

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Gustavo Duarte Bocayuva Tavares

Detecção, purificação parcial, caracterização e mutagenicidade de extrato de proteínas bioativas
de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)

Rio de Janeiro

2019

Gustavo Duarte Bocayuva Tavares

Detecção, purificação parcial, caracterização e mutagenicidade de extrato de proteínas bioativas de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia.

Orientador: Cláudia Alessandra Fortes Aiub

Coorientador: César Luis Siqueira Júnior

Rio de Janeiro

2019

B231 Bocayuva, Gustavo Duarte Tavares
Detecção, purificação parcial, caracterização e mutagenicidade de extrato de proteínas bioativas de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) / Gustavo Duarte Tavares Bocayuva. -- Rio de Janeiro, 2019.

63

Orientadora: Claudia Alessandra Fortes Aiub.
Coorientador: César Luis Siqueira Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019.

1. saboeiro. 2. proteínas bioativas. 3. mutagênese. I. Fortes Aiub, Claudia Alessandra, orient. II. Siqueira Júnior, César Luis, coorient. III. Título.

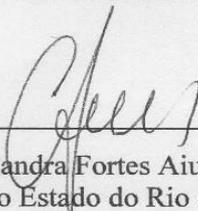
Gustavo Duarte Bocayuva Tavares

**DETECÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL, CARACTERIZAÇÃO E
MUTAGENICIDADE DE EXTRATO DE PROTEÍNAS BIOATIVAS DE
SEMENTES DE *SAPINDUS SAPONARIA* L. (SAPINDACEAE)**

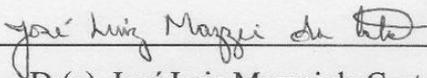
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2019.

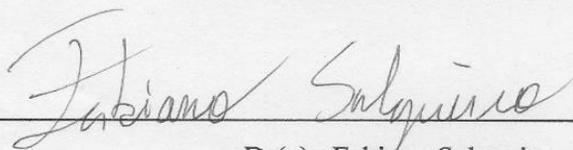
Banca Examinadora



Dr(a). Claudia Alessandra Fortes Aiub (Orientadora)
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)



Dr(a). José Luiz Mazzei da Costa
(Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)



Dr(a). Fabiano Salgueiro
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)

Nesta vida não realizamos nada sozinhos, portanto dedico esta dissertação a todas as pessoas que estiveram comigo ao longo desta jornada. Em especial para as pessoas que sei que gostariam de compartilhar este momento comigo: meus avós (*in memoriam*).

"Good Morning!" said Bilbo, and he meant it. The sun was shining, and the grass was very green. But Gandalf looked at him from under long bushy eyebrows that stuck out further than the brim of his shady hat.

"What do you mean?" he said. "Do you wish me a good morning, or mean that it is a good morning whether I want it or not; or that you feel good this morning; or that it is a morning to be good on?"

"All of them at once." said Bilbo.

The Hobbit – J.R.R. Tolkien

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Jaciara e Fernando, e irmão, Hugo, pelo apoio incondicional e amor dado ao longo de toda a minha jornada acadêmica. Não existem palavras que descrevam o sentimento que sinto e a gratidão de ter pessoas como vocês ao meu lado. Repito: não existem palavras.

Agradeço à minha melhor amiga, namorada e amor da minha vida, Ana Carolina, por igualmente me apoiar incondicionalmente e me colocar pra cima nos momentos mais difíceis dessa jornada. Nós somos um time, um time de duas pessoas, juntos nós podemos tudo.

Agradeço aos meus tios Ninil e Maria por estarem me apoiando, torcendo por mim e apostando firme no meu sucesso. Obrigado por estarem me acompanhando a cada passo que dei ao longo da minha vida acadêmica.

Agradeço aos meus orientadores: professora Dra. Cláudia Aiub e professor Dr. César Luis Siqueira que acreditaram no meu potencial e apostaram em mim. Obrigado pela dedicação em minha orientação. Mesmo quando estavam atolados de assuntos para resolver me atenderam prontamente e me apoiaram nos momentos mais complicados deste processo.

Agradeço a professora Dra. Andreia da Silva, professor Dr. Carlos Fernando Oliveira e ao professor Dr. Israel Felzenszwalb pela instrução fornecida em determinados experimentos e pela recepção em seu laboratório.

Agradeço aos meus amigos “Chicleteiro”, “Lucas de Astera”, “Bemastro do Youtube”, “Duduxo”, “Zeratul”, “Salsi”, “Thiti”, “Vitin” e “Hector” por me ouvirem reclamar e ao mesmo tempo festejar nos mais diversos momentos.

Agradeço ao grupo com quem tive o prazer de trabalhar ao longo desses 4 anos (graduação e mestrado): Márcio, Renato, Camilla e Stephane.

Agradeço aos meus queridos sogros, Jorge e Adriana, por me tratarem como um filho sempre que estive com eles.

Agradeço a minha professora do ensino fundamental, Mônica, pelas conversas, pelo incentivo e pelo exemplo profissional da educação.

Agradeço a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) pela qualidade dos profissionais que nela atuam, por me preparar profissionalmente e pela infraestrutura fornecida que possibilitou a realização deste estudo. Especialmente ao Laboratório de Bioquímica e Função de Proteínas Vegetais e ao Laboratório de Genotoxicidade.

Agradeço a Pro-Reitoria de Extensão e Cultura, por ter sido contemplado em uma seleção com uma bolsa de pesquisador extensionista de pós-graduação no projeto RAPATRA.

Agradeço a CAPES e ao PPGGIO por ter sido contemplado no início de 2017 com uma bolsa de pós-graduação.

Agradeço aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Fabiano Salgueir, Prof. Dr. José Luiz Mazzei, Profa. Dra. Adriana Salgueiro e Profa. Dra. Joelma de Mesquita pela disponibilidade e pelo aceite do convite para participar de minha avaliação.

RESUMO

Sapindus saponaria L., conhecida como saboeiro, é uma planta nativa dos Neotrópicos, com ampla distribuição no Brasil, possuindo diversos usos tradicionais, mas ainda carece de estudos que comprovem o envolvimento de proteínas e seus efeitos. Nesse sentido, o presente estudo buscou detectar, purificar parcialmente, caracterizar, e avaliar a mutagênicidade do extrato bruto de proteínas presentes nas sementes de saboeiro. Através da extração em meio aquoso, precipitação por sulfato de amônio e cromatografia por gel filtração, foram purificados parcialmente, um inibidor de proteases cisteínicas e uma protease serínica. O inibidor detectado, com peso molecular entre 32 e 33kDa, apresentou significativa atividade específica de inibição contra a papaína, inibindo 75% de sua atividade. Já a protease, de aproximadamente 40kDa, apresentou maior atividade proteolítica contra substrato específico para proteases serínicas, assim como teve sua atividade inibida somente por inibidor de protease serínica. A fim de avaliar o potencial mutagênico e citotóxico do extrato bruto das sementes, quatro concentrações diferentes foram avaliadas pelo ensaio de Sobrevivência e Teste de Ames, utilizando cinco cepas diferentes de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, com a finalidade de avaliar diferentes mecanismos de mutagênese. Por sua vez, as análises de mutagenicidade e citotoxicidade indicaram que nenhuma das concentrações do extrato bruto testadas induzem respostas mutagênicas ou citotóxicas para as cepas utilizadas, na ausência de metabolização exógena. Dessa forma, as sementes de saboeiro produzem, de forma constitutiva, um inibidor de protease cisteínica e uma protease serínica, indicando que a detecção de novas moléculas bioativas é uma demonstração do potencial biotecnológico do vegetal a ser estudado.

Palavras-chave: saboeiro; proteínas bioativas; mutagênese

ABSTRACT

Sapindus saponaria L., known as soapberry, is a plant native to the Neotropics, widely distributed in Brazil possessing several traditional uses, but still lacks studies that prove the involvement of proteins and their effects. In this sense, the present study sought to detect, partially purify and characterize, as well as to evaluate the mutagenic and cytotoxic response of the crude extract of proteins in soapberry seeds. Through extraction in aqueous medium, ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography, were partially purified, an inhibitor of cysteine proteases and a serine protease. The inhibitor, with molecular weight between 32 and 33 kDa, showed a high specific activity of inhibition of the papain, inhibiting 75% of its activity. The protease, of approximately 40kDa, presented greater proteolytic activity against specific substrate of serine proteases, as well as its activity inhibited specifically by serine protease inhibitor. In order to evaluate the mutagenic and cytotoxic potential of the crude seed extract, four different concentrations were evaluated by the Ames and Survival Test, using five different strains of *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, in order to evaluate different mechanisms of mutagenesis. Further, mutagenicity and cytotoxicity analyzes indicated that the crude extract at all concentrations tested do not induce mutagenic or cytotoxic responses to the strains used, in the absence of exogenous metabolism. Thus, the seeds of soapberry constitutively produce a cysteine protease inhibitor and a serine protease, indicating that the detection of new bioactive molecules is a demonstration of the biotechnological potential of the plant to be studied.

Keywords: soapberry; bioactive protein; mutagenicity;

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Registro fotográfico do fruto e da semente de <i>Sapindus saponaria</i> L.	17
Figura 2 - A: Fórmula para cálculo da Atividade Residual da Papaína. B: Fórmula para cálculo da Unidade de Inibição.	30
Figura 3 - Fórmula para Unidade de Atividade Proteolítica.	31
Figura 4 - Avaliação da atividade de inibidor de protease cisteínica do EB e frações parcialmente purificadas de sementes de saboeiro.	35
Figura 5 - SDS-Page – Análise eletroforética do perfil proteico ao longo da primeira etapa de purificação.	36
Figura 6 - Perfil cromatográfico da F30 em Biogel P-100.	37
Figura 7 - Avaliação da atividade de inibidor de protease cisteínica ao longo das etapas de purificação.	38
Figura 8 - Avaliação da atividade proteolítica da fração F60 sob efeito de diferentes inibidores.	40
Figura 9 - Avaliação da atividade proteolítica da fração F60 sobre substratos diferentes. ...	41
Figura 10 - SDS-Page – Análise eletroforética do perfil proteico da fração F60. A: Gel SDS-Page. B: Gel Zimografia.	42
Figura 11 - Perfil cromatográfico da F60 em Biogel P-100.	43
Figura 12 - Avaliação da atividade de protease serínica ao longo das etapas de purificação.	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características das linhagens de Salmonella enterica sorovar Typhimurium.....	25
Tabela 2 - Avaliação do rendimento geral das etapas de enriquecimento do inibidor de proteases cisteínicas detectado.	39
Tabela 3 - Avaliação do rendimento geral das etapas de enriquecimento da proteinase serínica detectada	45
Tabela 4 - Avaliação da indução de mutagenicidade e citotoxicidade (Teste de Ames) em modelo procarioto pelo EB	47

Lista de abreviações e siglas

% Sobrev. – Percentual de sobrevivência

Abs - Absorbância

ANOVA – Análise de variância

BANA – *N*-benzoil-arginina-naftilamida

BApNA – Benzoil-arginina-*p*-nitroanilida

BSA – Bovine Sour Albumine

DN - Desnaturante

E64 – *trans*-Epoxisuccinil-L-leucil-amido(4-guanidino)-butano

EB – Extrato Bruto

EDTA – Ethilenediamine tetraacetic acid

P30 – Fração obtida entre 0 e 30% de saturação salina

P60 – Fração obtida entre 30 e 60% de saturação salina

P90 – Fração obtida entre 60 e 90% de saturação salina

P100 In – Fração contendo inibidor de protease obtida por gel filtração

P100 P – Fração contendo protease obtida por gel filtração

His- - Auxotrofia para histidina

His+ - Prototrofia para histidina

IM – Índice de Mutagenicidade

IT - Inibidor de tripsina

JB – Jardim Botânico

LB – Meio Louria Bertani

MP – Marcador de Peso

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

PVP - Polivinilpirrolidona

REFLORA - Plantas do Brasil: Resgate Histórico e Herbário Virtual para o Conhecimento e Conservação da Flora Brasileira

RJ – Rio de Janeiro

SDN - Semidesnaturante

SSTI – *Sapindus saponaria trypsin inhibitor I*

SSTI2 – *Sapindus saponaria trypsin inhibitor II*

UA - Unidade de Atividade

UI - Unidade de Inibição

Sumário

1.	Introdução	17
1.1.	<i>Sapindus saponaria</i> L. e seu uso tradicional	17
1.2.	Compostos bioativos com ênfase em proteínas	19
1.2.1.	Proteases e inibidores de proteases.....	20
1.2.2.	Proteases	20
1.2.3.	Inibidores de proteases	20
1.2.4.	Potencial farmacológico de proteínas bioativas de origem vegetal.....	21
1.2.5.	O potencial biotecnológico de proteínas bioativas em <i>Sapindus saponaria</i> L	22
1.3.	Análises toxicológicas e sua importância para saúde, biotecnologia e farmacologia	23
1.3.1.	Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico	24
1.4.	Justificativa.....	26
2.	Objetivos.....	27
2.1.	Objetivo geral	27
2.2.	Objetivos específicos.....	27
3.	Metodologia.....	28
3.1.	Material vegetal	28
3.2.	Extração de proteínas de sementes de saboeiro.....	28
3.3.	Purificação parcial de proteínas a partir de extrato bruto de sementes de saboeiro	28
3.4.	Quantificação de proteínas	29
3.5.	Detecção de inibidores de protease cisteínicas a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro	29

3.6.	Detecção e caracterização de atividade de proteases a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro	31
3.7.	Fracionamento das proteínas via SDS-PAGE	32
3.8.	Fracionamento das proteínas via zimografia	32
3.9.	Ensaio de mutagenicidade (Teste de Ames) e citotoxicidade	33
4.	Resultados.....	35
4.1.	Detecção de proteínas bioativas a partir do extrato bruto de sementes de saboeiro.....	35
4.2.	Detecção e purificação parcial de um inibidor de protease cisteínica a partir do extrato bruto de sementes de saboeiro	37
4.3.	Detecção e caracterização de proteases a partir de extrato bruto e frações de proteínas extraídas de sementes de saboeiro	40
4.4.	Purificação parcial de uma protease serínica a partir de extrato bruto de sementes de saboeiro.....	43
4.5.	Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico do extrato bruto de sementes de saboeiro em modelo procarioto (Teste de Ames)	46
5.	Discussão	48
6.	Conclusão	54
7.	Perspectivas Futuras	55
8.	Referências	56

8. Referências

- ABREU GUIRADO, O. A. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, 2005.
- ABREU MATOS, F. J. O formulário fitoterapico do professor Dias da Rocha. Fortaleza: **Universidade Federal do Ceará**, 1997.
- AHMED, I. A. M. et al. Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 483–491, 2009a.
- AHMED, I. A. M. et al. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 395–400, 2009b.
- AL AKEEL, R. et al. Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 147–151, 2014.
- ALBIERO, A. L. M.; BACCHI, E. M.; MOURÃO, K. S. M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L.(Sapindaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 549–560, 2001.
- ALBIERO, A. L. M.; SERTIÉ, J. A. A.; BACCHI, E. M. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 41–44, 2002.
- AMRI, E.; MAMBOYA, F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 99–104, 2012.
- BEN AMIRA, A. et al. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 2, p. 1–9, 2017.
- BIESALSKI, H. K. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, p. 1202–1205, 2009.

BRITO, M. S. DE et al. Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. seeds and antibacterial effect of protein fractions. **Hoehnea**, v. 43, n. 1, p. 11–18, 2016.

CAFFREY, C. R.; STEVERDING, D. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 12–19, 2009.

CORREA, E. et al. Leishmanicidal and trypanocidal activity of *Sapindus saponaria*. **Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas**, v. 13, n. 4, p. 311–323, 2014.

DA SILVA, M. L. et al. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 366–375, 2012.

DAMKE, E. et al. In vivo activity of *Sapindus saponaria* against azole-susceptible and -resistant human vaginal *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 35, 2011.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. Medicinal plants of the Guianas. **Histoire**, p. 490, 2004.

EGITO, A. S. et al. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 816–825, 2007.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Neurology**, v. 4 JAN, n. January, p. 1–10, 2014.

FIORINI, A. et al. *Candida Albicans* protein profile changes in response to the butanolic extract of *Sapindus Saponaria* L. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. April, 2016.

FOX, P. F. et al. Fundamentals of Cheese Science: Enzymatic Coagulation of Milk Summary. **Fundamentals of Cheese Science**, p. 185–229, 2017.

GOMES, M. T. R. et al. Plant Proteinases and Inhibitors: An Overview of Biological Function and Pharmacological Activity. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 417–436, 2011.

GUAADAOU, A. et al. What is a Bioactive Compound? A Combined Definition for a Preliminary Consensus. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 3, p. 174–179, 2014.

GUTERRES, S. B. **Estudo dos extratos dos frutos de Sapindus saponaria enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar**. USP, 2005.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, n. 3, p. 68–85, 2007.

HIBBETTS, K.; HINES, B.; WILLIAMS, D. An overview of proteinase inhibitors. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 4, p. 302–308, 1999.

HOOVER, N. M. Proteases: a primer. **Essays In Biochemistry**, v. 38, p. 1–8, 2002.

ICH, I. C. O. H. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1). v. 4, 2011.

JOANA GIL-CHÁVEZ, G. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.

JOANITTI, G.; FREITAS, S.; SILVA, L. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition**, v. 2, n. 3, p. 199–217, 2006.

JOSHI, B. N. et al. Cysteine Protease Inhibitor from Pearl Millet: A New Class of Antifungal Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, n. 246, p. 382–387, 1998.

KANOST, M. R.; CLEM, R. J. Insect Proteases. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, p. 346–364, 2017.

KANTYKA, T.; SHAW, L. N.; POTEMPA, J. Papain-like proteases of staphylococcus aureus. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 712, p. 1–14, 2011.

KOUZUMA, Y. et al. Purification, characterization, and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, Sca and Scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 6, p. 1106–1113, 1996.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71–88, 2002.

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

LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 324–337, 2000.

LEVIN, D. E. et al. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 23, p. 7445–7449, 1982.

LIMA, G. P. G. DE. **Purificação, caracterização bioquímicas e atividade biológica in vitro contra insetos praga de um novo inibidor de tripsina isolado de sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. UFC, 2012.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.

MACEDO, M. L. R. et al. A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: Purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. **Protein Journal**, v. 30, n. 1, p. 9–19, 2011.

MAHAJAN, R. T.; CHAUDHARI, G. M. Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 5, p. 1173–1181, 2014.

MARINHO, G. J. P.; KLEIN, D. E.; SIQUEIRA-JUNIOR, C. L. Evaluation of soapberry (*Sapindus saponaria* L.) leaf extract against papaya anthracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 2, p. 127–131, 2018.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209–223, 2015.

MIYAGAWA, T. et al. Cardenolide glycosides of *Thevetia peruviana* and triterpenoid saponins of *Sapindus emarginatus* as TRAIL resistance-overcoming compounds. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1507–1511, 2009.

MONTI, R. et al. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 5, p. 501–507, 2000.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay Kristien. **Acarologia**, v. 455, p. 29–60, 2000.

NETO, G. G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. DA. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta bot. bras**, v. 14, n. 3, p. 327–334, 2000.

NIEMEYER, D. et al. The papain-like protease determines a virulence trait that varies among members of the SARS-coronavirus species. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1–27, 2018.

OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing. **OECD Guidekub for testing of chemicals**, 1997.

OECD. Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. **Genetic toxicology Guidance Document**, p. 1–58, 2015.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91–104, 2003.

OZGUR, A.; TUTAR, Y. Therapeutic Proteins: A to Z. **Protein & Peptide Letters**, v. 20, n. 12, p. 1365–1372, 2013.

- PELEGRINI, D. D. et al. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922–927, 2008.
- PERNAS, M. et al. Antifungal Activity of a Plant Cystatin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 7, p. 624–627, 1999.
- PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 4, p. 12–15, 1995.
- PRAXEDES-GARCIA, P. et al. Biochemical Aspects of a Serine Protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) Seeds: A Potential Tool to Access the Mobilization of Seed Storage Proteins. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–8, 2012.
- QI, R. F.; SONG, Z. W.; CHI, C. W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 5, p. 283–292, 2005.
- RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKHA, M. N.; MALLIKARJUNA, S. E. Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1324–1339, 2015.
- RANKIN, G. Chronic gastric ulcer and its treatment by papain. **The Lancet**, v. 145, n. 3728, p. 333–336, 1895.
- RASHED, K. N. et al. Antimicrobial Activity, Growth Inhibition of Human Tumour Cell Lines, and Phytochemical Characterization of the Hydromethanolic Extract Obtained from *Sapindus saponaria* L. Aerial Parts. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- RAWLINGS, N. D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D624–D632, 2018.
- REBELLO, A. N. DA S.; SIQUEIRA-JUNIOR, C. L. Detecção de uma proteína de defesa homóloga à cistatina do tomate em plantas de saboeiro (*Sapindus saponaria*). **Livro de Resumos: 13a Jornada de Iniciação Científica UNIRIO**, n. 2002, p. 5–6, 2006.

RODRIGUES, A. L. S. et al. Effectiveness of papain gel in venous ulcer treatment: randomized clinical trial. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 3, p. 458–465, 2015.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990.

SACHIN, G. et al. Review Article Medicinal Plants of the Genus Sapindus (Sapindaceae) - a Review of Their Botany , Phytochemistry , Biological Activity and. v. 4, n. 5, p. 7–20, 2014.

SALAS, C. E. et al. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2263–2269, 2008.

SANTOS, C. C.; SCHARFSTEIN, J.; ANA PAULA, A. P. C. Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 323–324, 2006.

SANTOS, W. L. et al. Effect of the aqueous extracts of the seeds of Talisia esculenta and Sapindus saponaria on fall armyworm. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 373–383, 2008.

SIQUEIRA-JÚNIOR, C. L. et al. 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 247–254, 2002.

SOMNER, G. V.; FERRUCCI, M. S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. **Sapindus in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20934>>. Acesso em: 9 fev. 2017.

SOUZA, C. M. P. et al. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 188–193, 2013.

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. DEC, 2016.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

YAO, Q. et al. A bacterial type III effector family uses the papain-like hydrolytic activity to arrest the host cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3716–3721, 2009.