111-117.

Spies, J. R., & Coulson, E. J. (1943). The Chemistry of Allergens. VIII. Isolation and properties of an active proteinpolysaccharidic fraction, CB-1A, from Castor Beans<sup>1a, b</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, 65(9), 1720-1725.

Strobl, S., Muehlhahn, P., Bernstein, R., Wiltscheck, R., Maskos, K., Wunderlich, M., ... & Holak, T. A. (1995). Determination of the three-dimensional structure of the bifunctional. alpha.-amylase/trypsin inhibitor from ragi seeds by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 34(26), 8281-8293.

Tanabe, S. (2007). Epitope peptides and immunotherapy. *Current Protein and Peptide, Science*, 8(1), 109-118.

Terras, F. R., Schoofs, H. M., De Bolle, M. F., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., ... & Broekaert, W. F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22), 15301-15309.

Terras, F. R., Schoofs, H. M., Thevissen, K., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (1993). Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiology*, 103(4), 1311-1319.

Tomar, P. P. S., Nikhil, K., Singh, A., Selvakumar, P., Roy, P., & Sharma, A. K. (2014). Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 448(4), 349-354.

Thevissen, K., Terras, F. R., & Broekaert, W. F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(12), 5451-5458.

Tyagi, B., Singh, D., Mishra, D. P., & Dubey, A. (2018).  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from some cassia species and their interaction with  $\alpha$ -amylase potential for crop Protection. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 8(1), 64-69.

Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B., & Pahr, S. (2015). Food allergies: the basics. *Gastroenterology*, 148(6), 1120-1131.

Van Hoeyveld, E., & De Swert, L. F. A. (2014). Diagnosis of food allergy Part 2. The use of allergen components for in vitro diagnosis of food allergy in children. *Journal du Pédiatre Belge*, 16(3), 113.

Verma, A. K., Kumar, S., Das, M., & Dwivedi, P. D. (2013). A comprehensive review of legume allergy. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 45(1), 30-46.

Vieira, M. R. (2002) Desgranulação de mastócitos por isoformas de albumina 2S de sementes de *R. communis*. **Monografia** - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro Brasil.

Wazilewski, W. T., Bariccatti, R. A., Martins, G. I., Secco, D., de Souza, S. N. M., Rosa, H. A., & Chaves, L. I. (2013). Study of the methyl crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) and soybean biodiesel oxidative stability. *Industrial Crops and Products*, 43, 207-212.

Yang X. Y., Xiao Y. H., Wang X. W., Pei Y. (2007) Expression of a novel small antimicrobial protein from the seeds of motherwort (*Leonurus japonicus*) confers disease resistance in tobacco. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 939–946

Yang, X., Li, J., Wang, X., Fang, W., Bidochka, M. J., She, R., & Pei, Y. (2006). Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*, 27(7), 1726-1731.

Youle, R. J., & Huang, A. H. (1978). Evidence that the castor bean allergens are the albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant physiology*, 61(6), 1040-1042.

Youle, R. J., & Huang, A. H. (1981). Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *American Journal of Botany*, 44-48.

Zhu-Salzman, K., & Zeng, R. (2015). Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Review of Entomology*, 60, 233-252.