



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



Thaís de Almeida Pedrete

Estudo

dos extratos protéicos de Bauhínias e *Chrysobalanus icaco*

Rio de Janeiro

2018

Thaís de Almeida Pedrete

Estudo

dos extratos protéicos de Bauhínias e *Chrysobalanus icaco*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josino Costa Moreira.

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

P371c Pedrete, Thaís de Almeida.  
Caracterização proteômica e avaliação de toxicidade de plantas hipoglicemiantes: estudo dos extratos protéicos de Bauhínias e *Chrysobalanus icaco* / Thaís de Almeida Pedrete. -- 2018.  
141 f. : il. color. ; tab. : graf.

Orientador: Josino Costa Moreira.  
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

1. Proteômica. 2. Toxicidade. 3. Plantas Medicinais.  
4. Hipoglicemia. 5. Bauhinia. 6. Chrysobalanaceae. 7. Plantas Hipoglicemiantes. I. Título.

CDD – 22.ed. – 615.321

Thaís de Almeida Pedrete

Estudo

dos extratos protéicos de Bauhínias e *Chrysobalanus icaco*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 06 de setembro de 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto  
Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Profª. Dra. Mônica Freiman de Souza Ramos  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências da Saúde

Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva  
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Tecnologia em Fármacos - Far-Manguinhos

Prof Dra. Rachel Ann Hauser-Davis  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente Sergio Arouca

Prof. Dr. Josino Costa Moreira (Orientador)  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2018

A todos que acreditaram em meu potencial e me apoiaram.

Ao meu orientador Jô, por acreditar em mim e na minha capacidade de desenvolver uma nova técnica no laboratório, pelos investimentos na minha formação como pesquisadora, por me fazer aceitar os desafios a mim propostos e por ser um bom ouvinte.

À Capes, pela bolsa de doutorado concedida, que viabilizou o trabalho.

Ao CESTEH/ENSP pelo apoio e pela permissão de realizar este trabalho

Aos meus pais por toda minha criação, devo muito a eles pela pessoa que sou, pela paciência comigo e aos meus irmãos e familiares pelo apoio fundamental.

Aos membros da banca por terem aceito o convite de participar e colaborar.

À Dra. Rachel por sempre compartilhar seus conhecimentos em proteômica

À Profa. Viviane Krueel, por abrir as portas do JBRJ e me ajudar na identificação das espécies.

Ao Prof. Emiliano Barreto, por me acolher e permitir que eu fizesse parte da pesquisa em seu laboratório.

Ao Julianderson Carmo por ter feito os ensaios de viabilidade e migração celular e por compartilhar comigo seu conhecimento.

Às amigas da minha vida, Lu, Deh e Thati, por estarem sempre comigo, em todas as fases da vida.

Aos amigos, que sempre me apoiaram, mesmo de longe.

À família carreta, pelos encontros e desencontros, vocês estarão sempre comigo não importa em que lugar d Brasil.

À equipe do Laboratório do Cesteh pela convivência e troca de ideias, em especial, ao Renato, por me aturar, pelo apoio e não me fazer desistir, à minha amiguinha Sandra e à minha aluna de graduação Mylena por ter ajudado com o preparo de amostra e por ter me feito uma boa orientadora.

*O cientista não é o homem que fornece  
as verdadeiras respostas; é quem faz  
as verdadeiras perguntas.*

LÉVI-STRAUSS, antropólogo.

O uso de plantas medicinais é uma forma opcional de tratamento aos pacientes diabéticos. A maioria das plantas utilizadas como antidiabéticas, ao serem avaliadas farmacologicamente demonstraram ter efeito hipoglicemiante, entretanto não se pode prescindir da avaliação dos efeitos terapêuticos sem que se conheça as propriedades toxicológicas. A proteômica abre novas perspectivas na biologia de plantas, por ser uma tecnologia que pode indicar biomarcadores que diferenciem espécies. No entanto, não há estudo proteômico utilizando espécies nativas brasileiras. O objetivo do estudo foi caracterizar as proteínas das plantas utilizadas na medicina popular como hipoglicemiantes a pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) e o abajerú (*Chrysobalanus icaco*), diferenciando as espécies pelas proteínas expressas e testando a citotoxicidade dos extratos proteicos. Verificou-se que uma outra espécie é vendida no lugar de *C. icaco*, a *Eugenia astringens*, a qual apresentou proteínas diferenciadas e seu extrato proteico se mostrou tóxico. Para a extração das proteínas, o método mais adequado para a secagem e moagem das plantas foi a liofilização e a maceração mecânica (moinho) e o antioxidante testado que mostrou maior eficiência foi o ditiotreitól ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Bandas eletroforéticas foram visualizadas em gel de poliacrilamida, a maioria na faixa de 50 kDa. Proteínas foram digeridas em solução com tripsina pelo método de preparo de amostra auxiliada por filtro (FASP). Rendimento da extração e digestão de proteínas foi avaliado pelo método de Lowry, certificando que os resultados foram satisfatórios. Peptídeos foram analisados por cromatografia líquida com espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para a caracterização de proteínas nas amostras. No total, foram 442 identificações, sendo 131 proteínas diferentes. As principais funções biológicas das proteínas identificadas foram a respiração celular, transporte, metabolismo e fotossíntese. Proteínas semelhantes à insulina não foram identificadas em nenhuma amostra. As concentrações de glutathiona e metalotioneína indicam, provavelmente, resposta ao estresse oxidativo, o qual pode ser pelas características ambientais e/ou pela contaminação por metais. Os ensaios de citotoxicidade mostraram que com o aumento da concentração do extrato proteico, a viabilidade dos fibroblastos diminui. Somente o extrato de *E. astringens* apresentou citotoxicidade em todas as concentrações, além de reduzir a migração dos fibroblastos. Os resultados obtidos neste estudo são o princípio para a caracterização do proteoma de plantas medicinais e mostram a importância na Saúde Pública, já que o uso de plantas medicinais e fitoterápicos pode se tornar equivocado.

Palavras-chave: Proteômica. Toxicidade. Plantas Hipoglicemiantes. Bauhínias. *Chrysobalanus icaco*.



The use of medicinal plants is an optional form of treatment for diabetic patients. When evaluated pharmacologically, most plants used as antidiabetics, have demonstrated hypoglycemic effects. However, the evaluation of the therapeutic effects can not be dispensed without knowing their toxicological properties. Proteomics opens new perspectives in plant biology, as it is a technology that can indicate biomarkers that differentiate species. However, no proteomic studies on native Brazilian specimens are available. The aim of the study was to characterize plant proteins used in popular medicine, such as the hypoglycemic agents cow's paw (*Bauhinia forficata* and *Bauhinia variegata*) and abajerú (*Chrysobalanus icaco*), differentiating the species by their expressed proteins and testing the cytotoxicity of their protein extracts. Another species is sold in place of *C. icaco*, *Eugenia astringens*, which expresses different proteins, and its protein extract has proved to be toxic. For protein extraction, the most suitable method for plant drying and milling was freeze-drying followed by mechanical maceration (mill), and most efficient tested antioxidant was dithiothreitol (100 mmol L<sup>-1</sup>). Electrophoretic bands were visualized on polyacrylamide gels, most in the 50 kDa range. Proteins were digested in-solution using trypsin by the filter-assisted sample preparation (FASP) method. Protein extraction and digestion yields were assessed by the Lowry method, certifying satisfactory results. Peptides were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for protein sample characterization. In total, 442 identifications were obtained, with 131 different proteins. The main biological functions of the identified proteins were cellular respiration, transport, metabolism and photosynthesis. Insulin-like proteins were not identified in any sample. Glutathione and metallothionein concentrations probably indicate responses to oxidative stress, which may be due to environmental characteristics and/or metal contamination. Cytotoxicity assays indicated that, as the protein extract concentration increases, fibroblast viability decreases. Only the *E. astringens* extract displayed cytotoxicity at all concentrations, in addition to reducing fibroblast migration. The results obtained in this study are the beginning of the proteome characterization of medicinal plants, and demonstrate the importance of this type of research in Public Health, since the current use of herbal and phytotherapeutic plants may be inadequate

Keywords: Proteomics. Toxicity. Hypoglycemic Plants. Bauhinias. *Chrysobalanus icaco*.

Figura 1 – Material botânico (folha) da <i>Bauhinia forficata</i> Link (a) e material botânico (folha) da <i>Bauhinia variegata</i> L. (b). .....	27
Figura 2 – Material botânico (ramo) da planta <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	29
Figura 3 – Composição (a) e organização da estrutura molecular (b) das proteínas. ....	32
Figura 4 – Exemplo de clivagem da cadeia peptídica com a enzima tripsina. ....	36
Figura 5– Estrutura química de um peptídeo, mostrando os fragmentos que podem ser gerados pela transferência de energia para o peptídeo (a); íons formados enumerados a partir do aminoácido N-terminal (b); fragmentação das porções amino e carboxi terminal de um mesmo aminoácido, produz íons amônio (c).....	38
Figura 6– Ciclo catalítico da GSH e sua conversão em GSSG. ....	42
Figura 7 – Mapa com os locais de coleta dos exemplares.....	50
Figura 8 – Fluxograma representativo dos testes de pré-tratamento das amostras. ....	51
Figura 9 – Fluxograma representativo das etapas do preparo de amostra auxiliada por filtro (FASP). .....	55
Figura 10 – Comparação entre os ramos de <i>Chrysobalanus icaco</i> L. (Chrysobalanaceae) (a) e <i>Eugenia astringens</i> Casar (Myrtaceae) (b). Parte abaxial da folha de <i>E. astringens</i> (c).....	63
Figura 11 – Comparação dos diferentes antioxidantes utilizados na extração de proteínas: a) amostras moídas em moinho (maceração mecânica); b) amostras maceradas em gral e pistilo (maceração manual).....	65
Figura 12 – Comparação entre os pré-tratamentos após escolha do antioxidante. ....	67
Figura 13 – Variação das concentrações de proteínas nas amostras de <i>Bauhinia forficata</i> , <i>Eugenia astringens</i> e <i>Chrysobalanus icaco</i> de diferentes locais de amostragem. ....	69
Figura 14 – Gel de eletroforese contendo 100 µg (a) e 200 µg (b) de proteínas.....	71
Figura 15 - Gel de eletroforese contendo 300 µg de proteínas antes (a) e após (b) purificação das amostras com Vivaspin <sup>®</sup> (3kDa). ....	71
Figura 16 – Variação das concentrações de peptídeos nas amostras digeridas de <i>Bauhinia forficata</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Eugenia astringens</i> e <i>Chrysobalanus icaco</i> de diferentes locais de amostragem. ....	73
Figura 17– Número de amostras por cada proteína identificada. ....	76
Figura 18 – Distribuição de proteínas identificadas unicamente nas amostras de plantas. ....	78
Figura 19 - Funções biológicas das proteínas identificadas. ....	79
Figura 20 – Variação da concentração de GSH entre as espécies <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Bauhinia</i>	

<i>forficata</i> , <i>Eugenia astringens</i> e <i>Chrysobalanus icaco</i> .....	83
Figura 21– Variação das concentrações de GSH nas amostras de diferentes locais.....	84
Figura 22 – Variação da concentração de MT entre as espécies <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Bauhinia forficata</i> , <i>Eugenia astringens</i> e <i>Chrysobalanus icaco</i> .....	86
Figura 23 – Variação das concentrações de MT nas amostras de diferentes locais.....	87
Figura 24 – Correlação entre as concentrações de GSH e MT nas amostras de planta.....	88
Figura 25 – Efeito dos extratos de <i>Bauhinia forficata</i> (NIT), <i>Eugenia astringens</i> (MAD), <i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA), <i>Chrysobalanus icaco</i> (AL) e <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG*) na viabilidade de fibroblastos.....	90
Figura 26 - Efeito dos extratos de <i>Bauhinia forficata</i> (NIT), <i>Eugenia astringens</i> (MAD), <i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA), <i>Chrysobalanus icaco</i> (AL) e <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG*) sobre a migração de fibroblastos nos tempos 0 e 24 horas. ....	92

Tabela 1 - Diferentes classes químicas de constituintes de extrato de planta.....	24
Tabela 2 – Lista dos aminoácidos mais comumente identificados e suas respectivas massas. ....	38
Tabela 3 – Alguns estudos de caracterização proteômica em espécies de planta. ....	39
Tabela 4 - Antioxidantes testados para a extração de proteínas. ....	51
Tabela 5 – Reagentes constituintes do gel de separação e de concentração. ....	54

Equação 1 – Densidade óptica das células submetidas ao ensaio de viabilidade celular. ....	60
Equação 2 – Taxa de migração de fibroblastos submetidos ao ensaio de migração celular....	61

2DE	Eletroforese bidimensional
AB	Bicarbonato de amônio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BME	$\beta$ -mercaptoetanol
BSA	<i>Bovine Albumin Serum</i> (Albumina de soro bovino)
CESTEH	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CTC	Carbonato de sódio, tartarato de potássio e sulfato de cobre
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPC	Equipamento de Proteção Coletiva
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FASP	<i>Filter-Aided Sample Preparation</i> (Preparação de amostras assistida por filtro)
GO	Glutaciona Oxidase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona Oxidada
GST	Glutaciona-S-transferase
LADA	<i>Latent Autoimmune Diabetes in Adults</i> (Diabetes Autoimune Latente em Adultos)
LC/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LPO	Lipoperoxidação
MS	Espectrometria de Massas
MPT	Modificação pós-traducional
MT	Metalotioneína

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio
NADPH	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato reduzido
NOTIVISA	Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
PBS	<i>Phosphate Buffered-Saline</i> (Tampão fosfato salino)
PNPMF	Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
Q-TOF	Quadrupólo – Tempo de voo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAFITO	Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SUS	Sistema Único de Saúde
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV	Ultravioleta

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
g	Força G
g	Gramma
g kg <sup>-1</sup>	Gramma por quilograma
kDa	quilodalton
mA	Miliampere
mg	Miligramma
mg mL <sup>-1</sup>	Miligrammas por mililitro
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol	Milimol
mmol L <sup>-1</sup>	Milimol por litro
mol L <sup>-1</sup>	Mol por litro
nm	Nanômetro
µg	Microgramma
µg mL <sup>-1</sup>	Microgramma por mililitro
µg µL <sup>-1</sup>	Microgramma por microlitro
µL	Microlitro
µmol L <sup>-1</sup>	Micromol por litro
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Potencial isoeletrico



## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	18
2.1	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS .....	18
2.1.1	<b>Principais legislações vigentes no uso de plantas medicinais e de fitoterápicos</b> ....	19
2.1.2	<b>Controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos</b> .....	20
2.2	DIABETES MELLITUS (DM) E CONTROLE POR PLANTAS MEDICINAIS .....	22
2.2.1	<b>Principais plantas medicinais com efeito hipoglicemiante</b> .....	24
2.2.1.1	Gênero <i>Bauhinia</i> .....	22
2.2.1.2	Gênero <i>Chrysobalanus</i> .....	25
2.3	ANÁLISE DE BIOMARCADORES NOS EXTRATOS DE PLANTAS HIPOGLICEMIANTES .....	30
2.3.1	<b>Caracterização proteômica</b> .....	31
2.3.2	<b>Glutathione e metalotioneína como biomarcadores de estresse oxidativo</b> .....	41
2.3.3	<b>Avaliação da toxicidade dos extratos protéicos</b> .....	44
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	47
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	48
4.1	OBJETIVO GERAL .....	48
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
5.1	MATERIAL, REAGENTES E SOLVENTES .....	49
5.2	AMOSTRAGEM DE PLANTAS.....	49
5.2.1	<b>Coleta de amostras para testes de pré-tratamento e testes de antioxidantes</b> .....	49
5.2.2	<b>Coleta de amostras para caracterização proteômica, análise de glutathione e metalotioneína, e viabilidade e migração de fibroblastos</b> .....	49
5.3	TESTES DE PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRA E TESTES DE ANTIOXIDANTES PARA EXTRAÇÃO PROTEICA.....	50
5.4	CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ..	52
5.4.1	<b>Extração de proteínas totais</b> .....	52
5.4.2	<b>Método de lowry</b> .....	52
5.4.3	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	53
5.4.4	<b>FASP e digestão de proteínas</b> .....	54
5.4.5	<b>Análise proteômica por espectrometria de massas</b> .....	56

5.5	DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA (GSH) .....	57
5.5.1	<b>Extração protéica</b> .....	57
5.5.2	<b>Quantificação da GSH</b> .....	57
5.6	DETERMINAÇÃO DE METALOTIONEÍNA (MT).....	58
5.6.1	<b>Extração protéica</b> .....	58
5.6.2	<b>Quantificação da MT</b> .....	58
5.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO PROTEICO .....	59
5.7.1	<b>Cultura de células</b> .....	59
5.7.2	<b>Ensaio de viabilidade celular (MTT)</b> .....	59
5.7.3	<b>Ensaio de migração celular</b> .....	60
5.8	PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	61
5.9	TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS, CUIDADOS E INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA.....	62
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
6.1	COLETA DE AMOSTRAS DE PLANTAS HIPOGLICEMIANTES – PATA-DE- VACA E ABAJERÚ.....	63
6.2	CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS ..	64
6.2.1	<b>Comparação entre os pré-tratamentos da amostra e entre os antioxidantes para a extração proteica</b> .....	64
6.2.2	<b>Extração de proteínas totais</b> .....	67
6.2.3	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	70
6.2.4	<b>Eficiência da digestão de proteínas e quantificação de peptídeos</b> .....	72
6.2.5	<b>Análise Proteômica por espectrometria de massas</b> .....	74
6.3	QUANTIFICAÇÃO DA GSH.....	82
6.4	QUANTIFICAÇÃO DA MT.....	85
6.5	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO PROTEICO .....	89
6.5.1	<b>Ensaio de viabilidade celular</b> .....	89
6.5.2	<b>Ensaio de migração celular</b> .....	91
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	93
8	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	95
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
	<b>ANEXOS</b> .....	104

## 1

O uso de plantas na terapêutica é uma prática tradicional utilizada pela população brasileira, sendo muitas vezes o único recurso utilizado na atenção básica de saúde. O uso de plantas medicinais e fitoterápicos é uma forma opcional de tratamento aos pacientes diabéticos, considerando ser um tratamento de menor custo, cujos benefícios se somam aos da terapia convencional.

Muitas espécies de plantas medicinais têm sido estudadas quanto as suas constituições químicas e composição de proteínas, por estarem relacionadas ao tratamento de doenças crônicas, como o diabetes. Esta doença situa-se entre as dez principais causas de morte no Brasil, apesar dos progressos em seu controle clínico. Além da hiperglicemia, há o risco de doenças vasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas, ao serem avaliadas farmacologicamente demonstraram ter efeito hipoglicemiante, principalmente devido aos efeitos sobre a atividade das células beta pancreáticas, provocando um aumento na produção de insulina ou inibindo a absorção intestinal de glicose ou a atividade semelhante à insulina dos extratos vegetais (NEGRI, 2005).

O uso terapêutico dessas plantas envolve várias etapas que vão desde o cultivo até a administração. Embora essas plantas sejam popularmente consideradas terapêuticas, frequentemente apresentam propriedades tóxicas desconhecidas pela população (ALTAN e UNAL, 2014). Por isso, é necessária a avaliação da toxicidade do extrato protéico, através de ensaios *in vitro*, além do possível estresse oxidativo que a planta pode induzir.

A proteômica visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento e surge como uma ciência para complementar os estudos sobre a biologia molecular e de complexos sistemas biológicos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Fragmentos associados à insulina são componentes protéicos em que as sequências de aminoácidos podem ser identificadas como biomarcadores de plantas hipoglicemiantes por espectrometria de massas (MS). Segundo SALVATO e CARVALHO (2010), a implementação da MS tornou possível a identificação de centenas de proteínas em experimentos únicos. Diversas metodologias estão disponíveis atualmente para o fracionamento e a purificação de amostras, a identificação de proteínas, a quantificação, a análise de modificações pós-traducionais (MPT's) e os estudos de interação. Dessa forma, a proteômica abre novas perspectivas na biologia de plantas com ênfase nos estudos de variabilidade genética, estresses fisiológicos e desenvolvimento de plantas.

## 2

### 2.1

O uso de plantas na medicina terapêutica é uma prática tradicional utilizada pela população brasileira. A busca por fitoterapias tem crescido cada vez mais devido aos efeitos colaterais, à ineficiência, aos altos custos de produção e à resistência associada ao uso das drogas comumente utilizadas. Além do interesse em terapias alternativas que sejam menos agressivas. Partes da planta como raízes, caules e folhas podem fornecer substâncias ativas que são empregadas na obtenção de medicamentos. Esses medicamentos são conhecidos como fitoterápicos que podem ser utilizados com finalidade terapêutica (DUTRA et al., 2016; KLEIN et al., 2009).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), planta medicinal é “a espécie vegetal cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. Chama-se planta fresca aquela coletada no momento de uso e planta seca a que foi precedida de secagem, equivalendo à droga vegetal”. Assim, a fitoterapia abrange as espécies vegetais podem ser frescas, secas, rasuradas, maceradas ou trituradas. Já o fitoterápico é o “produto obtido de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa.”.

A fitoterapia tem sido alvo da atenção dos usuários, autoridades e profissionais de saúde nos últimos anos, além de movimentar a economia mundial com bilhões de dólares. De acordo com dados do Ministério da Saúde, 85% da população mundial depende da utilização de partes de plantas ou medicamentos à base desses vegetais como fontes de tratamento e 80% da população de países em desenvolvimento utilizam-se de práticas tradicionais na atenção primária à saúde. No Brasil, 20% da população consomem 63% dos medicamentos alopáticos e o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação (DUTRA et al., 2016; KLEIN et al., 2009). Segundo dados publicados pela OMS, estima-se que aproximadamente 30% dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado são derivados de princípios ativos vegetais, seja direta ou indiretamente, segundo a lista de medicamentos essenciais (OMS, 2017).

### 2.1.1

No Brasil a regulamentação do uso de plantas medicinais e da fitoterapia iniciou-se em 2006 com a aprovação da Política de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) (BRASIL, 2006), que aborda, dentre outras práticas tradicionais, a utilização de plantas medicinais e a Fitoterapia. Um conjunto de resoluções e portarias descreve os instrumentos necessários à implantação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicas, destacando-se o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicas - PNPMF (BRASIL, 2016) e sua Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2009). Além disso, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), dispõe de várias resoluções (RDC - Resolução da Diretoria Colegiada) que regulamentam a obtenção, qualidade e distribuição (venda) do fitoterápico, como a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 26, que traz dados de nomenclatura, parte utilizada, posologia, modo de usar, via, indicações de uso, contra-indicações e efeitos adversos, para 66 espécies de plantas medicinais utilizadas na preparação de drogas vegetais pela empresa fabricante e o registro de medicamentos fitoterápicas (ANVISA, 2014).

As ações decorrentes da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicas, manifestadas no PNPMF tem, como primeiro princípio norteador, a ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção à saúde aos usuários do SUS, sendo a Atenção Primária à Saúde/Atenção Básica de Saúde (APS/ABS) a porta de entrada do sistema. A criação do PNPMF, em 2009, foi um marco legal e histórico, pois além de se firmar como uma política de saúde pública tem caráter ambiental, científico, social e econômico. O PNPMF (BRASIL, 2016) tem como objetivo geral:

“Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicas, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.”

Essa preocupação se deve à necessidade de garantir o uso seguro das plantas medicinais e fitoterápicas e ainda auxiliar no desenvolvimento das propostas do programa. A Organização Mundial de Saúde recomenda a difusão mundial dos conhecimentos necessários ao uso racional das plantas medicinais. Embora haja preocupação com a disseminação do uso de plantas medicinais pela população e com o uso de forma correta e

segura, as práticas tradicionais ainda permanecem presentes, que são adquiridas através do comércio popular (BOCHNER et al., 2012).

A RENISUS, que é a Relação Nacional de Plantas de Interesse para o SUS (BRASIL, 2009), elenca as plantas de uso medicinal popular. Dentre as 71 espécies registradas na RENISUS, cinco possuem potencial hipoglicemiante, incluindo as espécies de pata-de-vaca *Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata* (SOUZA, 2015). As plantas com suas indicações validadas farão parte da RENAFITO, que é a Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e que vem subsidiar a prescrição de fitoterápicos no âmbito dos serviços de saúde do SUS, sendo parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (BRASIL, 2006).

### 2.1.2

O avanço terapêutico dos fitomedicamentos vem crescendo ao associarem o conhecimento popular ao desenvolvimento tecnológico. Os extratos obtidos de plantas medicinais devem preservar os diversos componentes ativos, se caracterizando em um fitocomplexo, buscando garantir a ação farmacológica específica da espécie vegetal (DUTRA et al., 2016; KLEIN et al., 2009).

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas etc) e em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuva, da intensidade luminosa, das características dos solos, além do seu potencial genético (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Algumas substâncias químicas são características de uma determinada espécie vegetal, servindo como parâmetros para a sua caracterização e identificação, podendo atuar como substâncias marcadoras, essenciais para a padronização de fitoterápicos, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada no extrato também os demais componentes estarão igualmente representados (KLEIN et al., 2009).

As plantas medicinais e os fitoterápicos podem fornecer um tratamento eficaz para o paciente, contribuindo cada vez mais na assistência à saúde da população; entretanto, não se pode prescindir da avaliação dos efeitos terapêuticos, sendo necessário que se conheça as propriedades farmacológicas e se existem reações adversas quando administrado juntamente com outro medicamento (BOCHNER et al., 2012; KLEIN et al., 2009). De acordo com a ANVISA (ANVISA, 2014), para adquirir o registro do fitoterápico e sua liberação é necessário o cumprimento de várias etapas, que incluem estudos macro e microscópicos do vegetal, análise tóxico-farmacológica, entre outras.

Compete à ANVISA regulamentar, controlar e fiscalizar produtos de interesse para a saúde, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização dos produtos submetidos à vigilância sanitária. Atualmente, a Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 (ANVISA, 2014), estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos. O Sistema Nacional de Notificações para a Vigilância Sanitária (NOTIVISA) deve ter a capacidade de avaliar os benefícios e os riscos do produto, para assegurar a qualidade, segurança e eficácia compatíveis com seu uso racional. A facilidade de acesso a terapias tradicionais, as associações medicamentosas, a falsificação, venda ilegal de medicamentos e o uso indiscriminado dos produtos disponíveis tem contribuído para o surgimento de dúvidas em relação à segurança dos produtos comercializados (BOCHNER et al., 2012).

Os mesmos procedimentos e cuidados ainda não foram desenvolvidos para a cadeia produtiva das plantas medicinais. A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (BRASIL, 2006) aceita a premissa de que não deve ser subestimado o conhecimento popular sobre plantas medicinais e que este só deva ser repassado depois da confirmação das propriedades atribuídas às plantas e do estabelecimento do uso seguro. O Brasil, com sua ampla biodiversidade, rico em plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas e, principalmente, o potencial medicinal, tem um pouco mais de 46 mil espécies de plantas superiores catalogadas, mas somente cerca de 1100 tiveram suas propriedades medicinais avaliadas e apenas 8% foram estudadas cientificamente para a produção de novos compostos bioativos. Isto reflete na necessidade de pesquisas inovadoras que explorem a capacidade terapêutica dessa biodiversidade, para o desenvolvimento de novas biomoléculas (FLORA BRASIL 2020; SOUZA, 2015).

O uso terapêutico dessas plantas envolve várias etapas que vão desde o cultivo até a administração. Embora essas plantas sejam popularmente consideradas terapêuticas, frequentemente possuem propriedades tóxicas desconhecidas pela população. O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX registrou a ocorrência de 59.143 casos de intoxicação por plantas no Brasil no ano de 2016. Destas intoxicações, 1,1 % estavam relacionadas a circunstâncias intencionais em que a vítima buscava propriedades farmacológicas da planta. No Estado do Rio de Janeiro foram observadas 1347 intoxicações no mesmo ano (SINITOX, 2016). A notificação de reações adversas pode ser considerada um elemento chave para o fortalecimento dos sistemas de monitorização.

## 2.2

Com a cultura de utilização de plantas medicinais, os conhecimentos da sociedade antiga foram agregados ao conhecimento científico, formando uma ciência denominada etnofarmacologia, que é definida como “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (SIMÕES et al., 2010). Esta ciência está inserida no ramo da etnobiologia, definida como “uma disciplina devotada ao estudo, no mais amplo dos sentidos, do complexo conjunto de relações de plantas e animais com sociedades humanas do presente e do passado” (SIMÕES et al., 2010). A etnofarmacologia, associada ao desenvolvimento tecnológico-científico de insumos farmacêuticos, visam por meio de Políticas Nacionais que instituem o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS, estabelecer tratamentos eficazes para doenças de baixa gravidade, assim como para doenças crônicas, incluindo o diabetes (SOUZA, 2015).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica que aumenta a quantidade de glicose no sangue devido à não produção ou ineficiência da ação da insulina. Este distúrbio afeta, então, o metabolismo de carboidratos, de gorduras e de proteínas. O DM situa-se entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais e, apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas consequências letais (AQUINO et al., 2018; NEGRI, 2005). O número de pacientes tem crescido em todo o mundo segundo dados da FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES (2017), que mostram que 425 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentam quadro de diabetes, com o número de brasileiros sendo de cerca de 12,5 milhões.

Existem dois tipos de diabetes mellitus: tipo 1 e tipo 2. Os pacientes com diabetes tipo 1 sofrem de destruição autoimune das células beta pancreáticas que são as células produtoras de insulina. Com esta destruição a quantidade de insulina liberada é reduzida, não sendo suficiente para controlar toda a glicose consumida, sendo então acumulada na corrente sanguínea (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014). O diagnóstico do tipo 1 geralmente ocorre durante a infância e adolescência (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2017). Ainda não há prevenção primária, ou seja, para proteção de pessoas susceptíveis de desenvolver este tipo de diabetes, que se possa aplicar para toda a população, o que tem sido utilizado é imunomodulação e a



imunopressão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014). No diabetes tipo 2, o organismo produz insulina, mas as células adiposas e musculares não são capazes de absorvê-la ou, então, o organismo não produz insulina suficiente para controlar a taxa glicêmica. Este tipo possui associação com o aumento de peso e obesidade e normalmente é diagnosticada em adultos a partir dos 40 anos de idade. Representa cerca de 85% dos casos de diabetes em países desenvolvidos e a prevenção primária é baseada em dieta e na prática de exercícios físicos (POZZOBON et al., 2014). Além do Tipo 1 e Tipo 2, já foi constatado o Diabetes Autoimune Latente do Adulto (LADA - *Latent autoimmune diabetes of the adult*), que é caso no qual o paciente foi diagnosticado com o Tipo 2, mas houve a perda das células beta, devido à formação de anticorpos, além do diabetes gestacional, que pode ser transitório ou não, sendo identificado por volta do terceiro trimestre da gravidez (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

O DM exige cuidados clínicos contínuos e foco permanente no autocuidado para prevenir complicações agudas e reduzir o risco de complicações crônicas. Pacientes com DM desempenham papel fundamental no tratamento, promovendo a educação em saúde, com informações sobre o controle da dieta e o uso de medicamentos no controle glicêmico. Entretanto, apesar dos avanços no tratamento tradicional do DM e acesso aos serviços de saúde, muitos pacientes com DM tipo 2, caracterizada por graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina, ainda não tem níveis controlados de glicose. O controle glicêmico permanece abaixo do ideal, com uma estimativa de que apenas 56,8% dos pacientes com DM têm sua hemoglobina glicada (HbA1c) dentro da meta terapêutica (AQUINO et al., 2018; POZZOBON et al., 2014).

A insulina é o fator chave da doença, já que é o hormônio com a capacidade de controlar a quantidade de glicose no sangue, que é obtida por meio da alimentação e é convertida em fonte de energia. Sendo assim, o diabético não consegue utilizar a glicose de forma correta, aumentando o nível do mesmo no sangue, levando à hiperglicemia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

Os pacientes diabéticos podem desenvolver diferentes complicações no organismo. A hiperglicemia altera a função leucocitária, especialmente a quimiotaxia e a fagocitose, aumentando o risco de sangramento e prejudicando os processos inflamatório e de cicatrização. Essa dificuldade de cicatrização ocorre devido a complicações cardiovasculares, que causam o bloqueio ou a diminuição da circulação sanguínea, e devido ao excesso de glicose, que pode prejudicar o funcionamento do sistema imunológico. Ou seja, vasos doentes diminuem o fluxo sanguíneo, especialmente para

pernas e pés, prejudicando o processo de cura e altos níveis glicêmicos incapacitam as células de defesa do organismo. A hiperglicemia também induz estresse oxidativo e trombose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

O uso de plantas medicinais e fitoterápicos é uma forma opcional de tratamento aos pacientes diabéticos, considerando ser um tratamento de menor custo, cujos benefícios se somam aos da terapia convencional (KLEIN et al., 2009).

### 2.2.1

As plantas medicinais com efeito hipoglicemiante representam mais de 725 gêneros em 183 famílias e mais de 400 espécies (NEGRI, 2005). A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas possui efeito hipoglicemiante e possuem constituintes químicos que podem ser utilizados como agentes hipoglicemiantes, mas nem todos terapeuticamente úteis (DOS SANTOS e RIEDER, 2014; NEGRI, 2005). As substâncias biologicamente ativas extraídas das plantas são os chamados metabólitos secundários, os quais desempenham papel importante no mecanismo de defesa química, e muitas delas reduzem o nível de glicose (Tabela 1), indicando uma variedade de mecanismos de ação.

Tabela 1 - Diferentes classes químicas de constituintes de extrato de planta.

<b>Classe química</b>	<b>Número de constituintes ativos</b>
Alcalóides	38
Carboidratos	66
Cumarinas	4
Glicosídeos	1
Flavonóides	7
Glicopeptídeos	20
Sais inorgânicos	3
Iridóides	4
Lipídios	6
Peptídeos e aminas	15
Fenólicos	14
Fenolpropanóides	1
Esteróides	7
Estilbenzenos	1
Substâncias sulfúricas	2
Terpenóides	17
Vitaminas	2
Xantonas	1

Fonte: Adaptado de Negri (2005).

Algumas destas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem exibir um perfil tóxico como efeito colateral, podendo resultar em hipoglicemia devido à hepatotoxicidade e ao bloqueio  $\beta$ -adrenérgico. A toxicidade é influenciada pela identificação da espécie, da parte da planta usada na preparação do extrato, dosagem, método de preparo e rota de administração. Além disso, a alergenicidade e fotossensibilização são aspectos que podem contribuir para a toxicidade e ainda representam riscos significativos (VOLPATO et al., 2002).

A atividade hipoglicemiante das plantas se deve principalmente aos efeitos sobre a atividade das células  $\beta$ -pancreáticas, provocando um aumento na produção de insulina ou inibindo a absorção intestinal de glicose ou a atividade de uma proteína semelhante à insulina encontrada nos extratos vegetais (NEGRI, 2005). Os mecanismos de ação pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose no sangue também incluem os seguintes fatores: aumento da utilização periférica de glicose, aumento da síntese de glicogênio hepático, inibição da absorção de glicose intestinal, redução do índice glicêmico de carboidratos, redução do efeito da glutatona e eliminação de radicais livres e resistência à peroxidação de lipídios (NEGRI, 2005; VOLPATO et al., 2002).

O extrato aquoso de *C. icaco* possui uma capacidade de manter a homeostase da glicose através da normalização da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose e que esta capacidade pode estar associada ao conteúdo de polifenóis do extrato (WHITE et al., 2016). SALGUEIRO et al. (2016) verificaram que o efeito protetor do extrato de *B. forficata* pode ser atribuído à sua capacidade antioxidante, mais do que um potencial hipoglicemiante.

O diabetes pode alterar a homeostase do organismo, por distúrbios metabólicos complexos e primários dos carboidratos, que envolvem secundariamente, porém de forma importante, lipídeos e proteínas. A atividade hipoglicemiante também pode ser atribuída à presença de proteínas (NEGRI, 2005; VOLPATO et al., 2002). A atividade hipoglicemiante do extrato das sementes de *Urtica pilulifera* L. é atribuída à presença de lecitinas, glicoproteínas que se ligam especificamente a resíduos de açúcar. A ação hipoglicemiante da lecitina corresponde ao aumento da secreção de insulina, podendo, também, mimetizar a ação da insulina através da interação com os resíduos glicoproteína dos receptores de insulina (KAVALALI et al., 2003).

Desde a descoberta de substâncias similares à insulina bovina em plantas tem-se estimulado a caracterização destas proteínas e elucidação das suas funções. Uma proteína com massa molecular similar e mesma seqüência de aminoácidos que a insulina bovina foi

encontrada nos frutos de *Vigna unguiculata* L. (VENANCIO et al., 2003). Proteínas semelhantes à insulina (*insulin-like protein*) podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de plantas e outras funções metabólicas ainda desconhecidas. Além disso, eles podem ser responsáveis por algumas das ações dos extratos vegetais por suas propriedades antidiabéticas (KOONA et al., 2010).

#### 2.2.1.1 Gênero *Bauhinia*

As plantas do gênero *Bauhinia*, conhecidas popularmente como pata-de-vaca, pertencem à família Fabaceae, e compreendem aproximadamente 300 espécies, presentes em diversas áreas tropicais, com diferentes portes: ervas, arbustos, árvores e trepadeiras (DOS SANTOS e RIEDER, 2014). Todas as espécies deste gênero são conhecidas pelo formato de suas folhas que se assemelham a uma pata de vaca, mas cada espécie possui uma composição química própria (DOMINGOS e JÚNIOR, 2016).

No Brasil é muito comum a confusão entre as espécies *Bauhinia forficata* e a *Bauhinia variegata*, embora existam diferenças visíveis entre as mesmas. As duas espécies possuem potencial hipoglicemiante comprovado e estão listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de Interesse ao SUS (RENISUS) (SOUZA, 2015) e, mesmo assim ainda não foram regularizadas pela ANVISA.

A *Bauhinia forficata* Link (Figura 1a), é uma espécie nativa da América do Sul, estando presente na Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil, onde é encontrada nas regiões Sul e Sudeste, além dos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco. São consideradas plantas heliófilas, podendo medir até 5 a 9 m de altura, e possui flores brancas com pétalas lineares e estreitas. Os ápices das folhas são pontiagudos e há presença de estípulas modificadas presentes na base da folha. Sua principal característica morfológica é a presença de espinhos no ramo onde fica aderido o pecíolo de cada folha e suas flores são exclusivamente brancas e com pétalas estreitas (DOMINGOS e JÚNIOR, 2016; DUARTE et al., 2007). A *Bauhinia variegata* L. (Figura 1b) é nativa da China, mas é largamente utilizada em arborização urbana de praças e jardins nas regiões sul e sudeste do Brasil. A árvore na fase adulta mede de 7 a 10 metros de altura e possui caule liso (DOMINGOS e JÚNIOR, 2016; DUARTE et al., 2007).

Figura 1 – Material botânico (folha) da *Bauhinia forficata* Link (a) e material botânico (folha) da *Bauhinia variegata* L. (b).



Fonte: Fotos da autora.

Ensaio farmacológicos conduzidos com extratos de *B. variegata* tem comprovado as atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica, antimicrobiana, antiviral, citotóxica e antitumoral (DUARTE et al., 2007). A espécie *B. forficata* é a mais citada para o tratamento de diabetes por ter o seu efeito hipoglicemiante comprovado (DUARTE et al., 2007). A folha é a parte da planta que possui comprovação da ação antiglicêmica e é a mais utilizada para fazer chá. Devido ao seu grande uso para fins terapêuticos e interesse em pesquisas, existem inúmeros estudos que avaliam sua toxicidade, demonstrando que o uso do extrato aquoso é seguro e o uso do seu decocto, além de melhorar o quadro clínico do paciente, não causa toxicidade tecidual (BATISTA et al., 2013; DOS SANTOS e RIEDER, 2014).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com espécies do gênero *Bauhinia* revelaram que os principais metabólitos secundários produzidos são flavonoides, triterpenoides e glicosídeos esteroidais (DOS SANTOS e RIEDER, 2014). O flavonoide encontrado em maior quantidade é a kaempferitrina, o principal marcador químico, que está presente nas folhas de *B. forficata* e ausente na *B. variegata*. Há também a presença de outros compostos ativos como kaempferol-3-O- $\alpha$ -dirramnosídeo e  $\beta$ -sitosterol (BATISTA et al., 2013; SALGUEIRO et al., 2016).

As propriedades biológicas das espécies de *Bauhinia* foram atribuídas aos seus compostos fenólicos. Neste contexto, exemplares de *B. forficata* são capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio (EROs) porque contêm flavonóides entre seus constituintes, especialmente derivados da quercetina e do carnitol. Essas características podem ser extremamente importantes nas doenças em que há um aumento do estresse oxidativo,

como no DM e suas complicações. De fato, a hiperglicemia crônica na DM tem se relacionado à elevada produção de EROs e dano oxidativo severo em diferentes tecidos, incluindo o fígado. Além disso, relatos anteriores mostraram que, em modelos experimentais de DM, a enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) contendo sulfidrila foi inibida (SALGUEIRO et al., 2016).

O extrato de *B. divaricata* é usado para tratar uma variedade de enfermidades, tais como problemas gastrintestinais e respiratórios, sendo também usado no tratamento do diabetes. A atividade hipoglicemiante desta planta é atribuída à sua capacidade de inibir a  $\alpha$ -amilase, reduzindo a taxa de glicose, triglicerídeos e colesterol e sendo útil no tratamento do diabetes tipo 2 (NEGRI, 2005). Além de seu possível potencial hipoglicêmico, considerações sobre as atividades antioxidante e hepatoprotetora de algumas espécies de *Bauhinia* foram postuladas. Extratos de *B. forficata* Link e *B. cheilandra* (Bong.) Steud mostraram atividade antidiabética em ratos diabéticos por aloxana. Já a atividade antioxidante e hepatoprotetora foi previamente demonstrada para *B. forficata* Link, *B. racemosa* Lam e *B. variegata* L (SALGUEIRO et al., 2016).

#### 2.2.1.2 Gênero *Chrysobalanus*

O gênero *Chrysobalanus* faz parte da família Chrysobalanaceae, que consiste em aproximadamente 18 gêneros e 500 espécies diferentes (PRANCE, 2003). As espécies crescem em diversos habitats em regiões de baixa altitude, especialmente em florestas, matas de galeria, florestas inundáveis, cerrados e restingas.

*Chrysobalanus icaco* L. (Figura 2) é uma espécie de arbusto ou de árvore de pequeno porte (até 5 m de altura), com folhas alternas e simples e, que produz continuamente flores com corola branca e frutas drupas amarelas, roxas ou pretas. Esta espécie é conhecida no Brasil como abajurú, abajerú, bajerú, guajurú, guajirú entre outros nomes populares, ocorre no litoral brasileiro e também no litoral dos países do norte da América do Sul, América Central e México, bem como na costa ocidental da África (SILVA e PEIXOTO, 2009).

Figura 2 – Material botânico (ramo) da planta *Chrysobalanus icaco* L.



Fonte: Foto da autora.

Diferentes partes de *C. icaco* são utilizadas para distintos tratamentos. Os frutos, com uma polpa branca e adocicada, são comestíveis e em muitos países são utilizados como doces e em conservas. O óleo da semente pode ser aproveitado para preparação de uma emulsão anti-diarréica (SILVA e PEIXOTO, 2009). Suas raízes, cascas e folhas são adstringentes e utilizadas contra disenterias e pedra nos rins (DEFAVERI et al., 2011). Em consequência de seu efeito conhecido no controle do diabetes, o comércio das folhas frescas e/ou secas de *C. icaco* pode ser facilmente verificado tanto em feiras e mercados como na forma de ensacados vendidos, em diferentes estabelecimentos comerciais, na cidade do Rio de Janeiro (SILVA e PEIXOTO, 2009; BOCHNER et al., 2012). Embora as folhas do abajerú sejam utilizadas na medicina popular como hipoglicemiante e antioxidante, esta espécie não consta na RENISUS.

O extrato de folhas é usado na medicina popular, pois exerce atividades biológicas, como a diminuição dos níveis de açúcar no sangue, a sensibilidade à insulina e a angiogênese. Outros efeitos do extrato de folhas de *C. icaco* são descritos, como o diurético, antiangiogênico, citotóxico contra células da leucemia mieloide crônica e antioxidante (VENANCIO et al., 2018). Esses efeitos estão associados à presença de terpenóides (diterpenos e triterpenos), flavonóides, esteróides e taninos, com propriedades funcionais. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de flavonóides (polifenóis) como rutina, mirricitrina e quercitrina, assim como outros derivados de miricetina e

quercetina nos extratos aquoso e hidroalcoólico de suas folhas (WHITE et al., 2016).

Os frutos são ricos em antocianinas, pigmentos naturais que possuem capacidade antioxidante e são responsáveis por muitos efeitos benéficos, como proteção contra estresse oxidativo. Células no organismo geram espécies reativas ao oxigênio (EROs), e a superprodução dessas moléculas leva a interações deletérias com DNA, RNA, proteínas e lipídios. Os compostos antioxidantes obtidos a partir da dieta podem reduzir ou impedir a produção excessiva de EROs, promovendo a ação antioxidante endógena local e neutralizando rapidamente essas moléculas (VENANCIO et al., 2016). Dados indicam que compostos fitoquímicos e minerais no fruto do abajerú protegem contra dano no DNA, associado às propriedades antioxidantes (VENANCIO et al., 2018).

### 2.3

Biomarcadores são respostas biológicas produzidas pela presença de certas substâncias no ambiente, envolvendo variações bioquímicas, histológicas, fisiológicas, citoquímicas e comportamentais. São de extrema importância por estarem relacionados com o impacto na saúde dos indivíduos expostos, indicando melhores parâmetros de risco. A determinação de biomarcadores pode ajudar a delinear a continuidade dos eventos, fornecendo índices qualitativos e quantitativos do *status* de indivíduos em diferentes estágios do processo toxicológico, desde a exposição até a doença (CHEN et al., 2015).

Para avaliar qualquer alteração na estrutura ou função de um organismo, três categorias de biomarcadores podem ser identificadas: os biomarcadores de exposição, que estimam a dose interna ou a biodisponibilidade, como metabólitos e proteínas; os biomarcadores de efeito, que detectam estresse manifestado em nível de organização biológica, como aberrações cromossômicas e micronúcleo, e os biomarcadores de susceptibilidade, que indicam a habilidade adquirida de um organismo em responder à exposição a um xenobiótico, como os polimorfismos genéticos (PEDRETE e MOREIRA, 2018).

Os biomarcadores de exposição podem ser úteis na detecção precoce ainda que não tenham sido detectadas alterações significativas na saúde dos indivíduos expostos. Estes biomarcadores podem ser protéicos, metaloprotéicos ou enzimáticos, como as metalotioneínas (ligação a íons metálicos), enzimas antioxidantes (recuperação de danos oxidativos), inibições da acetilcolinesterase (efeito neurotóxico), entre outros (CHEN et al., 2015). O uso de biomarcadores protéicos é possível devido ao fato dos compostos tóxicos



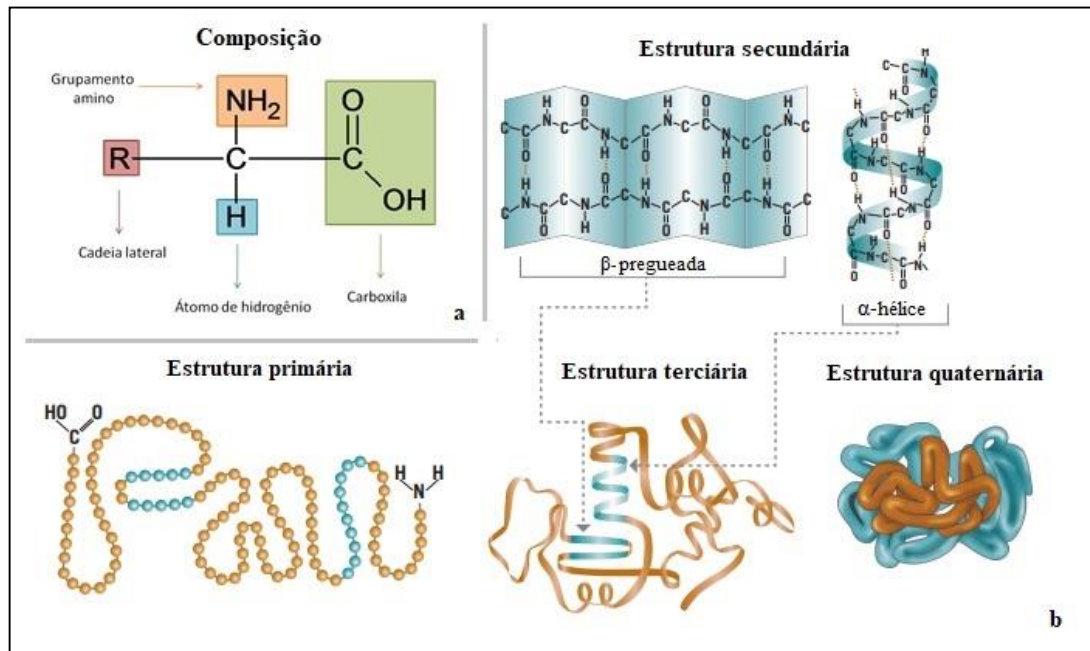
apresentarem grande afinidade pelos elétrons dos aminoácidos formadores das proteínas (ex. -SH) (BREDA et al., 2008, MAGALHÃES, 2008).

### 2.3.1

As proteínas são macromoléculas, compostos de aminoácidos de massa molar bastante variável. As proteínas desempenham papéis importantes nos processos biológicos e estrutura dos organismos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores ou transportadoras de moléculas através das membranas celulares e outros. Os aminoácidos moldam as propriedades das proteínas, de acordo com os tamanhos, formas, cargas das diferentes cadeias laterais, de acordo com a capacidade de preencher o interior da proteína, de formação de estruturas secundárias, de ionização e reatividade química, de interação com íons, de formar ligações de hidrogênio e de interação com a água (BREDA et al., 2008).

As proteínas são estruturas identificadas pelo código genético, compostas a partir de 20 aminoácidos, que combinam entre si formando uma grande variedade de estruturas. Os aminoácidos possuem uma composição, com um átomo de carbono central, ligado a um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral chamada de “R”, como ilustrada na Figura 3a. A cadeia lateral pode ser alifática ou aromática, carregada ou não carregada (MAGALHÃES, 2008). As estruturas das proteínas (Figura 3b) são classificadas em primária, secundária, terciária e quaternária, mas cada proteína possui uma configuração única de acordo com a sequência de aminoácidos e com a inclinação das ligações, proporcionada pelos arranjos intermoleculares. A estrutura primária consiste na sequência de aminoácidos. A secundária é arranjo espacial, estabilizada por pontes de hidrogênio entre a amina e a carbonila, sendo subdividida em  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -pregueada. A terciária é o dobramento da cadeia peptídica, chamada também de conformação da proteína e é estabilizada por pontes dissulfeto, ligação iônica, ligação de Van der Waals e ligações de hidrogênio. As proteínas que possuem mais de uma cadeia peptídica (subunidades) possuem um quarto nível de organização estrutural, a estrutura quaternária, que é o arranjo espacial das subunidades e os tipos de interações (BREDA et al., 2008; PARTICLE SCIENCES, 2009).

Figura 3 – Composição (a) e organização da estrutura molecular (b) das proteínas.



Fonte: adaptado de PARTICLE SCIENCES (2009).

Os aminoácidos presentes nas proteínas são ligados covalentemente por meio de uma reação de condensação, ou seja, quando há liberação de água, entre a carboxila de um aminoácido e o grupamento amina de outro aminoácido. Este tipo de ligação (C-N) é chamado de peptídica e a união de vários aminoácidos é chamada de cadeia polipeptídica (MAGALHÃES, 2008). Os aminoácidos com átomos quirais podem existir como estereoisômeros – moléculas que diferem somente no arranjo espacial dos átomos. Os  $\alpha$ -aminoácidos que constituem as proteínas têm a configuração estereoquímica L. Por convenção, na forma L, o grupo  $\alpha - \text{NH}_3^+$  está projetado para a esquerda, enquanto na forma D, está direcionado para a direita (BREDA et al., 2008).

Em pH ácido a amina se apresenta na forma protonada,  $-\text{NH}_3^+$ , mas a carbonila não sofre dissociação. Já em pH básico, a carbonila perde um próton apresentando-se na forma ionizada,  $-\text{COO}^-$ . Mas em um determinado pH ou ponto isoelétrico, a soma das cargas elétricas de um aminoácido é igual a zero, sendo então chamado de “*Zwitterion*”. Cada proteína apresenta um ponto isoelétrico (pI) e, neste ponto, algumas propriedades como viscosidade e solubilidade atingem o seu mínimo. Quando o pH for menor do que pI, a proteína irá apresentar carga positiva e quando o pH for maior do que o pI, apresentará carga negativa (MAGALHÃES, 2008).

A desnaturação de uma proteína consiste na quebra das estruturas secundárias e terciárias por meio da ação do calor que é capaz de romper as ligações de hidrogênio que

estabilizam a conformação da proteína, da agitação, radiações, mudanças bruscas de pH, entre outros, gerando a alteração de suas propriedades fisiológicas (MAGALHÃES, 2008; PARTICLE SCIENCES, 2009).

O proteoma pode ser definido com o conjunto de proteínas expressos por um genoma e varia de acordo com diversos fatores em que o organismo se encontra. O proteoma está mais próximo do fenótipo do que o genoma ou o transcriptoma e, como tal, pode ser mais diretamente responsivo ao ambiente e, portanto, está estritamente ligado à adaptação (PEDRETE e MOREIRA, 2018). No contexto da genética, o fenótipo pode ser observado a partir dos pontos de vista morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular. Sob a visão molecular, o fenótipo pode ser descrito em termos de mRNA e proteínas, associados ao genoma e influenciados pelo ambiente. A atividade das proteínas está associada à função do gene, uma vez que é o produto final da regulação da atividade gênica (SALVATO e CARVALHO, 2010).

A proteômica, que visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento, surge como mais uma ramificação entre as tecnologias ômicas para complementar os estudos sobre a biologia molecular das células. Estas tecnologias tem avançado no desenvolvimento de novas técnicas de análise simultânea de misturas complexas em sistemas biológicos. Dentre essas tecnologias, estão também a genômica, transcriptômica e metabolômica. O início da proteômica foi marcado pela caracterização de perfis proteicos, com o uso de géis de eletroforese, passando, posteriormente, a focar outros aspectos como a quantificação de proteínas, as interações entre proteínas e as modificações pós-traducionais, como a fosforilação, a glicosilação, a metilação e a sulfatação (NEWTON et al., 2004).

#### 2.3.1.1 Técnicas Proteômicas

Devido ao grande número de proteínas e suas complexidades, não há um único protocolo que seja eficaz para todas elas, sendo necessária a associação de tecnologias a fim de aumentar a resolução do proteoma.

O primeiro procedimento que deve ser realizado na amostra é o rompimento celular para que possa ocorrer a liberação das proteínas em um meio solúvel. Tecidos de plantas apresentam robusta parede celular, sendo necessárias condições drásticas para esta ruptura, porém, que podem comprometer as demais etapas, como a separação e identificação das proteínas (BARACAT-PEREIRA et al., 2012). São algumas delas: lise osmótica, lise realizada através de detergentes; lise por ação enzimática; e agitação e maceração com

diversas temperaturas. Durante esta etapa as proteínas são aquecidas na presença de um agente antioxidante, como o  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), ditioneitol (DTT) ou tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP), e de um detergente surfactante, como o SDS. O aquecimento é responsável pela desnaturação das proteínas, já os agentes redutores e o detergente são responsáveis pela redução das ligações dissulfeto tornando a cadeia linear e adquirindo a carga negativa do SDS. O DTT além de clivar as pontes de dissulfeto entre os resíduos de cisteína é um agente desnaturante, tornando-o mais eficiente e fazendo com que apresente melhores resultados. O TCEP não precisa ser removido durante a digestão, e o BME tem tendência a formar ligações com cisteínas livres (BARACAT-PEREIRA et al., 2012; MAGALHÃES, 2008).

A segunda etapa de uma análise proteômica envolve o conhecimento da natureza dos constituintes da amostra e de suas concentrações aproximadas, que é essencial antes da escolha da metodologia. Isto facilitará a identificação dos possíveis interferentes e, conseqüentemente, ajudará na escolha do método mais apropriado (MAGALHÃES, 2008). Outros fatores, também importantes, são a sensibilidade, dependente da concentração de proteína na amostra e do volume de amostra disponível, além da rapidez e o custo da metodologia. O método de LOWRY et al. (1961) para quantificação de proteínas totais é baseado no reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de ácido fosfórico, fosfomolibdato e fosfotungstato. A oxidação dos aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano) gera uma alteração colorimétrica para azul escuro, com absorção máxima em 750 nm.

As diferentes quantidades e combinações presentes em uma molécula de proteína conferem a ela peso e carga elétrica distinta. Nesse sentido, a eletroforese em gel de poli(acrilamida) é uma técnica que utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos. Para tal, a eletroforese bidimensional (2-DE) separa as proteínas em dimensões distintas. Na primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI) e na segunda de acordo com suas massas moleculares, para promover a separação de misturas complexas com melhor resolução (DIAS et al., 2007). O resultado da 2-DE é um perfil de distribuição de *spots* formados por proteínas únicas ou misturas simples de proteínas. No caso da eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), as proteínas são separadas apenas de acordo com o peso molecular.

O gel de poli(acrilamida) forma uma rede composta de polímeros (acrilamida e bis-acrilamida), permitindo a migração das moléculas, sendo mais fácil de atravessar o gel para proteínas com menor o peso molecular e para a maior concentração de acrilamida,

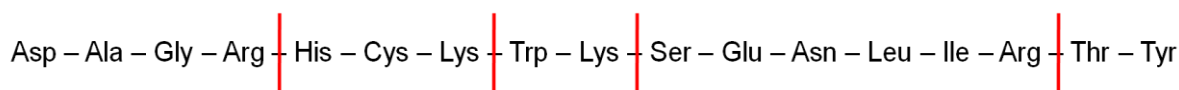
pois os poros formados são menores. Como as proteínas são anfóteras, ou seja, podem obter carga tanto positiva quanto negativa em função do pH, tem-se o cuidado de mantê-lo constante durante o procedimento. O SDS é um surfactante aniônico, que interage com as proteínas formando micelas e gerando carga negativa nas mesmas, o que facilita a separação por peso molecular. Como elas obtêm a carga negativa, irão migrar somente para o pólo positivo (SALVATO e CARVALHO, 2010). Apesar de ser um método preferencial para diferenciar isoformas de proteínas e para análise de modificações pós-traducionais (MPTs), a eletroforese apresenta diversas limitações, como a difícil automação, maior tempo para sua realização, não separa proteínas de membrana, apresenta uma faixa de concentração de proteínas limitada para detecção, além da digestão das proteínas ter que ser realizada em gel, descorando-o, o que faz ser mais trabalhoso que a digestão em solução (NEWTON et al., 2004).

Recentemente, a técnica de separação por eletroforese em gel de poliacrilamida e a digestão em gel vem sendo substituídos pelo método de preparação de amostra auxiliada por filtro (*Filter-Aided Sample Preparation - FASP*). Este método ocorre dentro de um dispositivo de filtração e pode ser utilizado para a geração de peptídeos tripticos a partir de células e tecidos lisados na presença de detergentes, sendo compatível com a análise por LC-MS e apropriado ao estudo de proteomas inteiros e frações proteicas. As principais características do método que o tornam superior aos outros métodos de preparo de amostras são: 1) fornece digestão em solução de proteínas; 2) pode ser aplicado a amostras contendo concentrações elevadas de detergentes; 3) não há nenhuma precipitação e a concentração da amostra é mantida elevada; 4) quantidade (0,2-200 µg) de proteína total que pode ser processados em um único dispositivo de filtro; 5) o rendimento e a pureza dos peptídeos podem ser monitorados por espectrofotometria no UV, permitindo o controle da qualidade da digestão (WIŚNIEWSKI, 2017). O FASP é usado posteriormente à extração das proteínas e envolve as etapas de remoção do detergente SDS, alquilação do grupo tiol com iodoacetamida, *clean-up*, redução da concentração de ureia e por fim, a digestão das proteínas (WIŚNIEWSKI et al., 2009). A remoção do SDS deve ser feita, pois este é capaz de alterar a separação cromatográfica dos peptídeos, de eliminar sinais quando utilizada a ionização por *electrospray* e de inibir a ação da tripsina.

A enzima tripsina, utilizada no processo de digestão das proteínas, apresenta diversas vantagens que a tornam a melhor escolha para este processo: possui baixo custo, cliva especificamente em C terminal de lisina (Lys) e arginina (Arg), como mostra a Figura 4, e favorece a fragmentação de peptídeos duplamente carregados, o que ajuda na geração

de espectros informativos de espectrometria de massa sequencial (WIŚNIEWSKI et al., 2009).

Figura 4 – Exemplo de clivagem da cadeia peptídica com a enzima tripsina.



Fonte: Elaborado pela autora.

O problema dos métodos de preparo de amostra para análise proteômica é a presença de interferentes que possam vir prejudicar alguma técnica. Por exemplo, os sais inorgânicos e detergentes (usados para remover lipídios e solubilizar proteínas de membrana) são capazes de interferir nas separações cromatográficas e na espectrometria de massa, enquanto que os inibidores de protease podem interferir na digestão das proteínas pela tripsina ou outras proteínas exógenas (TENÓRIO-DAUSSAT et al., 2014). Os processos de purificação de amostras levam em consideração vários fatores, sendo um desses a escolha do agente redutor, responsável por evitar a oxidação de proteínas e comumente usado para reduzir as ligações dissulfeto. Os reagentes mais comumente usados são o  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), o ditioneitol (DTT) e o cloridrato de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP). O TCEP reduz as ligações dissulfeto de forma tão eficaz quanto o DTT, mas, diferentemente desse e de outros agentes redutores contendo tiol, o TCEP não precisa ser removido. Este agente reduz seletivamente os dissulfetos de alquila mais estáveis e solúveis em água em faixa de pH mais ampla (1,5 a 8,5) do que o DTT (pH entre 6,5 e 9,0) e BME (entre 5,0 e 8,5) (TENÓRIO-DAUSSAT et al., 2014).

Após o desenvolvimento tecnológico houve a necessidade de equipamentos analíticos com boa seletividade, resolução e sensibilidade para o desenvolvimento da proteômica. O fluxo experimental normalmente utilizado na proteômica consiste na extração de proteínas, separação, quantificação e, por último, na sua identificação, na qual as informações sobre o proteoma de uma amostra podem derivar da análise de proteínas intactas (proteômica *top-down*) ou de seus peptídeos (proteômica *bottom-up*). Na proteômica *bottom-up*, as proteínas de uma mistura são digeridas, e os peptídeos resultantes são analisados por espectrometria de massa (MS). As limitações dessa estratégia podem estar na cobertura incompleta da sequência das proteínas, na perda das MPTs e nas degradações como resultado da digestão proteolítica. Já a análise *top-down* permite deduzir a estrutura primária da proteína e a maior parte das MPTs, mas esta estratégia é limitada pela energia de colisão

necessária na fragmentação da proteína que é insuficiente para proteínas maiores que 50 KDa, ficando restrita sua aplicação à análise de proteínas purificadas (HIRANO et al., 2004; SALVATO e CARVALHO, 2010).

A implementação da espectrometria de massa (MS) para a análise proteômica tornou possível a identificação de centenas de proteínas em experimentos únicos. A MS é uma importante ferramenta para a busca de novos biomarcadores, para a identificação de proteínas e para a análise de MPTs, devido a sua sensibilidade, velocidade, confiabilidade e precisão. Para a análise efetiva, o proteoma deve ser fracionado para permitir a detecção e quantificação por MS. A combinação de dois analisadores de massa é chamada de espectrometria de massas sequencial (*tandem mass spectrometry* ou MS/MS), permitindo a análise de peptídeos em amostras complexas. Peptídeos são separados pelas suas propriedades químicas na etapa da cromatografia e depois separados pelo seu valor de massa/carga ( $m/z$ ) no espectrômetro de massas com subsequente análise em sequência por MS/MS. Métodos computacionais permitem a aquisição automática do espectro em tempo real. O instrumento é programado para escolher quais íons precursores deve selecionar, geralmente os mais abundantes e com sinais mais fortes, para análise por MS/MS (BARACAT-PEREIRA et al., 2012).

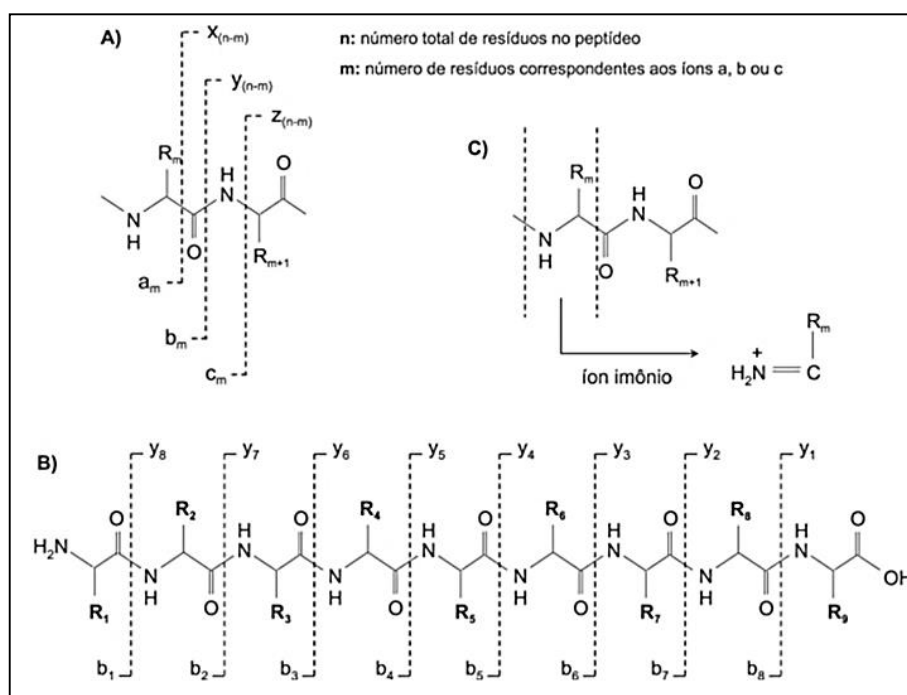
A fragmentação de peptídeos por espectrometria de massas para a posterior análise da sequência de aminoácidos é realizada, geralmente, por meio do processo de dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation* – CID). A fragmentação ocorre simultaneamente nas posições amino e carboxi-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, íons imônio são produzidos (Tabela 2). Esses íons servem como íons-diagnóstico, podendo indicar a presença ou ausência de determinados aminoácidos (CANTÚ et al., 2008). Durante a fragmentação, as ligações entre os aminoácidos na cadeia se desestabilizam, induzindo a formação de dois íon-fragmentos, como mostra na Figura 5: 1) íons que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal, gerando fragmentos -a, -b e -c, dependendo da ligação que é fragmentada; e 2) íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal, gerando os fragmentos -x, -y -z, dependendo da ligação que é fragmentada (CANTÚ et al., 2008).

Tabela 2 – Lista dos aminoácidos mais comumente identificados e suas respectivas massas.

Gly	G	57,052	57,02146	30	
Ala	A	71,079	71,03711	44	
Ser	S	87,078	87,03203	60	
Pro	P	97,117	97,05276	70	
Val	V	99,133	99,06841	72	
Thr	T	101,105	101,04768	74	
Cys	C	103,145	103,00919	76	
Leu	L	113,160	113,08406	86	72
Ile	I	113,160	113,08406	86	72
Asn	N	114,104	114,04293	87	70
Asp	D	115,089	115,02694	88	
Gln	Q	128,131	128,05858	101	84, 129
Lys	K	128,174	128,09496	101	70, 84, 112, 129
Glu	E	129,116	129,04259	102	
Met	M	131,199	131,04048	104	61
His	H	137,141	137,05891	110	82, 121, 123, 138, 166
Phe	F	147,177	147,06841	120	91
Arg	R	156,188	156,10111	129	59, 70, 73, 87, 100, 112
Tyr	Y	163,176	163,06333	136	91, 107
Trp	W	186,213	186,07931	159	117, 130, 170, 171

Fonte: Adaptado de CANTÚ et al. (2008).

Figura 5– Estrutura química de um peptídeo, mostrando os fragmentos que podem ser gerados pela transferência de energia para o peptídeo (a); íons formados enumerados a partir do aminoácido N-terminal (b); fragmentação das porções amino e carboxi terminal de um mesmo aminoácido, produz íons amônio (c).



Fonte: Adaptado de CANTÚ et al. (2008).



### 2.3.1.2 Análise Proteômica de Plantas Hipoglicemiantes

As análises proteômicas ainda são pouco utilizadas na área vegetal. Uma das maiores barreiras da proteômica vegetal é a falta do sequenciamento do DNA da maioria das espécies (DIAS et al., 2007); dificilmente se tem o proteoma em um banco de dados sem o genoma daquela determinada espécie.

Em comparação com os demais organismos, as plantas também exigem maior cuidado na análise proteômica já que apresenta proteases e outros compostos interferentes. A proteômica vegetal tem crescido e agregado informações sobre as questões biológicas. Para a cultura de tecidos de plantas, a proteômica apresenta-se como uma importante ferramenta no estudo e controle dos processos morfo genéticos *in vitro* (DIAS et al., 2007).

A análise proteômica em plantas surgiu com estudos do gênero *Arabidopsis* e do gênero *Oryza* e hoje é aplicada a diferentes culturas por MS, como o arroz (XU et al., 2015), o milho (CASAZZA et al., 2010) e a soja (LU et al., 2010), além das espécies na Tabela 3, em que os estudos identificaram as principais funções das proteínas. A análise de perfis protéicos na comparação de espécies com características de interesse agrônomo, envolvendo embriões (NOGUEIRA et al., 2007), endospermas (HE et al., 2015), raízes (LI et al., 2010), cultura de células (YABE et al., 2004) e folhas (MODDE et al., 2017) contribui cada vez mais para o estudo funcional de proteínas envolvidas na germinação, no enchimento e na maturação de grãos, e no seu desenvolvimento.

Tabela 3 – Alguns estudos de caracterização proteômica em espécies de planta.

<i>Arabidopsis thaliana</i>	2DE-LC-MS/MS	Metabolismo	KLEFFMANN et al. (2004)
<i>Sporobolus stapfianus</i>	2DE-LC-MS/MS		OLIVER et al. (2011)
<i>Vigna unguiculata</i>	2DE-Maldi-TOF	Quitinase e ribonuclease pertencente à família das proteínas PR-4 e PR-10	NOGUEIRA et al. (2007)
<i>Manihot esculenta</i>	2DE-LC-MS/MS	Desenvolvimento, metabolismo e biossíntese RuBisCO em partes aéreas	LI et al. (2010)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2DE-Maldi-TOF	Alterações nas proteínas de defesa em relação à patogênese (PR-10) e ao metabolismo	DATTA et al. (2013)
<i>Araucaria angustifolia</i>	2DE-LC-MS/MS	Vias metabólicas energéticas, processos de translação, regulação do estresse oxidativo e sinalização celular.	BALBUENA et al. (2011)

Fonte: Elaborada pela autora.

A proteômica tornou-se uma importante abordagem na biologia molecular de plantas, e sua integração com técnicas clássicas de melhoramento genético resultam em novas possibilidades a serem alcançadas no desenvolvimento de variedades de plantas mais resistentes e produtivas (DIAS et al., 2007). Em geral, a aplicação da proteômica no melhoramento genético de plantas pode se iniciar com a detecção de proteínas responsivas aos efeitos bióticos ou abióticos (SALVATO e CARVALHO, 2010). Estudos na área de estresses abióticos, como seca, temperatura e salinidade, e estresses bióticos, como doenças e pragas, podem empregar a análise de proteínas diferencialmente expressas, com o intuito principal de fornecer base à descoberta de novos marcadores moleculares. As respostas fenotípicas ao estresse hídrico são comuns às plantas tolerantes e sensíveis, o que dificulta a seleção de indivíduos superiores (BALBUENA et al., 2009; OLIVER et al., 2011). Outra aplicação importante seria na avaliação das modificações da expressão de proteínas decorrentes de mutações ou até mesmo do processo de transgenia (DONG e WENG, 2013). A identificação das proteínas afetadas, nesses casos, pode fornecer valiosas informações sobre os processos bioquímicos que são alterados no metabolismo, derivados tanto dos efeitos pleiotrópicos quanto decorrentes das perturbações genéticas (DONG e WENG, 2013; PORTER e DAY, 2016).

Novas metodologias abrirão novas perspectivas para fins de pesquisa etnobotânica e fitomédica. A aplicação das tecnologias ômicas desenvolve a possibilidade de investigar as fitopreparações para seus complexos mecanismos de ação de constituintes isolados em extratos de plantas, uma vez que o modo de ação de uma combinação de drogas pode diferir substancialmente do modo de ação dos mesmos medicamentos aplicados individualmente (ALTAN e UNAL, 2014; APAYA et al., 2016).

Extratos etanólicos de plantas medicinais tem sido testados para conferir o caráter medicinal e, no caso para o tratamento do diabetes, plantas medicinais com potencial hipoglicemiante, como a *Bauhinia forficata* (SALGUEIRO et al., 2016), *Bauhinia variegata* (AZEVEDO et al., 2006) e *Chrysobalanus icaco* (WHITE et al., 2016) estão sendo testadas na dieta de ratos induzidos à diabetes. A interação proteína-proteína é uma indicação de parceria funcional e, portanto, proteínas que se associam à insulina podem estar funcionalmente relacionadas com caminhos dependentes. Fragmentos associados à insulina são componentes protéicos, em que as sequências de aminoácidos podem ser identificadas como biomarcadores de plantas hipoglicemiantes por espectrometria de massas (ALTAN e UNAL, 2014; HARDIKAR et al., 2016; STADLBAUER et al., 2016), e diferenciando as espécies.

### 2.3.2

Estresses abióticos geralmente resultam em superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), como oxigênio ( $^1\text{O}_2$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ). Estas EROs causam danos oxidativos que levam à peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, inibição de enzimas e danos no DNA/RNA. As EROs também são reconhecidas por sua ação de sinalização na regulação de processos de desenvolvimento de tolerância ao estresse, devido ao desequilíbrio destas moléculas de sinalização oxidativa e a produção de substâncias antioxidantes. A regulação das EROs é, portanto, vital para melhorar a resistência ao estresse das plantas e é implementada por um sistema de defesa, composto de uma série de enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos (HASANUZZAMAN et al., 2017; LABUDDA et al., 2014).

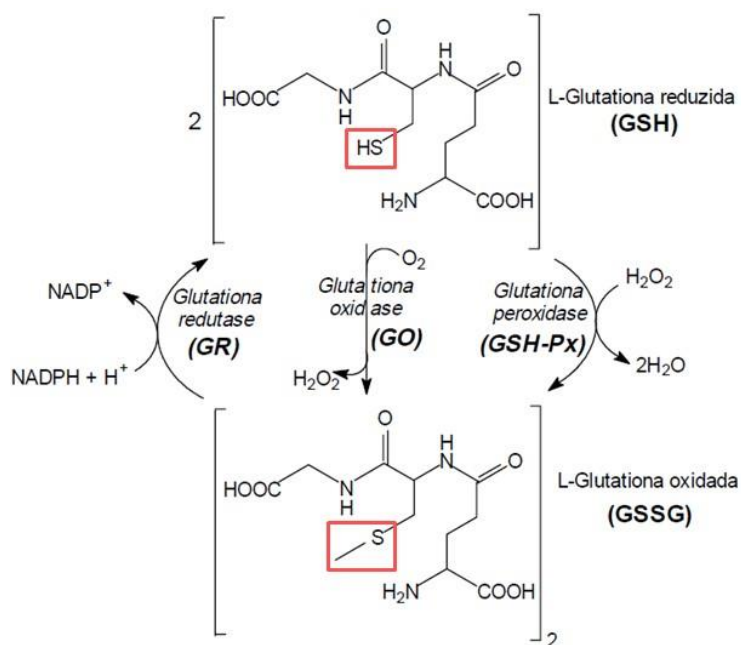
Antioxidantes estão entre os principais elementos que protegem plantas dos danos oxidativos causados por estresses abióticos. Entre os antioxidantes não enzimáticos, a glutathione (GSH) é um tiocomposto solúvel em água e de baixo peso molecular que é distribuído amplamente na maioria dos tecidos vegetais. A GSH é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) que contém um grupo sulfidril (-SH) presente na cisteína, conferindo grande capacidade redutora. Para além do papel no armazenamento e transporte de enxofre reduzido, a GSH participa na desintoxicação das EROs, direta ou indiretamente (HASANUZZAMAN et al., 2017). Níveis maiores de GSH indicam mecanismo de defesa em resposta ao estresse oxidativo, com a remoção do radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), enquanto a diminuição dos níveis de GSH pode ocorrer pela conjugação com a substância tóxica, com o auxílio da GST (glutathione S-transferase), pela ação redutora na célula ou pela proteção celular induzida por substâncias tóxicas. Isso reduz a capacidade celular de destruir os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, de modo que aumente o potencial oxidativo da célula (LABUDDA et al., 2014).

A GSH atua como co-fator em diferentes reações bioquímicas, interage com hormônios, sinaliza moléculas e seu estado redox desencadeia a transdução de sinal. Outra função importante do GSH é a formação de fitoquelatinas (PCs) que ligam metais para transporte seguro e sequestro no vacúolo. Assim, desempenha papel vital na desintoxicação de metais/metaloídes e xenobióticos tóxicos (HASANUZZAMAN et al., 2017). As várias propriedades bioquímicas da GSH conferem-lhe o potencial de envolvimento no crescimento e desenvolvimento das plantas, tanto em condições normais de crescimento como sob diferentes condições de stress. A GSH também desempenha papel fundamental na senescência de folhas pela modulação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em plantas do gênero *Arabidopsis*

(DING et al., 2016). A glutathiona modula a proliferação celular, a apoptose, a fibrogênese, o crescimento, o desenvolvimento, o ciclo celular, a expressão gênica, a atividade proteica e a função imunológica (NOCTOR et al., 2012).

Sua forma varia entre o tiol reduzido (GSH) e oxidado (GSSG), na qual dois tripeptídeos de glutathiona estão unidos por uma ligação dissulfeto. Para que a atividade protetora da GSH ocorra, esta precisa ser regenerada através do ciclo catalítico (Figura 6). A reação que ocorre é uma reação reversível, na qual há a transformação da GSH em GSSG pela ação da enzima GPx e glutathiona oxidase (GO) por meio de uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH e o inverso da reação, ou seja, a transformação da GSSG em GSH ocorre pela ação da glutathiona redutase (GR) que depende de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato reduzido (NADPH) (DING et al., 2016).

Figura 6– Ciclo catalítico da GSH e sua conversão em GSSG.



Fonte: adaptado de ROVER-JÚNIOR et al. (2001).

Elementos como metais devem apresentar homeostase controlada em sistemas biológicos. Os metais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, no entanto, níveis excessivos de metais essenciais e não essenciais, como o cádmio (Cd), são tóxicos para as plantas, causando inúmeros efeitos deletérios. Níveis de Cd<sup>2+</sup> na rizosfera retardam o crescimento e podem causar alterações em muitos processos fisiológicos, incluindo o metabolismo de carboidratos, metabolismo de nitrogênio, fotossíntese e, portanto, danificar a atividade da ATPase nuclear e de membrana das células vegetais. De modo a

manter a homeostase do metal, as plantas desenvolveram numerosas formas de mitigar os efeitos prejudiciais dos íons de metais excessivos, tais como as metalotioneínas (MT) (YANG et al., 2015).

A relação entre desequilíbrios redox celulares que levam ao estresse oxidativo e à toxicidade de metais em plantas tem sido estudada, refletindo um efeito do metal na desregulação celular. Estudos também apontam uma relação entre o estresse metálico e a homeostase redox e a capacidade antioxidante. A análise de plantas expressando modificações direcionadas de componentes do sistema antioxidante, a comparação de espécies vegetais relacionadas com diferentes graus de sensibilidade a metais tóxicos e estudos efetores com, por exemplo, ácido salicílico estabeleceram uma ligação entre o grau de tolerância da planta a metais e o nível de antioxidantes (SHARMA e DIETZ, 2006, 2008). Como propriedade geral, os metais se ligam e interferem nos alvos ou competem pelos sítios de ligação, alterando assim as funções da proteína alvo, que por sua vez causa alterações no metabolismo celular ou desencadeia eventos de sinalização que podem levar à aclimatação. Reparo de macromoléculas danificadas, fortalecimento do sistema de defesa antioxidante e diminuição dos níveis de metais nos compartimentos plasmáticos são alguns dos mecanismos decorrentes da tolerância da planta aos metais e o nível de antioxidantes (SHARMA e DIETZ, 2006).

As metalotioneínas (MTs) são uma família de proteínas de baixo peso molecular (6–7 kDa) e 30% de suas cadeias de aminoácidos são compostas por cisteína (Cys), o que as tornam proteínas capazes de se ligar em metais (YANG et al., 2015). As MTs possuem radicais tióis ou sulfidril (-SH) devido à grande quantidade de cisteína o que facilita a formação de interação com metais bivalentes como  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ , entre outros, prevenindo a ação tóxica e danos celulares (LESZCZYSZYN et al., 2013)

As MTs desempenham funções importantes em processos celulares, incluindo a detoxificação de metais, como cádmio e mercúrio, regulação da homeostase de metais essenciais, como zinco e cobre, regulação do crescimento e proliferação celular, reparação de danos no DNA e proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS). MTs são capazes de ligar uma variedade de metais pela formação de ligações entre os numerosos resíduos Cys presentes nas proteínas e no metal e, é o arranjo desses resíduos que em parte determina as propriedades de ligação ao metal das proteínas MT (DOMÈNECH et al., 2006).

Uma das primeiras questões a ser abordada quando se estuda as proteínas MT refere-se ao número de íons metálicos que são ou podem ser ligados - muitas vezes

referido como estequiometria metal:proteína. Em geral, o número de íons metálicos que pode ser ligado a uma MT depende do número de enxofre tiolato, SH<sup>-</sup> (ou, em alguns casos, também outros resíduos de ligação a metal, em particular histidinas), o número de coordenação e geometria do respectivo íon metálico e também a estrutura espacial das proteínas. A formação de agregados metal-tiolato particulares pode ser energeticamente favorável, como por exemplo, M(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>, M(II)<sub>3</sub>Cys<sub>9</sub>, M(II)<sub>4</sub>Cys<sub>11</sub> e M(II)<sub>4</sub>Cys<sub>12</sub>. A premissa subjacente para as determinadas estequiometrias é que, para cada MT, há um número "ideal" de íons metálicos que resulta em uma proteína bem estruturada, com todos os tiolatos Cys ligados a pelo menos um íon metálico, reduzindo a suscetibilidade à oxidação do ar de um tiol. Com base em razões de metal para cisteína previamente observadas, as ligações esperadas para metalotioneína de planta são os íons de Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> e Cu<sup>+1</sup> (LESZCZYSZYN et al., 2013).

### 2.3.3

Para a avaliação da toxicidade de extratos de plantas em células animais várias podem ser as técnicas, como por exemplo, através de ensaios citotóxicos, utilizando tipos celulares distintos como alvo.

A viabilidade celular pode ser avaliada por vários métodos, mas é aconselhável um processo que garanta reprodutibilidade e tempo na análise das amostras. Dentre os testes, o ensaio de viabilidade celular envolvendo a conversão de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazan, um produto insolúvel, por reativação mitocondrial em células de vida ativa é muito utilizado (ZANDI et al., 2016).

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico padrão que estima o potencial citotóxico das amostras testes. Também pode ser usado para mensurar a proliferação celular de agentes medicamentosos. Citotoxicidade significa causar efeito tóxico no nível celular, como alterações na permeabilidade da membrana, a morte celular ou a inibição enzimática (STOCKERT et al., 2012).

O sal MTT de coloração amarela é reduzido na mitocôndria das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis, refletindo o estado funcional da cadeia respiratória. A absorvidade resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro. No final, a viabilidade celular é expressa como uma percentagem de células vivas do material testado, comparando com a percentagem de células do controle

positivo de citotoxicidade (STOCKERT et al., 2018).

Outro ensaio para avaliar a toxicidade do extrato proteico é o ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* (*Scratch Wound Healing Assay*), que permite mensurar a migração de células que é um fenômeno presente no processo de cicatrização. Trata-se de um método fácil e de baixo custo para medir a migração celular, em que é realizada uma fenda, imitando uma ferida, em uma monocamada de células confluentes, para que as células na borda movam-se gradualmente em direção à fenda (MANOJ et al., 2009). Uma vez que a monocamada de células é rompida, a perda de interação célula-célula resulta estimula a liberação de fatores estimuladores da migração e mitose, iniciando a migração e proliferação de células (PITZ et al., 2016). Para acompanhar o fechamento da fenda registra-se por imagem a condição inicial e diferentes tempos após a confecção da fenda. Desta forma é possível comparar as imagens e determinar a taxa de migração de células (LIANG et al., 2007).

A proliferação e a migração celular são duas características extremamente importantes durante a fase de formação do tecido na cicatrização de uma ferida (lesão ocasionada). A cicatrização de feridas é o processo de reparação e regeneração da derme e da epiderme que acompanha as lesões da pele e de outros tecidos do corpo. A avaliação da atividade cicatrizante de extratos de plantas é escassa no nível celular. As culturas de fibroblastos têm sido propostas como um método para a investigação da atividade de cicatrização de feridas, já que estas células são a principal fonte de matriz de tecido conjuntivo extracelular e a migração de fibroblastos é considerada vital para o reparo rápido e efetivo da pele danificada (MANOJ et al., 2009).

Uma das principais vantagens deste método é a reprodutibilidade do evento de migração que ocorre em sistemas *in vivo*. Outra vantagem deste ensaio é a sua adequação para estudar a regulação da migração celular por interação com matriz extracelular e interações célula-célula. Além disso, o ensaio também pode ser acompanhado por microscopia, incluindo imagens de células vivas, permitindo a análise de eventos em tempo real. Por outro lado, também é, provavelmente, o método mais simples para estudar a migração celular *in vitro* e usa apenas os suprimentos comuns e baratos encontrados na maioria dos laboratórios capazes de cultivar células (LIANG et al., 2007).

Entretanto, há desvantagens e limitações do ensaio de cicatrização de feridas em comparação com outros métodos disponíveis. É necessário um tempo relativamente maior para executar do que alguns outros métodos, por conta da formação de monocamada de células, que leva de 1-2 dias, e da migração celular para fechar o arranhão, que dura de 8-

18 horas. E uma quantidade relativamente grande de células e produtos químicos será necessária para o ensaio. Portanto, não é um método de escolha se a disponibilidade de células (por exemplo, células primárias especializadas que são difíceis de obter em quantidade suficiente) ou produtos químicos (por exemplo, reagentes caros) é limitante. Apesar dessas limitações do método, no geral, este ensaio ainda é frequentemente o método de escolha para analisar a migração celular em laboratório porque é fácil de configurar, não requer nenhum equipamento especializado e todos os materiais necessários para o ensaio estão disponíveis em qualquer laboratório que realize cultura celular (LIANG et al., 2007).



### 3

As plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população, porém essa utilização na maioria das vezes é feita a partir de indicação leiga, sem levar em conta os riscos de intoxicação e a necessidade de confirmação das espécies, e também as práticas tradicionais que podem levar ao erro no consumo de plantas medicinais. O Ministério da Saúde incentiva o uso das práticas integrativas e complementares, dentre elas a fitoterapia, e reforça a necessidade de ações para promoção do uso seguro e racional das plantas medicinais e fitoterápicos.

Este trabalho pode contribuir para incentivar o aumento do cultivo de plantas medicinais brasileiras, que auxilia no processo de conservação e possível geração de renda local. É necessário o incentivo de plantas nativas, em especial, aquelas que já vem sendo indicadas a partir de estudos etnobotânicos para o tratamento do diabetes, e a inclusão dessas na lista da RENISUS.

A proteômica é uma ferramenta fundamental para expandir informações na biologia de plantas, que colaborarem para a identificação das espécies e de biomarcadores proteômicos (proteínas diferencialmente expressas), com a finalidade de indicar o uso de plantas medicinais para o tratamento de determinada doença crônica. Fragmentos associados à insulina são componentes protéicos em que as sequências de aminoácidos podem ser identificadas como biomarcadores de plantas hipoglicemiantes por espectrometria de massas (MS). No entanto, apenas a geração de dados proteômicos não resolve a complexidade dos sistemas biológicos, sendo necessária a integração de dados oriundos da proteômica com a genômica, transcriptômica e metabolômica, além dos dados citotóxicos dos extratos proteicos. Os dados integrados contribuem para o melhor entendimento da toxicologia de plantas medicinais e seu uso seguro.

Diante do exposto, justifica-se este trabalho como forma de reunir e sistematizar informações que possam ser utilizadas para promover o uso racional de plantas medicinais e divulgar a sua importância para a Saúde Pública.

## 4

### 4.1

Caracterizar as proteínas das plantas utilizadas na medicina popular como hipoglicemiantes, a pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata*) e o abajerú (*Chrysobalanus icaco*).

### 4.2

- ✓ Identificar as espécies adquiridas e correlacioná-las com seus proteomas;
- ✓ Obter método eficiente de pré-tratamento das amostras, testando e comparando antioxidantes para a extração de proteínas, para maior obtenção dessas moléculas;
- ✓ Caracterizar e diferenciar as proteínas entre as espécies de plantas adquiridas em mercados, as provenientes do arboreto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e aquelas coletadas em seus ambientes naturais;
- ✓ Identificar um possível biomarcador que indique o caráter hipoglicemiante da *Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata* e *Chrysobalanus icaco*;
- ✓ Avaliar níveis de glutathione e metalotioneína nas plantas;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos proteicos das plantas sobre a viabilidade e migração de fibroblastos.

## 5

### 5.1

Todo material utilizado que foi colocado em contato com amostra biológica foi autoclavado, a fim de eliminar micro-organismos e esporos.

Todos os reagentes usados foram de grau analítico da marca Sigma, exceto a Bisacrilamida e o SDS obtidos da Bio-Rad, o carbonato de sódio obtido da Vetec e o hidróxido de sódio (NaOH) obtido da Alphatec. O padrão de peso molecular para eletroforese foi da marca Bio-Rad A enzima tripsina utilizada foi a Gold da marca Promega. Digesto de *citocromo c* foi obtido na Thermo Fisher Scientific. A água purificada foi obtida por um sistema Milli-Q Millipore®.

### 5.2

Os 13 exemplares adquiridos foram identificados pela pesquisadora em etnobotânica Dra. Viviane Kruehl do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico – JBRJ.

#### 5.2.1

-

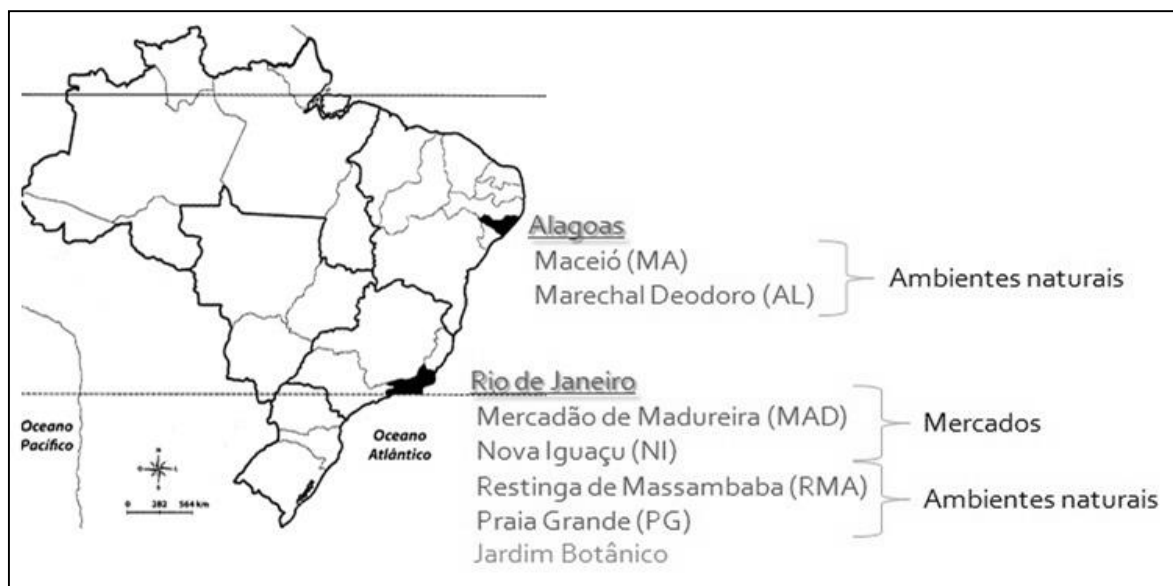
Foram utilizadas as folhas de pata-de-vaca das espécies *Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata* colhidas na cidade de Niterói, município do Rio de Janeiro, para escolher o melhor método de secagem e moagem de plantas e o antioxidante mais adequado para a extração proteica, a fim de otimizar o preparo das amostras para a extração e posterior determinação das proteínas totais,

#### 5.2.2

Foram coletadas folhas de pata-de-vaca *Bauhinia forficata*, provenientes do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ - cultivado) e Niterói (NIT; -22,9573088, -43,3055644), de *Bauhinia variegata* (NIT; -22,9573088, -43,3055644) e de abajerú, *Chrysobalanus icaco*, provenientes do JBRJ (cultivado), Praia Grande – Arraial do Cabo- RJ (PG; -22,9696606, -42,0302859), Restinga de Massambaba – RJ (RMA; -22,9337727, -42,4267012), Maceió – AL (MA; -9,6360524, -35,6979559), Marechal Deodoro – AL (AL; -9,7823233, -35,852364), e compradas no mercadão de Madureira (MAD) e no horto de Nova Iguaçu (NI), conforme o mapa (Figura 7). As folhas das amostras de abajerú,

provenientes de Praia Grande, foram divididas de acordo com tamanho e coloração foliar: folhas jovens (PG1), folhas adultas (PG2) e ramo (PG\*), contendo ambos os tipos de folhas, além da amostra de fruto (PG3). Um dos exemplares coletados na Praia Grande foi depositado no herbário do JBRJ (RB761269).

Figura 7 – Mapa com os locais de coleta dos exemplares



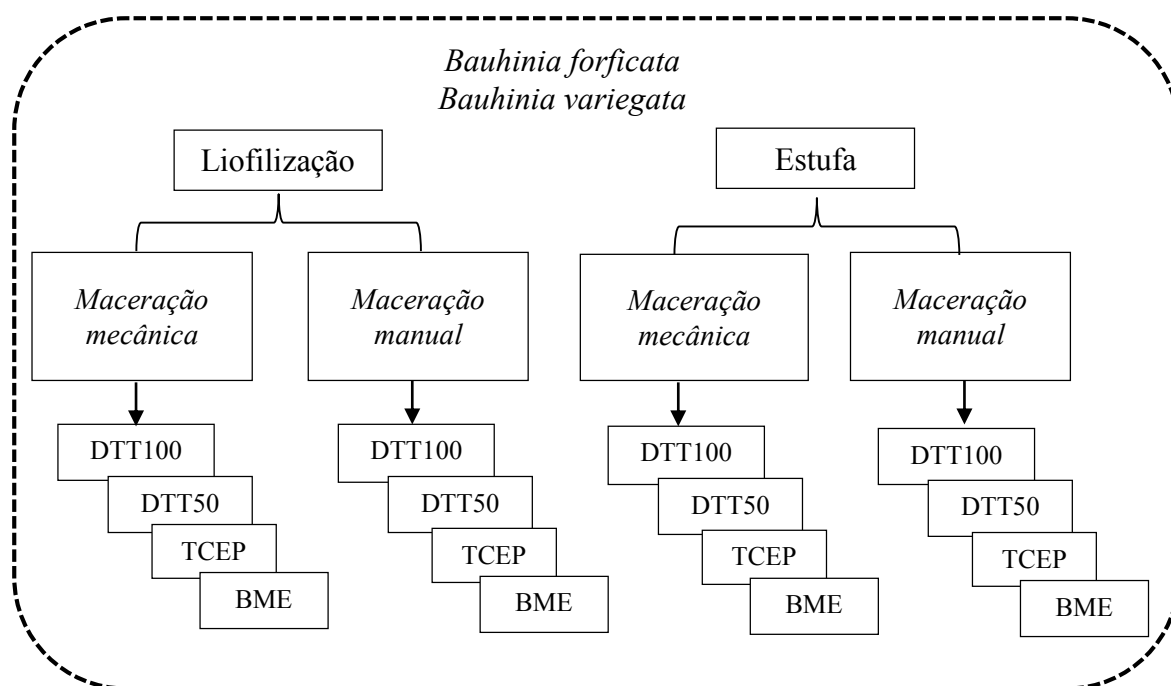
Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.3

As amostras coletadas e descritas no item 5.2.1 foram separadas e classificadas no laboratório, conforme os tratamentos, segundo método de secagem, nas seguintes categorias: a) secagem em liofilizador após o congelamento ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) das amostras durante 48 horas, sob uma pressão de 72 mmHg e temperatura de  $-99\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; b) secagem em estufa por 24 horas a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e moagem após a desidratação; c) amostras submetidas à maceração mecânica com uso de moinho de facas; d) amostras submetidas à maceração manual com o auxílio de gral e pistilo de porcelana. As amostras foram armazenadas em tubos tipo Falcon de 50 mL após moagem.

Concomitantemente, diferentes antioxidantes foram testados para verificar melhor rendimento, em termos de concentração de proteínas após extração, para cada tipo de pré-tratamento, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma representativo dos testes de pré-tratamento das amostras.



DTT100- ditioneitol 100 mmol L<sup>-1</sup>, DTT50- ditioneitol 50 mmol L<sup>-1</sup>, TCEP - tris(2-carboxietil)fosfina, BME - β-mercaptoetanol. Fonte: Elaborado pela autora.

Os antioxidantes testados foram ditioneitol (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) e β-mercaptoetanol (BME), em diferentes tampões pH (Tabela 4), contendo dodecilsulfato de sódio (SDS). Uma quantidade de 10 mg de amostra foi pesada para cada teste, em duplicata. A extração de proteínas totais e a quantificação das mesmas seguiram os métodos descritos nos itens 5.4.1 e 5.4.2, respectivamente.

Tabela 4 - Antioxidantes testados para a extração de proteínas.

4% SDS Tris-HCl 100 mmol L <sup>-1</sup>	7,6
4% SDS Tris-HCl 50 mmol L <sup>-1</sup>	7,6
4% SDS Hepes-NaOH 100 mmol L <sup>-1</sup>	8,5
4% SDS Hepes-NaOH 100 mmol L <sup>-1</sup>	8,5

DTT100- ditioneitol 100 mmol L<sup>-1</sup>, DTT50- ditioneitol 50 mmol L<sup>-1</sup>, TCEP - tris(2-carboxietil)fosfina, BME - β-mercaptoetanol.

## 5.4

A partir das folhas coletadas, descritas no item 5.2.2, e tratadas conforme o melhor método de secagem e moagem, e o melhor antioxidante para extração proteica, descrito anteriormente no item 5.3, as proteínas foram extraídas e digeridas com tripsina, usando o método de preparo de amostra auxiliada por filtro (*Filter-Aided Sample Preparation – FASP*). Proteínas totais e peptídeos foram quantificados via espectrofotometria através do método de Lowry. Proteínas totais também foram analisadas qualitativamente, por eletroforese em gel de poliacrilamida em um sistema Bio-Rad, utilizando o corante Coomassie Brilliant Blue R-250 e caracterizadas por espectrometria de massas (MS).

### 5.4.1

Cerca de 10 mg das amostras foram pesadas em microtubos tipo Eppendorf, em triplicata, para cada tampão. As amostras foram incubadas na presença de 400  $\mu\text{L}$  tampão de lise (4% SDS Tris-HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,6) a 95° C por 5 minutos em uma placa aquecedora e agitadas em mesa agitadora por 5 minutos, realizando este procedimento três vezes no total. O extrato foi transferido para outro microtubo devidamente identificado e centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos (Centrifuge 5430R eppendorf®). O sobrenadante lisado foi transferido para um novo microtubo devidamente identificado. As amostras foram congeladas a -80°C para posterior quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry.

### 5.4.2

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método modificado de LOWRY et al., (1951), utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Para tal, foi feita uma solução (CTC) contendo 0,625 g de carbonato de sódio, 0,125 g de tartarato de sódio e potássio e 0,0625 g de sulfato de cobre diluídos em 6,25 mL de água tipo I (água ultrapura). Para fazer a solução do “reativo A”, juntou-se os 6,25 mL da solução CTC, 6,25 mL de NaOH 0,8 mol  $\text{L}^{-1}$ , 6,25 mL de SDS 10% e mais 6,25 mL de água tipo I em um tubo Falcon de 50 mL, homogeneizando lentamente.

Preparou-se uma solução-mãe de albumina bovina sérica (BSA) contendo 2,0 mg  $\text{mL}^{-1}$  para a construção da curva analítica diluindo com água tipo I, a fim de obter volume final de 1000  $\mu\text{L}$ . A curva analítica foi preparada nas seguintes concentrações: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para a quantificação de proteínas totais, uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$

de cada amostra foi avolumada a 1000  $\mu\text{L}$  com água tipo I em microtubos, devidamente identificados. Foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  do “reativo A” em cada tubo (amostras e pontos da curva), agitando cada tubo rapidamente e reservado por 10 minutos. Enquanto isso, preparou-se o “reativo B”, diluindo 2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu concentrado em 8mL de água tipo I em tubo Falcon de 15 mL. Após os 10 minutos, adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  do “reativo B” em cada tubo (amostras e pontos da curva), agitando cada tubo rapidamente. As amostras e a curva analítica foram incubadas por 30 minutos no escuro e, então, as amostras foram lidas em espectrofotômetro Jasco V-530, no comprimento de onda de 750 nm com o auxílio de um cubeta de quartzo.

### 5.4.3

-

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada para verificar em quais pesos moleculares as bandas proteicas estavam situadas, além de checar se novas etapas de purificação e deslipidificação seriam necessárias. O gel consiste em dois tipos: gel de separação (corrida), contendo 12%, e gel de concentração, contendo 4% acrilamida:bisacrilamida. A solução para o gel de separação foi preparada conforme a ordem estabelecida na Tabela 5. Ao adicionar o agente polimerizante, TEMED, a solução foi vertida entre as placas de vidro e coberta com uma camada de etanol, para evitar o contato da solução com o ar. Uma vez polimerizada, o etanol foi removido e a solução de concentração, preparada conforme a Tabela 5, foi vertida entre as placas e ao final, o pente contendo os poços foi inserido imediatamente. Após a polimerização do gel, o pente foi removido e as placas de vidro foram anexadas a cuba, a qual foi imersa no tampão de corrida 1X, contendo tris, glicina e SDS, para carregamento das proteínas no gel.

Foram utilizadas diferentes alíquotas de amostras, de forma que se colocasse no gel 300  $\mu\text{g}$  de proteínas de cada uma. O volume correto de amostra foi calculado a partir da concentração obtida na quantificação de proteínas totais (Anexo C). Com o auxílio de uma seringa analítica, aplicou-se as amostras diluídas na proporção 1:1 com o tampão de amostra (0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 6,8, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 0,05%,  $\beta$ -mercaptoetanol e água ultra-pura). Aplicou-se também o padrão de peso molecular (15  $\mu\text{L}$ ), diluído também na proporção 1:1 com tampão de amostra.

Tabela 5 – Reagentes constituintes do gel de separação e de concentração.

		40 mL	1,3 mL
		33,5 mL	6,1 mL
-	-	25 mL	-
-	-	-	2,5 mL
		1 mL	100 µL
		500 µL	50 µL
		50 µL	10 µL
		100 mL	10 mL

Fonte: Manual da cuba Protean II xi Comb da Bio-Rad.

Posteriormente, o sistema da cuba Protean II xi Comb da Bio-Rad foi fechado e os cabos devidamente conectados. A fonte de eletroforese foi ajustada em 600 V e 45 mA durante 20 minutos ou até que as amostras entrassem no gel de separação, e depois aumentando para 75 mA até as bandas de proteínas percorrerem todo o gel (aproximadamente 90 minutos), sem extravasamento.

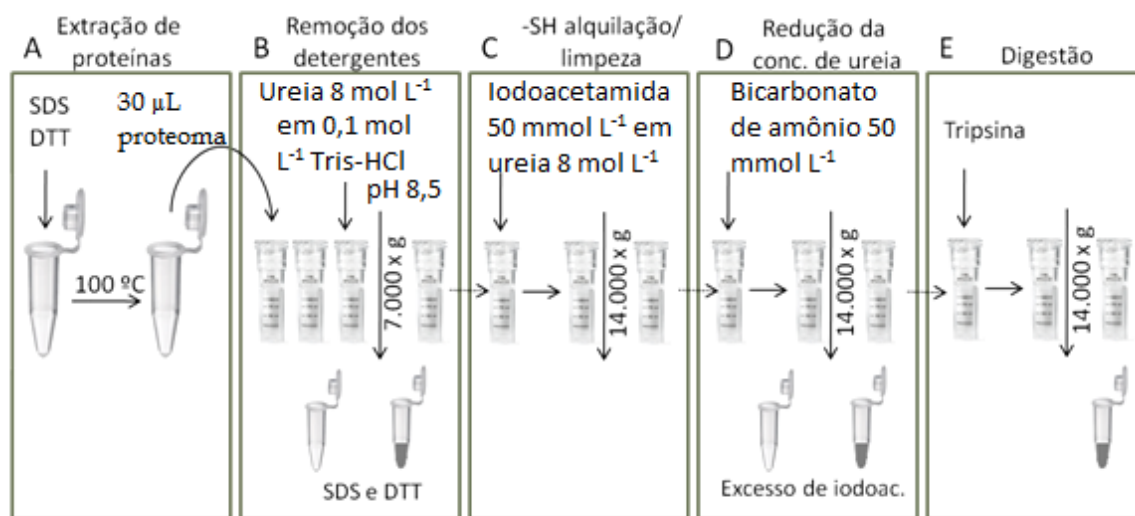
Ao final da corrida, o gel cuidadosamente retirado do suporte e colocado em um pirex para a etapa de fixação, que se sucedeu com a imersão do gel em uma solução de metanol 40% (v/v), água tipo I 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) *overnight* sob agitação. Para a coloração, o gel foi imerso em uma solução contendo etanol 40% (v/v), água tipo I 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e Coomassie Blue R 0,25 %, durante 1 hora sob agitação. Posteriormente, o gel foi descorado em solução contendo água tipo I 80% (v/v), etanol 15% (v/v) e ácido acético 5% (v/v), realizando a troca da solução a cada 30 minutos até a visualização das bandas.

#### 5.4.4

O método de preparo de amostra auxiliada por filtro - FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*) consiste em três etapas, segundo WIŚNIEWSKI et al. (2009): remoção do detergente, alquilação do tiol, *clean up*, e digestão das proteínas em solução, conforme ilustrado na Figura 9. Antes de iniciar este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos (Centrifuge 5430R eppendorf®).



Figura 9 – Fluxograma representativo das etapas do preparo de amostra auxiliada por filtro (FASP).



Fonte: modificado de WIŚNIEWSKI (2017).

O proteoma (30 µL), previamente solubilizado em SDS e DTT durante a extração, foi lavado com 200 µL de uréia 8 mol L<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 8,5, duas vezes em um dispositivo de filtração Vivaspin<sup>®</sup>-3kDa (Sartorius), por centrifugação (10.000 x g por 15 minutos). O fluido do tubo coletor é descartado.

Para alquilação do grupamento tiol, uma alíquota de 100 µL de iodoacetamida (IAA) 50 mmol L<sup>-1</sup> em ureia 8 mol L<sup>-1</sup> foi adicionada ao dispositivo, o qual foi agitado em um mixer a 900 rpm por 1 minuto e incubado no escuro sem misturar por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 15 minutos.

Para a etapa de *clean up* das proteínas, 100 µL ureia 8 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados ao dispositivo, o qual foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min, repetindo-se este procedimento mais 2x e, então, o excesso de IAA foi removido.

Para o preparo da digestão, adicionou-se ao dispositivo 100 µL de bicarbonato de amônio (AB) 50 mmol L<sup>-1</sup>, centrifugando as amostras a 14.000 x g por 15 minutos. Este procedimento foi repetido mais 2x, sendo que, na última lavagem, o fluido do tubo coletor não foi descartado. Para a digestão das proteínas, uma alíquota (depende da quantidade de proteínas na amostra) da enzima tripsina foi adicionada ao dispositivo, avolumando a 50 µL com bicarbonato de amônio 50 mmol L<sup>-1</sup> e, então, as amostras foram incubadas a 37 °C *overnight* (~18 horas) em câmara úmida. A proporção enzima:proteína na amostra deve ser de 1:100.

Para a eluição dos peptídeos, o dispositivo com filtro foi transferido para um novo tubo coletor e foi centrifugado a 14000 x g por 7 minutos. Adicionou-se bicarbonato de amônio 50 mmol L<sup>-1</sup> (50 µL) para lavagem, centrifugando 14000 x g por 10 minutos. O dispositivo com o filtro foi descartado e o concentrado do microtubo do Vivaspin® devidamente armazenado a - 80 °C. Para determinação do rendimento da digestão, a concentração de peptídeos foi estimada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), conforme descrito no subitem 5.2.4, sendo utilizada uma alíquota de 40 µL de cada amostra.

#### 5.4.5

Peptídeos foram separados em coluna microcapilar de fase reversa Aclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm x 15 cm, *nanoViper* (Thermo Fischer Scientific), com o uso de um cromatógrafo líquido de ultra performance nLC (UltiMate™ 3000 RSLCnano - Dionex). As fases móveis utilizadas consistiram de um gradiente linear do eluente B (80 % acetonitrila) em eluente A (0,1 % ácido acético), com fluxo de 350 nL min<sup>-1</sup> na *nanopump* e, também, de um modo isocrático 100 % de solução de acetonitrila (2 %) e ácido trifluoroacético (0,05 %), com fluxo de 2 µL min<sup>-1</sup> na *loading pump*. O gradiente aplicado foi de 10 minutos a 5 % B, 60 minutos a 45 % B, 63 minutos a 99 % B, 80 minutos a 5 % B e término aos 100 minutos, retornando às condições iniciais. Alíquotas (1-2 µL) de amostra (200 ng µL<sup>-1</sup>), previamente preparadas em 5 % de acetonitrila e 0,1 % de ácido acético, foram injetadas por um *autosampler* em um *full loop* de 25 µL a uma temperatura da coluna de 45° C. Amostras foram analisadas em duplicata e a cada grupo, um branco analítico foi injetado.

Posteriormente, os peptídeos foram ionizados, fragmentados e analisados por espectrometria de massa com fonte *CaptiveSpray*, que proporciona sensibilidade de *nanospray* (nESI), resiste a entupimentos e oferece um fluxo reproduzível e ininterrupto, mesmo para as amostras proteômicas mais complexas. A ionização foi realizada no modo positivo, no qual as principais reações são baseadas na protonação das moléculas, com o auxílio do vapor de acetonitrila, gerado pelo *nanoBooster*, que aprimora a ionização. As massas das moléculas ionizadas foram analisadas pelo Impact II™ (Q-TOF, Bruker, Germany), que é um espectrômetro de massa híbrido de alta resolução que combina os analisadores quadrupolo, que seleciona o íon precursor para fragmentação, e o tempo de voo, que acelera os íons gerados na célula de colisão por um pulso de campo elétrico, separando-os. Para ajustar os parâmetros instrumentais do espectrômetro de massa, uma amostra de digesto de *citocromo c* foi injetada como padrão analítico. Estes parâmetros incluem: voltagem do

capilar a 1600 V, pressão da *nanoBooster* a 0,2 bar, fluxo de N<sub>2</sub> a 3 L min<sup>-1</sup> e temperatura de vaporização a 160 °C. O instrumento foi operacionalizado em modo *full-scan*, em um intervalo de massa de 150-2200 *m/z*, com sinal 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup>, obtendo 2 espectros por segundo (*spectra rate* – 2 Hz) com fragmentação de íons precursores por dissociação induzida por colisão (CID) para gerar íons produtos. A calibração foi feita *online* com acetato de sódio 1 mmol L<sup>-1</sup>, através da infusão (60 µL h<sup>-1</sup>) do calibrante por uma bomba (KDS-120, KD Scientific) no *trap* da válvula de comutação do cromatógrafo.

## 5.5

A glutatona (GSH) foi quantificada nas amostras via espectrofotometria para avaliar a possibilidade das plantas estarem sob algum estresse oxidativo significativo.

### 5.5.1

A extração da glutatona (GSH) seguiu o método descrito previamente (WILHELM-FILHO et al., 2005). As amostras de plantas, em triplicata, foram pesadas (50 mg) em um microtubo e transferidas para um homogeneizador manual de vidro, no qual foram adicionados 900 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5, contendo sacarose 0,25 mol L<sup>-1</sup> e EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>. As amostras foram homogeneizadas manualmente de forma brusca durante 3 minutos. O extrato foi transferido para um novo microtubo, centrifugando-o a 13.500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi, então, transferido para outro microtubo devidamente identificado e foi congelado a -80 °C, para posterior quantificação da proteína glutatona.

### 5.5.2

A quantificação foi realizada de acordo com o método descrito por BEUTLER (1975), utilizando a reação de Ellman (ELLMAN et al., 1961) e a própria GSH a 10 mmol L<sup>-1</sup> como padrão, preparada em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0. Dissolveu-se 0,005 g de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 8,0, resultando na solução 1.

Para a curva analítica, utilizaram-se alíquotas de GSH 10 mmol L<sup>-1</sup> nas seguintes concentrações: 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 µmol L<sup>-1</sup>, avolumando com tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7. Foram removidas alíquotas de 350 µL de cada ponto da curva para microtubos. Alíquotas 350 µL da solução 1 foram adicionadas nesses

microtubos, que foram incubados em local escuro durante 15 minutos. Posteriormente, alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  dos microtubos foram aplicadas em uma microplaca de polietileno de 96 poços, transparente.

Para a quantificação da glutathiona, alíquotas de 175  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram diluídas em 175  $\mu\text{L}$  de água tipo I em um microtubo. A este foram adicionados 350  $\mu\text{L}$  da solução 1 e em seguida, as amostras foram incubadas em local escuro durante 15 minutos. Após este período, alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  foram aplicadas em uma microplaca.

A curva analítica e as amostras foram lidas em um leitor de microplaca ELISA série Expert Plus em um comprimento de onda de 412 nm.

## 5.6

A metalotioneína (MT) foi quantificada nas amostras via espectrofotometria para avaliar a possibilidade das plantas estarem sob algum estresse oxidativo significativo.

### 5.6.1

A extração da metalotioneína (MT) foi realizada pelo método (ERK et al., 2002). As amostras de plantas, em triplicata, foram pesadas (50 mg) em um microtubo e transferidas para um homogeneizador manual de vidro, no qual foi adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 0,02 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 8,6, contendo 0,0241 mmol de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF - agente antiproteolítico), preparado em etanol, e 0,0702 mmol de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente antioxidante), homogeneizando por 3 minutos. O extrato foi transferido um microtubo e centrifugado a 20.000 x g por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante lisado foi transferido para um microtubo, incubado a 70 °C por 10 minutos em placa aquecedora de microtubo e centrifugado novamente a 20.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo microtubo devidamente identificado, o qual foi congelado a -80 °C para posterior quantificação da MT.

### 5.6.2

A quantificação seguiu o método (VIARENGO et al., 1997) por meio da reação de Ellman, utilizando como padrão a GSH. Para isso, duas soluções foram feitas: 1) 0,00744 g de EDTA foram dissolvidos em 5 mL de água tipo I, adicionando no final 49,3  $\mu\text{L}$  de HCl 32%; e 2) 0,017 g de DTNB foram dissolvidos em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 8,0 e em 50 mL de cloreto de sódio 2 mol  $\text{L}^{-1}$ .

Para a curva analítica, utilizou-se alíquotas de GSH 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  nas seguintes

concentrações: 0, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 500, 700, 1000 e 1500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , avolumando com água tipo I. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada ponto da curva foram transferidas para microtubos previamente identificados. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da solução 1 e uma de 1400  $\mu\text{L}$  da solução 2 foram adicionadas a esses microtubos, incubados no escuro por 30 minutos. Após este período, alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  foram aplicadas em uma microplaca.

Para a quantificação da MT, foram removidas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra para microtubos, aos quais 50  $\mu\text{L}$  da solução 1 e 1400  $\mu\text{L}$  da solução 2 foram adicionados, incubando em local escuro por 30 minutos. Após este período, alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  foram aplicadas em uma microplaca de polietileno de 96 poços, transparente.

O cálculo de concentração de MT foi estimado a partir da GSH de acordo com a proporção de: 1 mol de MT correspondendo a 20 moles de GSH. A curva analítica e as amostras foram lidas em um leitor de microplaca ELISA série Expert Plus com comprimento de onda de 412 nm.

## 5.7

As plantas medicinais também podem ter propriedades tóxicas desconhecidas. Para isso, é necessária a avaliação da toxicidade do extrato proteico, através de ensaios *in vitro*. Os ensaios para avaliar o potencial citotóxico foram realizados no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob a supervisão do Dr. Emiliano Barreto.

### 5.7.1

Fibroblastos da linhagem 3T3 foram mantidos em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino (SBF), L-glutamina (2  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e gentamicina (40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 5.7.2

O efeito dos extratos proteicos de *Bauhinia forficata* (Niterói), *Eugenia astringens* (Mercadão de Madureira), *Chrysobalanus icaco* (Restinga de Massambaba – RJ, Marechal – AL, Praia Grande – RJ - ramo) sobre a viabilidade dos fibroblastos foi avaliado através do ensaio de MTT (MOSMANN, 1983).

As células foram semeadas em placas de 96 poços e colocadas em incubadora de  $\text{CO}_2$  *overnight*. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações das

amostras (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), em quatro replicatas. O grupo controle foi tratado somente com o meio, também em quatro replicatas. Após incubação com o tratamento, 22,5  $\mu\text{L}$  de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$  em tampão fosfato salino – PBS 1X pH 7,4) foram adicionados em cada poço e deixado em repouso por 4 horas na incubadora. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e 150  $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan formados. A absorbância de cada poço foi mensurada utilizando um espectrofotômetro de placas (DTX 880 *Multimode Detector*, Beckman Coulter), ajustado para 595 nm, e a densidade óptica foi calculada (Equação 1).

Equação 1 – Densidade óptica das células submetidas ao ensaio de viabilidade celular.

$$A = \frac{DO_t}{DO_{nt}} \times 100, \text{ sendo que:}$$

DO<sub>t</sub> – densidade óptica das células tratadas  
DO<sub>nt</sub> – densidade óptica das células não-tratadas

### 5.7.3

O efeito dos extratos de *Bauhinia forficata* (Niterói), *Eugenia astringens* (Mercadão de Madureira), *Chrysobalanus icaco* (Restinga de Massambaba – RJ, Marechal – AL, Praia Grande – RJ - ramo) sobre a migração dos fibroblastos foi avaliada através da técnica de migração celular (*Scratch Wound Healing Assay*), método descrito por LIANG et al. (2007), fácil, de baixo custo e bem desenvolvido para medir a migração celular *in vitro*.

As células ( $7 \times 10^4$  células/poço, medidas pela câmara de Neubauer) foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas em estufa *overnight* para a adesão celular e formação de uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência. Em seguida, essa monocamada foi interrompida removendo-se com o auxílio de uma ponteira de pipeta de 200  $\mu\text{L}$  uma pequena parte do meio da placa (faz-se um risco na monocamada e despreza-se a parte removida). As células foram lavadas com PBS e tratadas com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  das amostras ou meio de cultura (controle), em triplicata. A migração celular foi avaliada mediante a análise das fotomicrografias nos tempos 0 e 24 horas após o risco, usando um microscópio invertido (Olympus IX70) com auxílio de câmera digital para medir a área de fechamento da ferida. As fotomicrografias foram analisadas no software Image J e a migração celular foi expressa como a área em pixels, de modo que foi determinada quantitativamente a porcentagem de fechamento da área inicial formada (Equação 2).

Equação 2 – Taxa de migração de fibroblastos submetidos ao ensaio de migração celular.

$$\% \text{ migração} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100, \text{ sendo que:}$$

$A_0$  – área original (tempo = 0 h)

$A_t$  – área no período após o risco (tempo = 24 h).

## 5.8

Para as análises estatísticas referentes à comparação entre os pré-tratamentos, entre os antioxidantes utilizados na extração de proteínas e os dados de proteínas totais nos tecidos das espécies avaliadas, a normalidade dos dados foi primeiramente testada, utilizando o teste W de Shapiro-Wilks. Após a verificação da distribuição, como o N era pequeno, assumiu-se que os dados eram não-paramétricos e, com isso, os testes não-paramétricos, Kurskal-Wallis (múltiplos grupos independentes) e Mann-Whitney (dois grupos independentes) foram escolhidos para obter informações sobre as medianas. Possíveis *outliers* foram testados com o teste de Grubbs. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa STATISTICA<sup>®</sup> 12 (StatSoft Inc, Tulsa OK, EUA).

Para a análise da caracterização proteômica, os dados brutos foram deconvoluídos e processados pelo *software* Compass<sup>™</sup> Data Analysis (v. 4.0, Bruker Daltonics, Bremen) e a lista de compostos e proteínas foi gerada pelo sistema ProteinScape<sup>™</sup> (Bruker Daltonics, Bremen), que tem como bancos de dados o NCBIInr e o SwissProt e busca de proteínas pelo MASCOT *ion search software* (Matrix Science), utilizando o grupo taxonômico Viridiplantae, de algas e plantas terrestres. Não existe o proteoma das espécies usadas neste estudo. Os seguintes parâmetros foram utilizados no ProteinScape<sup>™</sup>: tolerância de massa de peptídeo de 20 ppm, tolerância de MS/MS 0,5 Da, cargas <sup>+1</sup> <sup>+2</sup> e <sup>+3</sup>, permitindo até uma clivagem perdida. Informações qualitativas dos dados foram geradas, com o entendimento da significância biológica dos mesmos com o auxílio do UniProt e Gene Ontology, bancos de dados disponíveis na rede.

Os resultados dos ensaios de viabilidade e migração celular foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), realizados em triplicata e analisados estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.01 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, EUA).

## 5.9

O armazenamento, tratamento e coleta foram realizados de acordo com as normas de gerenciamento de resíduo já implantado no Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH).

Todos os reagentes e soluções foram manipulados com o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) como jaleco, luvas, óculos de proteção e máscara contra pó e na presença de equipamentos de proteção coletiva (EPC) como capela, chuveiro, lava-olhos e extintor de incêndio.

Os resíduos de soluções foram descartados em bombonas previamente identificadas e separadas pela seguinte classificação: orgânicos halogenados e orgânicos não halogenados. O descarte de material contaminado com material biológico, como ponteiras e microtubos tipo eppendorf, foi realizado no próprio laboratório em uma lixeira identificada como resíduo biológico. O material que entrou em contato com substâncias químicas foi descartado em uma barrica de papelão, identificada como material sólido contaminado, que é de uso comum de todos os laboratórios do CESTEH. As bombonas e barricas são recolhidas por empresa responsável, que as destina de acordo com as normas vigentes de descarte.



## 6

## 6.1

As plantas hipoglicemiantes pata-de-vaca e abajerú foram coletadas de diferentes locais, como descrito no item 5.2.2. Verificou-se que as plantas obtidas no mercado e no horto não eram da espécie abajerú *Chrysobalanus icaco* L., da família Chrysobalanaceae, como foram vendidas, sendo identificadas como a espécie *Eugenia astringens* Cambess., da família Myrtaceae, também conhecida com o mesmo nome popular de abajerú.

As Chrysobalanaceae são morfologicamente distintas das espécies brasileiras de Myrtaceae, em relação a algumas características, como a filotaxia, que é alterna (e oposta nas Myrtaceae) e folhas sem pontos translúcidos e nervura marginal, comuns em Myrtaceae (SILVA e PEIXOTO, 2009). Apesar disso, a forma semelhante das folhas de *C. icaco* e *E. astringens* pode ocasionar confundimento (Figura 10). A folha de *E. astringens* apresenta uma dobra ao seu redor voltada para a parte abaxial (Figura 10c).

Figura 10 – Comparação entre os ramos de *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) (a) e *Eugenia astringens* Casar (Myrtaceae) (b). Parte abaxial da folha de *E. astringens* (c).



Fonte: Elaborado pela autora.

Foi decidido dar prosseguimento com a análise de proteínas, glutathione e metalotioneína e também com a avaliação da viabilidade e migração de fibroblastos nessas amostras de *E. astringens* para diferenciá-las de *C. icaco*, e checar seus efeitos biológicos, além de se tratar de uma espécie que não tem caráter hipoglicemiante como a *C. icaco*,

podendo ocasionar uma intoxicação naquelas pessoas que compram de forma errônea, achando que estão adquirindo o abajerú correto.

Este equívoco já foi relatado anteriormente (BOCHNER et al., 2012; SILVA e PEIXOTO, 2009), alegando que o comércio de plantas medicinais não é uma fonte segura de venda, pois pode ocorrer dificuldade tanto por parte do comerciante/fornecedor quanto do consumidor em identificar corretamente uma planta. E ainda há o agravo de que plantas diferentes conhecidas pelo mesmo nome popular são comercializadas sem que tenha comprovação de suas propriedades farmacológicas e segurança toxicológica (BOCHNER et al., 2012), além das possibilidades de adulteração. A fiscalização do comércio de plantas medicinais por órgãos competentes ainda é incipiente.

SILVA e PEIXOTO (2009) levantaram três hipóteses quanto à introdução de *Eugenia astringens*, substituindo *Chrysobalanus icaco* na comercialização popular. Primeiro, seria uma estratégia dos comerciantes de burlar a fiscalização competente, por possuir o mesmo nome popular, mas nem esta saberia distinguir. Uma segunda hipótese seria em relação à dificuldade no reconhecimento das espécies pelos extratores e erveiros vendedores, bem como pelos consumidores, por conta da morfologia semelhante. A última hipótese seria a atribuição da atividade hipoglicemiante à *E. astringens*, por parte dos erveiros, já que outras espécies de Myrtaceae, como pitanga, jambo e eucalipto, são usadas pela população para tal e tem propriedades antioxidantes, antifúngica e antibacteriana (QUEIROZ et al., 2015). E ainda, os ambientes naturais a que *C. icaco* ocorre são locais de vegetação do tipo de restinga, que em geral, são áreas de proteção ambiental, o que dificulta a coleta de exemplares desta espécie. Logo, isso também poderia ser uma hipótese quanto à introdução de *E. astringens*, substituindo *C. icaco* na comercialização popular.

## 6.2

As amostras foram submetidas a testes de pré-tratamento e a várias etapas de tratamento para avaliar e caracterizar o conteúdo proteico de cada uma delas.

### 6.2.1

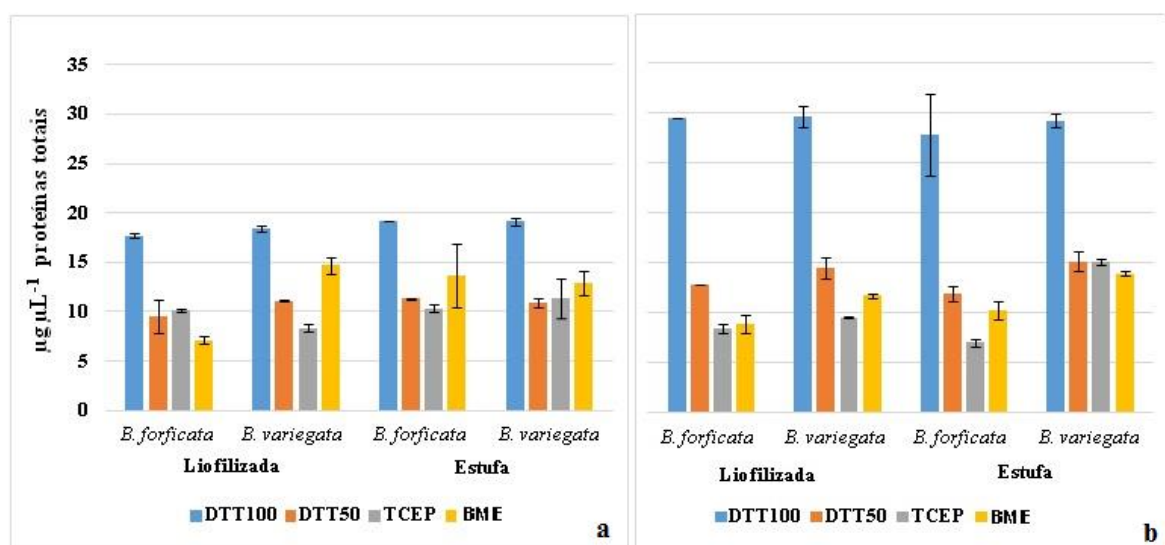
-

As amostras de pata-de-vaca *Bauhinia forficata* e *Bauhinia variegata* foram extraídas, em duplicata, com quatro antioxidantes distintos com o intuito de comparar os resultados e optar pelo antioxidante que apresentasse maior concentração de proteínas

extraídas. Após a extração, quantificaram-se as proteínas totais pelo método de Lowry, descrito no item 5.4.2. Os resultados obtidos estão expressos no Anexo A e na curva analítica de BSA (absorvância x concentração  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) no Anexo D.

As concentrações de proteínas totais variaram de 6,87 a 30,44  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  e de 6,78 a 30,76  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , em amostras submetidas à liofilização e à secagem em estufa, respectivamente. Para aquelas com maceração mecânica, ou seja, moídas em moinho, as concentrações variaram de 6,87 a 19,17  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , enquanto para as amostras com maceração manual, ou seja, maceradas em gral e pistilo, as concentrações de proteínas variaram de 6,78 a 30,76  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Em relação à extração de proteínas totais usando os antioxidantes DTT100, DTT50, TCEP e BME, as concentrações variaram de 19,16 a 30,76  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , de 8,37 a 15,89  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , de 8,10 a 15,35  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  e de 6,87 a 15,92  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados tiveram as medianas e a variabilidade calculadas e expressas na Figura 11. Os resultados encontrados para a extração de proteínas mostraram que, independente do pré-tratamento das amostras, ou seja, do tipo de secagem e de moagem, o DTT de concentração 100  $\text{mmol L}^{-1}$  (DTT100) foi o antioxidante que conseguiu extrair a maior concentração de proteínas.

Figura 11 – Comparação dos diferentes antioxidantes utilizados na extração de proteínas: a) amostras moídas em moinho (maceração mecânica); b) amostras maceradas em gral e pistilo (maceração manual).



DTT100- ditioneitol 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , DTT50- ditioneitol 50  $\text{mmol L}^{-1}$ , TCEP - tris(2-carboxietil)fosfina, BME -  $\beta$ -mercaptoetanol. N=2. Fonte: Elaborado pela autora.

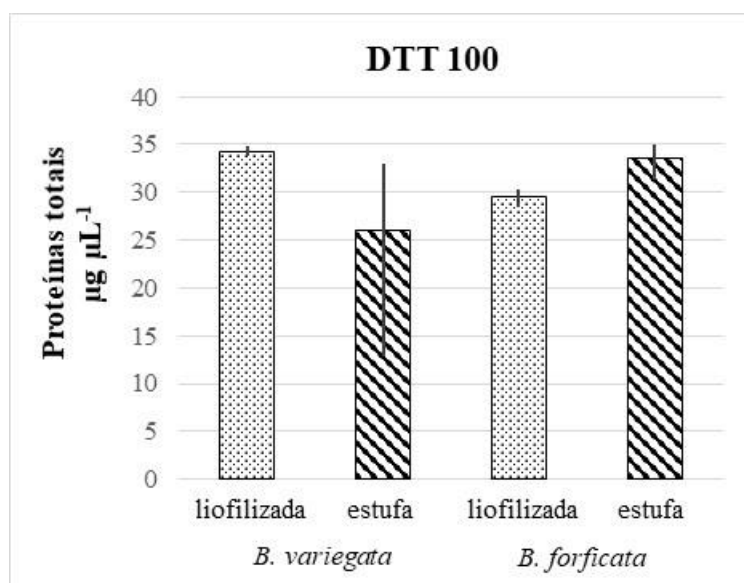
Após o teste de Mann-Whitney pode-se afirmar que não houve diferença

estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os quatro antioxidantes utilizados, independente do pré-tratamento utilizado, tipo de secagem ou moagem. Apesar disso, o DTT100 foi escolhido para posterior aplicação na extração de proteínas totais das espécies estudadas, por ser o antioxidante que se mostrou mais eficiente no método, obtendo uma maior concentração de proteínas durante a extração.

Comparando as concentrações de proteínas totais, usando o DTT100 na Figura 11, é possível verificar que os níveis são maiores nas amostras com maceração manual do que mecânica. Por não haver diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney entre os dois métodos de maceração, escolheu-se proceder com a maceração mecânica, pois esta técnica resulta em amostras mais homogêneas, sendo o ideal para as análises, mesmo com a maceração manual permitindo obter maiores concentrações de proteínas; isto se deu, possivelmente, por conta da ação do processo físico sobre a estrutura vegetal. Talvez a moagem usando uma lâmina com gramatura maior no moinho rendesse uma maior concentração de proteínas.

Na Figura 12 pode-se verificar que as concentrações de proteínas entre amostras liofilizadas e secas em estufas são similares, mas para certificar isso mais precisamente e escolher o método ideal de secagem, novos testes foram feitos com amostras, em triplicata, usando maceração mecânica e DTT100 para a extração proteica, comparando amostras liofilizadas e secas em estufa. A quantificação das proteínas totais foi realizada através do método de Lowry, descrito no item 5.2.4, realizando a média das absorvâncias e descontando o valor do branco de cada média obtida. Os resultados obtidos estão expressos no Anexo B e na curva analítica de BSA (absorvância x concentração  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) no Anexo D. Calculou-se a mediana e a variabilidade dos dados, como mostra a Figura 12. As concentrações variaram de 28,48 a 34,86  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  e de 12,90 a 34,93  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , para amostras liofilizadas e secas em estufa, respectivamente.

Figura 12 – Comparação entre os pré-tratamentos após escolha do antioxidante.



DTT100- ditioneitol 100 mmol L<sup>-1</sup>. Fonte: Elaborado pela autora.

Verificou-se estatisticamente que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os dois métodos de secagem das amostras, já que a mediana não foi significativamente diferente de acordo com o teste Mann-Whitney. A liofilização foi escolhida como método de secagem ideal. A secagem na estufa pode causar desnaturação das proteínas, modificando a estrutura das mesmas, por conta da temperatura elevada. A liofilização tende a danificar menos o tecido vegetal que está sendo desidratado que os outros métodos, que envolvem temperaturas mais altas. Além disso, as condições de baixa pressão e temperatura envolvidas no processo tornam-se determinantes para a preservação da qualidade nutricional do alimento, pois as proteínas, que são termolábeis, ficam protegidas das reações enzimáticas e oxidativas (TERRONI et al., 2013).

É de extrema importância o teste de antioxidantes, pois dependendo do tipo de amostra, tal agente redutor vai se adaptar melhor, permitindo obter uma maior concentração de proteínas, assim como o método de secagem e maceração. Os processos de purificação de amostras levam em consideração vários fatores, sendo um desses a escolha do agente redutor, responsável por evitar a oxidação de proteínas e comumente usado para reduzir as ligações dissulfeto (TENÓRIO-DAUSSAT et al., 2014).

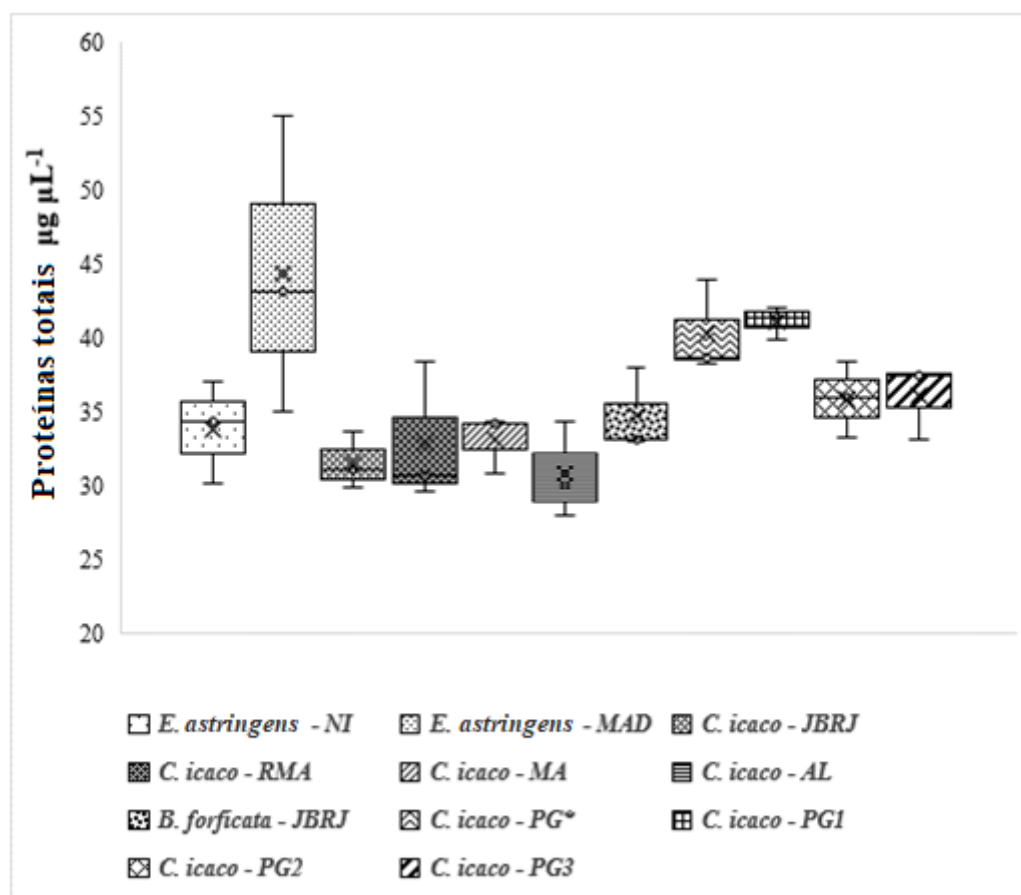
As amostras de plantas de diferentes locais tiveram suas proteínas extraídas com DTT100, em triplicata, quantificadas posteriormente pelo método de Lowry. Os resultados

obtidos estão expressos no Anexo C. As concentrações de proteínas totais variaram de 30,18 a 54,95  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  em *Eugenia astringens*, de 28,01 a 43,88  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  em *Chrysobalanus icaco* e de 33,04 a 38,01  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  em *Bauhinia forficata*. Os valores se mantiveram na mesma faixa que os apresentados nos testes de pré-tratamento das amostras, no item 6.2.1.

As concentrações de proteínas nas amostras, conforme o local de amostragem, estão ilustrados na Figura 13, na qual se pode notar que são similares entre as espécies e locais, exceto para *E. astringens* do Mercado de Madureira (MAD) e para *C. icaco* de Praia Grande (PG), em que os valores deram acima da média das demais amostras. Não se sabe a procedência e a forma de armazenamento dos ramos das amostras de MAD, podendo estar sujeitas à exposição ao calor, à luz e à contaminação microbiana. Segundo BOCHNER et al. (2012), é possível ter uma contaminação e um comprometimento da preservação dos princípios ativos pela secagem e armazenamento inadequados, além de que não há nenhum cuidado no manuseio que garanta a conservação e higiene, conforme observação do armazenamento e exposição das ervas nos boxes do Mercado de Madureira. A variação na concentração de proteínas nas amostras pode ter sido causada pela soma de todas essas condições. Em relação às duas amostras de PG, que estão acima da concentração média, uma caracterizada por folhas jovens e adultas e a outra só por jovens, pode ser que tenha mais proteínas em folhas jovens que adultas, já que a concentração de proteínas foi maior quando comparada à amostra que apresenta apenas folhas adultas.

A variabilidade entre as replicatas foi pequena, exceto para aquelas das amostras de *E. astringens* (MAD), mas sem interferir na continuidade do processamento das amostras e na confiabilidade do método de extração de proteínas totais.

Figura 13 – Variação das concentrações de proteínas nas amostras de *Bauhinia forficata*, *Eugenia astringens* e *Chrysobalanus icaco* de diferentes locais de amostragem.



NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercado de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto). Valores expressos em mediana, média, desvio-padrão, máximo e mínimo. N=3. Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações encontradas nesta etapa são úteis para a análise proteômica. Para a preparação da corrida do gel de eletroforese SDS-PAGE, é necessário que se aplique uma quantidade conhecida de amostra, assim como para digestão de proteínas, para saber o quanto de tripsina, em µL, deve ser utilizado, para ser o suficiente para obtenção dos peptídeos.

De acordo com a análise estatística não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras, considerando todos os locais, porém é significativa ( $p < 0,05$ ), segundo teste de Mann-Whitney, quando são comparadas as amostras de *Chrysobalanus icaco* do Sudeste (RMA e PG) com as do Nordeste (MA e AL).

Os resultados da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida em amostras de plantas são apresentados nas Figuras 14 e 15.

Na Figura 14a observa-se o resultado do gel com o equivalente a 100  $\mu\text{g}$  de proteínas, porém não foi possível visualização das bandas proteicas. Decidiu-se, fazer um novo gel, desta vez, adicionando 200  $\mu\text{g}$  de proteínas (Figura 14b). As bandas ficaram visíveis, mas ainda não tão nítidas. Um novo gel foi feito, desta vez, aplicando 300  $\mu\text{g}$  de proteínas. Na Figura 15a, as bandas proteicas estão mais nítidas e definidas. Comparando as bandas das amostras com as do padrão de peso molecular (P), pode-se afirmar que as proteínas constituintes das amostras apresentam peso molecular na faixa de 50 kDa.

Ainda neste gel, é possível notar bandas arrastadas que podem significar impurezas, como sais e lipídios nas amostras, as quais, então, foram depois purificadas com filtro Vivaspin<sup>®</sup> (3 kDa). Com a eliminação de impurezas, é possível a visualização bem nítida e definida das bandas proteicas das amostras (Figura 15b).

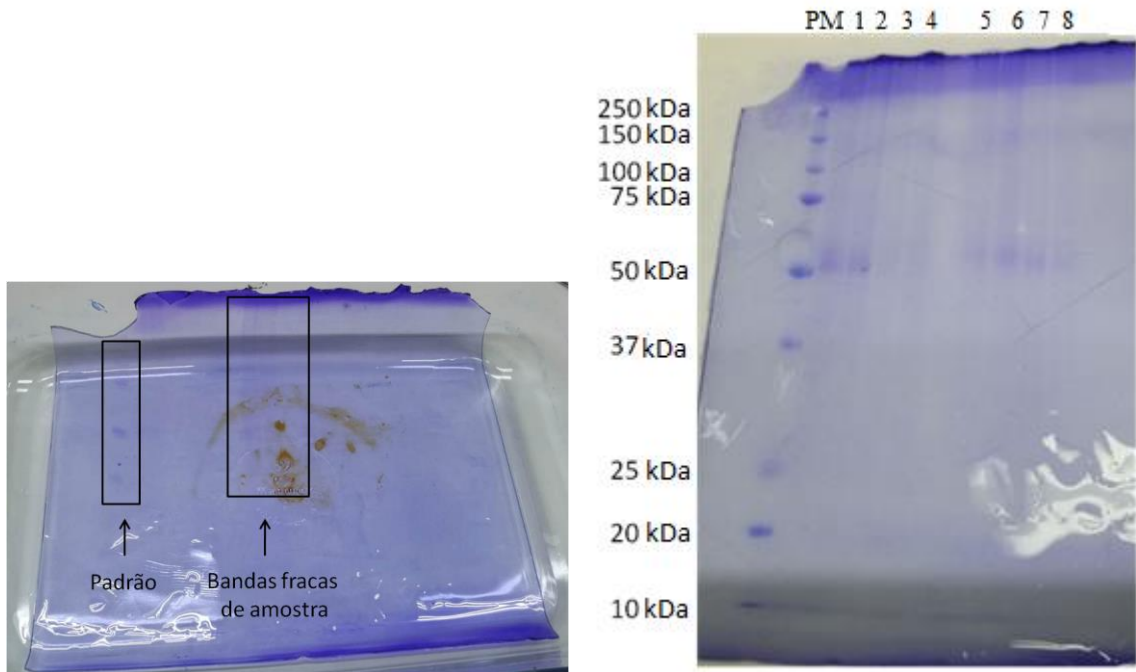
Uma vez que as proteínas são extraídas, a remoção de contaminantes e detergentes é necessária. Alguns detergentes podem interferir na digestão enzimática e, também, na cromatografia de fase reversa e espectrometria de massas, podendo danificar instrumentos e arruinar irreversivelmente as colunas. A remoção de material celular indesejado, como lipídios e DNA genômico, evita a supressão de sinal, a interferência cromatográfica e apresenta um espectro muito mais limpo a partir do qual se obtêm dados de identificação de proteínas (FEIST e HUMMON, 2015).

O sal utilizado na extração de proteínas das folhas das amostras de planta, foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um sal aniônico e o melhor método para removê-lo é por filtração (FEIST e HUMMON, 2015).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é importante para a visualização das bandas de proteínas das amostras, verificando em que faixas de peso molecular se encontram, comparando-as com as do marcador de peso molecular. Além de checar se há necessidade de purificação das amostras, previamente à digestão, possibilita checar a efetividade de um procedimento de separação durante o fracionamento de células/tecidos. Com estas informações é possível a melhoria em análises posteriores, podendo até ser utilizado um filtro de corte maior do que o de 3 kDa utilizado, resultando numa eficiente purificação das amostras.

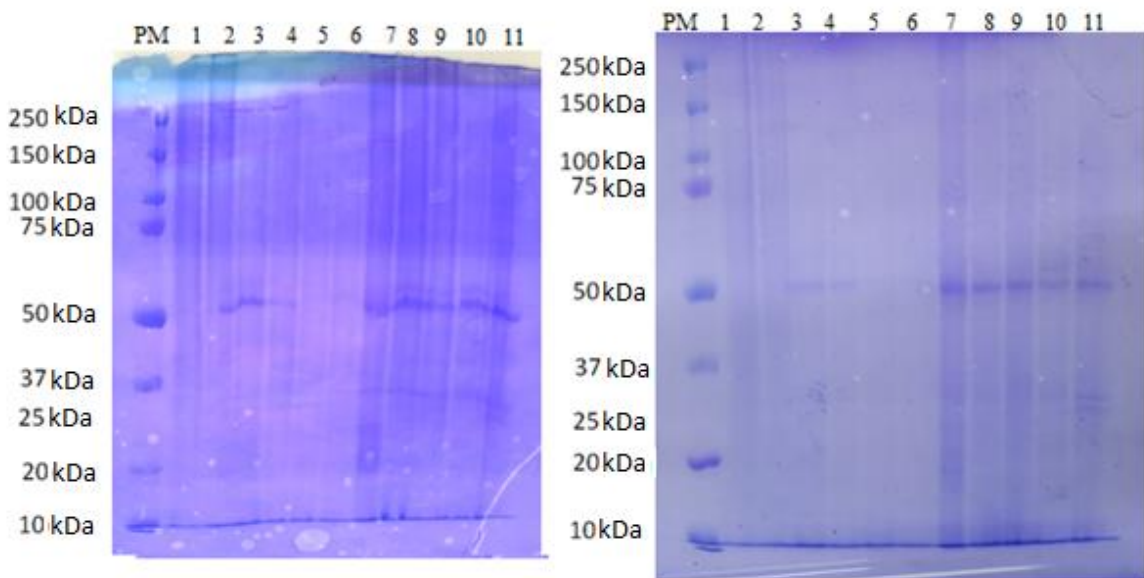


Figura 14 – Gel de eletroforese contendo 100  $\mu\text{g}$  (a) e 200  $\mu\text{g}$  (b) de proteínas.



PM – Padrão de peso molecular, 1- NI – Horto de Nova Iguaçu, 2 - MAD – Mercado de Madureira, 3 - JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 4 - RMA – Restinga de Massambaba, 5 - MA – Maceió, 6 - AL – Marechal Deodoro, 7 – JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 8 - PG – Praia Grande (PG\* - ramo).  
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15 - Gel de eletroforese contendo 300  $\mu\text{g}$  de proteínas antes (a) e após (b) purificação das amostras com Vivaspin<sup>®</sup> (3kDa).



PM – Padrão de peso molecular, 1- NI – Horto de Nova Iguaçu, 2 - MAD – Mercado de Madureira, 3 - JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 4 - RMA – Restinga de Massambaba, 5 - MA – Maceió, 6 - AL – Marechal Deodoro, 7 – JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 8-11 - PG – Praia Grande (PG\* - ramo, PG1, PG2, PG3 - fruto). Fonte: Elaborado pela autora.

Como mostrado anteriormente, a maioria das proteínas se encontra na faixa de banda proteica de 50 kDa, que pode ser referente à enzima ribulose bis-fosfato carboxilase, a RuBisCO, responsável pela fixação de carbono no processo de fotorrespiração, que será descrita no item 6.2.5. Segundo SILVA e SOUZA (2009), quando analisada em condições desnaturantes, a RuBisCO é visualizada na forma de subunidades maior e menor, como peso molecular de 52 kDa e 13 kDa, respectivamente.

A proteína similar à insulina não foi visualizada no gel, pois sua banda proteica se encontra na faixa de 6 kDa (AZEVEDO et al., 2006), sendo que o peso molecular mínimo do padrão é de 10 kDa; então, é possível que a insulina, caso estivesse na amostra, teria saído da porção final do gel após a corrida. A substituição do tampão de corrida contendo glicina por um com tricina seria mais adequado. A tricina tem uma carga negativa maior do que a glicina o que permite que esta molécula migre mais rapidamente no gel, além de ter uma maior força iônica. Esta característica permite que proteínas de baixa massa molecular sejam mais facilmente separadas em gel com menor percentual de acrilamida (STEPHAN et al., 2013).

As amostras de plantas passaram por digestão de proteínas em solução pelo método de preparo de amostra auxiliada por filtro - FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*), e a eficiência deste procedimento foi checada, através da quantificação dos peptídeos pelo método de Lowry, já citado, utilizando BSA como padrão para a curva analítica.

Os resultados obtidos estão expressos no Anexo E e a curva analítica de BSA (absorvância x concentração  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) no Anexo F.

Foi decidido considerar também as amostras liofilizadas de pata-de-vaca (Figura 12), coletadas em Niterói (NIT), utilizadas para o teste de secagem (item 6.2.1), a fim de procurar diferenças na expressão proteica entre as espécies de pata-de-vaca e nos níveis de glutatona e metalotioneína, analisadas a seguir.

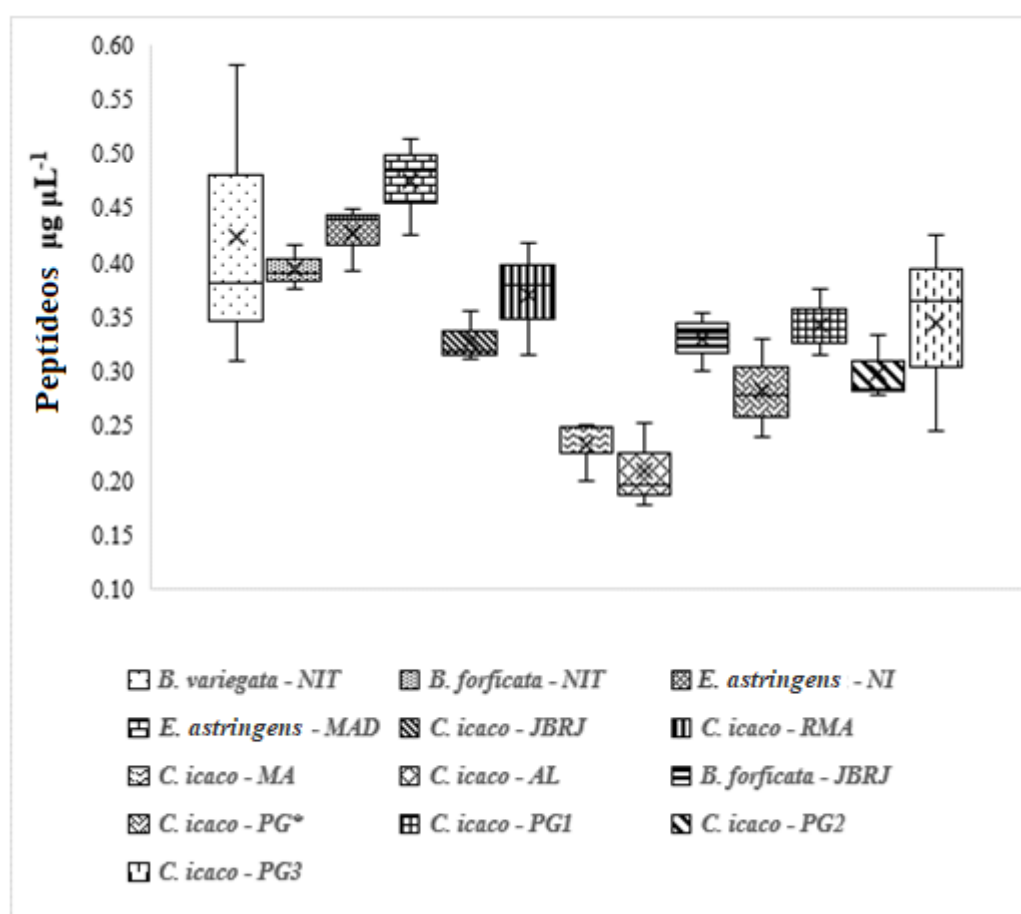
As concentrações de peptídeos variaram de 0,39 a 0,51  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  em *Eugenia astringens*, de 0,18 a 0,42  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  em *Chrysobalanus icaco*, de 0,30 a 0,39  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  em *Bauhinia forficata* e de 0,31 a 0,58  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  em *Bauhinia variegata*.

Os valores se mantiveram na mesma faixa que os apresentados nos testes de pré-tratamento das amostras, no item 6.2.1. Os níveis de peptídeos nas amostras digeridas, conforme o local de amostragem, estão ilustrados na Figura 16.

É notória a baixa variabilidade entre as replicatas, indicando que o método foi

eficiente, somente na amostra PG3, dos frutos de *C. icaco* coletados em Praia Grande, há uma pequena dispersão dos valores. A eficiência do método pode ser alterada por fatores como temperatura e centrifugação, resultando em uma dispersão da concentração de peptídeos entre as amostras.

Figura 16 – Variação das concentrações de peptídeos nas amostras digeridas de *Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata*, *Eugenia astringens* e *Chrysobalanus icaco* de diferentes locais de amostragem.



NIT – Niterói, NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercado de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto). Valores expressos em mediana, média, desvio-padrão, máximo e mínimo. N=3. Fonte: Elaborado pela autora.

A digestão em solução tem a vantagem da simplicidade e requer menos proteína, porque a perda de amostras é maior para análises baseadas em gel. A extração de peptídeos de um gel é inerentemente menos eficiente que uma digestão em solução (Feist & Hummon, 2015). A digestão em solução pela técnica do FASP demonstrou ser eficiente com as amostras de plantas, pois os valores obtidos de peptídeos estão proporcionais e não

estão dispersos. A complexidade da amostra pode ser compensada usando um fracionamento pré ou pós-digestão em solução, como a cromatografia líquida aplicada neste estudo.

As concentrações de peptídeos encontradas são úteis para a análise proteômica, já que as amostras devem ser preparadas de acordo com as concentrações de peptídeos a serem injetadas ( $200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) no espectrômetro de massas para caracterização das proteínas.

Os peptídeos resultantes da digestão das proteínas extraídas das plantas foram analisados por espectrometria de massas para identificação das proteínas constituintes de cada amostra, diferenciando por espécie e local de amostragem.

No total, foram 442 identificações, sendo 131 proteínas diferentes. Os genes, a sequência e a modificação de aminoácidos, a função molecular e biológica e a localização celular de cada proteína são reportadas no Anexo G, além do número de amostras e espécies em que ocorrem (Anexo H).

A Figura 17 ilustra o número de amostras em que cada proteína foi identificada.

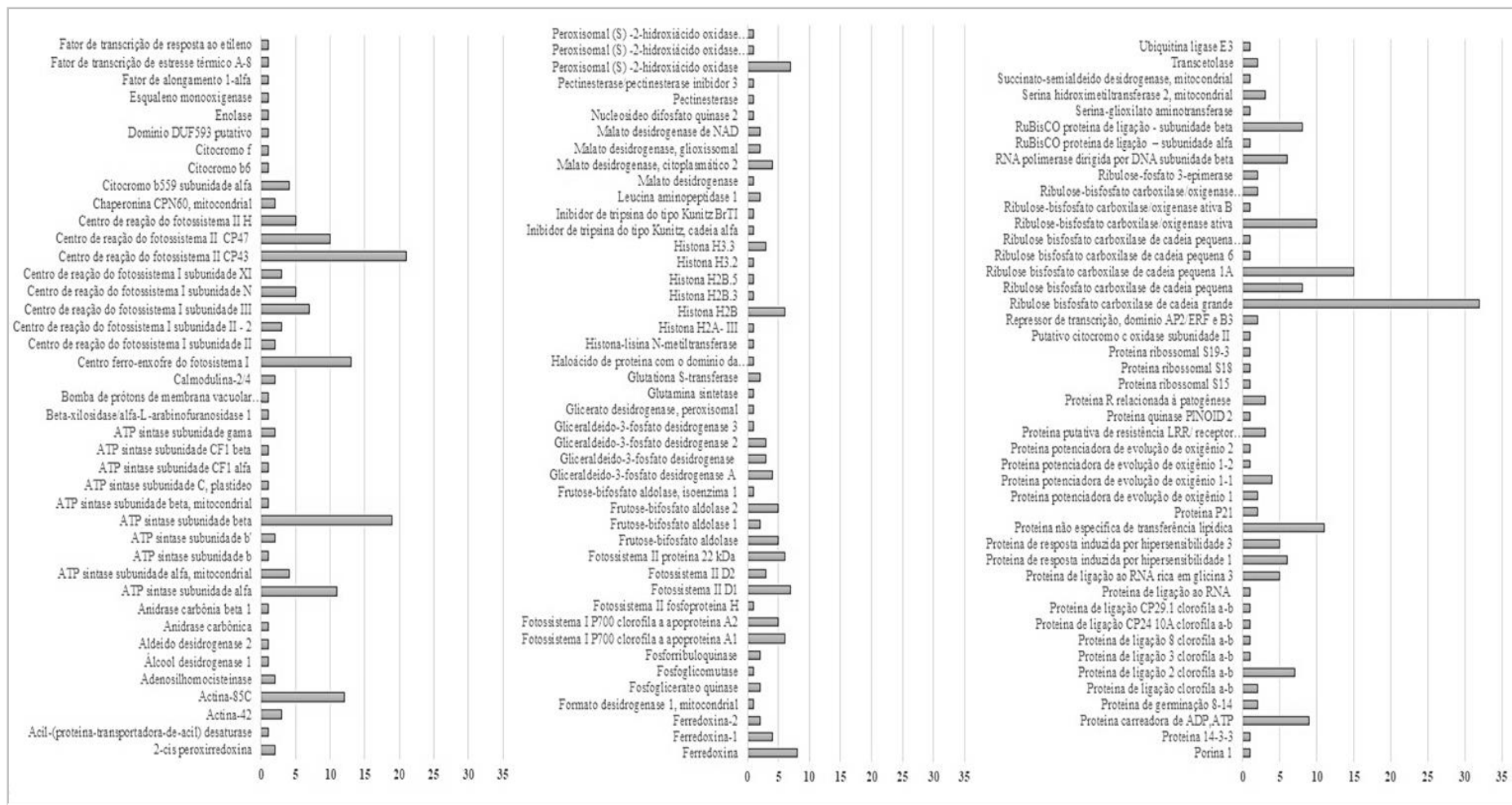
Não foi encontrado nenhum estudo de caracterização de proteínas por LC-MS/MS em plantas com caráter hipoglicemiante, utilizadas no Brasil. Entretanto, há estudos do uso do extrato de *Chrysobalanus icaco* e *Bauhinia forficata* em ratos com o diabetes induzido, avaliando compostos químicos (peroxidação lipídica, catalase, superóxido dismutase, etc) relacionados ao estresse oxidativo (SALGUEIRO et al., 2016; WHITE et al., 2016). O extrato aquoso de *C. icaco* em concentrações mais baixas pode impedir o armazenamento de gordura ou aumentar a utilização de gordura através do aumento da atividade locomotora. Além disso, isso reforça sua capacidade de manter a homeostase da glicose através da normalização da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. Essas atividades podem estar associadas ao conteúdo de polifenóis do extrato (WHITE et al., 2016). SALGUEIRO et al. (2016) verificaram que o estresse oxidativo elevado parece ser um mecanismo potencial envolvido no dano hepático em condições hiperglicêmicas. O efeito protetor do extrato de *B. forficata* pode ser atribuído à sua capacidade antioxidante, mais do que um potencial hipoglicêmico. Em outro estudo (VENANCIO et al., 2016), ratos receberam em sua dieta frutos de *C. icaco* para avaliar a possível proteção dos polifenóis e minerais presentes no fruto contra dano ao DNA, associada com suas propriedades antioxidantes. Este fruto apresentou atividade antioxidante *in vivo* contra danos em

neutrófilos de sangue periférico de ratos, antigenotoxicidade em células do sangue periférico e antimutagenicidade em células de medula óssea e células do sangue periférico.

A enzima ribulose-bisfosfato carboxilase de cadeia grande (gene RbcL), também conhecida como RuBisCO, foi identificada em cerca de 82 % das 39 amostras e 7,2 % do total de quantificações. Esta onipresença pode ser explicada pelo fato de que é uma enzima muito importante no processo de fotorrespiração e por ser a mais abundante nas plantas C3, que fixam o carbono pelo Ciclo de Calvin (fase escura da fotossíntese) (FEIZ et al., 2012). Ela catalisa duas reações, usando  $Mg^{2+}$  como cofator: a carboxilação de D-ribulose-1,5-bisfosfato, o evento primário na fixação de dióxido de carbono, bem como a fragmentação oxidativa do substrato das pentoses no processo de fotorrespiração. Ambas as reações ocorrem simultaneamente e em competição no mesmo local ativo (STEC, 2012). RuBisCO é um complexo hexadecamérico composto de oito grandes (RbcL, 50 kDa) e oito pequenas subunidades (RbcS, 12-15 kDa), localizado nos cloroplastos. As subunidades RbcL formam uma forma tetramérica de dímeros anti-paralelos que é limitado por quatro subunidades RbcS na parte superior e quatro subunidades RbcS na parte inferior (JOSHI et al., 2015; STEC, 2012). A ribulose-bisfosfato carboxilase de cadeia pequena (gene RbcS) também foi bastante representativa nas amostras (39 %), que auxilia no dobramento da RbcL (JOSHI et al., 2015).

Um estudo usando 2D-LC-MS/MS para identificação de proteínas em uma espécie de gramínea indicou que enzimas de glicólise, tanto citoplasmáticas quanto cinco enzimas do ciclo de Calvin, aumentaram em abundância, após experimento de desidratação. No entanto, a grande subunidade RuBisCO e as proteínas associadas foram reduzidas, indicando uma perda de fixação de carbono. Alterações na abundância de várias proteínas que tem função na estrutura e função da cromatina indicam que essas estruturas sofrem mudanças significativas como resultado da desidratação (OLIVER et al., 2011).

Figura 17– Número de amostras por cada proteína identificada.



Fonte: Elaborada pelo autora.

Outra proteína identificada na maior parte das amostras (54 %) é a CP47 (gene *PsbC*) do centro de reação do fotossistema II (PSII). Esta proteína se liga à clorofila e ajuda a catalisar os processos fotoquímicos induzidos pela luz primária do PSII, que usa energia luminosa para abstrair os elétrons da molécula de H<sub>2</sub>O, gerando O<sub>2</sub> e um gradiente de prótons posteriormente usado para a formação de ATP. Além disso, a CP47 participa da montagem do PSII (CASAZZA et al., 2010).

A ATP sintase subunidade beta (*atpB*) foi identificada em 49 % das amostras. Esta enzima sintetiza o ATP a partir do ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana do cloroplasto. Os sítios catalíticos são hospedados principalmente pelas subunidades beta (LAPAILLE et al., 2010).

A proteína do centro de reação ferro-enxofre (gene *psaC*) do fotossistema I (PSI) também consiste dentre as proteínas mais identificadas, cerca de 33 % destas. É uma apoproteína para os dois centros 4Fe-4S FA do PSI, essencial para a atividade fotoquímica e para a regulação da expressão de genes. FB é o receptor de elétrons terminal de PSI, doando elétrons para ferredoxina. O C-terminal interage com PsaA/B/D e ajuda a montar a proteína no complexo PSI, que é uma oxidoredutase de plastocianina-ferredoxina, convertendo excitação fotônica em uma separação de carga, que transfere um elétron do par de clorofila doadora P700 para os receptores (YABE et al., 2004).

A actina-85C (gene *ac85C*), presente em 31 % das amostras analisadas, é uma proteína importante do citoesqueleto de seres eucarióticos, inclusive de plantas, atuando em processos celulares, como transdução de sinal, resposta ao estresse biótico e abiótico e sinalização de defesa para o sistema imunológico de resposta a patógenos (PORTER e DAY, 2016).

A Figura 18 mostra as proteínas que foram identificadas somente em determinada amostra, ou seja, são únicas para aquela espécie de planta, podendo ser apontadas como biomarcadores. Além disso, algumas peculiaridades foram notadas, como serão discutidas a seguir.

Apesar da ribulose-bisfosfato carboxilase de cadeia grande (*RbcL*), ser uma proteína abundante, esta não foi identificada em nenhuma amostra da espécie *Eugenia astringens*. A proteína centro de reação H do fotossistema II, a proteína de ligação ao RNA rica em glicina 3 e a proteína R relacionada à patogênese foram identificadas em todas as replicatas de *Bauhinia variegata* (NIT), *Bauhinia forficata* (JBRJ) e *Chrysobalanus icaco* (PG3), respectivamente. Sendo que esta última amostra é constituída de frutos e não folhas, logo a proteína R relacionada à patogênese pode ser um biomarcador do fruto de *C. icaco*.

Figura 18 – Distribuição de proteínas identificadas unicamente nas amostras de plantas.

<p><i>Bauhinia variegata</i> (NIT)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Citocromo f</li> <li>•Fator de transcrição de estresse térmico A-8</li> <li>•Fosfoproteína H Fotossistema II</li> <li>•Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3</li> <li>•Histona H2B.5</li> <li>•Peroxisomal (S)-2-hidroxiácido oxidase GLO2</li> <li>•Proteína de ligação 8 clorofila a-b</li> </ul>	<p><i>Bauhinia forficata</i> (NIT)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Fator de alongamento 1-alfa</li> <li>•Glutamina sintetase</li> <li>•Histona H2A- III</li> <li>•Histona H2B.3</li> <li>•Malato desidrogenase</li> <li>•Proteína de ligação 3 clorofila a-b</li> <li>•Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 1-2</li> <li>•Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 2</li> <li>•Proteína ribossomal S18</li> <li>•Proteína ribossomal S19-3</li> </ul>	<p><i>Eugenia rotundifolia</i> (MAD)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Acil-(proteína-transportadora-de-acil) desaturase</li> <li>•Domínio DUF593 putativo</li> <li>•Ubiquitina ligase E3</li> </ul>	<p><i>Eugenia rotundifolia</i> (NI)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Fator de transcrição de resposta ao etileno</li> <li>•Histona-lisina N-metiltransferase</li> <li>•Proteína ribossomal S15</li> <li>•Putativo citocromo c oxidase subunidade II</li> </ul>	
<p><i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Porina 1</li> <li>•Proteína de ligação CP29.1 clorofila a-b</li> <li>•ATP sintase subunidade CF1 alfa</li> <li>•ATP sintase subunidade CF1 beta</li> </ul>	<p><i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena SSU1</li> </ul>	<p><i>Chrysobalanus icaco</i> (MA)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•ATP sintase subunidade C, plastídeo</li> <li>•Proteína de ligação CP24 10A clorofila a-b</li> </ul>	<p><i>Chrysobalanus icaco</i> (PG*)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Proteína quinase PINOID 2</li> </ul>	<p><i>Chrysobalanus icaco</i> (PG3)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Álcool desidrogenase 1</li> <li>•Enolase</li> <li>•Fosfoglicomutase</li> <li>•Frutose-bifosfato aldolase, isoenzima 1</li> <li>•Proteína R relacionada à patogênese</li> <li>•Succinato-semialdeído desidrogenase, mitocondrial</li> </ul>
<p><i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Histona H3.2</li> <li>•Pectinesterase</li> <li>•Pectinesterase/pectinesterase inibidor 3</li> <li>•Centro de reação do fotossistema I subunidade II</li> <li>•Beta-xilosidase/alfa-L-arabinofuranosidase 1</li> <li>•Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena 6</li> <li>•Proteína P21</li> <li>•Inibidor de tripsina do tipo Kunitz, cadeia alfa</li> <li>•Inibidor de tripsina do tipo Kunitz BrTI</li> <li>•Proteína de ligação ao RNA</li> </ul>		<p><i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Aldeído desidrogenase Anidrase carbônica Anidrase carbônica beta 1 ATP sintase subunidade b ATP sintase subunidade beta, mitocondrial Bomba de prótons de membrana vacuolar energizada com pirofosfato Citocromo b6 Esqualeno monooxigenase Formato desidrogenase 1 Glicerato desidrogenase, peroxisomal Haloácido de proteína Nucleosídeo difosfato quinase 2 Peroxisomal (S)-2-hidroxiácido oxidase GLO1 Proteína 14-3-3 Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase ativa B RuBisCO proteína de ligação - subunidade alfa Serina-glioxilato aminotransferase</li> </ul>		

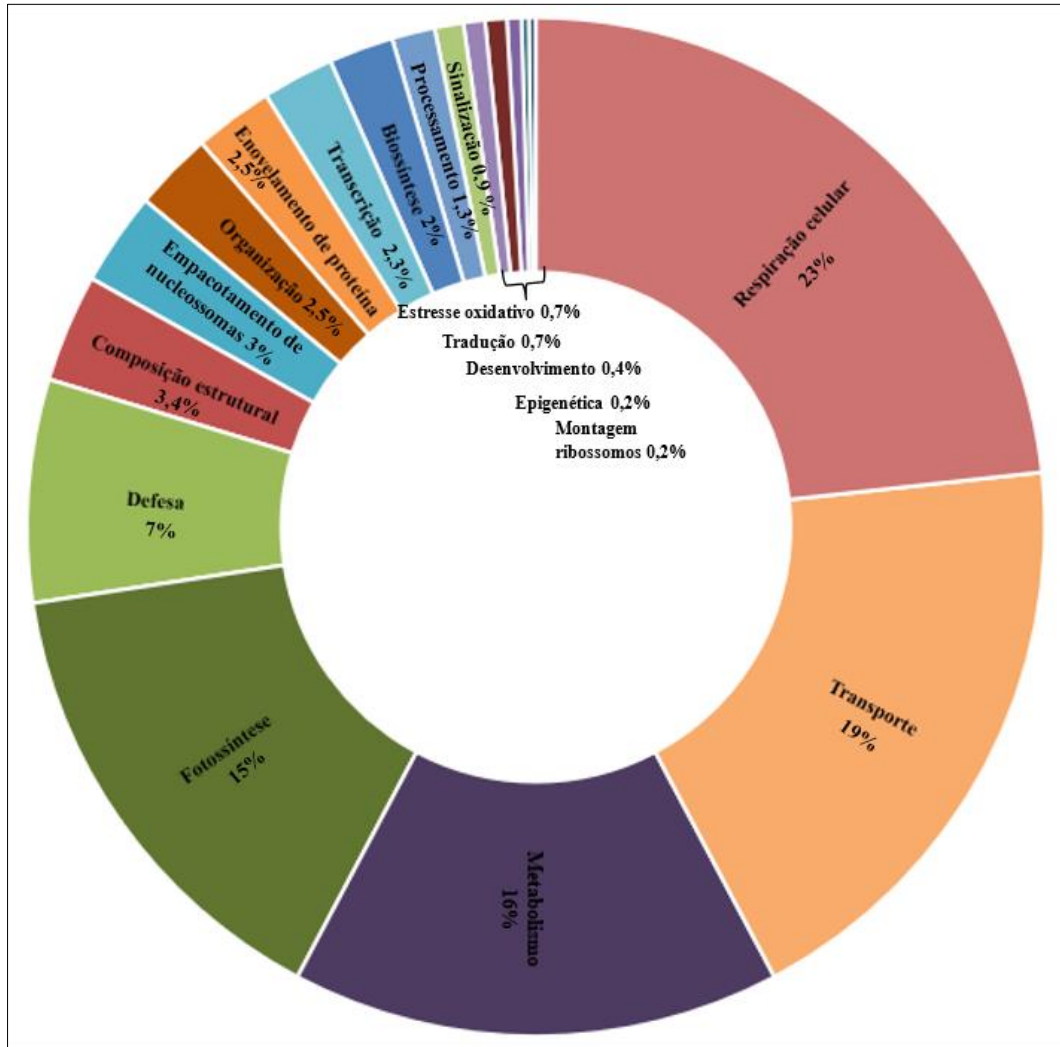
Fonte: Elaborado pela autora.

A maioria das proteínas identificadas por espectrometria de massas faz parte de processos biológicos importantes nas plantas (Figura 19), como a respiração celular transporte (íons, elétrons ou moléculas), o metabolismo e a fotossíntese, representando 23 %, 19 %, 16% e 15 % das identificações nas amostras, respectivamente. Além de outras como organização celular e biossíntese de metabólitos, aminoácidos e carboidratos. Por mais que estes processos biológicos sejam os mais importantes para as plantas e as



proteínas que os regulam sejam as mais abundantes, outras funções se destacam.

Figura 19 - Funções biológicas das proteínas identificadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

As plantas possuem mecanismo de defesa contra agentes fitopatogênicos ou de fatores abióticos, como frio, intensidade luminosa, estresse hídrico e salino e agentes químicos (etileno, ácido acetilsalicílico, cloreto de mercúrio etc), afetando a expressão gênica e consequentemente as proteínas expressas. A indução destas proteínas é mediada pela ação de substâncias sinalizadoras que são classificadas em dois tipos, conforme sua origem: elicitores endógenos, da própria planta; e elicitores exógenos, do patógeno (PORTER e DAY, 2016). Uma das respostas principais de defesa é a proteína induzida por hipersensibilidade (HR) que é uma resposta rápida e localizada, ou seja, que ocorre no sítio de infecção do patógeno, liberando compostos tóxicos. Essas proteínas se encontram

expressas em baixos níveis sob condições normais. Entretanto, seus níveis são aumentados quando as plantas são submetidas a condições de estresse (FERNANDES et al., 2009). Essas proteínas foram identificadas em amostras de *Bauhinia forficata*, *B. variegata* (NIT), e de *Chrysobalanus icaco* (JBRJ, MA, AL, PG\* e PG2) que, provavelmente, encontravam-se sob algum tipo de estresse, principalmente aquelas amostradas em restinga e no Nordeste, provavelmente devido ao estresse hídrico e salino.

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) era visto, até pouco tempo, apenas como um composto tóxico para a célula de organismos, em geral. Atualmente, sabe-se que ele é muito mais do que isso. O  $H_2O_2$  atua como uma molécula sinalizadora que controla diferentes respostas e estímulos e sua geração é aumentada em resposta a diferentes condições de estresse. O  $H_2O_2$  é continuamente gerado por diversas vias durante o metabolismo normal da planta. Um controle é feito, principalmente, pela enzima catalase, que o degrada a água e oxigênio molecular. Outra importante fonte geradora de  $H_2O_2$  é por meio de enzimas específicas como, por exemplo, xantina oxidase, amina oxidase, peroxidase da parede celular. O estresse oxidativo gerado a partir do ataque de fitopatógenos gera uma síntese rápida deste composto, com consecutiva liberação no apoplasto (FERNANDES et al., 2009; SOARES e MACHADO, 2007). As proteínas ligadas ao estresse oxidativo, como a succinato-semialdeído desidrogenase e a 2-cis peroxirredoxina, além da proteína álcool desidrogenase, envolvida na degradação do peróxido, foram encontradas nas amostras de *Bauhinia forficata* (JBRJ) e *Chrysobalanus icaco* (PG2, PG3), corroborando o estresse descrito no parágrafo anterior para estas amostras.

As proteínas inibidoras de tripsina da família Kunitz tem efeito sobre insetos, protegendo as plantas, se ligando às enzimas digestivas e, conseqüentemente, ocasionando efeitos adversos nesses organismos, inclusive mortalidade (OLIVEIRA et al., 2007). As duas isoformas desta proteína, a cadeia alfa e a BrTI, foram identificadas nas amostras de *Bauhinia forficata* (JBRJ).

A proteína R relacionada à patogênese está relacionada à defesa contra patógenos e alérgenos vegetais. A invasão de patógenos pode induzir uma série de atividades de defesa como *crosslinking* das paredes celulares, morte celular programada seguida pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), produção de metabólitos secundários, taninos, fitoalexinas, compostos fenólicos e proteínas relacionados à patogênese (PR-) (ASENSIO et al., 2004; MOOSA et al., 2017). A expressão de proteínas PR está diretamente correlacionada com a indução de resistência sistematicamente adquirida em planta. Estas

proteínas desempenham um papel distinto no sistema natural de defesa das plantas, pois são ativadas durante a resposta induzida por hipersensibilidade e resistência sistemicamente adquirida (MOOSA et al., 2017). As três replicatas de *Chrysobalanus icaco* (PG3) apresentaram esta proteína, podendo inferir que, junto às informações citadas anteriormente, esta amostra estava sob efeito de estresse oxidativo (proteína HR, succinato-semialdeído desidrogenase, 2-cis peroxirredoxina e álcool desidrogenase) e biótico (proteína PR-), mostrando as inter-relações entre estas proteínas. A amostra PG3 se refere ao fruto de *C. icaco* do mesmo local das folhas coletadas (PG\*, PG1 e PG2).

A expressão destas proteínas de defesa e de estresse abiótico/biótico pode fazer com que substâncias tóxicas sejam liberadas nas folhas das plantas (ASENSIO et al., 2004; DANG e VAN DAMME, 2015), mas não se sabe se podem causar alergia e até mesmo intoxicação, caso estejam em concentrações elevadas, ao consumi-las, no caso de *B. forficata* e *C. icaco*, para o controle do diabetes. Por causa de suas atividades biológicas, as proteínas vegetais tóxicas também são consideradas ferramentas potencialmente úteis na proteção de cultivos e em aplicações biomédicas, como o tratamento do câncer. Os genes que codificam as proteínas vegetais tóxicas foram introduzidos nos genomas das culturas usando tecnologia de engenharia genética, a fim de aumentar a resistência da planta contra patógenos e doenças (DANG e VAN DAMME, 2015).

Não foi encontrada proteína com sequência peptídica (FVNQHLXGSH LVEALYLVXG ERGFFYTPKA GIVEQXXASV XSPLYQLENYX N) de 51 aminoácidos semelhante à proteína parecida com a insulina (*insulin protein-like*) em nenhuma amostra. Esta proteína tem a metade do número de aminoácidos em sua sequência que a insulina humana (KOONA et al., 2010). Esperava-se encontrar esta proteína nos extratos das plantas estudadas, já que foi analisada anteriormente (KOONA et al., 2010; VENANCIO et al., 2003; XAVIER-FILHO et al., 2003). O fato de não ter encontrado esta proteínas nos extratos, não quer dizer que as plantas estudadas não tenham. O processo de digestão pode ter influenciado, como o filtro de corte usado, que foi o de 3kDa, podendo ter eliminado a proteína, já que é de baixa massa molecular.

Entretanto, outras proteínas que tem funções metabólicas importantes foram identificadas, como a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que é uma enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato na presença de  $\text{NAD}^+$  e fosfato inorgânico, sendo também capaz de catalisar a reação inversa; pode, ainda, causar alteração

no balanço de açúcar e aminoácidos, pois a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é importante para a síntese de serina nas raízes. A suplementação de serina restaura os níveis normais de carboidratos e as atividades biossintéticas do açúcar (MUÑOZ-BERTOMEU et al., 2009). A serina foi encontrada em amostras de *B. forficata* (NIT e JBRJ) e *C. icaco* (JBRJ, MA e PG2).

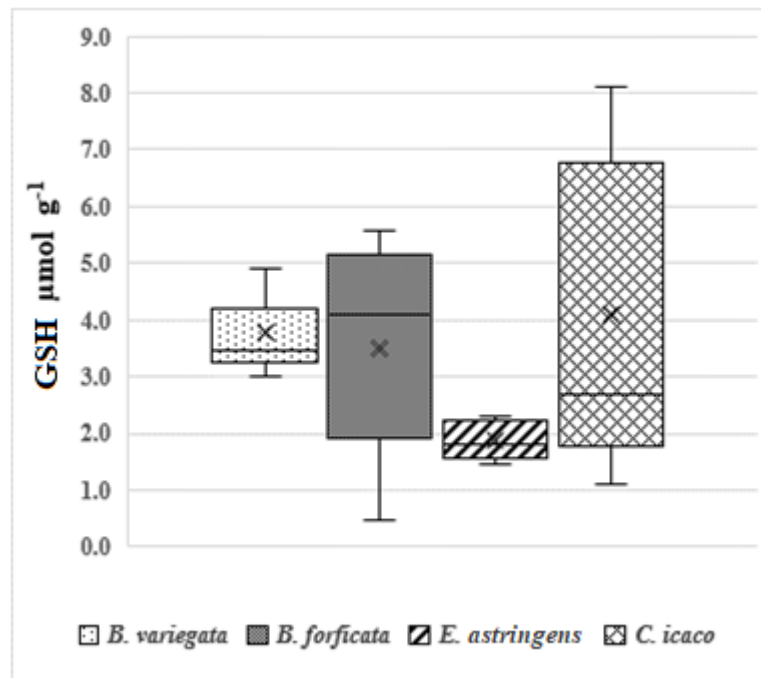
As proteínas serina-glioxilato aminotransferase (gene AGT1) e serina hidroximetiltransferase (gene SHM2) são responsáveis pela biossíntese de glicina. Serina-glioxilato aminotransferase (SGAT) converte glioxilato e serina em glicina e hidroxipiruvato durante a fotorrespiração. Além disso, a SGAT opera com vários outros substratos, incluindo asparagina. A elevada atividade de SGAT causa mudanças no metabolismo e interfere na absorção de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese e acúmulo de biomassa, tendo que ser ajustada dinamicamente para garantir o fluxo variável, através da via fotorrespiratória com um consumo mínimo de asparagina e níveis adequados de serina para outro metabolismo celular (MODDE et al., 2017). A serina hidroximetiltransferase (SHMT) é também uma enzima que catalisa a transferência reversível de serina para glicina e, por desempenhar um papel fundamental no metabolismo de aminoácidos e na biossíntese da maioria dos neurotransmissores, tem sido considerada um alvo potencial para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos e antineoplásicos (LENG et al., 2017), além de ser termofílica, protegendo a planta contra temperaturas. Ambas as proteínas foram identificadas em *C. icaco* (PG2), mas em *C. icaco* (JBRJ e PG3), somente a SHMT foi encontrada.

### 6.3

As amostras foram submetidas à extração da glutatona (GSH), em triplicata, e quantificadas através da curva analítica de GSH (Anexo I).

Os valores individuais são apresentados no Anexo J. Os níveis de GSH variaram de 3,00 a 4,89  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Bauhinia variegata*, de 0,48 a 5,59  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Bauhinia forficata*, de 1,47 a 2,32  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Eugenia astringens* e de 1,10 a 8,09  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Chrysobalanus icaco*. A variação entre as espécies é nítida (Figura 20), sendo menores valores encontrados para *E. astringens*, seguido da *B. variegata*. As amostras de *B. forficata* e *E. astringens*, espécies com potencial hipoglicemiante comprovado, obtiveram grandes concentrações de GSH.

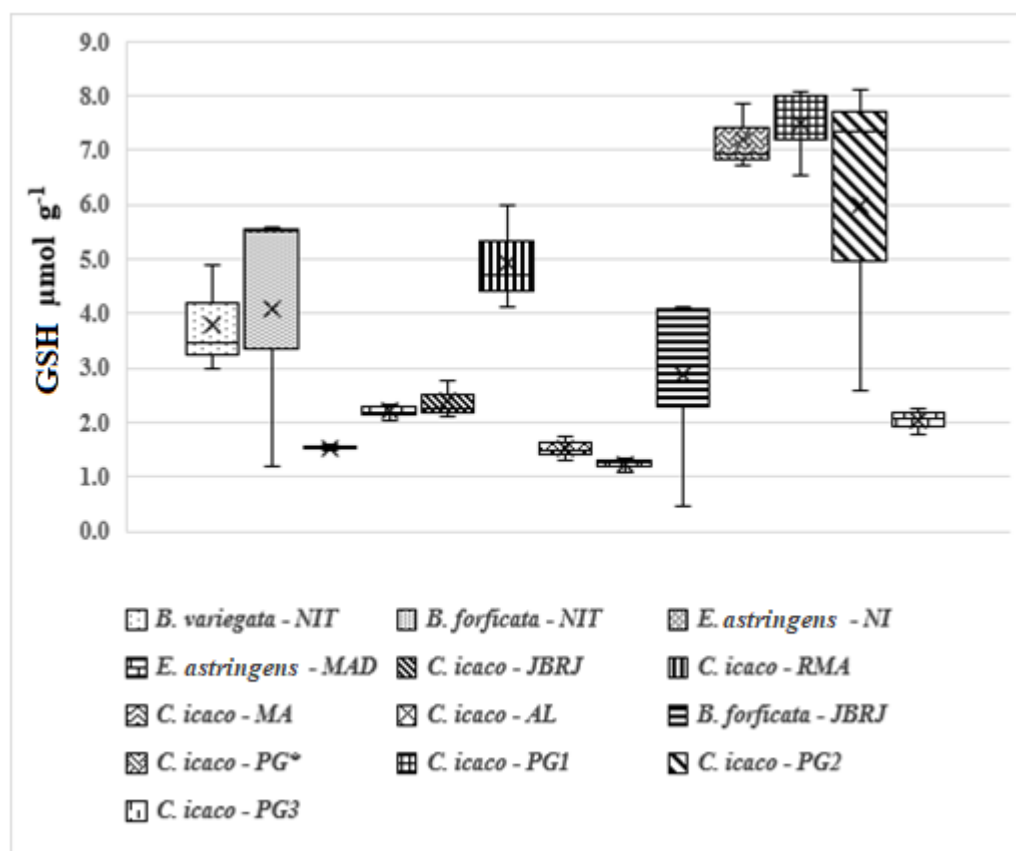
Figura 20 – Variação da concentração de GSH entre as espécies *Bauhinia variegata*, *Bauhinia forficata*, *Eugenia astringens* e *Chrysobalanus icaco*.



Valores expressos em mediana, média, desvio-padrão, máximo e mínimo. N=3. Fonte: Elaborada pelo autora.

As amostras de *Chrysobalanus icaco* de Praia Grande (PG), exceto a do fruto (PG3) mostraram níveis superiores às demais (Figura 21). Amostra de folhas jovens (PG2) foi a que apresentou maior concentração de GSH. Outra amostra notável é a da Restinga de Massambaba (RMA), localizada também na Região dos Lagos – RJ, além das amostras de *Bauhinia forficata* (NIT e JBRJ) e de *Bauhinia variegata* (NIT). Em relação às demais amostras de *C. icaco*, a cultivada no JBRJ não apresentou expressão significativa de GSH, assim como as de MA e AL, coletadas no ambiente natural em Alagoas. Aparentemente, a regionalização pode interferir na expressão de GSH, talvez pelo regime de ventos, sendo maior na Região dos Lagos, segundo dados gerais. O conteúdo de nutrientes no solo pode também ser responsável na expressão de GSH, conforme local de amostragem.

Figura 21– Variação das concentrações de GSH nas amostras de diferentes locais.



NIT – Niterói, NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercado de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto). Valores expressos em mediana, média, desvio-padrão, máximo e mínimo. N=3. Fonte: Elaborado pela autora.

Concentrações maiores de GSH indicam mecanismo de defesa contra estresse oxidativo ou proteção celular contra agentes. Estresses abióticos geralmente resultam em superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), cuja regulação é vital para melhorar a resistência ao estresse das plantas e é implementada por um sistema de defesa antioxidante composto de uma série de enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos (COGO et al., 2009; HASANUZZAMAN et al., 2017). Entre os antioxidantes não enzimáticos, a glutatona (GSH) participa na desintoxicação de ROS, direta ou indiretamente. Outra função importante do GSH é a formação de fitoquelatinas que ligam metais para transporte seguro e sequestro no vacúolo. Assim, desempenha papel vital na desintoxicação de metais/metalóides e xenobióticos tóxicos (SHARMA e DIETZ, 2006, 2008). Em muitas espécies de plantas, a tolerância a metais tóxicos é altamente dependente da glutatona, um metabólito essencial para a desintoxicação celular. Os níveis maiores de GSH encontrados nas amostras descritas acima, também podem estar relacionados à

contaminação por metais.

A GSH regula eventos de sinalização precoce, expressão gênica relacionada ao estresse e à defesa (DUBREUIL-MAURIZI e POINSSOT, 2012), aumentando a tolerância da planta a diferentes estresses abióticos, incluindo salinidade, seca, alta e baixa temperatura e estresse por metais tóxicos (HASANUZZAMAN et al., 2017). A GSH, seu par redox (GSH/GSSG) e enzimas relacionadas (GPXs, GSTs, GR) mostraram proteção de plantas contra o estresse oxidativo induzido pelo déficit hídrico nos tecidos. Assim, o sistema GSH é sempre considerado como um marcador útil em estudos ecofisiológicos de plantas (LABUDDA et al., 2014). Os níveis maiores de GSH encontrados nas amostras descritas acima, também podem estar relacionados à seca, principalmente em locais de restinga, como é o caso de Praia Grande (PG) e Restinga de Massambaba (RMA).

DA SILVA et al. (2017) avaliaram as respostas do metabolismo da glutathiona ao arsenito ( $\text{AsO}^-$ ) em *Salvinia molesta*, uma samambaia aquática que tem potencial de fitorremediação. O  $\text{AsO}^-$  causou danos na membrana celular das folhas submersas, indicando estresse oxidativo. Houve um aumento no conteúdo de glutathiona e atividade enzimática de glutathiona peroxidase, glutathiona sulfotransferase e glutathiona redutase. Estes achados sugerem um importante papel da GSH na proteção da *S. molesta* contra os efeitos tóxicos do  $\text{AsO}^-$ .

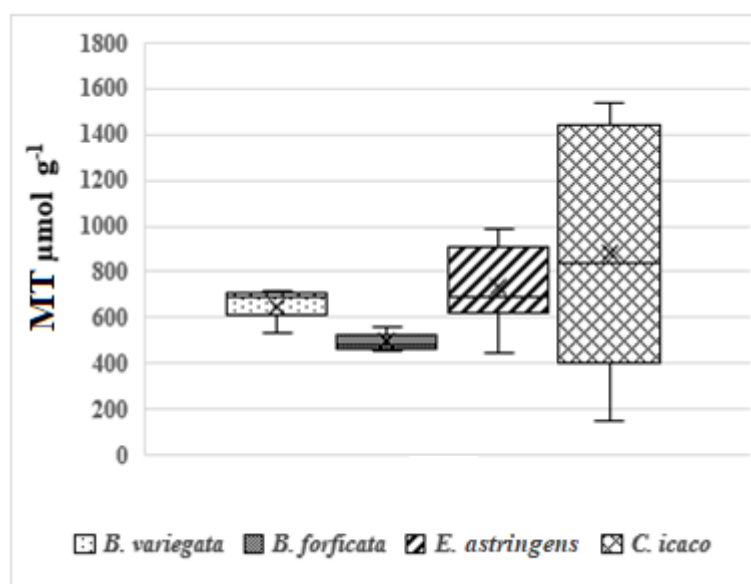
A partir da análise estatística, foi constatado que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis) entre as amostras, considerando todos os locais; porém, mostra-se significativa quando são comparadas as amostras de *Chrysobalanus icaco* do Sudeste (RMA e PG) com as do Nordeste (MA e AL),  $p < 0,001$ , de acordo com o teste de Mann-Whitney. Com esses resultados é possível que a regionalização influencie nas expressões de proteínas e também na resposta contra o estresse oxidativo.

#### 6.4

As amostras foram submetidas à extração e à quantificação da metalotioneína (MT), em triplicata. Com os valores das absorvâncias obtidas e a curva analítica (Anexo K), calculou-se as concentrações da MT em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Anexo L). Os níveis de MT variaram de 536,42 a 721,25  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Bauhinia variegata*, de 453,87 a 556,64  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Bauhinia forficata*, de 445,89 a 985,77  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Eugenia astringens* e de 150,10 a 1532,50  $\mu\text{mol g}^{-1}$  em *Chrysobalanus icaco*. A variação dos níveis de MT entre as espécies é observada (Figura 22), sendo menores valores encontrados para *B. variegata* e *B.*

*forficata*, e enquanto em *E. astringens*, não foi tão significativa quanto em *C. icaco*, que apresentou concentrações elevadas de MT.

Figura 22 – Variação da concentração de MT entre as espécies *Bauhinia variegata*, *Bauhinia forficata*, *Eugenia astringens* e *Chrysobalanus icaco*.

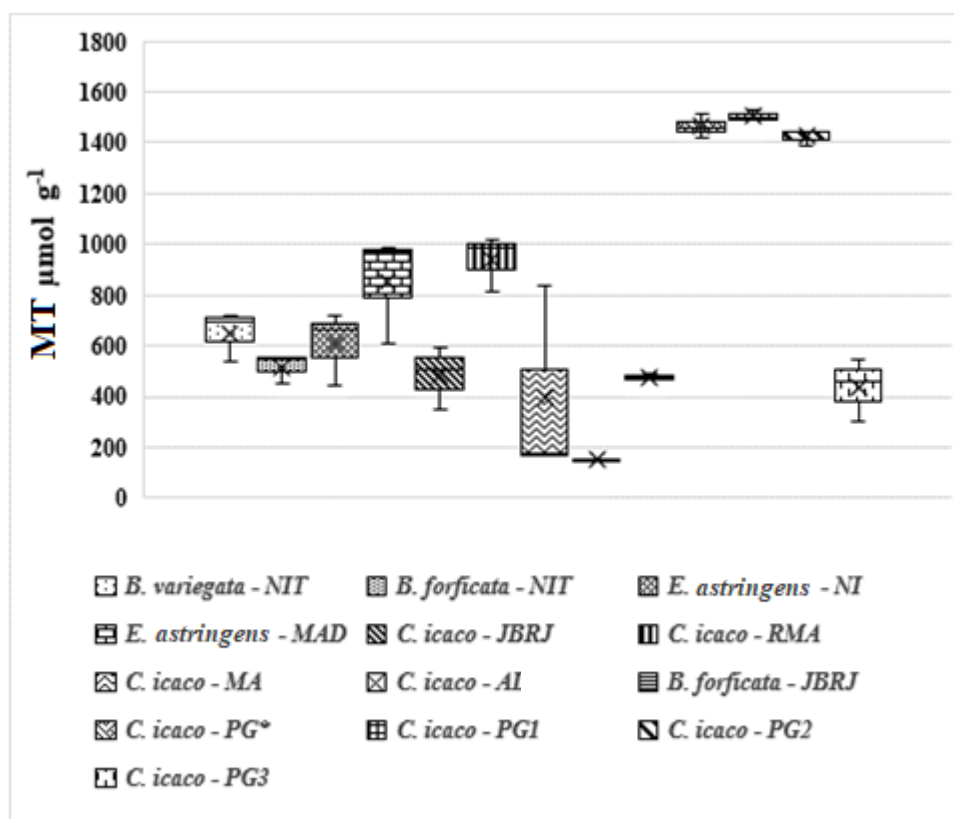


Valores expressos em mediana, média, desvio-padrão, máximo e mínimo. N=3. Fonte: Elaborado pela autora.

As amostras de *Chrysobalanus icaco* de Praia Grande (PG), exceto a do fruto (PG3) mostraram níveis elevados de MT (Figura 23), seguida da amostra da Restinga de Massambaba (RMA), localizada também na Região dos Lagos – RJ, e da *Eugenia astringens* do Mercado de Madureira, porém, com menor expressão, além das amostras de *Bauhinia forficata* (NIT e JBRJ) e de *Bauhinia variegata* (NIT).



Figura 23 – Variação das concentrações de MT nas amostras de diferentes locais.



NIT – Niterói, NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercado de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto). Valores expressos em mediana, média, desvio-padrão, máximo e mínimo. N=3. Fonte: Elaborado pela autora.

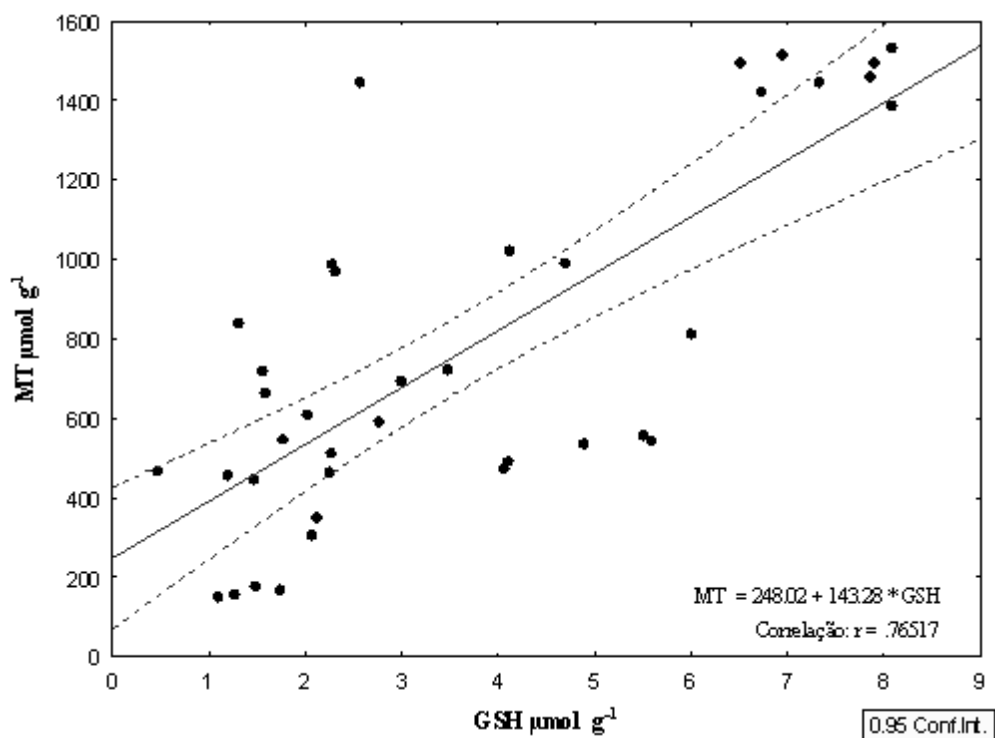
Determinações de metalotioneína MT são usadas para avaliar a toxicidade e a bioacumulação de metais, e a MT pode ser induzida em resposta a fatores que promovem estresse oxidativo, pois desempenham papel importante nos processos celulares, incluindo a regulação do crescimento celular, reparação de danos no DNA e eliminação de espécies reativas de oxigênio (GRENNAN, 2011). É provável que as amostras de Praia Grande estejam sob efeito de estresse oxidativo e/ou por contaminação de metais.

As metalotioneínas são capazes de ligar a uma variedade de metais pela formação de ligações mercaptanas entre os numerosos resíduos Cys presentes nas proteínas e no metal, e é o arranjo desses resíduos que em parte determina as propriedades de ligação ao metal das proteínas (GRENNAN, 2011; LESZCZYSZYN et al., 2013). A premissa subjacente para as determinadas estequiometrias é que para cada MT, há um número "ideal" de íons metálicos, que resulta em uma proteína bem estruturada, com todos os tiolatos Cys ligados a pelo menos um íon metálico. As ligações esperadas para metalotioneína de planta são os íons de  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Cu^{1+}$  (LESZCZYSZYN et al., 2013).

YANG et al. (2015) constataram que *Ziziphus jujuba* acumula  $\text{Cd}^{2+}$  nas folhas e diminui a toxicidade de  $\text{Cd}^{2+}$  nas raízes, por conta da ligação com MTs, que detoxifica este metal.

A quantificação de MT foi realizada através da medição dos grupos sulfidril da das proteínas. A partir da análise estatística, foi checado que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis) entre as amostras, considerando todos os locais, porém é significativa, quando são comparadas as amostras de *Chrysobalanus icaco* do Sudeste (RMA e PG) com as do Nordeste (MA e AL),  $p < 0,05$ , de acordo com o teste de Mann-Whitney, o que pode significar que apresentam sensibilidade diferente para metais. Dados estatísticos ainda mostram que existe uma correlação entre níveis de GSH e MT,  $p < 0,05$ , considerando todas as amostras ( $r = 0,765$ ) (Figura 24). Considerando somente as amostras de *C. icaco* coletadas em Praia Grande (PG), a correlação entre GSH e MT é ainda maior ( $r = 0,826$ ) (Anexo M). *Bauhinia forficata* (NIT e JBRJ) também obteve elevada correlação ( $r = 0,842$ ) entre níveis de GSH e MT (Anexo N). Isto quer dizer que estas amostras, em particular, estão sob estresse oxidativo, causado provavelmente pela exposição aos metais, que induzem a expressão de MT, a qual está atuando contra espécies reativas de oxigênio (EROs). E por ter correlação com os níveis de GSH encontrados nas folhas, corrobora que a expressão de GSH pode também estar relacionada à contaminação de metais.

Figura 24 – Correlação entre as concentrações de GSH e MT nas amostras de planta.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 6.5

Células de fibroblastos da linhagem 3T3 foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular, expostas a diferentes concentrações do extrato protéico e ao ensaio de migração celular, expostas a uma determinada concentração do mesmo.

### 6.5.1

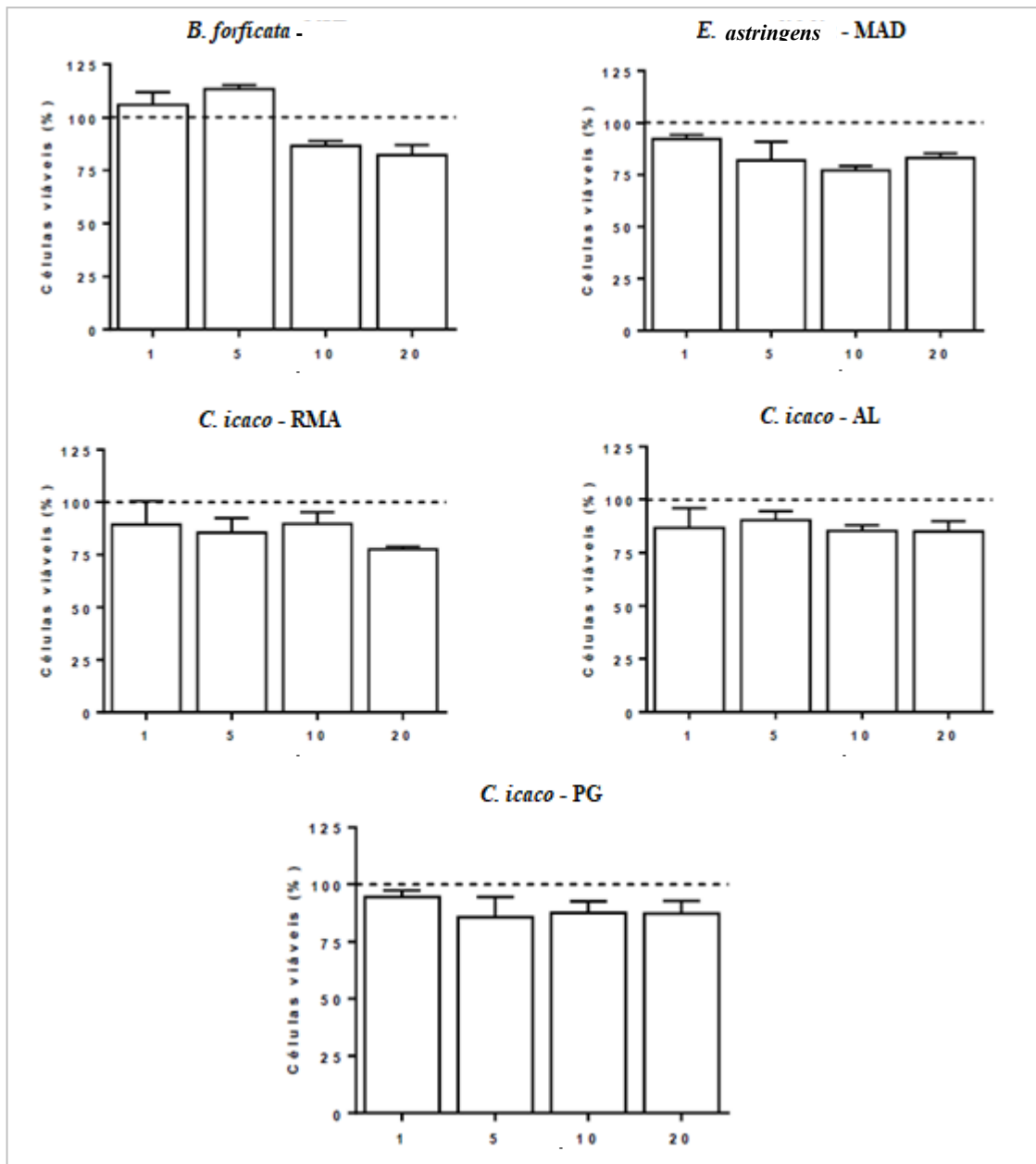
O tratamento com *Bauhinia forficata* (NIT), nas concentrações de 1 e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não alterou a viabilidade dos fibroblastos, como apresentado na Figura 25. Entretanto, foi evidenciado que o tratamento nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  deflagrou uma diminuição de 13,5% e 17,8% ( $p < 0,001$ ) na viabilidade celular, respectivamente. O tratamento com *E. astringens* (MAD), por sua vez, em todas as concentrações testadas, causou uma redução na viabilidade celular, diminuindo em 8,8 % (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 19,2 % (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 23 % (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 17 % (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a porcentagem de células viáveis.

A exposição com *C. icaco* (RMA), nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não alterou a viabilidade dos fibroblastos. Por outro lado, o aumento na concentração acarretou em uma diminuição na porcentagem de células viáveis, levando uma redução de 22,4% ( $P < 0,001$ ) na viabilidade celular quando a maior concentração (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi usada. O tratamento com *C. icaco* (AL), por sua vez, induziu uma diminuição na viabilidade celular em todas as concentrações testadas, quando comparado com o grupo controle. Adicionalmente, o tratamento com *C. icaco* (PG\*), na concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não alterou a viabilidade dos fibroblastos, enquanto que o tratamento com as demais concentrações induziu uma diminuição na viabilidade celular.

ZANDI et al. (2016) checaram a viabilidade de fibroblastos (linhagem ovina) em extratos de diferentes plantas (*Aloe vera*, hena, camomila, alcaçuz, murta, menta, canela, gengibre e cedro), e que na concentração mínima (6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), a viabilidade dos fibroblastos dérmicos pelo ensaio de MTT aumentou significativamente no cedro ( $p < 0,05$ ). Combinação de *Aloe vera*, extrato de menta e alcaçuz aumentou significativamente a viabilidade dos fibroblastos dérmicos ( $p < 0,05$ ). *Aloe vera*, que é conhecida também pela sua atividade hipoglicemiante, tem a habilidade de estimular a proliferação de fibroblastos L929 (MANOJ et al., 2009). CALLONI et al. (2016) testaram o extrato fenólico de *Plinia trunciflora*, da mesma família que *Eugenia astringens*, em células de fibroblastos de pulmão humano, na presença e na ausência de amiodarona, fármaco utilizado para tratar arritmia, mas que causa toxicação nos pulmões. O extrato rico em polifenóis foi capaz de

prevenir o decréscimo da viabilidade celular (teste de MTT), além de reduzir a diminuição da atividade do complexo I e da biossíntese de ATP.

Figura 25 – Efeito dos extratos de *Bauhinia forficata* (NIT), *Eugenia astringens* (MAD), *Chrysobalanus icaco* (RMA), *Chrysobalanus icaco* (AL) e *Chrysobalanus icaco* (PG\*) na viabilidade de fibroblastos.



NIT – Niterói, MAD – Mercado de Madureira, RMA – Restinga de Massambaba, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo). A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com meio de cultivo DMEM). N=4. Fonte: Elaborado pela autora.

Não há estudos testando a viabilidade de fibroblastos expostos a extratos proteicos

de *Bauhinia forficata*, *B. variegata* e *Chrysobalanus icaco*, mas extratos etanólicos dessas espécies demonstram ser importantes em processos celulares. O gênero *Bauhinia* possui extrato etanólico com atividade citotóxica sobre o desenvolvimento tumoral (CHEW et al., 2014; SOLOMON et al., 2016). GÓIS et al. (2017) testaram 16 compostos etanólicos de *Bauhinia acuruana* em linhagens tumorais, em que alguns compostos mostraram inibição do crescimento de células tumorais devido à citotoxicidade. KUMAR e BHAT (2014) avaliaram a atividade anticancerígena *in vitro* da fração rica em flavonoides do extrato etanólico de *B. variegata* em linhas celulares HeLa (células de adenocarcinoma cervical humano), testando a viabilidade dessas células pelo ensaio com MTT. A citotoxicidade do extrato de *B. variegata* foi comprovada. SILVA et al. (2017) avaliaram a atividade antifúngica do extrato etanólico de *C. icaco*, constatando a inibição do crescimento de *Candida albicans* e *C. parapsilosis*, cepas expostas a esse extrato.

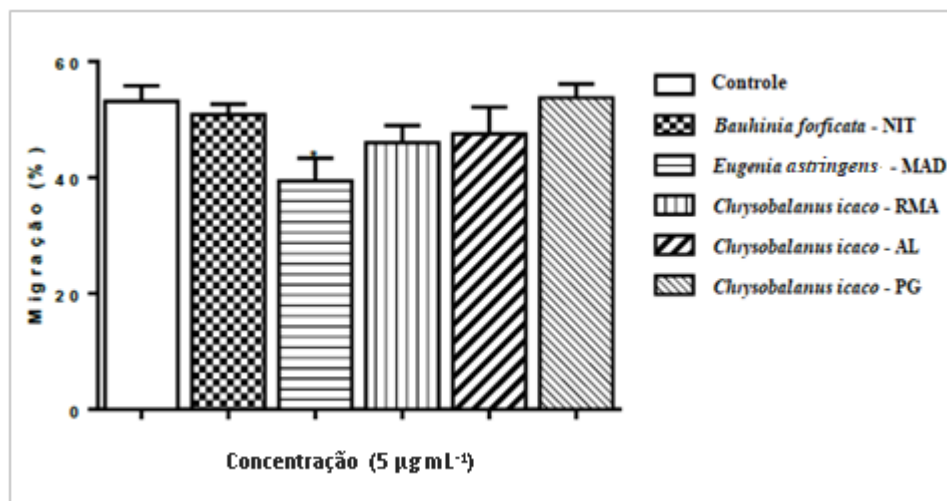
### 6.5.2

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos de *B. forficata* (NIT), *E. astringens* (MAD), *C. icaco* (RMA), *C. icaco* (AL) e *C. icaco* (PG\*) sobre a migração de fibroblastos, foi realizado o ensaio de migração celular (*Scratch Wound Healing Assay*).

Como mostrado na Figura 26, o tratamento com *B. forficata* (NIT), *C. icaco* (RMA), *C. icaco* (AL) e *C. icaco* (PG\*) não foi capaz de alterar a taxa de migração dos fibroblastos. Por outro lado, pode-se notar que o tratamento com *E. astringens* levou a redução na migração destas células em 26,04% ( $p < 0,05$ ). As imagens e taxas de migração celular nas amostras estão apresentadas nos Anexos P e Q, respectivamente.

PITZ et al. (2016) avaliaram a atividade *in vitro* de extrato etanólico de cascas de *Plinia peruviana*, mesma família da planta *Eugenia astringens*, em processos de cicatrização e atividade antioxidante em fibroblastos urinários (linhagem celular L929). O ensaio de migração celular (*Scratch Wound Healing Assay*) indicou que nenhuma das concentrações testadas da casca (0,5, 5, 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi capaz de aumentar a taxa de migração após 12 horas de incubação. Estes resultados demonstram um efeito positivo da casca no processo de cicatrização de feridas na linha celular de fibroblastos L929, provavelmente devido à atividade antioxidante exibida por fitoquímicos no extrato. MANOJ et al. (2009) verificaram o efeito de germoplasmas de *Aloe vera*, que também tem caráter hipoglicemiante, em fibroblastos L929, através do ensaio de migração celular, constatando o aumento da migração de fibroblastos, que é importante para regeneração e reparo da pele em caso de ferida.

Figura 26 - Efeito dos extratos de *Bauhinia forficata* (NIT), *Eugenia astringens* (MAD), *Chrysobalanus icaco* (RMA), *Chrysobalanus icaco* (AL) e *Chrysobalanus icaco* (PG\*) sobre a migração de fibroblastos nos tempos 0 e 24 horas.



NIT – Niterói, MAD – Mercado de Madureira, RMA – Restinga de Massambaba, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo). \*p < 0,05. N=3. Fonte: Elaborado pela autora.

Não há estudos testando a viabilidade e migração de fibroblastos expostos a extratos protéicos de *B. forficata*, *B. variegata*, *C. icaco* e *E. astringens*, entretanto extratos etanólicos são utilizados em estudos para comprovar as atividades anti-inflamatória e antitumoral do gênero *Bauhinia* e ensaios de toxicidade com espécies do gênero *Eugenia*. ANANTH et al. (2010) observaram o efeito de extratos em metanol e em clorofórmio de *Bauhinia purpurea* em ratos com ferimentos. Nos modelos de excisão e queimaduras, os animais tratados apresentaram redução significativa no tempo de epitelização e contração da ferida (50%) em relação ao controle. Esses achados indicam a atividade cicatrizante de folhas de *B. purpurea*. Santos et al. (2018) checaram o efeito antitumoral do extrato etanólico de *B. variegata* em células HeLa (células de adenocarcinoma cervical humano), através do ensaio de migração celular (*Scratch Wound Healing Assay*), no qual as células tiveram a migração reduzida pelo extrato de *B. variegata*. A atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* foi determinada pela inibição da autoxidação espontânea em homogenato de cérebro, sendo a dose letal DL<sub>50</sub> de 5,93 g kg<sup>-1</sup> em camundongos (AURICCHIO et al., 2007). No teste de fitotoxicidade do extrato de *Eugenia catharinae* observou-se que as frações acetato de etila e hexano inibiram a germinação de sementes, enquanto que a fração hexano apresentou maior inibição das plântulas de alface. *E. catharinae* demonstrou uma atividade tóxica considerável, incentivando-se a busca pelos compostos responsáveis por essa atividade (COLLA e BRIGHENTE, 2011).

## 7

Há uma confusão quanto à identificação das espécies de *Bauhinia*, pois as folhas e flores das variações e das subespécies são similares e nem todas tem caráter hipoglicemiante. Adicionalmente, há um equívoco em relação à venda de abajerú no Mercado de Madureira e Horto de Nova Iguaçu, onde a *Eugenia astringens*, de mesmo nome abajerú, é vendida no lugar de *Chrysobalanus icaco*. Isso é de grande preocupação com a Saúde Pública, pois a população que consome o chá das folhas de *C. icaco*, provenientes desses mercados, acredita estar se tratando do diabetes. O uso de plantas medicinais, por ser de fácil acesso à população geral e por muitas vezes não possuir sua eficácia e segurança bem estabelecidas, pode se tornar um risco para quem as usa, podendo causar mais efeitos deletérios do que trazer benefícios à saúde. Isso mostra que é de suma importância a fiscalização por profissional qualificado dos exemplares, dos vendedores, dos distribuidores e dos produtores para que haja uma regularização da venda de plantas medicinais.

Verificou-se que o método por liofilização foi o mais adequado devido à automação do processo e pela menor probabilidade de contaminação da amostra sendo, portanto, escolhido para aplicação na análise das amostras de pata-de-vaca. Além disso, o método de maceração mecânica (moinho de facas) apresentou-se mais adequado analiticamente por conta da homogeneização das amostras.

A extração de proteínas obteve sucesso, tendo o ditiotreitól na concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup> como o antioxidante escolhido, demonstrado ser mais eficiente no método, permitindo obter uma maior concentração de proteínas durante a extração. O teste de antioxidantes é de extrema importância, pois dependendo do tipo de amostra, tal agente redutor vai se adaptar melhor. Os processos de purificação de amostras levam em consideração vários fatores, sendo um desses a escolha do agente redutor.

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) foi realizada de maneira adequada e os resultados foram satisfatórios, pois mesmo não fazendo a digestão em gel, este serviu para checar as bandas proteicas e respectivos pesos moleculares e se existem interferentes nas amostras. Embora fosse necessário o aumento da massa das proteínas inseridas no gel, é possível afirmar que há presença de proteínas, em sua maioria, com a massa em torno de 50 kDa.

A digestão de proteínas pelo método de preparo de amostras auxiliada por filtro (FASP) mostrou-se eficiente para a digestão de proteínas, sendo somente necessário o

ajuste do corte do filtro, a fim de obter uma maior quantidade de proteínas e, conseqüentemente, peptídeos.

A identificação de proteínas por espectrometria de massa foi um sucesso, pois foi a primeira vez que o equipamento foi utilizado e se adaptou muito bem à matriz biológica, e foi obtido um número consideravelmente grande de proteínas e, dentre estas, boa parte foi representada por proteínas diferentes e uma menor parte por proteínas únicas, ou seja, referente a uma determinada espécie. Ajustes nos parâmetros de identificação poderão aprimorar a busca de proteínas parecidas com a insulina.

Níveis de glutathiona (GSH) e metalotioneína (MT) encontrados nas plantas podem estar relacionados com a contaminação de metais e também com o local de amostragem, sendo influenciados pelas características regionais. A análise de metais nas amostras poderá contribuir para elucidar estas relações. O método espectrofotométrico foi escolhido por ser prático, rápido e adequado para análise de GSH e MT, além para a quantificação de proteínas totais e peptídeos, verificando o rendimento da extração e digestão, respectivamente.

Os ensaios para avaliar a toxicidade dos extratos proteicos das plantas estudadas serviram para complementar os dados proteômicos e para contestar a venda e o uso da planta *Eugenia astringens* vendida no lugar de *Chrysobalanus icaco*, uma vez que reduziu a viabilidade celular em todas as concentrações do extrato testadas e diminuiu a taxa de migração dos fibroblastos. Estes resultados mostram que *E. astringens* pode causar efeitos citotóxicos se consumida em doses maiores.

Os resultados obtidos neste estudo são o princípio para a caracterização do proteoma de plantas medicinais e de fitoterápicos. Pouco se tem de informação sobre a proteômica de plantas no Brasil. Associados a estudos futuros certamente contribuirão para o entendimento das proteínas no processo de controle das taxas glicêmicas no sangue.

O presente trabalho demonstra a importância da pesquisa na área da Saúde Pública, e da divulgação e comunicação para a sociedade dos resultados de trabalhos científicos já que devido ao confundimento do uso de plantas medicinais, pacientes diabéticos podem vir a optar por produtos naturais no uso terapêutico para o tratamento do diabetes, de maneira equivocada.



## 8

O trabalho realizado foi o “pontapé inicial” da proteômica no Laboratório de Toxicologia do Centro de Pesquisas da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH). Esta linha de pesquisa continuará sendo desenvolvida no laboratório, realizando alguns ajustes de metodologia para aplicação tanto em plantas medicinais e fitoterápicos quanto em outras matrizes biológicas.

Ajustes como na digestão e na identificação de proteínas são necessários para aprimorar a análise proteômica, obtendo uma maior quantidade de proteínas identificadas e possíveis biomarcadores indicados. A separação das amostras em duas frações para a digestão, uma com o filtro de FASP com menor corte e outra com maior corte, resultaria em uma amostra mais livre de interferentes, como a maioria das proteínas está na faixa de 50 kDa, mas também não eliminaria as proteínas parecidas com a insulina, que tem em torno de 7 kDa. Além do teste do filtro de FASP de maior volume, para aproveitar uma maior quantidade da amostra, sendo concentrada ao longo do processo. Adicionalmente, alguns parâmetros na identificação de proteínas por espectrometria de massas serão testados, em busca das proteínas parecidas com a insulina e demais possíveis biomarcadores proteômicos. Há também o intuito de comparar os extratos protéicos, já analisados, com os extratos aquosos, a fim de avaliar diferenças no conteúdo protéico.

Para as amostras já processadas, serão analisados compostos metálicos para avaliar se de fato existe correlação entre a concentração de glutathione e metalotioneína com a contaminação por metais e verificar se há relação entre níveis de metais e proteínas de defesa identificadas. Além de checar a composição química e mineralógica do solo dos locais de coleta (somente os locais considerados habitats naturais) no Sistema de Informação de Solos Brasileiros da Embrapa, para verificar possível estresse oxidativo e contaminação causados por conta do solo. Há também o interesse de determinar níveis de peróxido de hidrogênio e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo para corroborar com as demais análises.

Por fim, há um propósito de aumentar o número de amostras, de outras espécies e de outras localidades com o intuito de avaliar a regionalização, se influencia na expressão de proteínas, especialmente a proteína parecida com a insulina.

- ALTAN, F.; UNAL, R. Focus on Proteomics and Bioinformatics in Translational Research and Plant Research of Obesity and Diabetes. *Journal of Proteomics*, v. 1, n. 2, p. 1–6, 2014.
- ANANTH, K.V. et al. Evaluation of wound healing potential of *Bauhinia purpurea* leaf extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, n. 1, p. 122–127, 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução de Diretoria Colegiada*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, Nº 90, 14 de maio de 2014.
- APAYA, M.K.; CHANG, M.T.; SHYUR, L.F. Phytomedicine polypharmacology: Cancer therapy through modulating the tumor microenvironment and oxylipin dynamics. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 162, p. 56–68, 2016.
- AQUINO, J.A. et al. Pharmacotherapeutic empowerment and its effectiveness in glycemic control in patients with Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 13, n. 1, p. 137–142, 2019.
- ASENSIO, T. et al. Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 11, n. 4, 896–899, 2004.
- AURICCHIO, M.T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. *Journal of Natural Products*, v. 26, n. 1, p. 76–81, 2007.
- AZEVEDO, C.R. et al. Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. *Journal of Proteomics*, v. 39, n. 11, p. 1435–1444, 2006.
- BALBUENA, T.S. et al. Challenges in proteome analyses of tropical plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 21(3), 175–186, 2009.
- BALBUENA, T.S. et al. Phytochemistry differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Journal of Proteomics*, v. 72, n. 4–5, p. 302–311, 2011.
- BARACAT-PEREIRA, M.C. et al. Separomics applied to the proteomics and peptidomics of low-abundance proteins: Choice of methods and challenges - A review. *Journal of Proteomics*, v. 35, p. 283–291, 2012.
- BATISTA, N. et al. The influence of using *Bauhinia forficata* Link in glycemic, lipid and toxicological profile in in vivo experimental models: A systematic review. *Journal of Proteomics*, v. 7, p. 2343–2348, 2013.
- BEUTLER, E. The preparation of red cells for assay. In: *Methods in Hematology*. New York: Grune and Stratton Company, 1975. p. 8–18.
- BOCHNER, R. et al. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. *Journal of Proteomics*, v. 14, n. 3, p. 537–547, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção

- Básica. - PNPIC-SUS/ Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. - . Espécies vegetais. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf> >. Acesso em: 20 jul 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. /Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190p.
- BREDA, A. et al. Protein structure, modelling and applications. In GRUBER, A.; DURHAM, A.M.; HUYNH, C.; PORTILLO, H.A. (Org.). . Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2008. p. 161-202.
- CALLONI, C. et al. Data in brief data on cell viability of human lung fibroblasts treated with polyphenols-rich extract from *Plinia*. , v. 6, p. 728–731, 2016.
- CANTÚ, M.D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. , v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.
- CASAZZA, A.P. et al. Energy transfer processes in the isolated core antenna complexes CP43 and CP47 of photosystem II. , v. 1797, n. 9, p. 1606–1616, 2010.
- CHEN, J.J.; LU, T.; CHEN, Y. Predictive biomarkers for treatment selection: statistical considerations. , v. 9, p. 1121–1135, 2015.
- CHEW, Y.L. et al. Bioactivity-guided isolation of anticancer agents from *Bauhinia kockiana* Korth. , v. 11, n. 3, p. 291–299, 2014.
- COGO, A.J., et al. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. , v. 7, n. 1, p. 37–42, 2009.
- COLLA, G; BRIGHENTE, I.M.C. Potencial tóxico dos extratos de *Eugenia catharinae*. In: 51º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA. v. 7, n. 136, 2011.
- DA SILVA, A.A. et al. Role of glutathione in tolerance to arsenite in *Salvinia molesta*, an aquatic fern. , v. 31, n. 4, p. 657–664, 2017.
- DANG, L.; VAN DAMME, E.J.M. Toxic proteins in plants. , v. 117, p. 51–64, 2015.
- DATTA, R.; SINHA, R., & CHATTOPADHYAY, S. Changes in leaf proteome profile of *Arabidopsis thaliana* in response to salicylic acid. , v. 38, p. 317–328, 2013.
- DEFAVERI, A.C.A.; ARRUDA, R.C.O.; SATO, A. Leaf anatomy and morphology of *Eugenia rotundifolia* Casar., Myrtaceae, applied to the authentication of the “abajurú” commercially sold. , v. 21, n. 3, p. 373–381, 2011.

- DIAS, L.C. et al. Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Reports*, v. 13, p. 2002–2008, 2007.
- DING, S. et al. Decreased glutathione reductase2 leads to early leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v. 58, n. 1, p. 29–47, 2016
- DOMÈNECH, J. et al. Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Plant Cell*, v. 88, n. 6, p. 583–593, 2006.
- DOMINGOS, A.H.; JÚNIOR, L.C. Plantas medicinais: patas-de-vaca. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. *Acta Horticulturae*, v. 60, 29 p., 2016.
- DONG, X.; WENG, Z. The correlation between histone modifications and gene expression. *Plant Cell*, v. 5, n. 2, p. 113–116, 2013.
- DOS SANTOS, T.M.; RIEDER, A. Plantas do gênero *Bauhinia* e suas potencialidades hipoglicemiante e antidiabética: Um estudo analítico. *Acta Horticulturae*, v. 3, n. 2, p. 35–48, 2014.
- DUARTE, M.R. et al. *Bauhinia variegata*: Diagnose morfoanatômica e análise comparativa entre exemplares de regiões climáticas distintas. *Acta Horticulturae*, v. 26, n. 6, p. 837–845, 2007.
- DUBREUIL-MAURIZI, C.; POINSSOT, B. Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Cell*, v. 7, n. 2, p. 210–212, 2012.
- DUTRA, R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Acta Horticulturae*, v. 112, p. 4–29, 2016.
- ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Anal Biochem*, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.
- ERK, M. et al. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Anal Biochem*, v. 57, n. 6, p. 1211–1218, 2002.
- FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. ATLAS. 8ª edição, 2017. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 07 ago. 2018.
- FEIST, P.; HUMMON, A. Proteomic challenges: Sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *Anal Biochem*, v. 16, n. 2, p. 3537–3563, 2015.
- FEIZ, L. et al. Ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase/oxygenase accumulation factor1 is required for holoenzyme assembly in maize. *Plant Cell*, v. 24, n. 8, p. 3435–3446, 2012.
- FERNANDES, C. F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Embrapa Rondonia. *Acta Horticulturae*, v. 133, 18 p., 2009.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 30 out. 2018
- GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Acta Horticulturae*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GÓIS, R.W.S. et al. Chemical constituents from *Bauhinia acuruana* and their cytotoxicity. *Acta Horticulturae*, v. 27, p. 711–715, 2017.

- GRENNAN, A. Metallothioneins, a diverse protein family. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 155, p. 1750–1751, 2011.
- HARDIKAR, M.R. et al. Elucidation of hypoglycemic action and toxicity studies of insulin-like protein from *Costus igneus*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 124, p. 99–107, 2016.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Glutathione in plants: Biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 23, n. 2, p. 249–268, 2017.
- HE, M. et al. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 15, n. 97, p. 1–17, 2015.
- HIRANO, H.; ISLAM, N.; KAWASAKI, H. Technical aspects of functional proteomics in plants. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 65, n. 11, p. 1487–1498, 2004.
- JOSHI, J. et al. Role of small subunit in mediating assembly of red-type form I Rubisco. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 290, n. 2, p. 1066–1074, 2015.
- KAVALALI, G. et al. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 84, p. 241–245, 2003.
- KLEFFMANN, T. et al. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 14, p. 354–362, 2004.
- KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: Um mercado promissor. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.
- KLEY, J. et al. Isolating intact chloroplasts from small *Arabidopsis* samples for proteomic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 398, n. 2, p. 198–202, 2010.
- KOONA, S. J. et al. Plant insulin: An in silico approach. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 30, n. 4, p. 191–193, 2010.
- KUMAR, S.; BHAT, K.I. Apoptosis and flowcytometric studies of *Bauhinia variegata* bark extract. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 7, n. 1, p. 45–47, 2014.
- LABUDDA, M.; MOHAMMAD, F.; AZAM, S. Glutathione-dependent responses of plants to drought: A review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 83, n. 1, p. 3–12, 2014.
- LAPAILLE, M. et al. Loss of mitochondrial ATP synthase subunit beta (Atp2) alters mitochondrial and chloroplastic function and morphology in *Chlamydomonas*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 1797, n. 8, p. 1533–1539, 2010.
- LENG, F. et al. Determinants of thermostability in serine hydroxymethyltransferase identified by principal component analysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 7, n. 46463, p. 1–10, 2017.
- LESZCZYSZYN, O.I.; IMAM, H.T.; BLINDAUER, C.A. Diversity and distribution of plant metallothioneins: A review of structure, properties and functions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 5, n. 9, p. 1146–1169, 2013.
- LI, K. et al. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 8, p. 1–12, 2010.

- LIANG, C.; PARK, A.Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay : a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 7, n. 2, p. 88–90, 1961.
- LU, M. et al. Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean. *Plant Physiology*, v. 11, n. 620, p. 1–15, 2010.
- MAGALHÃES, C.S. *151f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas*, 2008.
- MANOJ, K. et al. Screening wound-healing potential of different *Aloe vera* L. germplasms at the cellular level. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 3, n. 1, p. 2–4, 2009.
- MODDE, K. et al. High serine : glyoxylate aminotransferase activity lowers leaf daytime serine levels , inducing the phosphoserine pathway in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, v. 68, n. 3, p. 643–656, 2017.
- MOOSA, A. et al. Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi – 15 years of success. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, doi: 10.1080/07929978.2017.1288407.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.
- MUÑOZ-BERTOMEU, J. et al. Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance. *Plant Physiology*, v. 151, p. 541–558, 2009.
- NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 41, n. 2, p. 121–142, 2005.
- NEWTON, R.P. et al. Plant proteome analysis by mass spectrometry: Principles, problems, pitfalls and recent developments. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 65, p. 1449–1485, 2004.
- NOCTOR, G. et al. Glutathione in plants: An integrated overview. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 35, p. 454–484, 2012.
- NOGUEIRA, F.C.S. et al. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 26, p. 1333–1343, 2007.
- OLIVEIRA, A.S. et al. Identification of a kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 55, p. 7342–7349, 2007.
- OLIVER, M.J. et al. Phytochemistry proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, *Sporobolus stapfianus*, in response to dehydration. *Journal of Cellular Biochemistry*, 72, 1273–1284, 2011.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. *WHO Technical Report Series 1006*, 2017. 604p. ISBN 978-92-4-121015-7.

- PARTICLE SCIENCES. . 2009. Relatório Técnico. v. 8. 2p. Disponível em: <<https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/protein-structure.html>>. Acesso em: 10 ago. 2018.
- PEDRETE, T.A.; MOREIRA, J.C. Biomarkers of susceptibility for human exposure to environmental contaminants. In: HAUSER-DAVIS, R.; PARENTE, T. (Org.). . Boca Raton: CRC Press, 2018. p. 252–280. cap. 13.
- PITZ, H.S. et al. (2016). In vitro evaluation of the antioxidant activity and wound healing properties of jaticaba (*Plinia peruviana*) fruit peel hydroalcoholic extract. , v. 3, p. 1-6, 2016.
- PORTER, K.; DAY, B. From filaments to function : The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. , v. 58, n 4, p. 299–311, 2016.
- POZZOBON, A. et al. Verificação do efeito hipoglicemiante da planta medicinal *Bauhinia forficata* em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. , v. 13, n. 1, p. 69–75, 2014.
- PRANCE, G.T. Chrysobalanaceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; GIULIETTI, A.M.; KIRIZAWA, M. (Org.) . São Paulo: FAPESP: RiMa, 2003. v. 3. p. 33-44.
- QUEIROZ, J.M.G. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. , v. 9, n. 2, p. 73-159, 2015.
- ROVER-JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. , v. 24, n. 1, p. 112–119, 2001.
- SALGUEIRO, A.C.F. et al. Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. , v. 2016, p. 1–9, 2016.
- SALVATO, F.; CARVALHO, M.C.C.G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. , v. 40, n. 3, p. 727–734, 2010.
- SANTOS, K.M. et al. *Bauhinia variegata* candida fraction induces tumor cell death by activation of caspase-3, RIP, and TNF-R1 and inhibits cell migration and invasion in vitro. , v. 2018, p. 1–10, 2018.
- SHARMA, S.S.; DIETZ, K. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. , v. 57, n. 4, p. 711–726, 2006.
- SHARMA, S.S.; DIETZ, K. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. , v. 14, n. 1, p. 43–50, 2008.
- SILVA, I.M.; PEIXOTO, A.L. O abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. , v. 19, n. 1B, p. 325–332, 2009.
- SILVA, J. et al. Antifungal activity of hydroalcoholic extract of *Chrysobalanus icaco* against oral clinical isolates of candida species. , v. 9, n. 1, p.

96–100, 2017.

SILVA, R.S.; SOUZA, C.R. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*.  
 , v. 39, n. 2, p. 255–260, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). . Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p. 6.ed.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas).  
 Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2016. Disponível em: <[https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil1\\_1.pdf](https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil1_1.pdf)>. Acesso em: 06 ago. 2018.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio.  
 , v. 1, n. 1, p. 9–19, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES.  
 : 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2014-05/diretrizes-sbd-2014.pdf>>. Acesso em: 07 ago. 2018.

SOLOMON, S.; MURUGANANTHAM, N.; SENTHAMILSELVI, M.M. Anti-cancer activity of *Bauhinia tomentosa* (flowers) against human liver cancer.  
 , v. 5, n.1, p. 287–290, 2016.

SOUZA, N.M. de. Plantas hipoglicemiantes presentes na RENISUS: Uma abordagem etnofarmacológica.  
 , v. 7, p. 1–16, 2015.

STADLBAUER, V. et al. Biomolecular characterization of putative antidiabetic herbal extracts.  
 , v. 11, n. 1, p. 1–20, 2016.

STEC, B. Structural mechanism of RuBisCO activation by carbamylation of the active site lysine,  
 , v. 109, n. 46, p. 18785–18790, 2012.

STEPHAN, M.P. et al. -

Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2013. Comunicado técnico. v. 197. 4p. 2013. ISSN 0103 5231

STOCKERT, J.C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets.  
 , v. 114, n. 8, p. 785–796, 2012.

STOCKERT, J.C. et al. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives.  
 , v. 120, n. 3, p. 159–167, 2018.

TENÓRIO-DAUSSAT, C.L. et al. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses.  
 , v. 120, p. 491–497, 2014.

TERRONI, H.C. et al. Liofilização.  
 , v. 1, n. 1, p. 271-284,



2013.

VENANCIO, T.M. et al. A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea).  
 , v. 36, p. 1167-1173, 2003.

VENANCIO, V.P. et al. *Chrysobalanus icaco* L. fruits inhibit NADPH oxidase complex and protect DNA against doxorubicin-induced damage in Wistar male rats.  
 - Part A, v. 79, n. 20, p. 885–893, 2016.

VENANCIO, V.P. et al. *Cocoplum* (*Chrysobalanus icaco* L.) decreases doxorubicin-induced DNA damage and downregulates Gadd45a, Il-1 $\beta$ , and Tnf- $\alpha$  in vivo.  
 , v. 105, p. 996–1002, 2018.

VIARENGO, A. et al. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs.  
 , v. 44, n. 1, p. 69–84, 1997.

VOLPATO, G. et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do *Diabetes mellitus*.  
 , v. 4, n. 2, p. 35–45, 2002.

WHITE, P.A.S. et al. *Chrysobalanus icaco* L. leaves normalizes insulin sensitivity and blood glucose and inhibits weight gain in high-fat diet-induced obese mice.  
 , v. 19, n. 2, p. 155–160, 2016.

WILHELM-FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847).  
 , v. 244, n. 1, p. 349–357, 2005.

WIŚNIEWSKI, J.R. Filter-aided sample preparation: The versatile and efficient method for proteomic analysis.  
 , v. 585, p. 15-27, 2017.

WIŚNIEWSKI, J.R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis.  
 , v. 6, n. 5, p. 359–362, 2009.

XAVIER-FILHO, J. et al. Plant insulin or glucokinin: A conflicting issue.  
 , v. 15, n. 1, p.67-78, 2003.

XU, J. et al. Quantitative proteomic analysis of the rice (*Oryza sativa* L.) salt response.  
 , v. 10, n. 3, p. 1-19, 2015.

YABE, T. et al. The arabidopsis chloroplastic NIFU-like protein CNFU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I.  
 , v. 16, p. 993–1007, 2004.

YANG, M. et al. Characterization of a type 1 metallothionein gene from the stresses-tolerant plant *Ziziphus jujuba*.  
 , v. 16, p. 16750–16762, 2015.

ZANDI, M. et al. Optimal concentrations and synergistic effects of some herbal extracts on viability of dermal fibroblasts.  
 , v. 3, n. 4, p. 1–7, 2016.

<i>Bauhinia forficata</i> -	DTT100	1	29,45	33	17,52
		2	29,45	34	17,88
	DTT50	3	12,85	35	10,79
		4	12,87	36	8,37
	TCEP	5	8,18	37	10,28
		6	8,84	38	10,09
	BME	7	9,09	39	6,87
		8	10,39	40	7,42
<i>Bauhinia variegata</i> -	DTT100	9	28,93	41	18,69
		10	30,44	42	18,24
	DTT50	11	13,76	43	11,15
		12	15,21	44	11,03
	TCEP	13	9,54	45	8,10
		14	9,60	46	8,65
	BME	15	11,91	47	15,32
		16	11,54	48	14,13
<i>Bauhinia forficata</i> -	DTT100	17	24,96	49	19,16
		25	30,76	50	19,17
	DTT50	18	11,46	51	11,22
		26	12,46	52	11,39
	TCEP	19	7,33	53	10,06
		27	6,78	54	10,65
	BME	20	10,92	55	15,92
		28	9,68	56	11,33
<i>Bauhinia variegata</i> -	DTT100	21	28,74	57	18,89
		29	29,72	58	19,45
	DTT50	22	14,48	59	11,25
		30	15,89	60	10,65
	TCEP	23	15,35	61	9,99
		31	14,92	62	12,81
	BME	24	13,76	63	12,04
		32	14,08	64	13,72

DTT100- ditiotreitól 100 mmol L<sup>-1</sup>, DTT50- ditiotreitól 50 mmol L<sup>-1</sup>, TCEP - tris(2-carboxietil)fosfina, BME - β-mercaptoetanol. Fonte: Elaborada pelo autora.

**BAUHINIA VARIEGATA    BAUHINIA FORFICATA**

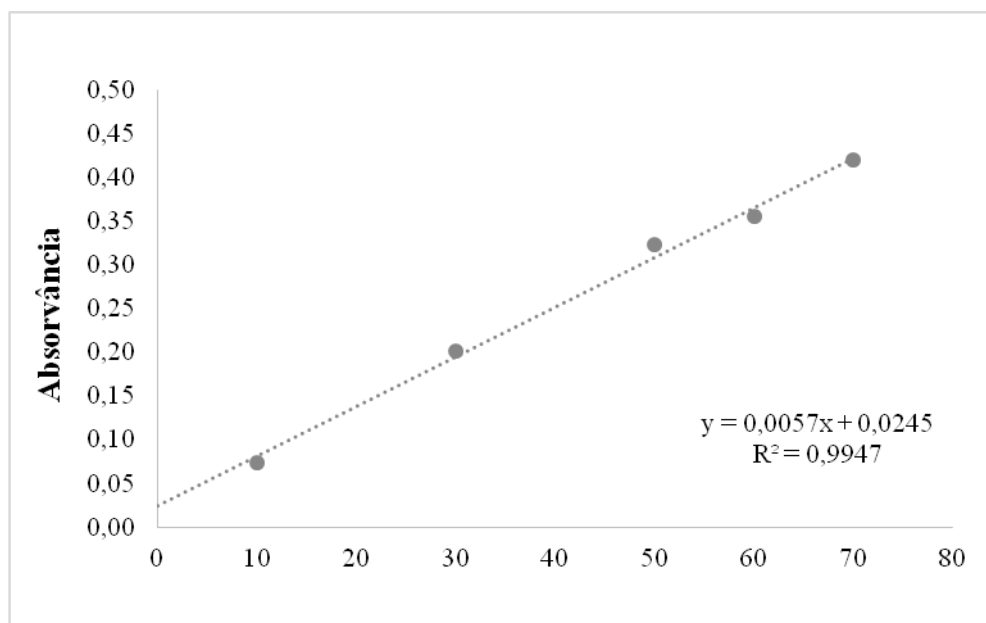
	Amostra	$\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	Mediana	Média $\pm$ DP
<b><i>Bauhinia variegata</i> - liofilizada</b>	68	34,86	34,15	34,30 $\pm$ 0,50
	69	34,15		
	70	33,89		
<b><i>Bauhinia variegata</i> - estufa</b>	71	12,90	32,15	26,02 $\pm$ 11,36
	72	32,99		
	73	32,15		
<b><i>Bauhinia forficata</i> - liofilizada</b>	74	30,35	29,68	29,51 $\pm$ 0,95
	75	29,68		
	76	28,48		
<b><i>Bauhinia forficata</i> - estufa</b>	77	34,93	34,25	33,50 $\pm$ 1,92
	78	34,25		
	79	31,31		

Valores expressos em mediana, média e desvio-padrão. Fonte: Elaborada pelo autora.

<b>Espécie Local coleta</b>	<b>Amostra</b>	<b><math>\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}</math></b>	<b>Mediana</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>
<i>Eugenia astringens</i> NI	80	30,18	34,31	33,83 $\pm$ 3,44
	81	34,31		
	82	37,01		
<i>Eugenia astringens</i> MAD	83	54,95	43,05	44,36 $\pm$ 10,00
	84	35,08		
	85	43,05		
<i>Chrysobalanus icaco</i> JBRJ	86	31,12	31,12	31,55 $\pm$ 1,97
	87	29,83		
	88	33,70		
<i>Chrysobalanus icaco</i> RMA	89	38,35	30,76	32,92 $\pm$ 4,73
	90	29,66		
	91	30,76		
<i>Chrysobalanus icaco</i> MA	92	34,25	34,25	33,12 $\pm$ 2,00
	93	30,81		
	94	34,31		
<i>Chrysobalanus icaco</i> AL	95	34,41	30,01	30,81 $\pm$ 3,27
	96	30,01		
	97	28,01		
<i>Bauhinia forficata</i> JBRJ	98	38,01	33,20	34,75 $\pm$ 2,82
	99	33,20		
	100	33,04		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG*	101	38,31	38,65	40,28 $\pm$ 3,12
	102	38,65		
	103	43,88		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG1	104	39,91	41,37	41,12 $\pm$ 1,10
	105	42,07		
	106	41,37		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG2	107	38,35	35,95	35,85 $\pm$ 2,55
	108	33,26		
	109	35,95		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG3	110	33,20	37,43	36,08 $\pm$ 2,49
	111	37,61		
	112	37,43		

NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercado de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto).

Valores expressos em mediana, média e desvio-padrão. Fonte: Elaborada pelo autora.

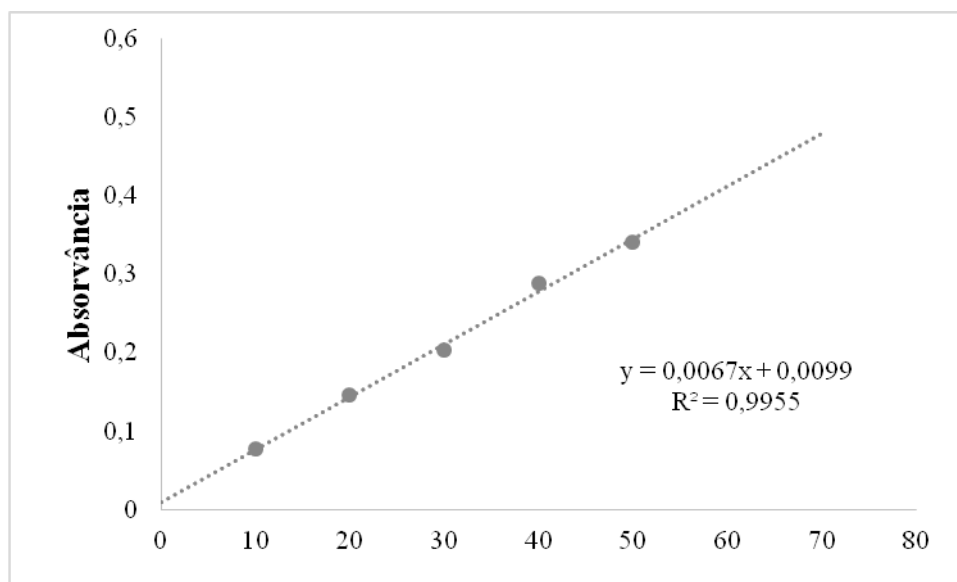


Fonte: Elaborado pela autora.

<b>Espécie Local de coleta</b>	<b>Amostra</b>	<b>µg µL<sup>-1</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>Média ± DP</b>
<i>Bauhinia variegata</i> NIT	68	0,31	0,38	0,42 ± 0,14
	69	0,38		
	70	0,58		
<i>Bauhinia forficata</i> NIT	74	0,42	0,39	0,39 ± 0,02
	75	0,38		
	76	0,39		
<i>Eugenia astringens</i> NI	80	0,39	0,44	0,43 ± 0,03
	81	0,44		
	82	0,45		
<i>Eugenia astringens</i> MAD	83	0,51	0,48	0,47 ± 0,05
	84	0,48		
	85	0,42		
<i>Chrysobalanus icaco</i> JBRJ	86	0,36	0,32	0,33 ± 0,02
	87	0,31		
	88	0,32		
<i>Chrysobalanus icaco</i> RMA	89	0,38	0,38	0,37 ± 0,05
	90	0,42		
	91	0,32		
<i>Chrysobalanus icaco</i> MA	92	0,25	0,25	0,23 ± 0,03
	93	0,25		
	94	0,20		
<i>Chrysobalanus icaco</i> AL	95	0,20	0,20	0,21 ± 0,04
	96	0,18		
	97	0,25		
<i>Bauhinia forficata</i> JBRJ	98	0,30	0,34	0,33 ± 0,03
	99	0,35		
	100	0,34		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG*	101	0,28	0,28	0,28 ± 0,05
	102	0,24		
	103	0,33		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG1	104	0,32	0,34	0,34 ± 0,03
	105	0,38		
	106	0,34		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG2	107	0,33	0,28	0,30 ± 0,03
	108	0,28		
	109	0,28		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG3	110	0,24	0,36	0,34 ± 0,09
	111	0,36		
	112	0,43		

NIT – Niterói, NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercado de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto).

Valores expressos em mediana, média e desvio-padrão. Fonte: Elaborada pelo autora.



Fonte: Elaborado pela autora.

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>2-cis peroxirredoxina</b>	BAS1	K.SGGLGLDLK.Y K.SFGVLIPDQGIALLR.G		Atividade peroxidase	Homeostase redox célula Defesa contra bactéria	Cloroplasto
<b>Acil-(proteína-transportadora-de-acil) desaturase</b>	S-ACP-DES1	R.ICGAIAADEKR.H	Carbamidometilação: 2	Atividade de proteína carreadora Ligação ao íon metálico Atividade desnaturase	Processo biossintético de ácidos graxos	Cloroplasto
<b>Actina-42</b>		-.AGFAGDDAPR.A K.VVAPPER.K		Ligação ao ATP		Citoesqueleto
<b>Actina-85C</b>	AC85C	-.AGFAGDDAPR.A		Ligação ao ATP		Citoesqueleto
<b>Adenosil-homocisteinase</b>	SAHH	R.ATDVMIAAGK.V	Oxidação: 5	Atividade adenosil-homocisteinase Ligação ao NAD	Processo metabólico Processo catabólico de S-adenosil-homocisteína	Citosol Vacúolo
<b>Álcool desidrogenase 1</b>	ADH1	R.GVMIGDGGK.S K.INPEAPLDK.V	Oxidação: 3	Atividade de álcool desidrogenase (NAD) Ligação de nucleotídeos Homodimerização de proteínas Ligação ao íon zinco	Regulação da resposta celular à hipóxia Resposta (ácido abscísico, íon cádmio, frio, estradiol, peróxido de hidrogênio, hipóxia, estresse osmótico e salino, privação de água)	Citoplasma
<b>Aldeído desidrogenase 2 Família 2, membro B4</b>	ADLH2B4	K.LAFTGSTDTGK.V		Atividade NAD Ligação ao ATP	Resposta ao íon cádmio	Mitocôndria
<b>Anidrase carbônica</b>	-	K.FMVFACSDSR.V KR.VCPSHVLDFQPGEA FVVR.N	Carbamidometilação: 6; Oxidação: 2 Carbamidometilação: 2	Catalisa interconversão de CO <sub>2</sub> e HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		-



Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Anidrase carbônica beta 1</b>	BCA1	K.YGGVGA AIEYAVLH LK.V K.VENIVVIGHSACGGI K.G	Carbamidometilação: 12	Atividade de carbonato desidratase Ligação ao íon zinco	Resposta de defesa a bactérias e fungos Regulação do complexo e movimento estomático Fotossíntese Resposta ao dióxido de carbono	Cloroplasto - estroma Membrana de plasma
<b>ATP sintase subunidade alfa</b>	ATPA	- .IVNTGTVLQVGDGIAR. I R.LIESPAPGIISR.A R.ELIIGDR.Q		Ligação ao ATP Atividade de ATP sintase transportadora de prótons, mecanismo rotacional Ligação ao íon de zinco	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons Resposta de defesa à bactéria Resposta ao frio	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana periférica
<b>ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial</b>	ATPA	R.VVSVGDGIAR.V K.APGIIR.K R.QMSLLLR.R	Oxidação: 2	Ligação ao ATP Atividade ATP sintase transportadora de prótons	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons	Mitocôndria – membrana interna
<b>ATP sintase subunidade b</b>	ATPF	K.VEIEADQFR.V		Ligação ao ATP Atividade transportadora transmembrana de prótons	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons Resposta à citocinina	Cloroplasto – membrana tilacóide proteína membrana de passagem única
<b>ATP sintase subunidade b'</b>	ATPG	R.AEISAALNK.M		Ligação ao ATP Atividade transportadora transmembrana de prótons	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem única
<b>ATP sintase subunidade beta</b>	ATPB	R.AVAMSATDGLTR.G K.ESGVINEENIAESK.V K.TVLPME LINNIAK.A K.VALVYGQMNEPPGA R.M	Oxidação: 4, 11 Oxidação: 5 Oxidação: 8	Atividade de ATP sintase transportadora de prótons, mecanismo rotacional Ligação ao íon de zinco	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons Resposta de defesa ao fungo Resposta ao frio	Cloroplasto - membrana periférica
<b>ATP sintase subunidade beta, mitocondrial</b>	ATPB	K.TVLIMELINNVAK.A R.VALTGLTVAEYFR.D		Ligação ao ATP Atividade transportadora transmembrana de prótons	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons	Mitocôndria – membrana interna

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>ATP sintase subunidade C, plastídeo</b>	ATPE	R.QPEAEGK.I		Ligação a lipídios Atividade transportadora transmembrana de prótons	Síntese e hidrólise de ATP acoplada ao transporte de prótons	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem única
<b>ATP sintase subunidade CF1 alfa</b>	ATPA	R.ADEISNIIR.E K.IVNTGTVLQVGDGIA R.I R.IAQIPVSEAYLGR.V R.INPTTSGPGVSAFE K.K		Ligação ao ATP	Processo metabólico do ATP Transporte transmembranar de prótons	Cloroplasto
<b>ATP sintase subunidade CF1 beta</b>	ATPB	R.DAVGQQINVTCEVQ QLLGNNR.V R.AVAMSATDGLM R.G R.ALQESLASELAAR.M	Carbamidometilação: 11  Oxidação: 4, 11	-	Processo metabólico do ATP Transporte transmembranar de prótons	Cloroplasto
<b>ATP sintase subunidade gama</b>	-			Atividade de ATP sintase transportadora de prótons, mecanismo rotacional	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana periférica
<b>Beta-xilosidase/alfa-L-arabinofuranosidase 1</b>	XYL1	R.ADPATGYPR.T		Atividade beta-xilosidade e arabinofuranosidase	Processo catabólico de xilano	Matriz extracelular
<b>Bomba de prótons de membrana vacuolar energizada com pirofosfato</b>	-	K.AADVGDVLVVK.V	Ligação dissulfeto	Atividade pirofosfatase Atividade difosfatase inorgânica Ligação ao íon metálico	Transporte transmembrana de próton	Vacúolo
<b>Calmodulina-2/4</b>	PCM2	K.ELGTVMR.S	N6- trimetil-lisina	Ligação ao íon cálcio	-	-
<b>Centro ferro-enxofre do fotosistema I</b>	PSAC	K.QIASAPR.T K.IYDTCIGCTQCVR.A K.IASAPR.T	Carbamidometilação: 5, 8, 11	Ligação a cluster de ferro e enxofre Atividade de transferência de elétrons Ligação a íons de metal	Fotossíntese Transporte de elétrons fotossintéticos no fotosistema I	Cloroplasto

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
Centro de reação do fotossistema I subunidade II	PSAD	K.DGVYPEKVNPGR.E K.NVSPIEVK.F		-	Fotossíntese	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana periférica estroma
Centro de reação do fotossistema I subunidade II - 2	PSAD2	K.EQCLALGTR.L K.NVSPIEVK.F	Carbamidometilação:3 Fosfotreonina	Ligação à proteína de domínio específico	Fotossíntese	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana periférica estroma
Centro de reação do fotossistema I subunidade III	PSAF	-.DISGLTPCK.E	Carbamidometilação: 8	Ligação à proteína de domínio específico	Fotossíntese	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem única lado lumenal
Centro de reação do fotossistema I subunidade N	PSAN	R.LATSGANFAR.A	N-acetilglicina	Ligação à proteína de domínio específico	Fotossíntese	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana periférica lado lumenal
Centro de reação do fotossistema I subunidade XI	PSAL	R.TAVSPLLR.G		Ligação à proteína de domínio específico	Fotossíntese	Cloroplasto - membrana de passagem múltipla
Centro de reação do fotossistema II CP43	PSBC	R.AAAAGFEK.G	N-acetilglicina Fosfotreonina Asparagina desaminada	Ligação à clorofila Transporte de elétrons Ligação aos íons metal	Transporte de elétrons fotosintéticos no fotossistema II Ligação proteína-cromóforo	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana de passagem múltipla
Centro de reação do fotossistema II CP47	PSBB	K.DIQPWQER.R R.AAAAGFEK.G K.LGDPTR.R		Ligação à clorofila Transporte de elétrons	Transporte de elétrons fotosintéticos no fotossistema II Montagem do fotossistema II Ligação proteína-cromóforo	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana de passagem múltipla

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Centro de reação do fotossistema II H</b>	PSBH	M.ATQTVEGSSR.A	N-acetilamina Fosfotreonina	Ligação ao íon fosfato	Fotossíntese Estabilização da proteína	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana de passagem única
<b>Chaperonina CPN60, mitocondrial</b>	AT3G13860	K.VLEAAVK.S		Ligação ao ATP Ligação de proteínas envolvidas no dobramento de proteínas Ligação de proteínas desdobradas	Dobramento de proteínas 'de novo' e de proteínas mediadas por chaperonas Importação de proteínas no espaço intermembranar mitocondrial Resposta ao íon cádmio	Mitocôndria
<b>Citocromo b559 subunidade alfa</b>	PSBE	M.SGSTGER.S R.QGIPLITGR.F R.FDSLEQLDEFSK.S		Ligação heme Ligação ao íon metálico	Cadeia fotossintética de transporte de elétrons	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem única
<b>Citocromo b6</b>	PETB	R.GSASVGQSTLTR.F		Transporte de elétrons Ligação heme Ligação ao íon ferro	Cadeia respiratória de transporte de elétrons	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana de passagem múltipla
<b>Citocromo f</b>	PETA	K.NIIVVGPVPGQK.Y R.GQIYPDGSK.S		Atividade de transferência de elétron Ligação ao íon ferro Ligação ao heme	Fotossíntese	Cloroplasto - membrana tilacóide
<b>Domínio DUF593 putativo</b>		K.MVELGDPR.T				
<b>Enolase</b>	PGH1	K.LTAEIGEK.V		Ligação aos íons magnésio Atividade da hidratase de fosfopiruvato	Processo glicolítico	Citoplasma
<b>Esqualeno monooxigenase</b>	SQE1	K.ISSTEIR.C		Ligação de dinucleotídeos de flavina adenina Atividade de esqualeno monooxigenase	Resposta à privação de água Processo biossintético de esterol	Membrana

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Fator de alongamento 1-alfa</b>	A1	R.IGGIGTVPVGR.-		Atividade GTPase Ligação ao GTP Atividade do fator de alongamento da tradução	-	Citoplasma
<b>Fator de transcrição de estresse térmico A-8</b>	HSFA8	K.LLLLSPSR.K		Atividade fator de transcrição de ligação ao DNA Ligação específica de sequência do DNA	Transcrição	Núcleo Citoplasma
<b>Fator de transcrição de resposta ao etileno</b>	ERF027	K.AAATAALLK.K		Atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA Ligação à sequência específica do DNA	Via de sinalização ativada por etileno Processo metabólico do glucosinolato Transcrição	Núcleo
<b>Ferredoxina</b>	FDC1	R.AGSCSSCAGK.V K.LTPEGEK.E	Carbamidometilacao: 4, 7	Ligação de cluster de ferro Atividade de transferência de elétron Ligação ao íon metal	-	Cloroplasto
<b>Ferredoxina-1</b>	FDC1	R.AGSCSSCAGK.V	Carbamidometilação: 4, 7	Ligação de cluster de ferro Atividade de transferência de elétron Ligação ao íon metal	Resposta à alta intensidade luminosa	Cloroplasto
<b>Ferredoxina-2</b>	FDC2	R.AGSCSSCAGK.V	Carbamidometilação: 4,7	Ligação de cluster de ferro Atividade de transferência de elétron Ligação ao íon metal		Cloroplasto
<b>Formato desidrogenase 1, mitocondrial</b>	FDH1	K.TVGTVGAGR.I		Atividade NAD <sup>+</sup> Ligação ao NAD Atividade oxidoredutase		Mitocôndria

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Fosfoglicerato quinase</b>	PGK1	R.LSELLGIQVVK.V K.ELDYLVGAVSNPK.R	Fosfoserina	Ligação ao ATP Atividade de fosfoglicerato quinase	Processo glicolítico Ciclo redutor de pentose-fosfato Resposta ao íon cádmio	Cloroplasto
<b>Fosfoglicomutase</b>	PGMP	R.LSGTGSEGATIR.L		Ligação aos íons magnésio Atividade da fosfoglicomutase	Processo metabólico de carboidratos Detecção de gravidade Processo catabólico de galactose, da glicose Processo biossintético de glicogênio e do amido	Cloroplasto
<b>Fosforribuloquinase</b>	PBKA	R.GVTALDPR.A	Ligação dissulfeto	Ligação ao ATP Ligação específica ao domínio desordenado Ligação enzimática Atividade fosforribuloquinase Homodimerização de proteínas	Resposta de defesa a bactéria Ciclo redutor de pentose-fosfato Resposta ao frio Resposta à citocinina	Cloroplasto
<b>Fotossistema I P700 clorofila a apoproteína A1</b>	PSAA	K.VAPATQPR.A		Ligação a cluster de ferro e enxofre Ligação à clorofila Ligação a íon metálico Atividade oxidoredutase	Fotossíntese Ligação proteína-cromóforo	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem múltipla
<b>Fotossistema I P700 clorofila a apoproteína A2</b>	PSAB	K.FSQGLAQDPTTR.R		Ligação a cluster de ferro e enxofre Ligação à clorofila Ligação a íon metálico Atividade oxidoredutase	Fotossíntese Ligação proteína-cromóforo	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem múltipla
<b>Fotossistema II fosfoproteína H, parcial (cloroplasto)</b>	PSBH	M.ATQTVEGSSR.S		Ligação ao íon fosfato	Fotossíntese Estabilização da proteína	Cloroplasto

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Fotossistema II D1</b>	PSBA	R.VINNTWADIINR.A R.ANLGMEVMHER.N R.ETTENESANEGYR.F	Oxidação: 5, 8  N-acetiltreonina Fosfotreonina	Ligação à clorofila Transporte de elétrons Ligação a íon metálico	Transporte de elétrons fotosintéticos no fotossistema II Ligação proteína-cromóforo Resposta a herbicida	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana de passagem múltipla
<b>Fotossistema II D2</b>	PSBD	R.AAEDPEFETFYTK.N	N-acetiltreonina Fosfotreonina	Ligação à clorofila Transporte de elétrons Ligação a íon metálico	Transporte de elétrons fotosintéticos no fotossistema II Ligação proteína-cromóforo Resposta a herbicida	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana de passagem múltipla
<b>Fotossistema II proteína 22 kDa</b>	PSBS	K.QNELFVGR.V K.ANELFVGR.L		Ligação à clorofila e à xantofila Ligação à proteína de domínio específico	Fotossíntese Resposta à carricina Organização da membrana do tilacóide Transporte transmembrana	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana de passagem múltipla
<b>Frutose-bifosfato aldolase</b>	ALDP	K.TIASPGR.G R.LASIGLENTEANR.Q R.EAAYYQAR.F		Atividade frutose-bifosfato-aldolase	Gliconeogênese Processo glicolítico	Cloroplasto – plastoglóbulo
<b>Frutose-bifosfato aldolase 1</b>	FBA1	R.TAAYYQQGAR.F		Atividade frutose-bifosfato-aldolase	Gliconeogênese Processo glicolítico Desenvolvimento da raiz	Citosol
<b>Frutose-bifosfato aldolase 2</b>	FBA2	R.SAAYYQQGAR.F K.TIASPGR.G	Carbamidometilação:12; Oxidação: 5	Atividade frutose-bifosfato-aldolase	Gliconeogênese Processo glicolítico Resposta ao ácido abscísico Resposta ao íon cádmio	Cloroplasto – plastoglóbulo estroma
<b>Frutose-bifosfato aldolase, isoenzima 1</b>	-	R.ALQQSTLK.T		Atividade frutose-bifosfato-aldolase	Processo glicolítico	Citoplasma
<b>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase A</b>	GAPA	K.GTMTTTHSYTGDR.L R.AAALNIVPTSTGAAK. A	Oxidação: 3	Atividade gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase Ligação ao NAD e ao NADP	Processo metabólico de glicose Ciclo de redução pentose-fosfato	Cloroplasto

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</b>	GAPA2	K.VLITAPGK.G K.GTTTHSYTGDQR.L R.AAALNIVPTSTGAAK. A	Oxidação: 3	Atividade de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (NADP <sup>+</sup> ) Ligação NAD e NADP	Processo metabólico da glicose Ciclo redutor de pentose-fosfato	Cloroplasto
<b>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 2</b>	GAPC2	R.SSIFDAK.A		Ligação ao DNA Ligação ao NAD Ligação ao íon cobre Ligação ao íon zinco	Resposta de defesa a bactéria Gliconeogênese Processo glicolítico Resposta ao íon cádmio e ao estresse oxidativo	Núcleo Citoplasma
<b>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3</b>	GAPC3	R.SSIFDAK.A		Ligação ao NAD e NADP	Processo metabólico da glicose Processo glicolítico	Citoplasma
<b>Glicerato desidrogenase, peroxisomal</b>	HPR	K.GQTVGVIGAGR.I K.EAILVNCSR.G	Carbamidometilação:7	Atividade de glicerato desidrogenase Atividade da NADP Atividade de hidroxipiruvato redutase Ligação NAD Ligação de RNA poli (U)	Resposta celular ao estímulo luminoso Resposta celular à privação de água Via oxidativa do carbono fotossintético	Peroxisomo
<b>Glutaciona S-transferase</b>	GST	K.VLDVYESR.L		Atividade transferase	Processo metabólico de aminoácidos aromáticos	Citosol
<b>Glutamina sintetase isoenzima</b>	GS2	K.AAEIFSNPK.V		Ligação ao ATP Atividade ligase glutamato-amônia	Processo biossintético da glutamina	Cloroplasto
<b>Haloácido de proteína com o domínio da enzima hidrolase tipo-desalogenase</b>	At2g33255	K.VAVCSTSNEK.A	Carbamidometilação: 4	Ligação a íon metálico Atividade fosfatase	Desfosforilação	Cloroplasto



Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Histona-lisina N-metiltransferase</b>	SUVR4	R.GAMVISPR.G		Atividade da histona-lisina N-metiltransferase Ligação ao íon zinco	Metilação de histona lisina	Núcleo Cromossomo
<b>Histona H2A-III</b>	-	K.AGLQFPVGR.I		Ligação ao DNA Atividade de proteína de heterodimerização	-	Núcleo Cromossomo
<b>Histona H2B</b>	HIS2B	R.EIQTAVR.L	N-acetil-lisina	Ligação ao DNA Atividade de heterodimerização	Condensação do cromossomo	Núcleo Cromossomo
<b>Histona H2B.3</b>	At2g28720	K.LAQEASR.L R.EIQTAVR.L		Ligação ao DNA Atividade de proteína de heterodimerização	-	Núcleo Cromossomo
<b>Histona H2B.5</b>	H2B.5	R.EIQTAVR.L R.LVLPGELAK.H		Ligação ao DNA Atividade de proteína de heterodimerização	-	Núcleo Cromossomo
<b>Histona H3.2</b>	HTR2	K.STELLIR.K		Ligação ao DNA nucleossômico Atividade de heterodimerização de proteínas	Montagem de nucleossomas	Núcleo Cromossomo
<b>Histona H3.3</b>	HTR3	K.STELLIR.K R.EIAQDFK.T		Ligação ao DNA nucleossômico Atividade de heterodimerização de proteínas	Montagem de nucleossomas	Núcleo Cromossomo
<b>Inibidor de tripsina do tipo Kunitz, cadeia alfa</b>		K.GGGLELAK.T		Atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina		

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Inibidor de tripsina do tipo Kunitz BrTI</b>		-.SVVLDTK.G		Atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina		
<b>Leucina aminopeptidase 1</b>	LAP1	K.SGVADMVNTGGR.A	Oxidação: 6	Atividade aminopeptidase Atividade dipeptidase Ligação ao íon manganês Atividade metaloexopeptidase	Resposta ao íon cádmio	Citoplasma
<b>Malato desidrogenase</b>	MDH1	R.ALGQISER.L		Atividade malato desidrogenase	Carboidrato metabólico Processo metabólico do malato e NADH Resposta ao íon cádmio, à citocinina, ao estresse salino, ao íon zinco Ciclo do ácido tricarbóxico	Citoplasma
<b>Malato desidrogenase, citoplasmático 2</b>	MDH2	R.ALGQVSER.L		Atividade malato desidrogenase	Carboidrato metabólico Processo metabólico do malato, NADH e oxaloacetato Ciclo do ácido tricarbóxico	Citoplasma
<b>Malato desidrogenase, glioxissomal</b>	MDHG	R.IQNGGTEVVEAK.A		Atividade malato desidrogenase	Ciclo do glioxilato Processo metabólico do malato Ciclo do ácido tricarbóxico	Peroxisomo - glioxissomo
<b>Malato desidrogenase de NAD</b>	PMDH1	R.IQDGGTEVVQAK.A		Atividade da L-malato desidrogenase	Ciclo de glioxilato Processo metabólico do malato Regulação da beta-oxidação de ácidos graxos Regulação da fotorrespiração Ciclo do ácido tricarbóxico	Peroxisomo

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Nucleosídeo difosfato quinase 2</b>	NDPK2	R.GDLAVQTGR.N		Ligação a íon metálico Atividade da nucleosídeo difosfato quinase	Processo biossintético CTP, GTP e UTP	Cloroplasto
<b>Pectinesterase</b>	PME1	R.TDPNQNTGIVIQK.S		Atividade da aspartilesterase, pectinesterase e metilesterase C-terminal da proteína	Modificação da parede celular Processo catabólico da pectina	Parede celular Golgi
<b>Pectinesterase/pectinesterase inibidor 3</b>	PPME3	R.TDPNQNTGIVIQK.C		Atividade da aspartilesterase, pectinesterase	Modificação da parede celular Resposta de defesa à bactéria Gram-negativa Processo catabólico da pectina Resposta ao fungo e ao nematoide	Região extracelular ou secretada – apoplasto Parede celular
<b>Peroxisomal (S) -2-hidroxiácido oxidase</b>	-	K.MAHPEGEYATAR.A K.GVITAEDAR.L	Oxidação:1 N-acetilmetionina	Ligação ao FMN Atividade ácido 2-hidróxi oxidase de cadeia média, longa e muito longa	Via oxidativa do carbono fotossintético	Peroxisomo
<b>Peroxisomal (S) -2-hidroxiácido oxidase GLO1</b>	GLO1	K.AIALTVDTPR.L K.GVITAEDAR.L		Ligação ao FMN Atividade da glicolato oxidase, da oxidase de cadeia muito longa, longa e média	Resposta de defesa a bactéria Processo biossintético de peróxido de hidrogênio Via oxidativa do carbono fotossintético Resposta à citocinina	Cloroplasto – estroma Citosol – ribossomo Região extracelular – apoplasto Núcleo Peroxisomo Plasmodesma
<b>Peroxisomal (S) -2-hidroxiácido oxidase GLO2</b>	GLO2	K.AIALTVDTPR.L R.VPVFLDGGVR.R	N-acetilmetionina	Ligação ao FMN Atividade da oxidase de cadeia muito longa, longa e média	Via oxidativa do carbono fotossintético	Cloroplasto Citosol Região extracelular Núcleo Peroxisomo

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Porina 1</b>	VDAC1	K.NITTDLK.V		Atividade porina	Defesa Resposta a bactéria	Mitocôndria - membrana externa
		K.DSTLIMQL R.-		Ligação específica ao domínio da proteína	Via de sinalização	Núcleo Citoplasma - translocada para o núcleo quando fosforilada
<b>Proteína 14-3-3</b>	GRF2					
<b>Proteína carreadora de ADP,ATP</b>	ABT	K.TAAAPIER.V R.GNTANVIR.Y		Atividade transportadora transmembrana	-	Mitocôndria - membrana interna proteína membrana de passagem múltipla
<b>Proteína de germinação 8-14</b>	GER5	K.VTFLDDAQVK.K		Ligação ao íon manganês Atividade de reserva de nutriente	-	Região extracelular ou secretada
<b>Proteína de ligação Clorofila a-b</b>	LHCA1	R.ELEVIHCR.W	Carbamidometilação: 7	Ligação à clorofila Ligação ao íon metal	Fotossíntese Ligação proteína- cromóforo	Cloroplasto - membrana tilacóide
<b>Proteína de ligação 2 Clorofila a-b</b>	LHCA2	R.ELEVIHSR.W K.NRELEVIHSR.F		Ligação à clorofila Ligação a íon metálico Ligação ao pigmento Ligação específica ao domínio da proteína	Fotossíntese, Ligação proteína-cromóforo Resposta à alta intensidade de luz Resposta a estímulos de baixa intensidade luminosa	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem única
<b>Proteína de ligação 3 Clorofila a-b</b>	LHCA3	R.ELEVIHSR.-		Ligação à clorofila Ligação a íon metálico	Fotossíntese, Ligação proteína-cromóforo	Cloroplasto - membrana tilacóide
<b>Proteína de ligação 8 Clorofila a-b</b>	CAB8	R.QLWFASK.Q K.WLAYGEVINGR.F K.QYFLGLEK.G		Ligação à clorofila Ligação a íon metálico	Fotossíntese, Ligação proteína-cromóforo	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem múltipla
<b>Proteína de ligação CP24 10A Clorofila a-b</b>	CAP10A	R.EAELIHGR.W		Ligação à clorofila Ligação ao pigmento	Fotossíntese, Ligação proteína-cromóforo Resposta a estímulos luminosos	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem múltipla

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Proteína de ligação CP29.1 Clorofila a-b</b>	LHCB4.1	K.NLAGDVIGTR.T		Ligação à clorofila Ligação a íon metálico Ligação ao pigmento Ligação específica ao domínio da proteína	Fotossíntese, Ligação proteína-cromóforo Resposta à luz azul Resposta à luz vermelha	Cloroplasto - membrana tilacóide proteína membrana de passagem múltipla
<b>Proteína de ligação ao RNA</b>	CP31B	K.VNVAEER.T		Ligação ao mRNA e ao RNA poli (U)	Resposta imune inata Processamento de mRNA Modificação de RNA	Cloroplasto
<b>Proteína de ligação ao RNA rica em glicina 3</b>	RBG3	R.NITVNEAQSR.-		Ligação ao ATP Ligação ao íon de cobre Ligação ao RNA Ligação ao DNA de fita simples	Modificação de citidina para uridina Modificação e processamento de mRNA Resposta ao frio	Mitocôndria
<b>Proteína de resposta induzida por hipersensibilidade 1</b>	HIR1	R.VQQLDR.C R.AMNEINAAAR.M	Oxidação:2	Ligação da proteína histidina quinase	-	Membrana do plasma
<b>Proteína de resposta induzida por hipersensibilidade 3</b>	HIR3	R.AMNEINAAAR.M	Oxidação:2	Resposta a oomicetos	-	Membrana do plasma
<b>Proteína não específica de transferência lipídica</b>	LTP1	K.ISPSTDCSK.V	Carbamidometilação: 7	Ligação à calmodulina Ligação lipídica	Processos biológicos Organização da parede celular Transporte lipídico	Parede celular
<b>Proteína P21</b>	HRAS	R.TGCNFDGSGR.G		Ligação à GTP Atividade GTPase	Transdução de sinal	Membrana de plasma
<b>Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 1</b>	-	R.LTYDEIQSK.T R.GSSFLDPK.G R.LSSSSSHVSR.A		Atividade em desenvolvimento de oxigênio	Montagem fotossistema II Estabilização do fotossistema II	Complexo fotossistema II

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 1-1</b>	PSBO1	R.LTYDEIQSK.T K.NAPPEFQNTK.L R.GSSFLDPK.G		Atividade envolvendo oxigênio Ligação ao RNA poli (U)	Resposta à bactéria Fotoinibição Fotossíntese Montagem e estabilização do fotossistema II Regulação da desfosforilação de proteínas	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana periférica
<b>Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 1-2</b>	PSBO2	R.LTYDEIQSK.T R.GSSFLDPK.G		Atividade envolvendo oxigênio Ligação ao RNA poli (U)	Fotoinibição Fotossíntese Montagem e estabilização do fotossistema II Regulação da desfosforilação de proteínas	Cloroplasto - membrana tilacóide membrana periférica
<b>Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 2</b>	PSBP	K.VDYLLGK.Q		Ligação ao íon cálcio	Fotossíntese	Cloroplasto - membrana tilacóide
<b>Proteína putativa de resistência LRR/receptor quinase PS4</b>		-.VVLSIPR.-				
<b>Proteína quinase PINOID 2</b>	PID2	R.SSLTAPDSR.R		Atividade quinase Atividade de proteína serina / treonina quinase	Via de sinalização Desenvolvimento de cotilédones Transdução de sinal	Núcleo Membrana do plasma
<b>Proteína R relacionada à patogênese</b>		R.TNCNFDGSGR.G	Carbamidometilação: 3		Defesa Resposta ao estímulo biótico	Vacúolo
<b>Proteína ribossomal S15</b>	RPS15A	R.VATAVAVR.R		Ligação ao RNA Constituinte estrutural do ribossomo	Montagem de subunidades pequenas ribossomais Tradução	Citoplasma
<b>Proteína ribossomal S18</b>	RPS18	R.NNNQNL.R.N		Ligação ao rRNA Constituinte do ribossomo	Translação	Cloroplasto

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Proteína ribossomal S19-3</b>	RPS19-C	R.LDQVAGR.I		Constituinte do ribossomo	Montagem de pequenas subunidades ribossomais	Citosol Vacúolo
<b>Putativo citocromo c oxidase subunidade II</b>		R.VVEALSPR.-				
<b>Repressor de transcrição, domínio AP2/ERF e B3</b>	TEM1	K.LSSPSTTTR.L		Ligação ao DNA Atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA	Via de sinalização ativada por etileno Fotoperiodismo, floração Transcrição	Núcleo
<b>Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia grande</b>	RBCL	K.DTDILAAFR.V R.AVYECLR.G R.AMHAVIDR.Q R.VALEACVQAR.N	Carbamidometilação: 5 Oxidação: 2 Carbamidometilação: 6 N-acetilprolina N6-carboxilisina Fosfoserina Fosfotreonina	Ligação de íons de magnésio Atividade de mono-oxigenase Atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase	Fotorrespiração Ciclo redutor de pentose-fosfato Resposta ao ácido abscísico Resposta ao íon cádmio	Cloroplasto
<b>Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena</b>	RBCS	K.SPGYYDR.Y		Atividade de mono-oxigenase Atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase	Fixação do carbono Fotorrespiração Fotossíntese	Cloroplasto
<b>Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena 1A</b>	RBCS-1A	R.SPGYYDGR.Y R.IGFDNVR.Q	Fosfoserina	Ligação ao íon cobre Atividade monooxigenase Atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase	Montagem de complexos de cloroplastos Fotorrespiração Fotossíntese Ciclo redutor de pentose-fosfato	Cloroplasto - membrana proteína membrana periférica estroma
<b>Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena 6</b>	RBCS-6	K.EVDYR.N R.SPGYYDGR.Y R.IIGFDNVR.Q		Atividade monooxigenase Atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase	Fotorrespiração Ciclo redutor de pentose-fosfato	Cloroplasto

Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena SSU1</b>	SSU1	K.EVDYLLR.N R.IIGFDNKR.Q		Atividade monooxigenase Atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase	Fotorrespiração Ciclo redutor de pentose-fosfato	Cloroplasto
<b>Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase ativa</b>	RCA	K.EGPPTFEQPK.I	Fosfotreonina	Ligação a ADP Ligação a ATP Atividade do reguladora de enzimas e ativadora da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase	Resposta de defesa a bactéria Senescência foliar Resposta ao frio Resposta ao ácido jasmônico Resposta à luz	Cloroplasto – plastoglobulo estroma
<b>Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase ativa B</b>	RCAB	K.NFMTLPNIK,V K.SFQCELVFAK.M K.MCCLFINDLDAGAG R.M		Ligação a ATP		Cloroplasto - estroma
<b>Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade grande</b>	RBCL			Ligação ao íon magnésio		Cloroplasto
<b>Ribulose-fosfato 3-epimerase</b>	RPE	K.SDIIVSPSILSANFSK.L		Ligação a íon metálico Atividade da fosfato de ribulose 3-epimerase	Desvio de pentose-fosfato Ciclo redutor de pentose-fosfato	Cloroplasto – membrana tilacóide
<b>RNA polimerase dirigida por DNA subunidade beta</b>	RPOB	K.KGNEIIR.S		Ligação ao DNA Atividade de RNA polimerase	Transcrição	Cloroplasto
<b>RuBisCO proteína de ligação subunidade alfa</b>	-	R.TALQSGIDK.L K.TNDSAGDGTSTASVL AR.E R.APLLIHAEDVTGEALA TLVVNK.M	Oxidação: 3 Carbamidometilação: 4  Carbamidometilação: 2, 3	Ligação à ATP	Redobramento de proteínas	Cloroplasto



Proteínas	Gene	Sequência de aminoácidos	Modificação de aminoácidos	Função molecular	Função biológica	Localização celular
<b>RuBisCO proteína de ligação - subunidade beta</b>	-	K.IVNDGVTVAK.E		Ligação à ATP	Redobramento de proteínas	Cloroplasto
<b>Serina-glioxilato aminotransferase</b>	AGT1	K.VFFDWNDYLK.F R.LAVAWGK.N	N-acetilmetionina N6-piridoxalfosfato-lisina Fosfoserina	Atividade da transaminase alanina-glioxilato, transaminase serina-glioxilato e transaminase serina-piruvato	Processo biossintético da glicina Fotorrespiração	Peroxisomo
<b>Serina hidroximetiltransferase 2, mitocondrial</b>	SHM2	K.YSEGYPGAR.Y R.MGTPALTSR.G	Oxidação: 1 N6-piridoxalfosfato-lisina	Ligação ao íon cobalto Atividade da glicina hidroximetiltransferase Ligação ao fosfato de piridoxal Ligação ao íon zinco	Processo biossintético de glicina Processo metabólico da glicina Processo metabólico de L-serina Interconversão de tetraidrofolato	Mitocôndria
<b>Succinato-semialdeído desidrogenase, mitocondrial</b>	ALDH5F1	R.AAALGAR.H	Ligação dissulfeto	Atividade de (NAD <sup>+</sup> ) e [NAD (P) <sup>+</sup> ]	Processo catabólico do ácido gama-aminobutírico Descarboxilação do glutamato Processo metabólico de espécies reativas de oxigênio Resposta à luz	Matriz mitocondrial
<b>Transcetolase</b>	TKL-1	K.FGASAPAGK.I	N-acetilalanina Fosfoserina	Ligação a íon metálico Atividade transcetolase	Ciclo redutor de pentose-fosfato Resposta ao íon cádmio e ao estresse salino	Cloroplasto - estroma
<b>Ubiquitina ligase E3</b>	ATL4	R.SLAADVGSGR.N		Ligação a íon metálico Atividade da proteína ligase ubiquitina Atividade ubiquitina-transferase	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina mediada por proteassoma Ubiquitinação	Proteína membrana de passagem única

Fonte: Elaborado pela autora.

	Nº amostras	Amostras	Espécies
<b>Fotossistema II fosfoproteína H</b>	1	68	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT)
<b>Ribulose-bisfosfato carboxilase de cadeia grande</b>	32	_68_69_70_74_75_76_83_86_87_88_89_90_91_92_93_94_96_97_98_99_100_102_103_104_105_106_107_108_109_110_111_112	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA, MA, AL, PG*, PG1, PG2 e PG3)
<b>Proteína de ligação 2 clorofila a-b</b>	7	_68_69_70_74_75_76_87	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ)
<b>Centro de reação do fotossistema II H</b>	5	_68_69_70_75_76	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT)
<b>Histona H2B</b>	6	_68_69_75_76_99_100	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA, MA, AL, PG*, PG1, PG2 e PG3)
<b>Ferredoxina-1</b>	4	_68_88_89_101	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA e PG*)
<b>Ferredoxina</b>	8	_68_89_92_93_101_108_109_110	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA, MA, PG*, PG2 e PG3)
<b>Fator de transcrição de estresse térmico A-8</b>	1	_69	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT)
<b>Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena 1A</b>	15	_69_70_74_75_76_88_92_93_100_102_104_107_108_110_111	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA, PG*, PG1, PG2 e PG3)
<b>Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena</b>	8	_69_75_87_94_96_106_108_109	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA, AL, PG1 e PG2)
<b>Frutose-bifosfato aldolase 2</b>	5	_69_76_87_100_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ e PG2)
<b>Centro de reação do fotossistema II CP43</b>	21	_69_70_75_76_87_88_90_92_93_94_96_99_100_102_104_106_107_108_109_110_111	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA, MA, AL, PG*, PG1, PG2 e PG3)
<b>Fotossistema II D1</b>	7	_70_87_88_90_91_93_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA, MA e PG2)
<b>Centro de reação do fotossistema II CP47</b>	10	_70_87_88_92_93_96_100_102_108_109	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA, MA, AL, PG*, PG1, PG2 e PG3)
<b>ATP sintase subunidade beta</b>	19	_68_69_70_74_75_76_86_87_88_92_93_94_96_98_99_100_102_107_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA, AL, PG* e PG2)
<b>Actina-85C</b>	12	_69_70_74_75_76_99_102_104_106_109_111_112	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG*, PG1, PG2 e PG3)

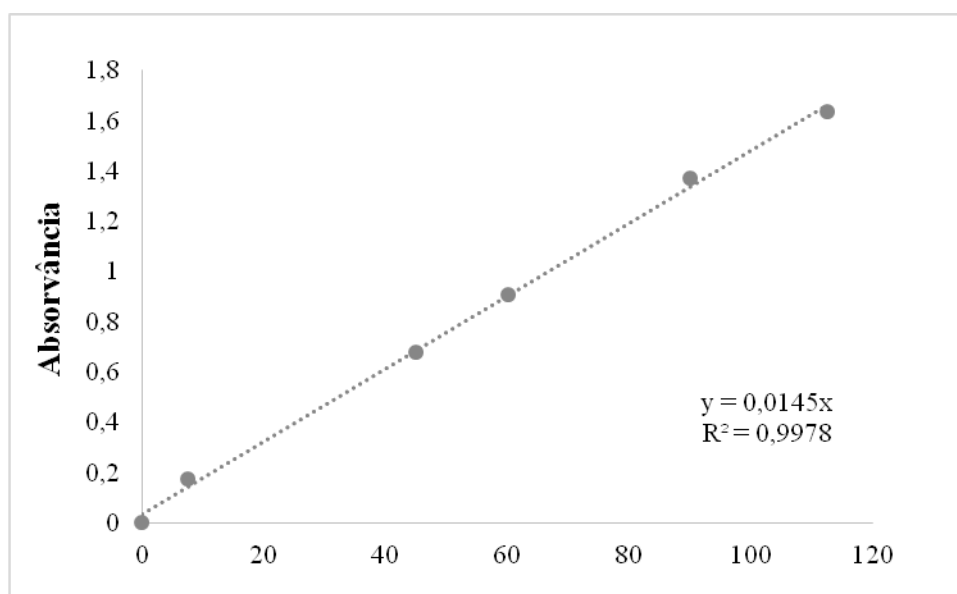
Proteínas	Nº amostras	Amostras	Espécies
Citocromo f Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3 Histona H2B.5 Peroxisomal (S) -2-hidroxiácido oxidase GLO2 Proteína de ligação 8 clorofila a-b Ribulose-fosfato 3-epimerase Transcetolase	1	_70	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT)
Frutose-bifosfato aldolase 1	2	_70_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Frutose-bifosfato aldolase 1	2	_70_110	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG3)
ATP sintase subunidade alfa	11	_70_74_76_87_88_92_93_99_107_108_109	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA e PG2)
Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase ativa	10	_70_74_76_87_98_99_102_108_110_111	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG*, PG2 e PG3)
Centro de reação do fotossistema I subunidade II - 2 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 2	3	_70_74_98	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ)
Centro ferro-enzofre do fotossistema I	13	_70_75_76_87_92_93_99_100_102_88_90_91_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA, MA, PG*e PG2)
Centro de reação do fotossistema I subunidade XI	3	_70_76_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Citocromo b559 subunidade alfa	4	_70_76_87_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ e PG2)
Centro de reação do fotossistema I subunidade N Frutose-bifosfato aldolase	5	_70_75_76_87_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ e PG2)
Proteína de resposta induzida por hipersensibilidade 3	5	_70_88_102_107_109	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, PG* e PG2)
Fotossistema II D2	3	_70_93_108	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (MA e PG2)
Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 1-1 Histona H2B.3 Proteína de ligação 3 clorofila a-b	4	_70_98_99_100	<i>Bauhinia variegata</i> (NIT) <i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ)
Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 1-2 Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 2	1	_74	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT)
Histona H3.3	3	_74_98_100	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ)

Proteínas	Nº amostras	Amostras	Espécies
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	3	_74_98_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Fotossistema I P700 clorofila a apoproteína A2	6	_76_86_87_93_100_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA e PG2)
Proteína potenciadora de evolução de oxigênio 1	2	_74_95	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (AL)
Fotossistema II proteína 22 kDa	6	_74_87_92_93_99_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA e PG2)
Proteína ribossomal S19-3	1	_75	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT)
Malato desidrogenase, glioxissomal	2	_75_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Proteína de ligação ao RNA rica em glicina 3	5	_74_75_98_99_100	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ)
Fator de alongamento 1-alfa			
Glutamina sintetase	1	_76	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT)
Histona H2A- III			
Malato desidrogenase			
Proteína ribossomal S18			
ATP sintase subunidade gama	2	_76_87	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ)
Proteína putativa de resistência LRR/ receptor quinase PS4	3	_76_85_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Eugenia astringens</i> (MAD) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Fotossistema I P700 clorofila a apoproteína A1	6	_76_86_87_93_100_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA e PG2)
Proteína não específica de transferência lipídica	11	_76_87_90_92_93_96_100_102_109_110_111	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, RMA, MA, AL, PG*, PG2 e PG3)
Centro de reação do fotossistema I subunidade III	7	_76_87_92_93_102_108_109	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA, PG* e PG2)
Proteína de resposta induzida por hipersensibilidade 1	6	_76_87_92_93_96_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA, AL e PG2)
Proteína carreadora de ADP, ATP	9	_76_87_92_93_99_102_108_110_111	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT e JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA, PG*, PG2 e PG3)
ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase A	4	_76_87_93_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA e PG2)
Fosforribuloquinase	2	_76_108	<i>Bauhinia forficata</i> (NIT) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Putativo citocromo c oxidase subunidade II	1	_81	<i>Eugenia astringens</i> (NI)
Fator de transcrição de resposta ao etileno			
Histona-lisina N-metiltransferase	1	_82	<i>Eugenia astringens</i> (NI)
Proteína ribossomal S15			

Proteínas	Nº amostras	Amostras	Espécies
Acil-(proteína-transportadora-de-acil) desaturase	1	_83	<i>Eugenia astringens</i> (MAD)
Domínio DUF593 putativo	1	_84	<i>Eugenia astringens</i> (MAD)
Ubiquitina ligase E3	1	_85	<i>Eugenia astringens</i> (MAD)
Porina 1			
Proteína de ligação CP29.1 clorofila a-b	1	_87	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ)
Fosfoglicerato quinase	2	_87_108	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ e PG2)
Leucina aminopeptidase 1			
Serina hidroximetiltransferase 2, mitocondrial	3	_87_108_110	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, PG2 e PG3)
Malato desidrogenase, citoplasmático 2	4	_87_108_110_111	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, PG2 e PG3)
RuBisCO proteína de ligação - subunidade beta	8	_87_88_98_100_102_107_108_109	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, PG2 e PG3)
Peroxisomal (S) -2-hidroxiácido oxidase	7	_87_92_93_94_107_108_109	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ, MA e PG2)
ATP sintase subunidade CF1 alfa	1	_88	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ)
ATP sintase subunidade CF1 beta			
Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade grande	2	_88_91	<i>Chrysobalanus icaco</i> (JBRJ e RMA)
Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena SSU1	1	_89	<i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA)
Repressor de transcrição, domínio AP2/ERF e B3 Ferredoxina 2	2	_89_101	<i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA e PG*)
RNA polimerase dirigida por DNA subunidade beta	6	_91_100_103_106_109_112	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA, PG*, PG1, PG2 e PG3)
Malato desidrogenase de NAD	2	_91_101	<i>Chrysobalanus icaco</i> (RMA e PG*)
ATP sintase subunidade C, plastídeo	1	_92	<i>Chrysobalanus icaco</i> (MA)
Proteína de ligação CP24 10A clorofila a-b			
ATP sintase subunidade b' Proteína de ligação clorofila a-b	2	_92_108	<i>Chrysobalanus icaco</i> (MA e PG2)
Proteína de germinação 8-14	2	_93_108	<i>Chrysobalanus icaco</i> (MA e PG2)
Glutationa S-transferase	2	_93_110	<i>Chrysobalanus icaco</i> (MA e PG3)
Histona H3.2	1	_98	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ)
Pectinesterase			
Pectinesterase/ inibidor 3			
Centro de reação do fotosistema I subunidade II	2	_98_99	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ)
Beta-xilosidase/alfa-L-arabinofuranosidase 1	1	_99	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ)
Ribulose bisfosfato carboxilase de cadeia pequena 6			

Proteínas	Nº amostras	Amostras	Espécies
ProteínaP21	2	_99_100	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ)
Inibidor de tripsina do tipo Kunitz, cadeia alfa			
Inibidor de tripsina do tipo Kunitz BrTI	1	_100	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ)
Proteína de ligação ao RNA			
2-cis peroxirredoxina	2	_100_108	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Actina-42	3	_100_108_110	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2 e PG3)
Adenosilhomocisteinase	2	_100_110	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG3)
Calmodulina-2/4	2	_100_111	<i>Bauhinia forficata</i> (JBRJ) <i>Chrysobalanus icaco</i> (PG3)
Proteína quinase PINOID 2	1	_102	<i>Chrysobalanus icaco</i> (PG*)
Chaperonina CPN60, mitocondrial	2	_107_110	<i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2 e PG3)
Aldeído desidrogenase			
Anidrase carbônica			
Anidrase carbônica beta 1			
ATP sintase subunidade b			
ATP sintase subunidade beta, mitocondrial / Bomba de prótons de membrana vacuolar energizada com pirofosfato/Citocromo b6			
Esqualeno monooxigenase			
Formato desidrogenase 1, mitocondrial /Glicerato desidrogenase	1	_108	<i>Chrysobalanus icaco</i> (PG2)
Haloácido de proteína			
Nucleosídeo difosfato quinase 2 /Peroxisomal (S) -2-hidroxiácido oxidase			
Proteína 14-3-3/ Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase ativa B			
RuBisCO proteína de ligação - alfa/Serina-glioxilato aminotransferase			
Álcool desidrogenase 1			
Enolase			
Fosfoglicomutase			
Frutose-bifosfato aldolase, isoenzima 1	1	_110	<i>Chrysobalanus icaco</i> (PG3)
Succinato-semialdeído desidrogenase, mitocondrial			
Proteína R relacionada à patogênese	3	_110_111_112	<i>Chrysobalanus icaco</i> (PG3)

NIT – Niterói, NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercadão de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto). Fonte: Elaborado pela autora



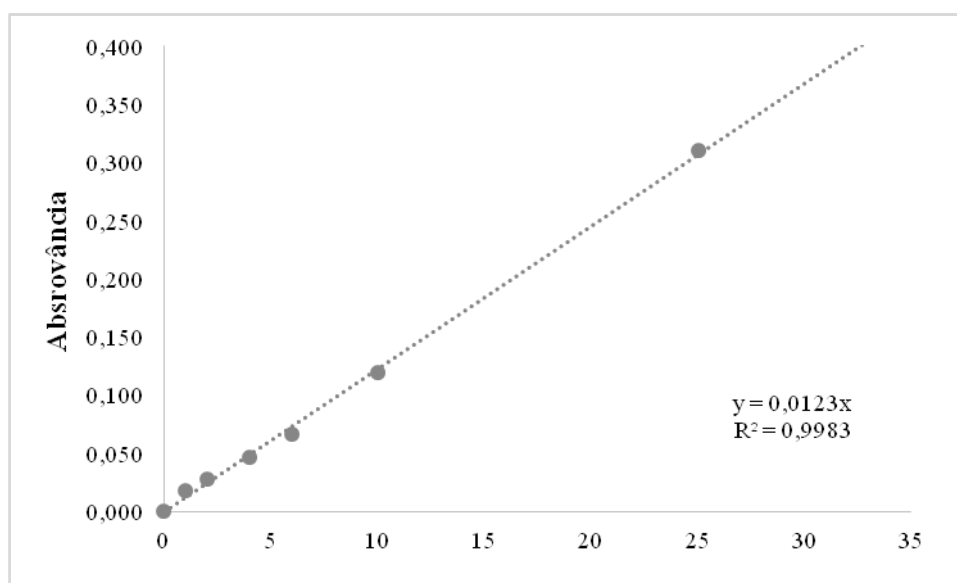
Fonte: Elaborado pela autora.

<b>Espécie Local de coleta</b>	<b>Amostra</b>	<b>µmol g<sup>-1</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>Média ± DP</b>
<i>Bauhinia variegata</i> NIT	68	4,89	3,47	3,79 ± 0,98
	69	3,47		
	70	3,00		
<i>Bauhinia forficata</i> NIT	74	1,20	5,51	4,10 ± 2,51
	75	5,59		
	76	5,51		
<i>Eugenia astringens</i> NI	80	1,55	1,55	1,53 ± 0,06
	81	1,47		
	82	1,58		
<i>Eugenia astringens</i> MAD	83	2,03	2,28	2,21 ± 0,16
	84	2,28		
	85	2,32		
<i>Chrysobalanus icaco</i> JBRJ	86	2,77	2,27	2,39 ± 0,34
	87	2,27		
	88	2,12		
<i>Chrysobalanus icaco</i> RMA	89	6,00	4,69	4,94 ± 0,96
	90	4,69		
	91	4,12		
<i>Chrysobalanus icaco</i> MA	92	1,32	1,49	1,52 ± 0,21
	93	1,49		
	94	1,74		
<i>Chrysobalanus icaco</i> AL	95	1,26	1,26	1,23 ± 0,12
	96	1,10		
	97	1,32		
<i>Bauhinia forficata</i> JBRJ	98	4,07	4,07	2,89 ± 2,09
	99	4,11		
	100	0,48		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG*	101	7,86	6,94	7,18 ± 0,60
	102	6,94		
	103	6,74		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG <sup>1</sup>	104	6,52	7,90	7,50 ± 0,85
	105	7,90		
	106	8,08		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG <sup>2</sup>	107	8,09	7,34	6,00 ± 2,99
	108	7,34		
	109	2,57		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG <sup>3</sup>	110	1,77	2,07	2,03 ± 0,25
	111	2,26		
	112	2,07		

NIT – Niterói, NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercadão de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto).

Valores expressos em mediana, média e desvio-padrão. Fonte: Elaborada pelo autora.



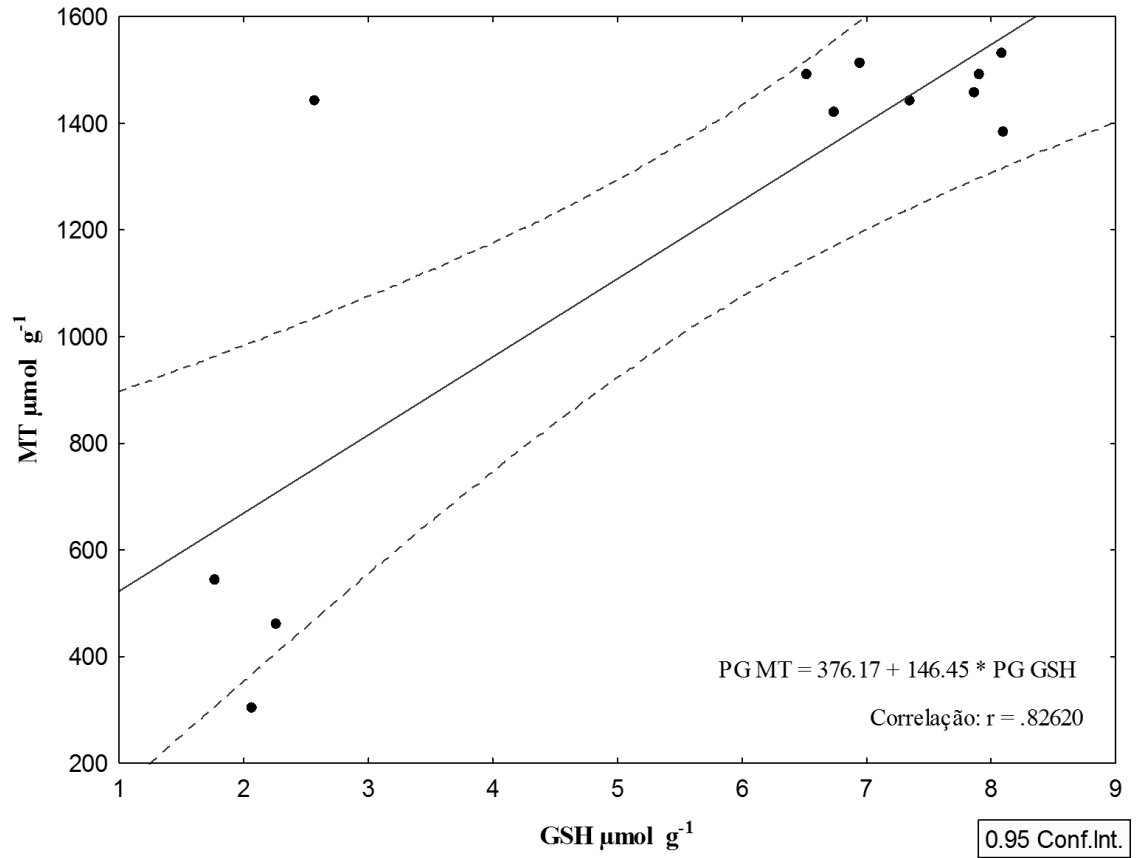


Fonte: Elaborado pela autora.

<b>Espécie Local de coleta</b>	<b>Amostra</b>	<b>μmol g<sup>-1</sup></b>	<b>Mediana</b>	<b>Média ± DP</b>
<i>Bauhinia variegata</i> NIT	68	536,42	693,11	650,26 ± 99,59
	69	721,25		
	70	693,11		
<i>Bauhinia forficata</i> NIT	74	453,87	543,26	517,92 ± 55,87
	75	543,26		
	76	556,64		
<i>Eugenia astringens</i> NI	80	718,14	660,61	608,21 ± 143,49
	81	445,89		
	82	660,61		
<i>Eugenia astringens</i> MAD	83	606,87	968,93	853,86 ± 214,07
	84	985,77		
	85	968,93		
<i>Chrysobalanus icaco</i> JBRJ	86	591,58	508,89	483,49 ± 122,78
	87	508,89		
	88	350,00		
<i>Chrysobalanus icaco</i> RMA	89	810,00	990,29	940,32 ± 113,88
	90	990,29		
	91	1020,67		
<i>Chrysobalanus icaco</i> MA	92	839,11	176,82	393,60 ± 385,87
	93	176,82		
	94	164,86		
<i>Chrysobalanus icaco</i> AL	95	154,41	152,26	152,26 ± 3,05
	96	150,10		
	97	-		
<i>Bauhinia forficata</i> JBRJ	98	472,17	472,17	475,01 ± 11,98
	99	488,17		
	100	464,71		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG*	101	1459,16	1459,16	1464,30 ± 45,84
	102	1512,50		
	103	1421,23		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG <sup>1</sup>	104	1492,57	1492,57	1505,59 ± 23,31
	105	1491,70		
	106	1532,50		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG <sup>2</sup>	107	1384,62	1443,45	1424,10 ± 34,19
	108	1443,45		
	109	1444,22		
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG <sup>3</sup>	110	545,06	461,96	436,91 ± 122,61
	111	461,96		
	112	303,71		

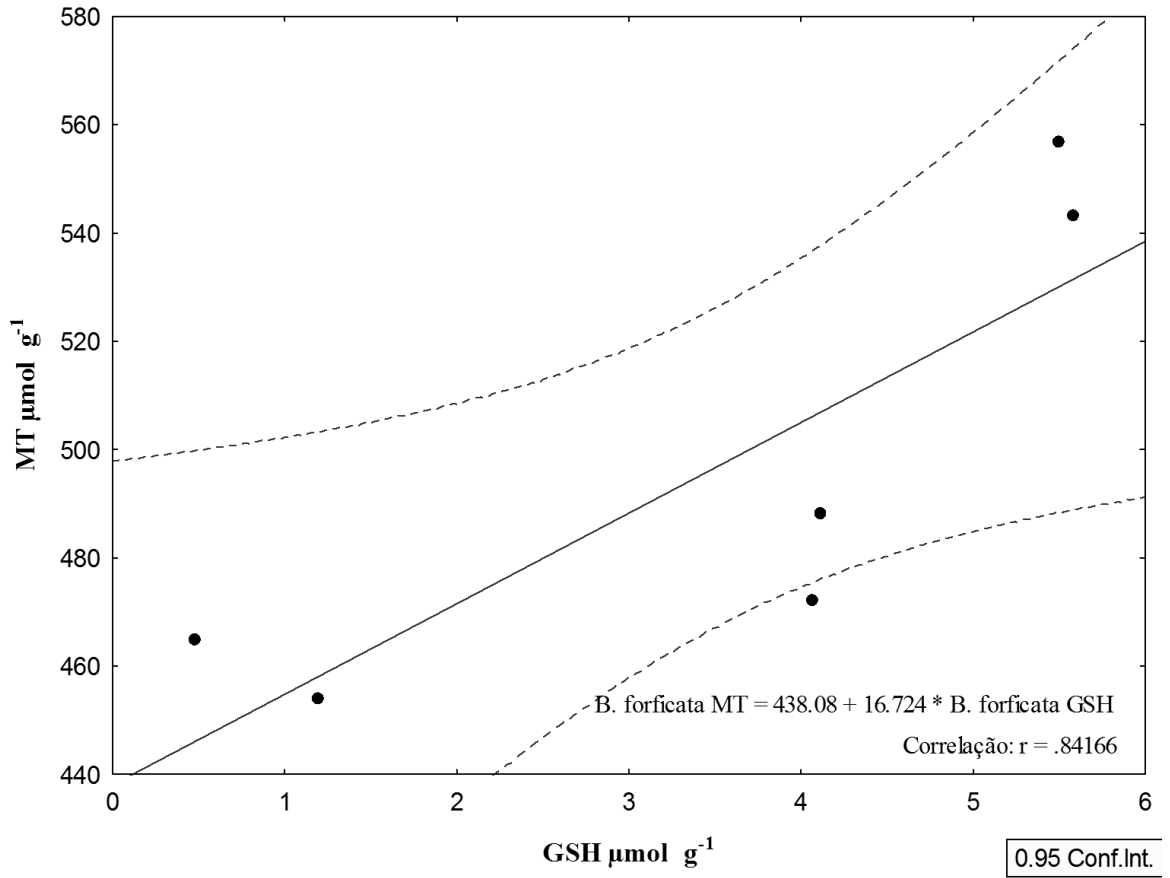
NIT – Niterói, NI – Horto de Nova Iguaçu, MAD – Mercadão de Madureira, JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RMA – Restinga de Massambaba, MA – Maceió, AL – Marechal Deodoro, PG – Praia Grande (PG\* - ramo; PG1 - folhas jovens; PG2 - folhas adultas; PG3 - fruto).

Valores expressos em mediana, média e desvio-padrão. Fonte: Elaborada pelo autora.

*CHRYSOBALANUS ICACO*

Fonte: Elaborado pela autora

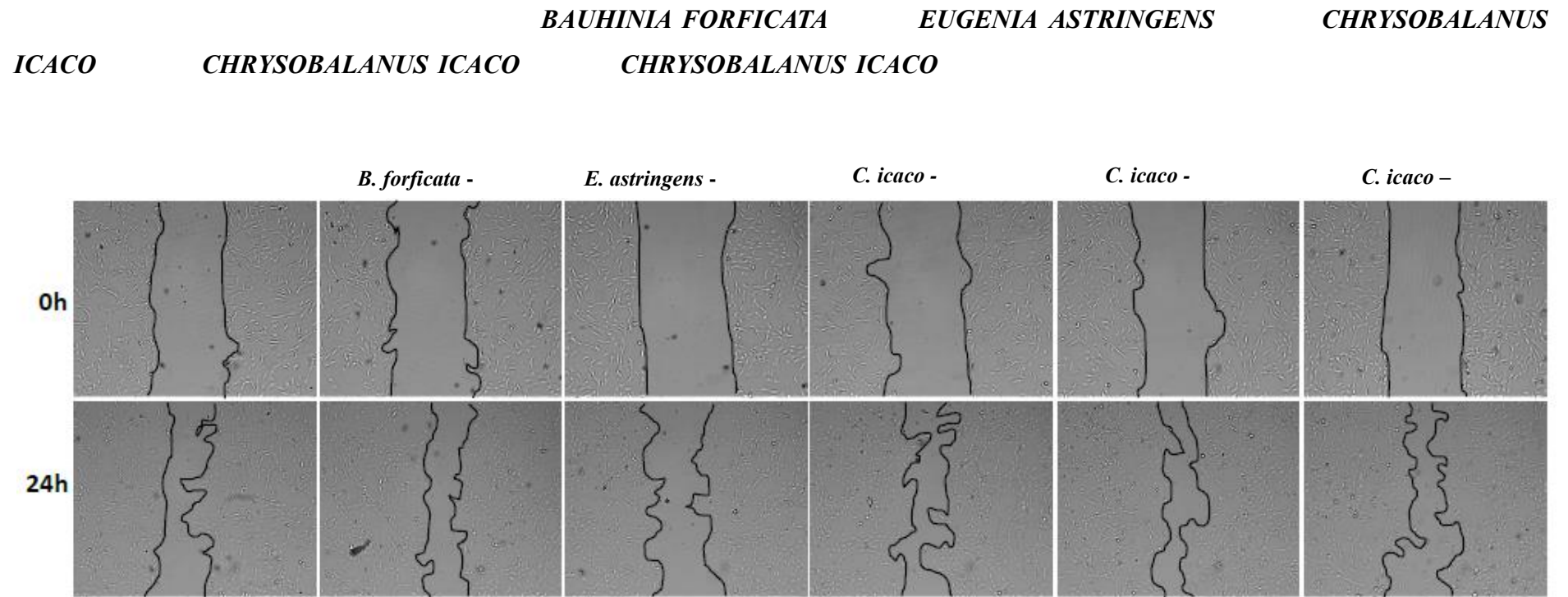
**BAUHINIA FORFICATA.**



Fonte: Elaborado pela autora

Amostra	Grupo	Células viáveis (%)			
		Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4
<i>Bauhinia forficata</i> NIT - 74		<b>Poço 1</b>	<b>Poço 2</b>	<b>Poço 3</b>	<b>Poço 4</b>
	1	102,54	106,52	100,25	114,15
	5	114,74	110,34	113,30	114,58
	10	86,10	83,56	88,47	88,05
	20	76,52	87,97	81,36	82,97
<i>Eugenia astringens</i> MAD - 83		<b>Poço 1</b>	<b>Poço 2</b>	<b>Poço 3</b>	<b>Poço 4</b>
	1	91,61	91,86	90,25	95,08
	5	94,49	74,15	82,03	76,86
	10	76,36	75,08	80,17	76,44
	20	80,33	82,80	83,39	85,76
<i>Chrysobalanus icaco</i> RMA - 89		<b>Poço 1</b>	<b>Poço 2</b>	<b>Poço 3</b>	<b>Poço 4</b>
	1	78,39	90,00	85,00	104,49
	5	89,49	75,42	88,98	88,56
	10	88,30	83,30	90,42	96,86
	20	78,22	77,11	79,15	76,27
<i>Chrysobalanus icaco</i> AL - 95		<b>Poço 1</b>	<b>Poço 2</b>	<b>Poço 3</b>	<b>Poço 4</b>
	1	95,93	76,86	93,30	80,68
	5	88,98	93,81	84,83	93,64
	10	88,13	81,95	86,86	84,15
	20	84,24	80,34	83,47	91,86
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG* - 101		<b>Poço 1</b>	<b>Poço 2</b>	<b>Poço 3</b>	<b>Poço 4</b>
	1	90,76	95,08	97,54	94,66
	5	85,17	74,32	86,95	96,10
	10	85,42	83,39	87,03	94,83
	20	92,03	91,95	82,80	82,46

NIT – Niterói, MAD – Mercado de Madureira, RMA – Restinga de Massambaba, AL – Marechal Deodoro, PG\* - Praia Grande - ramo. Controle – N=3, para cada concentração: 100% células viáveis. Fonte: Elaborado pela autora.



NIT – Niterói, MAD – Mercado de Madureira, RMA – Restinga de Massambaba, AL – Marechal Deodoro, PG\* - Praia Grande - ramo. Fonte: Elaborado pela autora.

Amostras	Migração (%)					
	Poço 1		Poço 2		Poço 3	
	0h	24 h	0h	24 h	0h	24 h
<i>Bauhinia forficata</i> NIT - 74	61,23	49,11	61,46	48,78	51,93	46,37
<i>Eugenia astringens</i> MAD - 83	46,39	47,10	47,25	53,40	57,13	53,75
<i>Chrysobalanus icaco</i> RMA - 89	30,03	35,61	54,09	47,36	30,55	38,67
<i>Chrysobalanus icaco</i> AL - 95	49,33	34,36	47,02	44,77	56,66	43,81
<i>Chrysobalanus icaco</i> PG* - 101	52,56	60,00	47,72	46,48	59,84	55,88

NIT – Niterói, MAD – Mercadão de Madureira, RMA – Restinga de Massambaba, AL – Marechal Deodoro, PG\* - Praia Grande - ramo. Fonte: Elaborado pela autora.