

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências de Florestas Tropicais**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INIBIDORES PROTEOLÍTICOS  
EM SEMENTES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA**

**LARISSA RAMOS CHEVREUIL**

Manaus, Amazonas  
Setembro, 2009

**LARISSA RAMOS CHEVREUIL**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INIBIDORES PROTEOLÍTICOS  
EM SEMENTES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA**

ORIENTADORA: Dra. SILVANA CRISTINA PANDO

CO-ORIENTADOR: Dr. JOSÉ FRANCISCO DE CARVALHO GONÇALVES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS, área de concentração em Silvicultura Tropical.

Manaus, Amazonas

Setembro, 2009

C529

Chevreuil, Larissa Ramos

Extração e purificação de inibidores proteolíticos em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia / Larissa Ramos Chevreuil . --- Manaus : [s.n.], 2009.

76 f. : il. color.

Dissertação(mestrado)-- INPA, Manaus, 2009

Orientador : Silvana Cristina Pando

Co-orientador : José Francisco de Carvalho Gonçalves

Área de concentração : Ciências de Florestas Tropicais

1. Fabaceae. 2. Sementes florestais. 3. Serinoproteinases. I. Título.

CDD 19. ed. 583.322

**Sinopse:**

Estudou-se a ocorrência de inibidores de tripsina bovina, quimotripsina bovina e papaína nos extratos obtidos por meio de diferentes métodos de isolamento protéico, bem como a purificação de inibidores de tripsina bovina a partir dos extratos salinos de sementes de *Parkia pendula*, *Parkia discolor*, *Parkia multijuga*, *Parkia nitida* e *Enterolobium schomburgkii*, cinco leguminosas arbóreas pertencentes à flora Amazônica.

**Palavras-chave:** Serinoproteinases, Fabaceae, sementes florestais.

A Deus

Aos meus pais, Welington e Mafalda

Ao meu irmão, Wellington

Ao meu namorado, André

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e apoio na realização desta dissertação;

Ao meu namorado André, por todo amor e ajuda na realização deste trabalho;

Ao meu irmão e minha avó Hildete por todo carinho, amor, apoio e convivência;

À minha orientadora Dra. Silvana Cristina Pando, pela orientação, ensinamento, confiança, amizade, respeito e, acima de tudo, pela paciência e dedicação, nós conseguimos!

Ao meu co-orientador e “orientador”, Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves, por todos os ensinamentos concedidos, pela confiança, respeito, amizade, oportunidade e pelas críticas construtivas que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional;

Ao Dr. Luiz Augusto, pelo fornecimento das sementes;

Ao INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais pela oportunidade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de mestrado concedida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa por meio do Programa de Colaboração Acadêmica (CAPES/PROCAD);

Aos colegas da turma de Mestrado CFT 2007, pela convivência, carinho e pelos momentos de confraternização;

Aos amigos Virna e Michael, por toda amizade e conselhos dados durante esta etapa de aprendizado;

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA-LFBV), pelo apoio, amizade e convivência;

Aos PIBICs, Flávia, Jailane, Cristiane, Stephany, Moisés e Ana Maria pelo apoio técnico;

À dona Inês, do laboratório de Nutrição de Peixes (INPA-LNP), pelas ajudas “urgentes”;

Ao Dr. Salvatore Giovanni De Simone, do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (FIOCRUZ/RJ), pela oportunidade de realização de experimentos em seu laboratório;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho: Muito obrigada!

## RESUMO

A família Fabaceae é importante na indústria madeireira, como fonte de proteínas vegetais e contém uma grande variedade de biomoléculas com potencial para aplicação industrial, incluindo os inibidores proteolíticos, os quais são proteínas que podem atuar como fonte de aminoácidos sulfurados, na regulação de proteinases endógenas e na defesa das plantas contra o ataque de insetos e patógenos. Os objetivos deste trabalho foram a investigação e caracterização parcial dos inibidores proteolíticos bem como suas propriedades bioquímicas em extratos e frações de sementes de leguminosas arbóreas da flora amazônica: *Parkia pendula*, *Parkia discolor*, *Parkia multijuga*, *Parkia nitida* e *Enterolobium schomburgkii*. Os extratos obtidos após extração salina, precipitação por acetona e precipitação por sulfato de amônio foram utilizados para a quantificação protéica e nas etapas de detecção da atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina bovina. O extrato total (ET), proveniente da extração salina, foi submetido à cromatografia de afinidade em Sepharose tripsina. As espécies *P. pendula*, *P. discolor* e *P. nitida*, mostraram maiores teores de proteínas nos ET, enquanto as espécies *E. schomburgkii* e *P. multijuga* mostraram estes resultados nos sobrenadantes submetidos ao fracionamento por sulfato de amônio a 0-30% e 60-80% de saturação. A atividade inibitória sobre tripsina foi maior nos extratos totais para todas as espécies, com possível perda de atividade após precipitação acetônica e precipitação por sulfato de amônio a 30-60% de saturação para *E. schomburgkii*. Contudo, a inibição da quimotripsina acima de 50%, foi observada apenas no extrato total e no precipitado cetônico de *P. nitida*. Os valores das constantes de inibição ( $K_i$ ) foram de  $8,92 \times 10^{-8}$  M;  $6,89 \times 10^{-8}$  M;  $6,15 \times 10^{-8}$  M, para *P. pendula*, *P. discolor* e *P. multijuga*, respectivamente. Os inibidores de tripsina apresentaram massas moleculares aparentes de 17 kDa (PpTI), 21 kDa (PdTI), 19 kDa (PmTI e PnTI) e 18 kDa (EsTI), bem como afinidade diferenciada contra a tripsina e quimotripsina bovina. Os resultados mostram que, provavelmente, os inibidores pertencem à família Kunitz.

## ABSTRACT

The Fabaceae family is important in the lumberjack industry, as source of vegetable protein and contain a great variety of biomolecules with potential industrial application, including the proteolitics inhibitors, which are proteins that can act as source of sulphur amino acids, in the regulation of endogenous proteinases and in the defense of plants against the attack of insects and pathogens. The aims of this work were the investigation and partial characterization of proteolitics inhibitors as well as its biochemists properties in extracts and fractions of seeds from leguminous tree of the Amazonian flora: *Parkia pendula*, *Parkia discolor*, *Parkia multijuga*, *Parkia nitida* and *Enterolobium schomburgkii*. The extracts obtained after saline extraction, precipitation by acetone and precipitation by ammonium sulphate, were used for the proteic quantification and in the steps of detection of the inhibitory activity against bovine trypsin and chymotrypsin. The total extract (ET) from the saline extraction was submitted to Sepharose trypsin affinity chromatography. The species *P. pendula*, *P. discolor* and *P. nitida* exhibited high protein content in the ET, while *E. schomburgkii* and *P. multijuga* exhibited these results in the supernatants submitted to ammonium sulphate fractionation at 0-30% and 60-80% of saturation. The inhibitory activity against trypsin was higher in total extracts for all the species, with possible loss of activity after precipitation by acetone and precipitation by ammonium sulphate 30-60% of saturation for *E. schomburgkii*. However, the chymotrypsin inhibition above of 50% was observed only in the total extract and in the acetonic precipitate of *P. nitida*. The values of the inhibition constants ( $K_i$ ) were of  $8.92 \times 10^{-8}$  M,  $6.89 \times 10^{-8}$  M and  $6.15 \times 10^{-8}$  M, for *P. pendula*, *P. discolor* and *P. multijuga*, respectively. The trypsin inhibitors presented apparent molecular mass of 17 kDa (PpTI), 21 kDa (PdTI), 19 kDa (PmTI and PnTI) and 18 kDa (EsTI) as well as different affinity against the bovine trypsin and chymotrypsin. The results show that, probably, the inhibitors belong to the Kunitz family.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1. Enzimas proteolíticas .....	15
2.2. Inibidores proteolíticos .....	18
2.3. Funções dos inibidores proteolíticos .....	18
2.3.1. Regulação de processos proteolíticos.....	18
2.3.2. Inibidores como proteínas de reserva .....	19
2.3.3. Inibidores como proteínas de defesa .....	19
2.4. Classificação dos inibidores proteolíticos.....	20
2.4.1. Inibidores de serinoproteinases .....	23
2.4.2. Inibidores de cisteíno-proteinases.....	31
2.4.3. Inibidores de proteinases aspárticas.....	32
2.4.4. Inibidores de metaloproteinases .....	32
2.5. Espécies estudadas .....	33
2.5.1. <i>Parkia pendula</i> (Willd.) Benth. Ex Walp.....	34
2.5.2. <i>Parkia discolor</i> Spruce ex Benth .....	35
2.5.3. <i>Parkia multijuga</i> Benth .....	35
2.5.4. <i>Parkia nitida</i> Miq.....	36
2.5.5. <i>Enterolobium schomburgkii</i> (Benth) Benth.....	37
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1. Objetivo Geral .....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1. Coleta de material biológico .....	39
4.2. Isolamento de proteínas.....	39
4.1.1. Extração salina.....	39
4.1.2. Precipitação por acetona 80% .....	39
4.1.3. Precipitação por sulfato de amônio .....	39
4.2. Purificação dos inibidores proteolíticos .....	40

4.2.1. Preparo da resina de tripsina-Sepharose 4B .....	40
4.2.2. Cromatografia de afinidade em tripsina - Sepharose 4B.....	41
4.3. Titulação dos sítios ativos das enzimas tripsina e quimotripsina .....	41
4.4. Caracterização da atividade dos inibidores proteolíticos .....	42
4.4.1. Medida da inibição de tripsina.....	42
4.4.2. Medida da inibição de quimotripsina .....	42
4.5. Determinação de proteína bruta .....	42
4.6. Determinação de proteínas totais .....	43
4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1. Determinação de proteína bruta .....	44
5.2. Determinação de proteínas totais .....	45
5.3. Determinação da atividade inibitória da tripsina.....	46
5.4. Determinação da atividade inibitória da quimotripsina .....	49
5.5. Curva de inibição da tripsina bovina .....	51
5.6. Determinação das constantes de inibição.....	53
5.7. Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B.....	53
5.8. Caracterização da atividade inibitória de PpTI, PdTI, PmTI, PnTI e EsTI.....	57
5.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS .....	58
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Famílias de enzimas proteolíticas.....	16
<b>Tabela 2</b> - Classificação de inibidores proteolíticos vegetais de acordo com a classe de enzima inibida.....	20
<b>Tabela 3</b> - Famílias de inibidores proteolíticos de acordo com a homologia da sequência de seus domínios inibitórios.....	21
<b>Tabela 4</b> - Famílias de inibidores de serinoproteinases de origem vegetal.....	23
<b>Tabela 5</b> - Inibidores tipo Kunitz e Bowman-Birk.....	24
<b>Tabela 6</b> - Teor de proteínas totais nos extratos das sementes de <i>P. pendula</i> , <i>P. discolor</i> , <i>P. multijuga</i> , <i>P. nitida</i> e <i>E. schomburgkii</i> .....	45
<b>Tabela 7</b> - Inibição da atividade da tripsina bovina (%) sobre o substrato BAPNA pelos extratos das espécies em estudo, após diferentes etapas de isolamento.....	47
<b>Tabela 8</b> - Constantes de inibição obtidas pelos extratos totais de <i>P. pendula</i> , <i>P. discolor</i> e <i>P. multijuga</i> .....	53
<b>Tabela 9</b> – Determinação de proteínas, inibidores e atividade específica dos extratos e frações de <i>P. pendula</i> , <i>P. discolor</i> , <i>P. multijuga</i> , <i>P. nitida</i> e <i>E. schomburgkii</i> .....	56
<b>Tabela 10</b> - Especificidade de inibição de PpTI, PdTI, PmTI, PnTI e EsTI sobre as enzimas tripsina e quimotripsina bovina.....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de interação entre os inibidores proteolíticos e as serinoproteinases.....	17
<b>Figura 2</b> - Estrutura tridimensional do inibidor de tripsina do tipo Kunitz extraído de soja (STI Kunitz).....	24
<b>Figura 3</b> – Representação da estrutura tridimensional de um inibidor do tipo Bowman-Birk.....	26
<b>Figura 4</b> - Estrutura tridimensional do inibidor tipo batata I extraído de <i>Cucurbita maxima</i> .....	27
<b>Figura 5</b> - Estrutura tridimensional do inibidor tipo batata II extraído de <i>Nicotiana glauca</i> .....	28
<b>Figura 6</b> - Estrutura tridimensional do inibidor tipo abóbora extraído de <i>Cucurbita maxima</i> .....	28
<b>Figura 7</b> - Estrutura tridimensional do inibidor da família cereal extraído de <i>Eleusine coracana gaertneri</i> .....	29
<b>Figura 8</b> - Estrutura tridimensional do inibidor da família rami I-2 extraído de <i>Hordeum vulgare</i> .....	30
<b>Figura 9</b> - Estrutura tridimensional do inibidor da família taumatina extraído de <i>Zea mays</i> .....	30
<b>Figura 10</b> - Estrutura tridimensional da oryzacistatina extraída de arroz ( <i>Oryza sativa japonica</i> ).....	32
<b>Figura 11</b> - Estrutura tridimensional do inibidor de metalocarboxipeptidase de batata ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	33
<b>Figura 12</b> – A espécie <i>P. pendula</i> .....	34
<b>Figura 13</b> - A espécie <i>P. discolor</i> .....	35
<b>Figura 14</b> – A espécie <i>P. multijuga</i> .....	36
<b>Figura 15</b> - A espécie <i>P. nitida</i> .....	36

<b>Figura 16</b> - A espécie <i>Enterolobium schomburgkii</i> .....	37
<b>Figura 17</b> – Fluxograma das etapas de extração de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia.....	40
<b>Figura 18</b> - Teores de proteína bruta em sementes de leguminosas arbóreas da flora amazônica.....	44
<b>Figura 19</b> – Inibição da atividade da quimotripsina bovina sobre o substrato BTPNA pelos extratos de <i>P. nitida</i> , após diferentes etapas de isolamento.....	50
<b>Figura 20</b> - Curva de inibição da tripsina bovina pelo extrato total (ET) de <i>P. pendula</i> , <i>P. discolor</i> e <i>P. multijuga</i> .....	52
<b>Figura 21</b> - Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B.....	55
<b>Figura 22</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	58
<b>Figura 23</b> - Determinação da massa molecular aparente do inibidor de <i>P. pendula</i> , <i>P. discolor</i> , <i>P. multijuga</i> , <i>P. nitida</i> e <i>E. schomburgkii</i> .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BIS: N, N' - Metileno bis acrilamida;
- DL-BAPNA: Benzoyl DL-Arginina p-Nitroanilida;
- DTT: Ditioneitol;
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético;
- EsTI: Inibidor de tripsina de *Enterolobium schomburgkii*;
- kDa: KiloDalton;
- M: Molar;
- nm: Nanômetro;
- p/v: Peso/volume;
- PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida;
- PdTI: Inibidor de tripsina de *Parkia discolor*;
- PmTI: Inibidor de tripsina de *Parkia multijuga*;
- PnTI: Inibidor de tripsina de *Parkia nitida*;
- PpTI: Inibidor de tripsina de *Parkia pendula*;
- SDS: Dodecil sulfato de sódio;
- TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina;
- Tris: Hidroximetil-aminometano;
- v/v: Volume/volume;

**ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS**

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Símbolo</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC; Voet *et al.*, 2000.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas, representando cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies, as quais estão presentes em diversos ecossistemas do mundo (Lewis *et al.*, 2005). No Brasil, esta família é uma das mais representativas, com cerca de 2.100 espécies nativas reunidas em 188 gêneros e distribuídas em diferentes ecossistemas. Fato que tem sido comprovado a partir de pesquisas na área de florística que apontam a família Fabaceae como uma das mais representativas em formações florestais (Lima *et al.*, 2007).

Em geral, espécies leguminosas arbóreas são importantes para a manutenção da cobertura florestal, fixação biológica de nitrogênio, apresentam alto valor comercial madeireiro, e recentemente, seus produtos florestais têm recebido maior valor econômico como consequência do aumento na demanda por espécies produtoras de óleos, resinas, pigmentos, fármacos, gomas naturais, dentre outros compostos vegetais, com aplicação industrial, incluindo os inibidores proteolíticos (Barbosa *et al.*, 2006; Behrens *et al.*, 2006).

Os inibidores proteolíticos são metabólitos importantes em decorrência das múltiplas funções que exercem na planta, podendo atuar de maneira constitutiva ou induzida, na defesa contra o ataque de insetos e patógenos, como fonte de aminoácidos sulfurados, na regulação de proteinases endógenas e como sinais de respostas às condições ambientais (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Ragg *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2007; Marra *et al.*, 2009). Adicionalmente, estudos têm demonstrado que os inibidores proteolíticos podem ser aplicados no tratamento de patologias, por exemplo, inflamações, hemorragias e câncer (Fear *et al.*, 2007).

Considerando o alto teor de proteínas nos tecidos de estocagem de leguminosas, e que há poucos estudos sobre o isolamento de inibidores proteolíticos em espécies pertencentes à flora Amazônica, a proposta deste estudo é investigar a ocorrência dessas proteínas em sementes de leguminosas arbóreas da flora Amazônica, contribuindo para o entendimento da interação entre inibidores e suas enzimas proteolíticas, na expectativa de que futuros estudos possam possibilitar a aplicação dessas moléculas sobre fungos, insetos e bactérias de interesse para as diferentes áreas do conhecimento, considerando a lógica de prospectar biomoléculas com potencial de uso sustentável da flora Amazônica.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas, também chamadas de proteinases, são essenciais para a regulação de processos vitais em todos os organismos vivos, atuando nas reações de degradação e em processos fisiológicos específicos como a ativação de zimogênios, liberação de peptídeos biologicamente ativos, liberação de hormônios precursores, reaproveitamento de aminoácidos (“turnover” de proteínas), na ativação ou translocação através da membrana e na coagulação sanguínea (Bode e Huber, 2000; Powers *et al.*, 2002; Chou e Cai, 2006).

Nas plantas, essas enzimas participam da degradação de proteínas de reserva, fornecendo nitrogênio e enxofre para as vias de biossíntese e estão associadas ao processo global de renovação de proteínas (Barret *et al.*, 2001; Shee e Sharma, 2008).

De modo geral, essas enzimas são responsáveis por catalisar a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas, podendo atuar nas ligações internas, sendo denominadas de proteinase ou endopeptidase, ou na clivagem das ligações entre os resíduos de aminoácidos C- ou N- terminal das proteínas, denominando-se protease ou exopeptidase (Mikola, 1983; Shen e Chou, 2009).

De acordo com o mecanismo de catálise, similaridade na seqüência de aminoácidos e composição de seu sítio ativo, essas proteínas são classificadas em serinoproteinases, cisteinoproteinases e proteinases aspárticas, possuindo em seus sítios ativos os aminoácidos *serina*, *cisteína* e *aspartato*, respectivamente. As metaloproteinases, por sua vez, possuem em seu sítio ativo um íon metálico ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) (Neurath, 1984; Shen e Chou, 2009). As famílias de enzimas proteolíticas estão apresentadas na tabela 1.

As serinoproteinases compreendem a classe de proteinases fisiologicamente mais versátil e melhor caracterizada e compreendem as serinoproteinases de mamíferos, dentre as quais destacam-se a tripsina, a quimotripsina, a elastase e as calicreínas (Xavier-Filho, 1992).

**Tabela 1** - Famílias de enzimas proteolíticas.

<b>Família</b>	<b>Proteínas representativas</b>	<b>Componentes característicos do sítio ativo</b>
Serinoproteinases I	Quimotripsina, Tripsina, Elastase, Calicreína	Asp (102), Ser (195), His (57)
Serinoproteinases II	Subtilisina	Asp (32), Ser (221), His (64)
Cisteíno-proteinases	Papaína, Actinidina, Bromelaína, Catepsinas B e H de fígado de rato	Cys (25), His (159), Asp (158)
Proteinases aspárticas	Penicilopepsina, pepsina, <i>Rhizopus chinesis</i> , <i>Endothia parasítica</i> , Revina	Asp (33), Asp (213)
Metaloproteinases I	Carboxipeptidase bovina A e B	Zn <sup>+2</sup> , Glu (270); Tyr (24)
Metaloproteinases II	Termolisina	Zn <sup>+2</sup> , Glu (143), His (23)

Fonte: Neurath (1984).

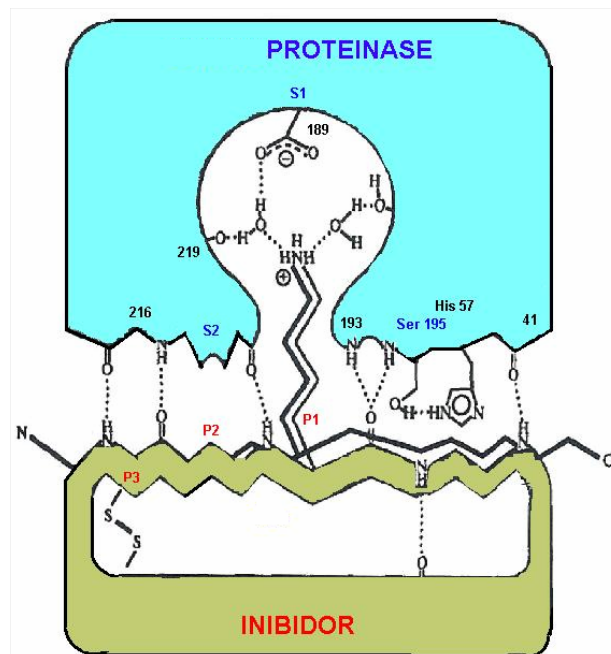
Apesar de serem importantes, as enzimas proteolíticas podem exercer diversos danos aos sistemas vivos quando a sua atividade não é eficientemente controlada. Desta forma, o controle da atividade proteolítica pode ser realizado pela biossíntese de precursores inativos, chamados pró-proteínas ou zimogênios e, portanto, dependente da proteólise de uma ou várias ligações peptídicas da porção N-terminal para tornar-se ativa. Outras formas de controle desta atividade incluem a regulação de sua expressão gênica, a diferença de compartimentação de enzimas e substratos, pela diferença no pH de ação da enzima ou pelo bloqueio ou diminuição de sua atividade catalítica sobre um determinado substrato por meio de inibidores (Xavier-Filho, 1992; Rawlings *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2002).

Esses inibidores são capazes de reduzir a velocidade da reação catalisada por uma enzima, resultando na inibição reversível e/ou irreversível da atividade

proteolítica, por meio da formação de um complexo estável, através da complementariedade do sítio reativo do inibidor ao sítio ativo da enzima (Bode e Huber, 2000; Laskowski e Qasim, 2000; Bazock *et al.*, 2005; Habib e Fazili, 2007).

A formação deste complexo estável entre enzima e inibidor é dependente da interação de aminoácidos, presentes no sítio reativo do inibidor, com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, determinando uma interação altamente específica com suas enzimas proteolíticas alvo (Haq *et al.*, 2004; 2005).

O primeiro estudo que desvendou o mecanismo de interação entre enzimas e inibidores foi realizado com serinoproteinasas, por meio da técnica de difração de raio X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Este estudo sugeriu que, o radical hidroxila do resíduo serina do sítio ativo da enzima interage com o sítio reativo do inibidor, formando um complexo covalentemente estável, onde poucos resíduos de aminoácidos (10 – 12) determinam a especificidade da interação (Figura 1) (Belitz e Weder, 1990; Matheson *et al.*, 1991; Valueva e Mosolov, 1999).



**Figura 1** - Mecanismo de interação entre os inibidores proteolíticos e as serinoproteinasas. Fonte: Valueva e Mosolov (1999).

A inibição das serinoproteinasas ocorre de forma estritamente competitiva. Isto ocorre, uma vez que os inibidores agem como “pseudosubstratos” altamente específicos para a enzima, inibindo em uma única ligação peptídica, a região do sítio

ativo. Contudo, além da ligação do sítio reativo do inibidor ao sítio ativo da enzima, há ainda uma grande área de contato entre essas duas moléculas, decorrente da presença de aminoácidos que circundam a região da ligação entre o sítio reativo e o sítio ativo, o que proporciona a resistência da interação enzima-inibidor, mediada pela compatibilidade entre todos os resíduos de aminoácidos (Richardson, 1991; Broadway, 1995; Legowska *et al.*, 2009).

## **2.2. Inibidores proteolíticos**

Inibidores proteolíticos são proteínas regulatórias dos eventos proteolíticos, sendo ubíquas em todos os organismos vivos, incluindo plantas, animais e microorganismos e estão envolvidos em diversos processos metabólicos (Mello *et al.*, 2006). Em muitas espécies de plantas, os inibidores estão presentes em altas concentrações nas sementes, representando de 5 a 15% do conteúdo de proteínas totais e, em sua grande maioria, são encontrados nas famílias Fabaceae, Brassicaceae e Poaceae (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Shee e Sharma, 2008).

Além de tecidos de reserva (sementes), tecidos reprodutivos e tecidos vegetativos podem acumular inibidores de maneira constitutiva ou induzida. Do ponto de vista funcional, estas proteínas participam dos processos de regulação dos eventos de apoptose, fotossíntese e expressão gênica, como proteínas de reserva, além de atuarem na defesa contra o ataque de patógenos e pragas, injúria mecânica e estresse abiótico (Koiwa *et al.*, 1997; Mosolov e Valueva, 2005; Marra *et al.*, 2009).

A maioria dessas proteínas compreende moléculas pequenas, com massa molecular variando de 8 a 25 kDa; são extremamente estáveis e resistentes ao calor, à variação de pH, são abundantes e de fácil purificação (Belitz e Weder, 1990; Birk, 1994; Tremacoldi e Pascholati, 2004).

## **2.3. Funções dos inibidores proteolíticos**

### **2.3.1. Regulação de processos proteolíticos**

Estudos têm levado à evidência de que os inibidores podem atuar controlando a atividade de enzimas endógenas em plantas, prevenindo a hidrólise prematura dos materiais de reserva (Richardson, 1991; Xavier-Filho, 1992; Oliveira *et al.*, 2003). As cistatinas são exemplos de inibidores que regulam proteinases endógenas, onde a sua síntese está relacionada à alta intensidade de desenvolvimento da semente, precedidos pela deposição de proteínas de reserva, sugerindo que, esses inibidores

previnem a degradação proteolítica antecipada dessas proteínas (Misaka *et al.*, 1996; Pernas *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2001).

No entanto, os inibidores que atuam sobre serinoproteinases não exercem tal função, uma vez que essas enzimas não participam da proteólise de proteínas de reserva (Xavier-Filho, 1992; Reeck *et al.*, 1997).

### **2.3.2. Inibidores como proteínas de reserva**

Os inibidores proteolíticos que desempenham esse papel são encontrados em sementes e tubérculos, e o seu conteúdo está relacionado à sua dinâmica no curso da maturação e germinação da semente, sendo as enzimas proteolíticas, em certos casos, responsáveis por iniciarem a degradação dos inibidores durante a germinação (Richardson, 1977; Wingate *et al.*, 1991).

Essas moléculas atuam como reserva de enxofre e nitrogênio, devido à composição de seus aminoácidos sulfurados, os quais são degradados e reutilizados na formação de outras proteínas, proporcionando melhor desenvolvimento da plântula (Valueva e Mosolov, 1999).

### **2.3.3. Inibidores como proteínas de defesa**

A função dos inibidores como forma de proteção das plantas contra o ataque de microorganismos fitopatogênicos e de insetos tem chamado muita atenção dos pesquisadores, em virtude da grande preocupação com a produção agrícola mundial, visando diminuir o uso indiscriminado de produtos químicos (Ye *et al.*, 2001; Bayés *et al.*, 2006).

A atuação dos inibidores como proteínas de defesa das plantas, no que diz respeito à interação planta-microorganismo, ainda não é totalmente conhecida. Contudo, acredita-se que as plantas sintetizem inibidores proteolíticos capazes de suprimir a atividade de enzimas proteolíticas extracelulares, excretadas pelos microorganismos, responsáveis por degradar paredes celulares (complexos de pectina-proteína) e proteínas de membrana. Deste modo, esses inibidores reduzem a desorganização celular e dificultam a penetração dos patógenos (Tremacoldi e Pascholati, 2002; 2004; Gvozdeva *et al.*, 2006; Revina *et al.*, 2008).

A interferência dos inibidores sobre o crescimento e desenvolvimento de insetos tem sido atribuída à sua capacidade de ligar-se e, portanto, inibir a ação das proteinases digestivas destes patógenos, resultando em deficiência de aminoácidos

essenciais para o “turnover” de proteínas (Mello e Silva-Filho, 2002; Bayés *et al.*, 2006; Mosolov e Valueva, 2008; Marra *et al.*, 2009).

#### 2.4. Classificação dos inibidores proteolíticos

Os inibidores vegetais têm sido extensivamente isolados e caracterizados quanto aos aspectos estruturais e funcionais, em muitas espécies de plantas leguminosas, especialmente nas sub-famílias Mimosoideae e Caesalpinioideae, e em plantas não leguminosas. Dentre os inibidores mais bem estudados, estão aqueles que afetam a atividade de serinoproteinases, cisteíno-proteinases, proteinases aspárticas e metaloproteinases, que compreendem os principais grupos de enzimas proteolíticas (Tabela 2) (Richardson, 1991; Haq *et al.*, 2004).

Além da especificidade inibitória, essa classificação de inibidores proteolíticos vegetais, tem levado em consideração a similaridade da estrutura primária, a massa molecular, o conteúdo de cisteína e a localização do sítio reativo. Deste modo, as nomenclaturas têm sido estabelecidas de acordo com a atividade sobre a enzima avaliada e com a origem do organismo ou tecido (Haq *et al.*, 2004; Bhattacharyya *et al.*, 2007). No entanto, esta classificação dificulta a correlação do mecanismo de ação de um inibidor com o mecanismo de outro, pois um mesmo inibidor pode atuar sobre duas ou mais enzimas diferentes (Frokiaer *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2004).

**Tabela 2** - Classificação de inibidores proteolíticos vegetais de acordo com a classe de enzima inibida.

Classes	Famílias
Inibidor de serinoproteinase	Inibidor de tripsina de soja (Kunitz), inibidor de Bowman-Birk, inibidor de batata I e II, inibidor de abóbora, inibidor de cereal, inibidor Ragi I-2 e inibidor de taumatina
Inibidor de cisteíno-proteinase	Inibidor de fitocistatinas
Inibidor de aspártico-proteinase	Inibidor de catepsina D
Inibidor de metaloproteinase	Inibidor de metalocarboxipeptidase de tomate e batata

Fonte: Haq *et al.*, 2004.

Atualmente tem sido proposta uma classificação adicional para os inibidores proteolíticos, a qual considera a homologia da seqüência de seus domínios inibitórios, distribuindo os inibidores vegetais em 10 famílias, descritas na Tabela 3 (Rawlings *et al.*, 2004; Habib e Fazili, 2007).

**Tabela 3** - Famílias de inibidores proteolíticos de acordo com a homologia da seqüência de seus domínios inibitórios.

Nome Comum	MEROPS família/ superfamília	Exemplos	Origem	Proteinasas inibidas
Kunitz (plantas)	13 A	Inibidor de tripsina tipo Kunitz de soja	<i>Glycine Max</i>	Tripsina, quimotripsina
		Inibidor de subtilisina de cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	Subtilisina, $\alpha$ -amilase
		Inibidor de quimotripsina de feijão	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	$\alpha$ -quimotripsina
		Inibidor de cisteínoproteinase I tipo Kunitz	<i>Solanum tuberosum</i>	cisteínoproteinasas
Kunitz (plantas)	I3B	Unidade de inibidor de inibidor de proteinase A	<i>Sagittaria sagitifolia</i>	Tripsina, quimotripsina, calicreína
		Inibidor de subtilisina tipo Kunitz	<i>Canavalia lineata</i>	Serinoproteinase de subtilisina- tipo microbial
		Inibidor de catepsina D	<i>Solanum tuberosum</i>	Catepsina D, tripsina
		Inibidor de tripsina	<i>Acacia confusa</i>	Tripsina e $\alpha$ -quimotripsina
Cereais	I6	Inibidor de tripsina e $\alpha$ -amilase em feijão	<i>Eleusine coracana</i>	$\alpha$ -amilase
		Inibidor de tripsina e do fator XIIa em cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	$\alpha$ -amilase, tripsina
		Inibidor de tripsina e $\alpha$ -amilase em trigo	<i>Triticum aestivum</i>	$\alpha$ -amilase, tripsina
		Inibidor de tripsina e fator XIIa em milho	<i>Zea mays</i>	Tripsina de mamíferos, fator ativado XIIa

## CONTINUAÇÃO

Abóbora	17	Inibidor de tripsina MCTI-I	<i>Momordica charantia</i>	Elastase pancreática
		Inibidor de tripsina MCTI-II	<i>Momordica charantia</i>	Tripsina
		Inibidor de tripsina macrocíclico em abóbora	<i>Momordica cochinchinensis</i>	Tripsina
		Inibidor de tripsina CSTI-IV	<i>Cucumis sativus</i>	Tripsina
Batata I	113	Inibidor de quimotripsina I	<i>Solanum tuberosum</i>	Quimotripsina, tripsina
		Inibidor de glutamina peptidase II	<i>Momordica charantia</i>	Protease de <i>S. griseus</i> , subtilisina
		Inibidor de subtilisina – quimotripsina CI – 1A	<i>Hordeum vulgare</i>	Subtilisina, quimotripsina
		Inibidor de subtilisina – quimotripsina em trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Subtilisina de <i>B. licheniformis</i> , $\alpha$ -quimotripsina
Mostarda	118	Inibidor de tripsina em mostarda	<i>Sinapis Alba</i>	$\beta$ - tripsina
		Inibidor de tripsina em mostrada 2	<i>Brassica hirta</i>	$\beta$ – tripsina bovina; $\alpha$ - quimotripsina
		Inibidor de tripsina	<i>Brassica napus</i>	Tripsina, quimotripsina
Cistatina	125B	Oncocistatinas	<i>Onchocerca volvulus</i>	Cisteinoproteinase
		Ovocistatinas	<i>Gallus gallus</i>	Tiol protease
Cininogênio	125C	Oryzacistatinas II	<i>Oryza sativa</i>	Cisteinoproteinase
		Inibidor de metaloproteinase	<i>Bothrops jararaca</i>	Atrolisina C, jararhagin
Bowman – Birk	112	Sarcocistatinas	<i>Sarcophaga peregrina</i>	Cisteinoproteinase
		Inibidor de tripsina Bowman-Birk unidade 1	<i>Glicine Max</i>	Tripsina, quimotripsina
		Inibidor de tripsina / quimotripsina Bowman – Birk	<i>Arachis hypogaea</i>	Tripsina, quimotripsina
		Inibidor de tripsina cíclico de girassol	<i>Helianthus annuus</i>	Tripsina, catepsina G, elastase, quimotripsina e trombina
Batata II	120	Inibidor de proteinase II	<i>Solanum tuberosum</i>	Tripsina, quimotripsina
		Inibidor de peptidase de batata II unidade 1	<i>Solanum tuberosum</i>	Tripsina, quimotripsina
		Inibidor de peptidase de tomate II unidade 1 e 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tripsina, quimotripsina



### 2.4.1. Inibidores de serinoproteinases

Os inibidores de serinoproteinases são os mais bem caracterizados e isolados, sendo facilmente encontrados em várias espécies de plantas e em diferentes tecidos da mesma planta, por isso, são os mais estudados entre as classes de inibidores (Birk, 1985; Haq *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos com essas proteínas foram realizados em órgãos de reserva das plantas (sementes e tubérculos) e, posteriormente em folhas e frutos. A partir desses estudos, verificou-se que esses inibidores não participavam da proteólise de proteínas de reserva, mas que foram expressos em resposta a ataques de pragas e patógenos (Peng e Black, 1976; Xavier-Filho, 1993; Reeck *et al.*, 1997).

Atualmente, existem pelo menos 16 famílias de inibidores de serinoproteinases, sendo que 8 destas correspondem aos inibidores de origem vegetal (Tabela 4).

As famílias Bowman-Birk e Kunitz são as mais bem estudadas e podem ser encontradas em altas concentrações em sementes de leguminosas (Tabela 5) (Richardson, 1991; Mosolov e Valueva, 2005; Bhattacharyya *et al.*, 2006).

**Tabela 4** - Famílias de inibidores de serinoproteinases de origem vegetal.

Família	Monômero	
	(kDa)	1/2 Cys
STI Kunitz	21-22	4
Bowman-Birk	8-9	14
Batata I	8-9	0-2
Batata II	6	8
Abóbora	3	6
Cereal	12-13	10
Ragi I-2	12-13	7-8
Thaumatina	22-23	16

Fonte: Adaptado de Richardson (1991) e Mosolov e Valueva (2005).

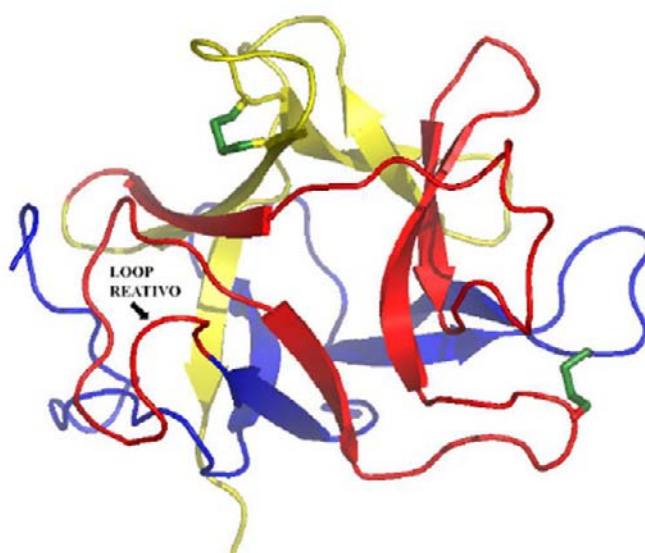
**Tabela 5** - Inibidores tipo Kunitz e Bowman-Birk.

<b>Família</b>	<b>Enzimas inibidas</b>	<b>Distribuição</b>
Kunitz	Tripsina, quimotripsina, elastase, subtilisina, calicreína	Fabaceae, Poaceae, Solanaceae
Bowman-Birk	Tripsina, quimotripsina, elastase	Fabaceae, Poaceae, Compositae, Aliaceae

Fonte: Mosolov e Valueva, 2005.

### **Inibidores Kunitz**

Os inibidores tipo Kunitz ocorrem, predominantemente, em leguminosas, batatas e cereais, podendo ser encontrados em todas as partes das plantas. Nas leguminosas, esses inibidores apresentam cadeia polipeptídica única, apresentando como característica geral massa molecular em torno de 20 kDa (Figura 2) (Richardson, 1991).



**Figura 2** - Estrutura tridimensional do inibidor de tripsina do tipo Kunitz extraído de soja (STI Kunitz). Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).

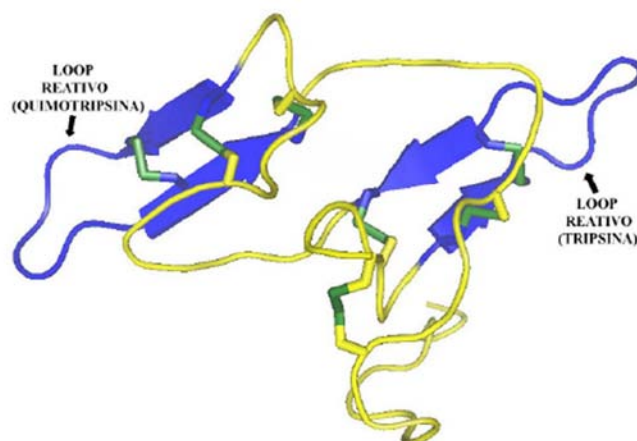
Contudo, na subfamília Mimosoideae são compostos por duas cadeias, uma alfa (16 kDa) e uma beta (5 kDa), ligadas entre si por pontes dissulfeto, resultantes de um processamento proteolítico de um precursor de cadeia única (Richardson, 1991). Adicionalmente, estes tipos de inibidores apresentam baixo conteúdo de cisteína (normalmente quatro resíduos formando duas pontes dissulfeto intracadeia) e um único sítio reativo que lhes permite inibir somente uma molécula de enzima, formando um complexo 1:1 (inibidor:enzima), geralmente, inibindo a tripsina. Contudo, muitos inibem a quimotripsina fracamente, bem como podem ser ativos contra outras classes de enzimas, que não serinoproteínases, tais como papaína e bromelaína (proteínases cisteínicas) (Birk, 1994; Terada *et al.*, 1994; Valueva *et al.*, 1997; Haq *et al.*, 2004).

### **Inibidores Bowman-Birk**

Os inibidores Bowman-Birk foram os primeiros inibidores de tripsina de sementes a terem suas sequências de aminoácidos determinadas, descrita por Bowman e caracterizada por Birk em 1946 (Figura 3) (José, 2002; Mello *et al.*, 2002; Mosolov e Valueva, 2005; Ragg *et al.*, 2006).

Os inibidores desta família são extensivamente encontrados em plantas que pertencem às famílias Fabaceae e Poaceae e são caracterizados por apresentarem massa molecular variando de 8 a 10 kDa e pela presença, em sua grande maioria, de dois domínios ou sítios inibitórios, podendo também ser encontrados inibidores com três, quatro e oito domínios (Richardson, 1991; Birk, 1994; Gariani e Leatherbarrow, 1997; Miller *et al.*, 2000).

Os dois domínios inibitórios, característicos desses inibidores, são formados devido a presença de cisteínas, aproximadamente 14 resíduos desse aminoácido, em sua estrutura protéica, as quais formam 7 pontes dissulfeto intracadeia, permitindo a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois domínios independentes, capazes de inibir simultaneamente duas moléculas de tripsina ou ainda uma molécula de tripsina e outra de quimotripsina ou elastase, formando os complexos 1:2 (inibidor: tripsina: tripsina) ou 1:1:1 (inibidor: tripsina: quimotripsina/elastase), localizados em extremos opostos da molécula (Figura 3) (Tsunogae *et al.*, 1986; Gariani e Leatherbarrow, 1997).

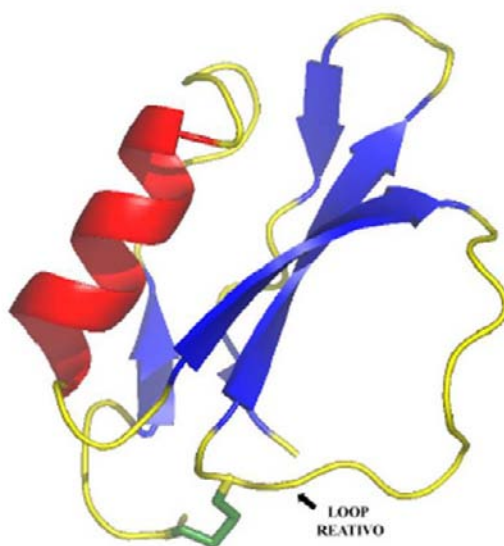


**Figura 3** – Representação da estrutura tridimensional de um inibidor do tipo Bowman-Birk. Fonte: Krauchenco (2005).

A posição dos domínios inibitórios é importante na definição da especificidade à enzima a ser inibida. Neste sentido, a inibição da tripsina está relacionada à presença de lisina ou arginina nos domínios, enquanto que a inibição da elastase está relacionada à presença de alanina e os inibidores de quimotripsina apresentam tirosina, arginina, leucina, fenilalanina ou metionina (Odani e Ikenaka, 1978; Prakash *et al.*, 1996; Mosolov e Valueva, 2005).

### **Inibidores do tipo batata I**

Os inibidores batata I podem ser encontrados em tecidos vegetais e animais, apresentam massa molecular variando entre 8 e 10 kDa e são constituídos de uma única cadeia polipeptídica, consistindo de, aproximadamente 70 – 71 resíduos de aminoácidos, com baixo teor de cisteína, formando uma única ponte dissulfeto (Figura 4). Essas proteínas são caracterizadas por inibirem fortemente a quimotripsina, a subtilisina e em menor grau a tripsina, por apresentarem em seus sítios reativos resíduos de metionina, leucina e ácido aspártico e pelo alto grau de homologia como inibidor de quimotripsina isolado de tubérculos de batatas (Richardson, 1991; Heitz *et al.*, 1993).



**Figura 4** - Estrutura tridimensional do inibidor tipo batata I extraído de *Cucurbita maxima*. Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).

### **Inibidores do tipo batata II**

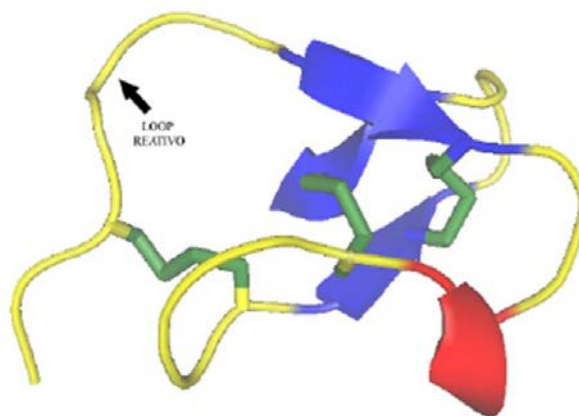
Os inibidores de batata II apresentam massa molecular em torno de 12 kDa e são constituídos de 96 – 98 resíduos de aminoácidos, contendo alto teor de cisteína, formando, aproximadamente, 6 pontes dissulfeto (Figura 5). Esses inibidores são caracterizados por inibir, principalmente a subtilisina, podendo também inibir a quimotripsina e a tripsina e por apresentarem em seus sítios reativos resíduos de arginina e asparagina (Mosolov e Valueva, 2005). Adicionalmente, esses inibidores são comumente encontrados em batatas, em mostardas e folhas de tomateiro. Contudo, estudos ainda não comprovaram sua presença em sementes (Richardson, 1991; Antcheva *et al.*, 1996).



**Figura 5** - Estrutura tridimensional do inibidor tipo batata II extraído de *Nicotiana glauca*. Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).

### **Inibidores do tipo abóbora**

Os inibidores tipo abóbora compreendem a menor família dos inibidores proteolíticos e têm sido isolados de sementes da família Curcubitaceae (Figura 6). Esses inibidores apresentam massa molecular em torno de 4 kDa e são constituídos de, aproximadamente, 27 - 34 resíduos de aminoácidos, formando apenas 3 pontes dissulfeto. Essas proteínas são caracterizadas por inibirem, principalmente, a tripsina e por apresentarem em seus sítios reativos resíduos de arginina, isoleucina e lisina (Richardson, 1991; Otlewski e Krowarsch, 1996).



**Figura 6** - Estrutura tridimensional do inibidor tipo abóbora extraído de *Cucurbita maxima*. Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).

### **Inibidores do tipo cereal**

Inibidores desta família têm sido descritos detalhadamente em trigo, mas também já se tem relatos de sua presença em arroz, milho, sorgo, cevada e centeio. Estas moléculas são caracterizadas por apresentarem atividade inibitória sobre a tripsina e  $\alpha$ -amilase, sendo esta última, característica comum a um grande número de indivíduos da família (Figura 7). Em alguns casos são ativas contra duas ou mais classes de enzimas, e por esta razão são classificadas como bifuncionais (Franco *et al.*, 2002; Gourinath *et al.*, 2000; Habib e Fazili, 2007).

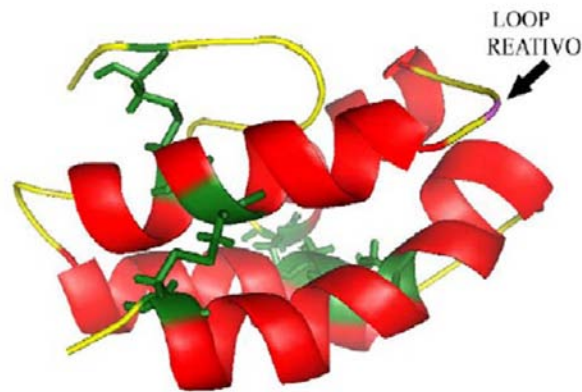
Os inibidores de tripsina/ $\alpha$ -amilase encontrados em cereais consistem em uma simples cadeia polipeptídica, contendo 5 pontes dissulfeto e massa molecular em torno de 13 kDa (Christeller e Liang, 2005; Habib e Fazili, 2007).



**Figura 7** - Estrutura tridimensional do inibidor da família cereal extraído de *Eleusine coracana gaertneri*. Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).

### **Inibidores do tipo ragi I-2**

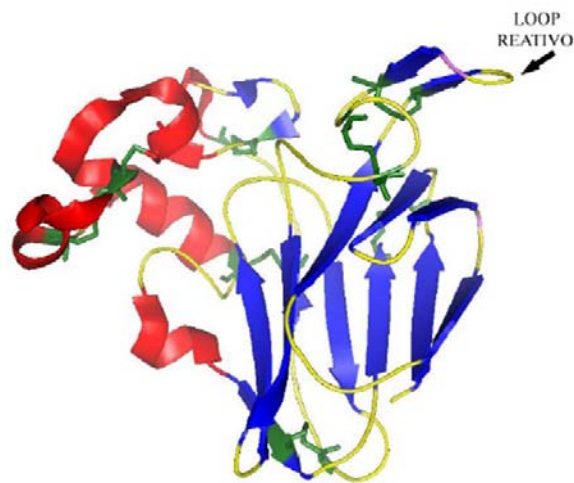
Inibidores desta família foram inicialmente isolados de sementes de *Eleusine coracana* e correspondem a um segundo inibidor de  $\alpha$ -amilase extraído desta espécie, sendo que o primeiro pertencente à família de inibidores do tipo cereal. Adicionalmente, a sequência de aminoácidos, desses dois inibidores, é completamente diferente, onde a similaridade do primeiro inibidor com o de outros cereais indica que os inibidores do tipo ragi I-2 pertencem a uma nova e separada família (Figura 8) (Richardson, 1991).



**Figura 8** - Estrutura tridimensional do inibidor da família rafi I-2 extraído de *Hordeum vulgare*. Note como a estrutura dessa família é bem diferente da família cereal, não contendo folhas  $\beta$  - pregueadas. Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).

### **Inibidores do tipo taumatina**

Os inibidores desta família são proteínas com massa molecular de, aproximadamente, 22 kDa e apresentam significativa similaridade com a sequência das “proteínas relacionadas com patogênese” (também denominadas PR-proteínas). Estas proteínas têm sido obtidas de frutos de *Thaumatococcus danielli*, no entanto, o inibidor mais bem caracterizado desta família é o inibidor bifuncional isolado de *Zea mays*, o qual inibe  $\alpha$ -amilases de insetos e tripsinas de mamíferos (Figura 9) (Franco *et al.*, 2002).



**Figura 9** - Estrutura tridimensional do inibidor da família taumatina extraído de *Zea mays*. Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).



#### 2.4.2. Inibidores de cisteínoproteinases

Essa classe de inibidores pode ser encontrada em diversos organismos vivos, incluindo plantas, microorganismos e animais. Nas plantas essas proteínas são responsáveis pela inibição da atividade da papaína, actinidina ou bromelaína, sendo a inibição da papaína uma das mais bem estudadas dessa classe (Xavier-Filho, 1992; Oliveira *et al.*, 2003).

Os membros desta família também são chamados de cistatinas e estão agrupados em quatro famílias (cistatina I, cistatina II, cistatina III e cistatina IV), baseadas na similaridade das seqüências primárias, nas massas moleculares, no número de pontes dissulfeto e na localização subcelular (Oliveira *et al.*, 2003).

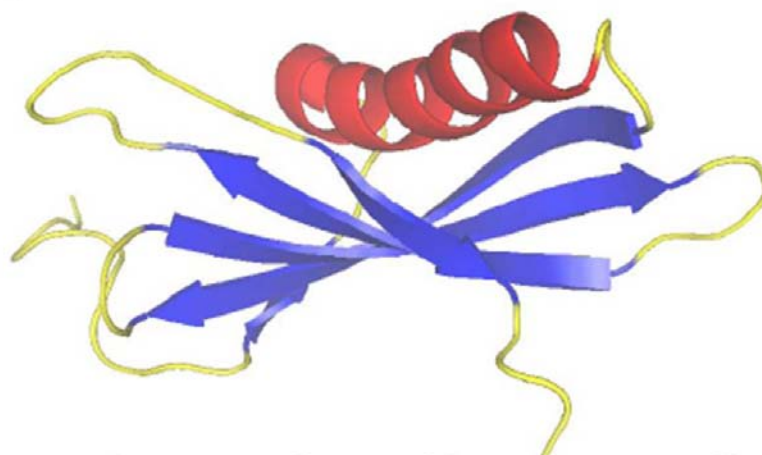
A família cistatina I é também denominada família stefina e ocorre, geralmente, no citosol, sendo caracterizada por apresentar massa molecular em torno de 11 kDa, com aproximadamente, 100 resíduos de aminoácidos e por não conter pontes dissulfeto (Figura 10) (Machleidt *et al.*, 1983; Oliveira *et al.*, 2003).

A família cistatina II consiste em proteínas com massa molecular entre 13 – 24 kDa, que apresentam aproximadamente 115 resíduos de aminoácidos, formando duas pontes dissulfeto. Estes inibidores apresentam um tripeptídeo conservado, com a seqüência de Phe – Ala – Val posicionado no C – terminal e um dipeptídeo conservado, Phe – Tyr, posicionado no N – terminal, sendo a conservação desses peptídeos essencial para a inibição da atividade de proteinases (Machleidt *et al.*, 1983; Turk *et al.*, 1997; Grzonka *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003).

Os inibidores da família cistatina III compreendem os cininogênios, caracterizados por serem glicoproteínas com importante função nos processos de coagulação sanguínea. Esses inibidores compreendem o grupo de cistatinas mais complexo, apresentando altas massas moleculares (60-120 kDa), e são conhecidas por conterem domínios resultantes de duplicações do material genético da família cistatina II (Salvesen *et al.*, 1986; Oliveira *et al.*, 2003).

Os inibidores da família cistatina IV são designados fitocistatina e representam todos os inibidores de cisteínoproteinases descritos em plantas, sendo amplamente identificados em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Estas proteínas apresentam massa molecular variando de 5 a 87 kDa e estão divididas em dois grupos, um constituído de um único domínio (compreendendo a maioria das fitocistatinas) e o outro constituído de múltiplos domínios (compreendendo os

inibidores isolados de tubérculos de batata e de folhas de tomate) (Walsh e Strickland, 1993; Pernas *et al.*, 1998; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).



**Figura 10** - Estrutura tridimensional da oryzacistatina extraída de arroz (*Oryza sativa japonica*). Fonte: Krauchenco (2005).

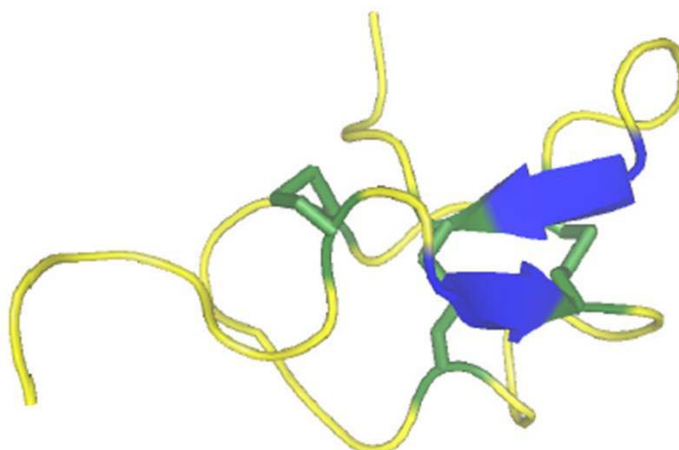
#### 2.4.3. Inibidores de proteinases aspárticas

O grupo de inibidores de proteinases aspárticas tem sido pouco estudado devido sua rara ocorrência, sendo as famílias de inibidores de catepsina e de pepsina as que melhor representam esse grupo. Dentre essas duas famílias, a catepsina D foi primeiramente isolada de batata (*Solanum tuberosum*), mas também, encontrada em várias outras plantas (Haq *et al.*, 2004). Estas proteínas são inibidoras efetivas de tripsina e quimotripsina, em virtude do elevado grau de similaridade com os inibidores da família Kunitz, contudo, apresentam massa molecular em torno de 27 kDa (Hannapel, 1993; Lawrence e Koundal, 2002).

#### 2.4.4. Inibidores de metaloproteinases

Os inibidores de metaloproteinases em plantas são representados pela família de inibidores de metalocarboxipeptidases, extraídos de tomates e batatas (Figura 11). Essas proteínas são relativamente pequenas, apresentam massa molecular em torno de 4,2 kDa, consistem em até 38 – 39 resíduos de aminoácidos e possuem três pontes dissulfeto (Hass e Hermodson, 1981; Graham e Ryan, 1997).

Esses inibidores são capazes de inibir fortemente uma ampla variedade de carboxipeptidases provenientes de animais e microorganismos, mas não inibem as carboxipeptidases provenientes de plantas (Habib e Fazili, 2007).



**Figura 11** - Estrutura tridimensional do inibidor de metalocarboxipeptidase de batata (*Solanum tuberosum*). Pontes dissulfeto são coloridas em verde. Fonte: Krauchenco (2005).

## 2.5. Espécies estudadas

A família Fabaceae compreende a terceira maior família botânica juntamente com a Orchidaceae e a Asteraceae, caracterizada por ser vasta, cosmopolita e geologicamente antiga, representando uma das principais e mais importantes famílias de plantas, sendo a mais numerosa em espécies e gêneros nativos (Silva e Souza, 2002; Ferreira *et al.*, 2004).

Sua importância econômica é grande e muito diversificada, sendo utilizada desde a alimentação humana e animal até na produção de corantes, óleos, perfumes, inseticidas, além de apresentar uso medicinal, agrônomo (enriquecimento de solos), ornamental e, principalmente, para produção de madeiras nobres e valiosas usadas na marcenaria e em construções em geral (Ferreira *et al.*, 2004). As leguminosas também são apontadas como uma das principais fontes para a produção de proteína vegetal, particularmente para os países subdesenvolvidos (Lima *et al.*, 1994).

A família Fabaceae está dividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (antiga Papilionoideae), com boa parte de suas espécies, originalmente pertencentes à flora brasileira, assumindo os mais diversificados habitats (como várzeas, savanas, campinas e campinaranas amazônicas) ou formas vegetativas de vida e inclui árvores de pequeno a grande porte, arbustos, cipós e ervas (Polhill e Raven, 1981; Barroso *et al.*, 1991; Joly, 1993; Silva e Souza, 2002).

Neste estudo a família Fabaceae está representada pela *Parkia pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga*, *P. nitida* e *Enterolobium schomburgkii*.

### 2.5.1. *Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex Walp.

A espécie *Parkia pendula*, conhecida vulgarmente por “visgueiro”, pertence à subfamília Mimosoideae e pode ser encontrada na América Central e norte da América do Sul, com ocorrência nas matas primárias ou secundárias da região amazônica, sul da Bahia, norte do Espírito Santo, Pernambuco e Alagoas (Rosa e Cavalcanti, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Pinedo e Ferraz, 2008).

É uma espécie arbórea, de dossel, com copa plana e vistosa, com cascas sempre vermelhas. O fato de pertencerem à família Fabaceae desperta interesse agrônomo, em vista da característica de fixação simbiótica de nitrogênio, importante para compor sistemas silvipastoris ou para o plantio em áreas degradadas, além de ser essencial para a restauração ambiental da Amazônia, mediante sua importância para a comunidade de pássaros e mamíferos, atraídos pela produção de sementes e resinas das vagens (Souza Filho *et al.*, 2005; Pinedo e Ferraz, 2008).



**Figura 12** - A espécie *P. pendula*. A: Árvore; B: Fruto; C: Sementes (Fotos: Chevreuril, L.R.).

### 2.5.2. *Parkia discolor* Spruce ex Benth

A espécie *Parkia discolor*, também é conhecida por visgueiro-do-igapó, arara-tucupi e faveira, pertence à subfamília Mimosoideae e apresenta ocorrência em floresta inundável de igapó da região Amazônica, com alta dominância no Rio Negro (Hopkins, 1983; Hopkins 1986; Parolin *et al.*, 2004).

Consiste em uma espécie de porte pequeno a médio, com copa irregular, aberta e com galhos longos e tortuosos (Hopkins, 1986). Além do potencial interesse econômico comum às espécies pertencentes à família Fabaceae, a *Parkia discolor*, também é utilizada na medicina popular e na produção de goma (Souza e Silva, 2003).



**Figura 13** - A espécie *P. discolor*. A: Copa da árvore; B: Fruto; C: Sementes (Fotos: Souza, L.A.G. e Chevreuil, L.R.).

### 2.5.3. *Parkia multijuga* Benth

A espécie *Parkia multijuga*, também conhecida por faveira, paricá grande da terra firme, benguê, arara-tucupi e visgueiro, pertence à subfamília Mimosoideae, apresenta ampla distribuição em toda a Amazônia, com ocorrência em mata primária ou secundária e várzea altas em solo argiloso de toda região Amazônica (Lorenzi, 1992; Ramos *et al.*, 2000; Lorenzi, 2008).

É uma espécie arbórea de grande porte, de fuste cilíndrico e casca cinza ou avermelhada, exudando resina. Seu principal potencial econômico está voltado ao seu valor madeireiro (Nascimento *et al.*, 2003).



**Figura 14** – A espécie *P. multijuga*. A: Árvore; B: Fruto e semente (Fotos: Chevreuil, L.R.).

#### 2.5.4. *Parkia nitida* Miq.

A espécie *Parkia nitida*, também conhecida como fava benguelê, arara tucupi, faveira branca, visgueiro, pertence à subfamília Mimooideae, apresenta ocorrência na floresta pluvial Amazônica, no sul do Panamá, leste da Venezuela e Guianas e é caracterizada por ser uma espécie de grande porte, de fuste cilíndrico, com copa arredondada, sendo sua madeira fácil de trabalhar, o que justifica o seu potencial madeireiro (Hopkins, 1986).



**Figura 15** – A espécie *P. nitida*. A: Fruto e B: Sementes (Fotos: Souza, L.A.G. e Chevreuil, L.R.).

### 2.5.5. *Enterolobium schomburgkii* (Benth) Benth

É uma espécie extensamente explorada na região amazônica, conhecida comercialmente como sucupira amarela ou orelha de macaco, pertence à subfamília Mimosoideae e pode ser encontrada no Brasil, na Bolívia, na Guiana Francesa, no Peru e na Venezuela, com ocorrência nas matas de terra firme da Região Amazônica (Souza e Varela, 1989).

A orelha de macaco é uma espécie com alto valor comercial em virtude de suas qualidades, apresentando alto peso específico, boa trabalhabilidade sendo, portanto, muito utilizada em construções em geral, marcenaria e para a produção de dormentes (Souza e Varela, 1989).



**Figura 16** – A espécie *E. schomburgkii*. A: Árvore; B: Fruto e semente (Fotos: Chevreuil, L.R.).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Bioprospectar inibidores proteolíticos e caracterizar parcialmente suas propriedades bioquímicas em extratos e frações de sementes de leguminosas arbóreas da flora Amazônica.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o rendimento protéico dos diferentes métodos de extração de proteínas em sementes de leguminosas arbóreas;
- Purificar e caracterizar parcialmente os inibidores proteolíticos;
- Monitorar o perfil protéico dos extratos totais e das frações com atividade inibitória.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Coleta de material biológico**

Sementes inteiras e maduras das espécies *Parkia pendula* e *Enterolobium schomburgkii* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, de *Parkia discolor* na Reserva Ecológica de Anavilhanas, *Parkia nitida* no Tarumã-Mirim e *Parkia multijuga*, proveniente da Associação das Indústrias Exportadoras de Madeiras do Estado do Pará (AIMEX).

### **4.2. Isolamento de proteínas**

As sementes inteiras foram trituradas em moinho analítico até a obtenção de um material finamente pulverizado, o qual foi utilizado nas etapas posteriores, que estão apresentados na figura 17.

#### **4.1.1. Extração salina**

O material finamente pulverizado (30 g) foi homogeneizado em 300 mL de NaCl 0,15M (10% p/v). A suspensão foi mantida sob leve agitação durante 2 horas, centrifugada a 5000 g, durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada, durante 48 horas, para a retirada do sal e, posteriormente, liofilizado, resultando no extrato total (ET).

#### **4.1.2. Precipitação por acetona 80%**

Ao extrato total, proveniente da etapa anterior, foi adicionado lentamente acetona, sob agitação a 4°C, até a concentração final de 80% (v/v).

Após o período de decantação (30 minutos), parte da acetona foi retirada e a fração restante foi centrifugada a 3000 g, durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado protéico foi espalhado em placas de Petri e seco à temperatura ambiente, resultando no precipitado cetônico (PA).

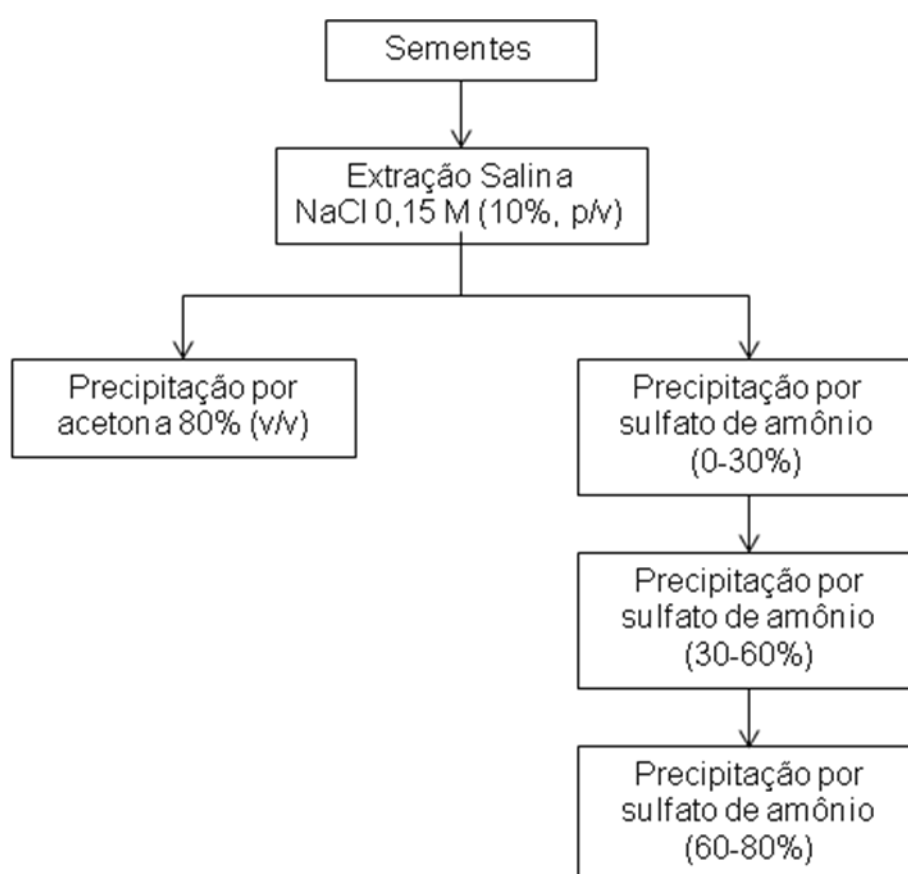
#### **4.1.3. Precipitação por sulfato de amônio**

O extrato total, proveniente da extração salina, foi primeiramente submetido a 0-30% de saturação com sulfato de amônio, onde após 12 horas, a mistura foi centrifugada a 8.000 x g, durante 20 minutos a 4°C, obtendo-se o sobrenadante I (SI) e o precipitado I (PI).

Parte do SI foi precipitado a 30-60% de saturação, e após 12 horas, seguiu-se o mesmo procedimento de centrifugação, obtendo-se o sobrenadante II (SII) e o precipitado II (PII).

Em seguida, parte do SII foi precipitado a 60-80% de saturação, seguindo-se o mesmo procedimento da etapa anterior, obtendo-se o sobrenadante III (SIII) e o precipitado III (PIII).

Os sobrenadantes (SI, SII e SIII) e os precipitados (PI, PII e PIII) foram dialisados contra água destilada e liofilizados.



**Figura 17** – Fluxograma das etapas de extração de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia.

## 4.2. Purificação dos inibidores proteolíticos

### 4.2.1. Preparo da resina de tripsina-Sepharose 4B

A enzima tripsina bovina foi acoplada ao gel de Sepharose ativado com CNBr de acordo com as recomendações do fabricante (GE). Para seu preparo, pesou-se 1g da resina para cada 3,5 mL final de gel. O pó foi ressuspensionado em 10 mL de HCl

1mM e lavado durante 15 minutos em funil de Büchner, sendo filtrado várias vezes com auxílio de uma bomba a vácuo.

Para a ligação da tripsina à resina, dissolveu-se 10 mg da enzima por mL de gel, em tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 8,3, contendo NaCl 0,5 M. A solução de tripsina foi então adicionada ao gel e incubada “overnight” a 4°C. Decorrido o tempo, o gel foi transferido para o tampão glicina 0,2 M pH 8,0 e deixada em repouso durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, o gel foi lavado em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 contendo NaCl 0,5M, alternando com a solução de bicarbonato de sódio 0,1 pH 8,3 contendo NaCl 0,5 M por cinco vezes, com a finalidade de se retirar o excesso de tripsina não acoplada à Sepharose.

#### **4.2.2. Cromatografia de afinidade em tripsina - Sepharose 4B**

A resina foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 0,3 M de NaCl. Os extratos totais foram aplicados nesta coluna, sendo coletadas frações de 1,0 mL até que a absorbância permanecesse próxima de zero, subsequentemente, o material retido foi eluído com HCl 0,1 M, contendo NaCl 0,3 M. As frações com atividade inibitória foram reunidas, dialisadas contra água deionizada, liofilizadas e utilizadas nas etapas posteriores. O monitoramento do perfil cromatográfico foi realizado por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm (Espectrofotômetro UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences).

#### **4.3. Titulação dos sítios ativos das enzimas tripsina e quimotripsina**

A determinação da concentração efetiva de solução de enzima foi realizada conforme metodologia descrita por Chase e Shaw (1970) e Sampaio *et al.* (1984). Este método envolve a formação de um complexo acil-enzima estável e a liberação do p-nitrofenil, medido espectrofotometricamente.

A mistura de incubação consistiu em 15 µl do substrato NPGB (9,4 mM) e 100 µl de uma solução recém preparada de tripsina e quimotripsina (1 mg/mL em HCl 1 mM) em meio de tampão barbital 0,06 M pH 8,3, para um volume final de 1 mL. A reação foi monitorada a 410 nm (Espectrofotômetro UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences).

#### **4.4. Caracterização da atividade dos inibidores proteolíticos**

##### **4.4.1. Medida da inibição de tripsina**

A mistura de pré-incubação, para o volume final de 2 mL, foi constituída de 250 µl de tampão Tris/HCl 0,05 M pH 8,0, 50 µl de tripsina bovina (62 µg da enzima dissolvida em HCl 1mM) e 150 µl dos extratos provenientes das diferentes etapas de isolamento. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C. Decorrido o tempo descrito, 1 mL do substrato cromogênico DL–BAPNA (0,5 mM) foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada espectrofotometricamente a 410 nm (Espectrofotômetro UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). O cálculo da atividade inibitória foi realizado pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio.

##### **4.4.2. Medida da inibição de quimotripsina**

A mistura de pré-incubação, para um volume final de 2 mL, foi constituída de 500 µl de tampão Tris/HCl (pH 8,0), 150 µl de quimotripsina (0,2 mg da enzima dissolvida em HCl 1 mM) e 100 µl dos extratos provenientes das diferentes etapas de isolamento. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C. Decorrido o tempo descrito, 50 µl do substrato cromogênico BTPNA (0,1 M) foi adicionado e, após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada espectrofotometricamente a 410 nm (Espectrofotômetro UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). O cálculo da atividade inibitória foi realizado pela determinação da atividade residual da quimotripsina no ensaio.

#### **4.5. Determinação de proteína bruta**

A determinação de proteína bruta foi realizada pelo método de micro – Kjeldahl (Anderson e Ingram, 1993), a partir da quantificação de nitrogênio total e sua conversão utilizando o fator 5,71 (FAO, 1982; Ezeagu *et al.*, 2002).

Após secagem em estufa à 65°C, 100 mg do material pulverizado foi submetido à digestão, em um bloco digestor a 350°C, em uma mistura contendo selenito de sódio (0,25 g), sulfato de cobre (11,25 g), sulfato de sódio (47,5 g), ácido salicílico (1,25 g) e ácido sulfúrico (500 mL), até o material apresentar coloração esverdeada. Após a digestão e resfriamento das amostras procedeu-se a destilação, a qual foi

acrescentada água destilada (20 mL), hidróxido de sódio 40% (15 mL) e, separadamente, em um béquer a solução receptora contendo ácido bórico. Para a titulação utilizou-se solução de ácido sulfúrico a 0,01 N.

#### **4.6. Determinação de proteínas totais**

As amostras provenientes de cada etapa de isolamento de proteínas e as frações obtidas na etapa cromatográfica tiveram suas concentrações de proteínas dosadas segundo o método de Bradford (1976). Amostras de 50 µL do isolado protéico foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente com 2,5 mL do reagente de Bradford, sendo a concentração de proteínas estimadas em leitura em espectrofotômetro a 595 nm (Espectrofotômetro UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences).

#### **4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

O gel de poliacrilamida foi realizado, em condições não redutoras, segundo o método descrito por Laemmli (1970). Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8%, preparada com água deionizada e mantida em refrigeração em geladeira (10°C) em frasco âmbar.

O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, e o gel de separação 12,5%, em tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20%. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10%.

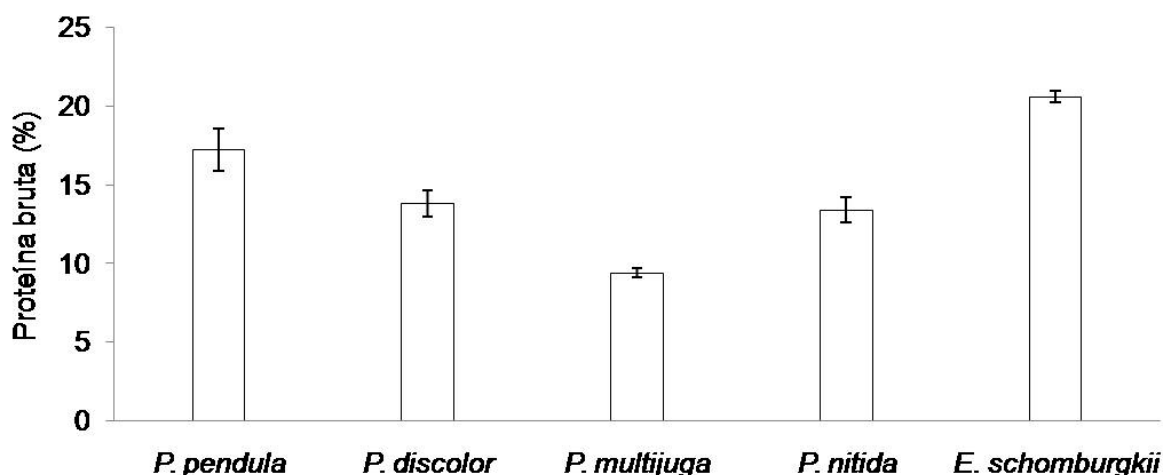
As amostras (50 µg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol, e posteriormente, foram imersas em água em ebulição durante 3 minutos e centrifugadas por mais 3 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 100 volts, 15 mA, durante 3 horas.

Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega (225 kDa - 10 kDa). Após os procedimentos de corrida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue, ácido acético 0,1%, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v), durante 3 horas e então descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Determinação de proteína bruta

A percentagem de nitrogênio total estimado nas sementes de *P. pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga*, *P. nitida* e *E. schomburgkii*, foi convertida em teor de proteína bruta multiplicando-se pelo fator 5,71 (Figura 18), visto que, o fator comumente utilizado (6,25) baseia-se na suposição de que 16% das proteínas animais são constituídas por nitrogênio, e desta forma, superestima a concentração de proteína em vegetais, que costumam apresentar um perfil de aminoácidos com predominância de átomos de nitrogênio maior que 1. Além disso, a presença de nitrogênio não protéico, na forma de compostos tais como ácidos nucleicos, glicosídeos nitrogenados, quitina e sais de amônio, representa outro fator importante para não recomendar o uso generalizado do fator 6,25 (FAO, 1982; Ezeagu *et al.*, 2002).



**Figura 18** – Teores de proteína bruta em sementes de leguminosas arbóreas da flora Amazônica. Concentração estimada pelo método de Kjeldahl.

Assim sendo, levando em consideração os argumentos descritos por Ezeagu *et al.* (2002) e por conseguinte aplicado o fator 5,71, os teores de proteína bruta estimados nas sementes das espécies estudadas variaram de, aproximadamente, 9% a 21%, sendo o menor teor encontrado para *P. multijuga* e o maior para *E. schomburgkii* (Figura 18).

Estudos realizados com oito espécies de leguminosas do cerrado demonstraram uma variação dos teores de proteína bruta de 9% a 30%, sendo as

maiores concentrações encontradas em sementes de *Acosmium subelegans*, *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* e *Crotalaria flavicoma* e as menores em *Andira laurifolia*, *Copaifera langsdorfii*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa* e *Inga uraguensis* (Sasaki, 2008). Contudo, a determinação de proteína bruta, em 10 outras espécies de leguminosas, mostraram uma diferença menor variando de aproximadamente 3% a 7% (Ezeagu *et al.*, 2002). Desta forma, o conteúdo de proteína bruta estimado nas sementes das espécies em estudo corrobora com resultados encontrados em outras espécies de leguminosas.

## 5.2. Determinação de proteínas totais

Os métodos aplicados para a extração protéica em sementes de *P. pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga*, *P. nitida* e *E. schomburgkii* corresponderam às técnicas comumente utilizadas para o isolamento de proteínas vegetais (Tabela 6). Dentre as técnicas utilizadas, a extração por meio de água, de soluções salinas e/ou ácidas e precipitação por solventes orgânicos ou por sais, têm sido empregadas para a obtenção de inibidores proteolíticos (Pando, 1999; Mello, 2001; Gomes, 2004).

**Tabela 6-** Teor de proteínas totais nos extratos das sementes de *P. pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga*, *P. nitida* e *E. schomburgkii*. Concentração estimada pelo método de Bradford.

	Concentração de proteínas (mg/g MF)							
	ET	PA	SI	PI	SII	PII	SIII	PIII
<i>P. pendula</i>	4,48	2,73	2,93	0,45	2,31	0,47	2,67	0,71
<i>P. discolor</i>	6,88	1,65	4,45	1,03	2,08	0,71	4,58	0,50
<i>P. multijuga</i>	5,39	3,76	4,50	0,27	2,37	0,80	5,16	2,22
<i>P. nitida</i>	8,25	2,10	3,22	0,33	2,63	0,60	1,50	0,82
<i>E. schomburgkii</i>	2,09	3,95	5,80	0,33	6,67	5,75	5,10	5,00

MF: massa fresca;

ET: extrato total;

PA: precipitado cetônico;

S: sobrenadante após saturação com sulfato de amônio;

P: precipitado após saturação com sulfato de amônio.

A espécie *P. pendula* apresentou maior concentração de proteínas no extrato total proveniente da etapa de extração em solução salina (ET). Contudo, no precipitado cetônico (PA) e sobrenadantes resultantes da precipitação por sulfato de amônio a 0-30% (SI), a 30-60% (SII) e 60-80% de saturação (SIII), houve pouca redução dos teores. Quanto aos precipitados oriundos da extração com sulfato de amônio a 0-30% (PI), 30-60% (PII) e 60-80% de saturação (PIII), nota-se drástica redução na percentagem de proteínas. Nos extratos de *P. discolor* observou-se um conteúdo protéico mais elevado em ET, SI e SIII, com significativa redução nas demais etapas.

Quanto à espécie *P. multijuga* verifica-se maiores concentrações de proteínas nos ET, SI e SIII, com expressiva redução dos teores em PI e PII. Por sua vez, a espécie *P. nitida* exibiu maiores valores de proteínas no ET e drástica redução nas demais etapas. No que diz respeito à espécie *E. schomburgkii*, elevados teores de proteínas foram observados nos extratos PA, SI, SII, PII, SIII e PIII, indicando que o isolamento de proteínas, para essa espécie, é mais efetivo utilizando métodos envolvendo a precipitação por solvente orgânico e sais (Tabela 6).

A diversidade de extratores utilizados, visando o isolamento de inibidores proteolíticos, tem sido demonstrada por diversos autores que empregaram técnicas de extração em água, em tampão PBS, precipitação por sulfato de amônio e precipitação por acetona, com a finalidade de isolar tais proteínas em sementes de *Tamarindus indica* e *Acacia victoriae*, respectivamente (Fook *et al.*, 2005; Ee *et al.*, 2008).

Considerando os diferentes métodos aplicados para a obtenção de inibidores proteolíticos, os resultados indicam que para as espécies do gênero *Parkia* a extração por meio de solução salina é suficiente para obter expressiva quantidade de proteínas, valendo ressaltar que este método proporciona maior rendimento, necessário para as etapas de purificação e caracterização dos inibidores, sendo este fator levado em consideração mesmo para *E. schomburgkii*, apesar do baixo conteúdo protéico no extrato total.

### **5.3. Determinação da atividade inibitória da tripsina**

O percentual da inibição da atividade da enzima tripsina, pelos inibidores presentes nos extratos de *P. pendula* demonstra que, dentre os diferentes métodos de extração, o PI e SII apresentaram a menor atividade inibitória, sendo 18% e 3%,



respectivamente, menores que a inibição detectada nas demais etapas de isolamento, as quais nota-se que não há diferença de atividade inibitória (Tabela 7).

**Tabela 7** - Inibição da atividade da tripsina bovina (%) sobre o substrato BAPNA pelos extratos das espécies em estudo, após diferentes etapas de isolamento.

	Inibição da tripsina bovina									
	<i>P. pendula</i>		<i>P. discolor</i>		<i>P. multijuga</i>		<i>P. nitida</i>		<i>E. schomburgkii</i>	
	%	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%	mg/g
ET	100	50,50	100	51,00	76	37,84	71	35,26	63	38,53
PA	100	37,04	100	33,78	73	26,17	48	15,34	ND	ND
SI (0-30%)	100	37,04	97	38,41	57	18,76	66	21,35	53	17,04
PI (0-30%)	82	29,45	49	18,66	63	20,58	29	8,58	41	12,97
SII (30-60%)	100	37,20	100	39,04	52	17,00	52	20,13	28	10,31
PII (30-60%)	97	34,26	52	19,51	57	18,75	19	6,76	ND	NI
SIII (60-80%)	100	34,01	39	14,55	52	16,79	11	3,40	20	7,17
PIII (60-80%)	100	33,91	29	10,60	36	11,33	1	0,789	7	1,79

mg/g: mg de tripsina inibida/ g da amostra

ET: extrato total

PA: precipitado cetônico

S: sobrenadante após saturação com sulfato de amônio

P: precipitado após saturação com sulfato de amônio

NI: Não inibe

A espécie *P. discolor* exibiu valores de atividade inibitória semelhantes à *P. pendula* na etapa ET, PA, SI e SII. No entanto, constatou-se redução drástica da percentagem inibitória em PI, PII, SIII e PIII. Estes resultados demonstram, em parte, a diferença de solubilização dos inibidores entre os extratores, onde a 60-80% de saturação de sulfato de amônio proporcionou perda de atividade de tais proteínas e, portanto, não é indicado para esta espécie.

As espécies *P. pendula* e *P. discolor* apresentaram valores elevados de inibição da tripsina, após serem submetidas aos diferentes métodos de extração (ET, PA, SI e SII). No entanto, constatou-se redução de 48% na atividade inibitória da

etapa PII de *P. discolor*. Além disso, essa espécie apresentou valores de inibição inferiores a 50% nas demais etapas de isolamento, que correspondem a PI, SIII e PIII.

Os métodos que envolveram extração em solução salina e precipitação por acetona demonstraram maior atividade inibitória sobre a tripsina em sementes de *P. multijuga*. Enquanto que nos demais extratos houve redução da atividade inibitória, que variou de 36 a 63% (Tabela 7).

As espécies *P. nitida* e *E. schomburgkii* exibiram maiores valores de inibição da tripsina nos extratos totais (ET). Adicionalmente, para *E. schomburgkii* o PA não inibiu a atividade da tripsina, corroborando com os resultados descritos na literatura, onde o fracionamento das proteínas com acetona pode acarretar a perda total ou parcial da atividade biológica dos inibidores (Mello, 2001; Pando, 2001). No entanto, inibidores de tripsina provenientes de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, ao serem extraídos com acetona, não perderam atividade sobre a tripsina, divergindo dos resultados encontrados para a espécie *E. schomburgkii*, apesar de serem representantes do mesmo gênero (Batista *et al.*, 1996).

Outros estudos também demonstram o isolamento de inibidores de tripsina, em sementes de leguminosas, por meio da acetona, sem haver perda da atividade biológica como, por exemplo, em *Leucaena leucocephala* e *Delonix regia* (Souza-Pinto, *et al.*, 1996; Pando *et al.*, 2001).

Essa diferença da atividade inibitória tem sido registrada na literatura, com estudos em que após extração em solução salina (NaCl 0,15 M), precipitação em acetona e saturação com sulfato de amônio, os resultados demonstraram maiores valores de inibição nas frações extraídas por sulfato de amônio, onde a espécie *Archidendron ellipticum* apresentou 96% de inibição da tripsina na faixa de 50-65% de saturação, enquanto que *Caesalpinia bonduc* apresentou 75,6% de inibição quando submetida à saturação de 30-60% (Bhattacharyya *et al.*, 2006; 2007).

Estudos com sementes de *Crotalaria pallida* e *Inga laurina* também comprovaram a diferença de atividade inibitória entre os diferentes métodos de extração, envolvendo tampão Tris-HCl e sulfato de amônio em diferentes saturações, onde os extratos submetidos à saturação de 30-60% renderam maiores valores de inibição (Gomes *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2007).

Quanto à detecção de inibidores proteolíticos em sementes de leguminosas pertencentes à flora amazônica, estudos preliminares demonstraram a presença de

inibidores de tripsina em sementes de *Tachigali plumbea*, *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Sesbania exasperata*, *Cedrelinga catenaeformis*, *Swartzia polyphylla* e *Peltogyne venosa*, sendo a atividade inibitória exibida pelos seus extratos de 96%, 95%, 84%, 69%, 43% e 34%, respectivamente (Bariani, 2008; Chevreuil *et al.*, 2009).

No que diz respeito à atividade inibitória expressa em miligrama de tripsina inibida por grama de amostra (Tabela 7), os valores obtidos confirmaram uma maior inibição da tripsina pelos extratos totais de todas as espécies, provenientes da extração salina. Estes resultados mostram altos valores de inibição, sendo, aproximadamente, duas vezes maiores que os encontrados para *Swartzia pickellii*, uma leguminosa pertencente à subfamília Caesalpinioideae (Cavalcanti *et al.*, 2002).

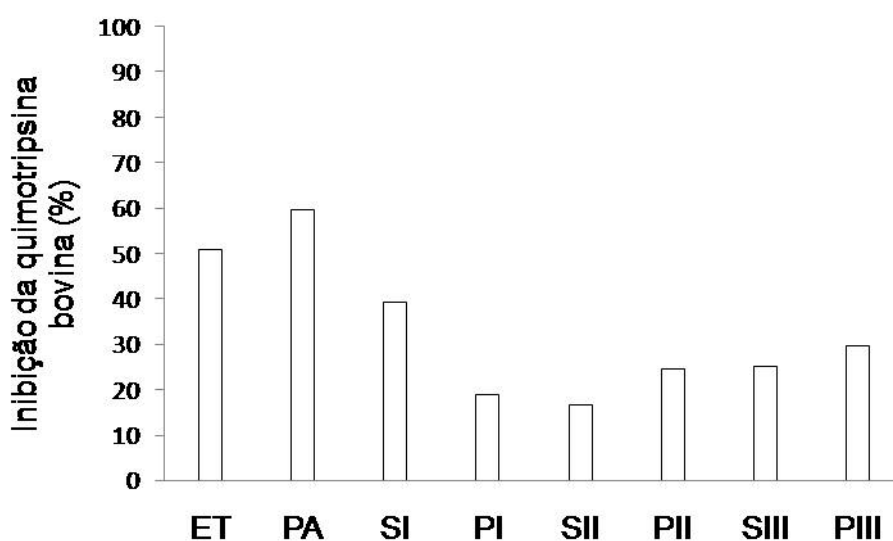
Nesse sentido, considerando que para todas as espécies investigadas neste estudo, a extração salina resultou em maior percentagem de atividade inibitória da tripsina, além de proporcionar maior rendimento, justifica-se a utilização deste procedimento na etapa de purificação.

#### **5.4. Determinação da atividade inibitória da quimotripsina**

Dentre as espécies estudadas, apenas a espécie *P. nitida* apresentou valor de atividade inibitória acima de 50% no extrato total, e portanto, justifica-se a realização da detecção dos inibidores de quimotripsina apenas nos extratos, provenientes das diferentes etapas de isolamento, dessa espécie (Figura 19).

A espécie *P. nitida* apresentou valores de atividade inibitória maiores que 50% sobre a quimotripsina bovina, após extração salina (ET) e precipitação com acetona (PA), sofrendo drástica redução nas demais etapas de isolamento.

Muitos estudos envolvendo inibidores e enzimas proteolíticas têm sido realizados com a finalidade de verificar o efeito biológico desses inibidores sobre proteinases de insetos, microorganismos, bem como no tratamento de doenças, como por exemplo, câncer e HIV. Adicionalmente, para tais estudos considera-se a concentração de inibidor capaz de promover a redução em 50% da atividade enzimática (IC<sub>50</sub>).



**Figura 19** – Inibição da atividade da quimotripsina bovina (%) sobre o substrato BTPNA pelos extratos de *P. nitida*, após diferentes etapas de isolamento. ET: extrato total; PA: precipitado cetônico; S: sobrenadante após saturação com sulfato de amônio e P: precipitado após saturação com sulfato de amônio.

Os resultados encontrados nos diferentes extratos de *P. nitida* divergem daqueles encontrados para a espécie *Derris trifoliata*, em que a atividade inibitória contra a quimotripsina aumentou após extração com sulfato de amônio à saturação de 0-75% (Bhattacharyya e Babu, 2009).

De fato, os inibidores vegetais apresentam variação quanto à especificidade inibitória, destacando-a os inibidores tipo Kunitz, que são potentes inibidores da tripsina e pouco específicos para quimotripsina (Garcia *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2007).

Resultados similares, quanto à diferença de inibição enzimática, foram encontrados por Norioka *et al.* (1988), esses autores, ao estudar a distribuição de inibidores de proteinases em sementes de leguminosas verificaram diferenças em algumas espécies como *Cassia tora*, *Delonix regia*, *Parkia speciosa* e *Crotalaria cratalia*, as quais inibiram a atividade da tripsina, mas não foram efetivas contra a quimotripsina. Por outro lado, espécies como *Caesalpinia pulcherrima*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa invisa* e *Sesbania cannabina* inibiram tanto a tripsina quanto a quimotripsina.

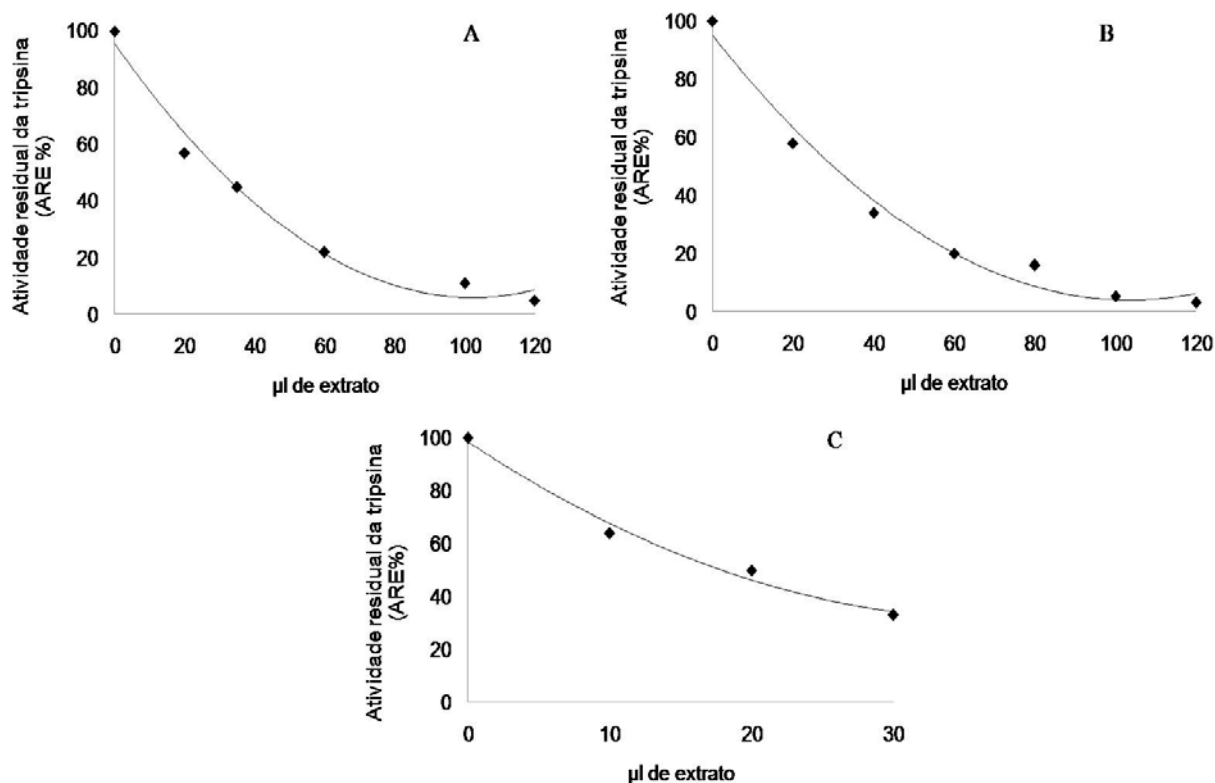
Lingaraju e Gowda (2008) e Ee *et al.* (2008) estudaram sementes de *Entada scandens* e *Acacia victoriae* e também observaram que os inibidores extraídos destas sementes inibiram somente a atividade da tripsina.

No que diz respeito aos estudos realizados com algumas espécies de leguminosas pertencentes à flora amazônica, já se tem relato de inibidores de quimotripsina e tripsina em extratos de sementes de *Cassia brasselari*, *Cassia occidentalis*, *Dialium guianense*, *Inga rubiginosa*, *Inga umbratica*, *Inga velutina* e *Mimosa guilandinae*, enquanto para *Inga fagifolia* e *Cassia grandis* a inibição foi específica contra a atividade da tripsina (Calderon *et al.*, 2001).

A diferença de especificidade de inibição enzimática é explicada mediante a formação de um complexo estável entre enzima e inibidor, o qual é dependente da interação de aminoácidos presentes no sítio reativo do inibidor com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, determinando uma interação altamente específica com suas enzimas proteolíticas alvo (Haq *et al.*, 2004; 2005). Desse modo, quando a posição P1 do sítio reativo for ocupado por um aminoácido lisina ou arginina, o inibidor será reconhecido pela tripsina, porém se o sítio reativo apresentar triptofano, fenilalanina, tirosina ou leucina, o inibidor será reconhecido pela quimotripsina. Assim, dependendo do tipo de resíduo de aminoácido no sítio reativo do inibidor, existe uma enzima específica que atua sobre este inibidor (Bode e Huber, 2000; Wesolowska *et al.*, 2001; Scarafoni *et al.*, 2008; Legowska *et al.*, 2009).

### **5.5. Curva de inibição da tripsina bovina**

A partir da extrapolação das curvas de inibição para o ponto de intersecção com a abscissa, pôde ser calculada a concentração de inibidor que promove a redução da atividade da tripsina na faixa de 50 a 60%. A inibição enzimática foi obtida na presença de, aproximadamente, 90 µg, 138 µg e 108 µg de proteínas dos extratos de *P. pendula*, *P. discolor* e *P. multijuga*, respectivamente (Figura 20).



**Figura 20** - Curva de inibição da tripsina bovina pelo extrato total (ET) de *P. pendula*, *P. discolor* e *P. multijuga*. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com BAPNA na presença de diferentes concentrações do inibidor. A: *P. pendula*, B: *P. discolor* e C: *P. multijuga*.

Adicionalmente, foi possível observar uma semelhança na curva de inibição de *P. pendula* e *P. discolor*, corroborando com os resultados encontrados por Sallai (1993), este autor ao estudar as espécies *Bauhinia forficata*, *Bauhinia rufa* e *Bauhinia unguolata*, observou superposição das curvas de inibição, indicando, desta forma, afinidade semelhante pela tripsina.

Considerando que a amostra obtida a partir de *E. schomburgkii* e *P. nitida* reduziram, respectivamente, apenas 37% e 39% a atividade da tripsina, não foi possível calcular o valor da constante de inibição, de acordo com o modelo proposto por Morrison (1982).

## 5.6. Determinação das constantes de inibição

Após a obtenção das curvas de inibição da tripsina pelos extratos totais de *P. pendula*, *P. discolor* e *P. multijuga*, foi possível determinar suas constantes de inibição de acordo com o procedimento de Morrison (1982) e adaptada ao programa computacional Enzfitter (Tabela 8). Este modelo é do tipo “slow tight-binding”, onde “slow” significa que a inibição não é imediata e “tight-binding” refere-se ao fato de que a inibição é significativa em concentrações próximas às das enzimas que está sendo inibida e, quanto menor for o  $K_i$ , mais forte será a interação entre inibidor e enzima, indicando a magnitude da afinidade entre enzima e inibidor.

**Tabela 8** – Constantes de inibição obtidas pelos extratos totais de *P. pendula*, *P. discolor* e *P. multijuga* sobre a tripsina bovina.

Espécies	$K_i$ (M)
<i>P. pendula</i>	$8,92 \times 10^{-8}$
<i>P. discolor</i>	$6,86 \times 10^{-8}$
<i>P. multijuga</i>	$6,15 \times 10^{-8}$

Os valores das constantes de inibição ( $K_i$ ) encontrados neste estudo corroboram com os resultados obtidos em outros trabalhos com inibidores vegetais, como por exemplo, os inibidores de *Pithecelobium dumosum*, *Plathymenia foliolosa* e *Albizzia kalkora*, as quais compreendem três espécies pertencentes à sub-família Mimosoideae e cujos valores de  $K_i$  foram  $1,65 \times 10^{-8}$  M;  $4 \times 10^{-8}$  M e  $2,5 \times 10^{-7}$  M, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

De modo geral, os inibidores de serinoproteinases apresentam inibição estritamente competitiva, sendo o complexo enzima-inibidor altamente estável, com valores de  $K_i$  variando entre  $10^{-8}$  a  $10^{-13}$  M (Richardson, 1991).

## 5.7. Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B

Os inibidores de tripsina presentes nos extratos totais das espécies em estudo foram parcialmente purificados e designados como PpTI, PdTI, PmTI, PnTI e EsTI, correspondentes às espécies *P. pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga*, *P. nitida* e

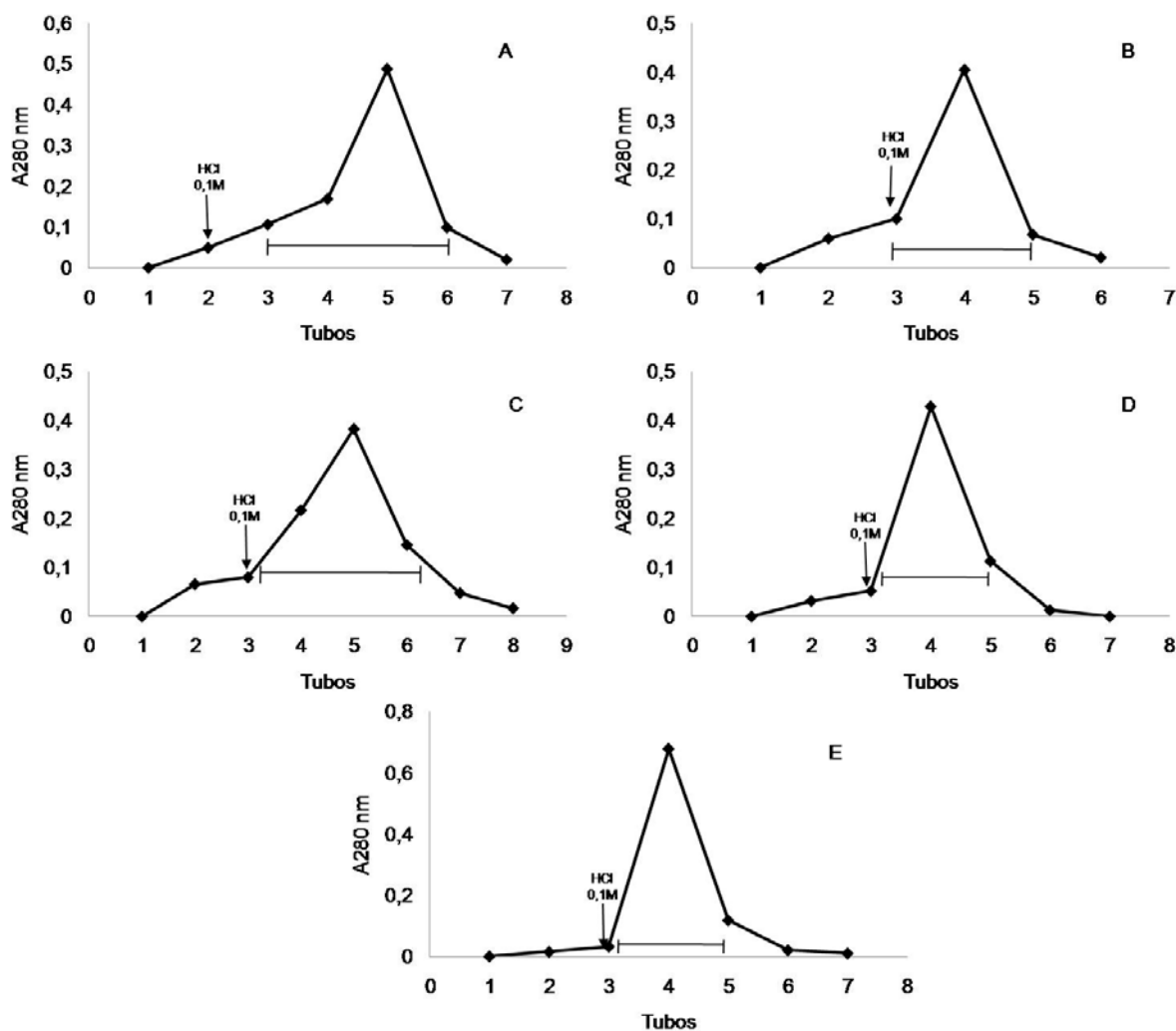
*E.schomburgkii* (Figura 21). Adicionalmente, tais inibidores apresentaram cerca de 99% de atividade antitriptica.

Muitos inibidores proteolíticos presentes nas sementes das mais variadas espécies de plantas são purificados e isolados com a utilização de técnicas cromatográficas. Desta forma, cromatografias de exclusão molecular, troca iônica, de afinidade e de fase reversa são amplamente utilizadas como passos obrigatórios durante o processo de purificação dos inibidores (Richardson, 1991; Mello, 2001).

Dentre essas técnicas cromatográficas, a de afinidade em colunas com proteinases imobilizadas é um método muito eficaz na purificação dessas proteínas. No entanto, uma desvantagem de sua utilização é que pode ocorrer a proteólise parcial do sítio reativo do inibidor, caso a tripsina não esteja imobilizada em uma forma inativa, podendo destruir a atividade do inibidor, ocasionando heterogeneidade nas preparações obtidas. Contudo, essa alteração pode ser evitada pela utilização de resinas com a proteinase específica imobilizada, como por exemplo, o uso de anidrotripsina - Sepharose (Belitz e Weder, 1990; Macedo *et al.*, 2000; Mello, 2001).

Com a finalidade de obter uma purificação total de inibidores proteolíticos, muitos pesquisadores têm aplicado várias técnicas cromatográficas. Nesse sentido, Liao *et al.* (2007) e Zhou *et al.* (2008) purificaram inibidores de tripsina de sementes de *Cassia obtusifolia* e *Albizia kalkora*, respectivamente, por meio da técnica de cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose e de exclusão molecular em Sephadex G-75. Contudo, Garcia *et al.* (2004) utilizaram, além dessas técnicas, a cromatografia em Sephadex G-100 e HPLC em coluna  $\mu$  - Bondapak C<sub>18</sub>, para a obtenção de um inibidor de tripsina totalmente purificado de sementes de *Poecilanthe parviflora*.





**Figura 21** - Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B. Amostra: aproximadamente 500 mg de extrato total. **A:** *Parkia pendula*; **B:** *Parkia discolor*; **C:** *Parkia multijuga*; **D:** *Parkia nitida* e **E:** *Enterolobium schomburgkii*. Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Tampão de eluição: HCl 0,1M/NaCl 0,3M. A eluição foi monitorada fotometricamente em A280 nm. (—) Fração com atividade inibitória.

Na tabela 9 ilustra-se a atividade total e específica dos extratos totais e das frações, das espécies em estudo, após a etapa de isolamento por meio da extração salina e purificação em tripsina-Sepharose 4B.

A atividade específica dos inibidores aumentou após a etapa de purificação, sendo este resultado esperado, uma vez que é um indicativo do grau de pureza, além de corroborar com os dados de purificação encontrados na literatura, como por

exemplo, para *Pithecelobium dumosum* e *Crotalaria pallida* (Gomes *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007).

**Tabela 9** – Determinação de proteínas, inibidores e atividade específica dos extratos totais e frações de *P. pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga*, *P. nitida* e *E. schomburgkii*.

Espécies	Etapas	Proteína total (mg/g MF)	Atividade total (UI/g MF)	Atividade específica (UI/ mg)
<i>P. pendula</i>	ET	4480,87	16,72	0,004
	PpTI	424,16	14,35	0,033
<i>P. discolor</i>	ET	6880,96	16,89	0,002
	PdTI	1198,71	14,29	0,012
<i>P. multijuga</i>	ET	5391,62	12,45	0,002
	PmTI	440,29	14,32	0,032
<i>P. nitida</i>	ET	8252,44	11,57	0,001
	PnTI	5666,21	14,29	0,002
<i>E. schomburgkii</i>	ET	918,25	11,78	0,013
	EsTI	1018,90	14,4	0,014

UI: Unidade de inibidor

ET: extrato total;

PpTI: inibidor de tripsina de *P. pendula*;

PdTI: inibidor de tripsina de *P. discolor*;

PmTI: inibidor de tripsina de *P. multijuga*;

PnTI: inibidor de tripsina de *P. nitida*;

EsTI: inibidor de tripsina de *E. schomburgkii*.

Zhou *et al.* (2008), após o fracionamento com sulfato de amônio (30-60%), obtiveram o valor de 965 de atividade total (UI) durante o processo de purificação do inibidor de tripsina de *Albizia kalkora*. Em seguida, esta fração foi aplicada em coluna Sepharose-tripsina, cujo valor de UI foi de 356, fato que permitiu a continuidade dos procedimentos de purificação. No entanto, neste estudo, foram utilizados os extratos totais provenientes da extração salina para a obtenção das frações em coluna de afinidade, uma vez que, o fracionamento com 30-60% de sulfato de amônio não

proporcionou rendimento e atividade inibitória necessários para a etapa cromatográfica.

### 5.8. Caracterização da atividade inibitória de PpTI, PdTI, PmTI, PnTI e EsTI

A caracterização da atividade inibitória de PpTI, PdTI, PmTI e EsTI sobre as enzimas, exibiram afinidade diferenciada entre as serinoproteinases, de modo que se observou uma alta inibição da tripsina, comparada à da quimotripsina (Tabela 10). Contudo, o PnTI mostrou-se um potente inibidor tanto para a tripsina quanto para a quimotripsina, sendo a diferença de inibição, entre essas duas serinoproteinases, de aproximadamente 11%, enquanto que PpTI não inibiu a atividade da quimotripsina.

**Tabela 10** – Especificidade de inibição de PpTI, PdTI, PmTI, PnTI e EsTI sobre as enzimas tripsina e quimotripsina bovina.

	Inibição (%)	
	Tripsina	Quimotripsina
<i>P. pendula</i>	99,4	ND
<i>P. discolor</i>	99,1	33,7
<i>P. multijuga</i>	99,3	53,2
<i>P. nitida</i>	99,1	88,3
<i>E. schomburgkii</i>	99,8	10,9

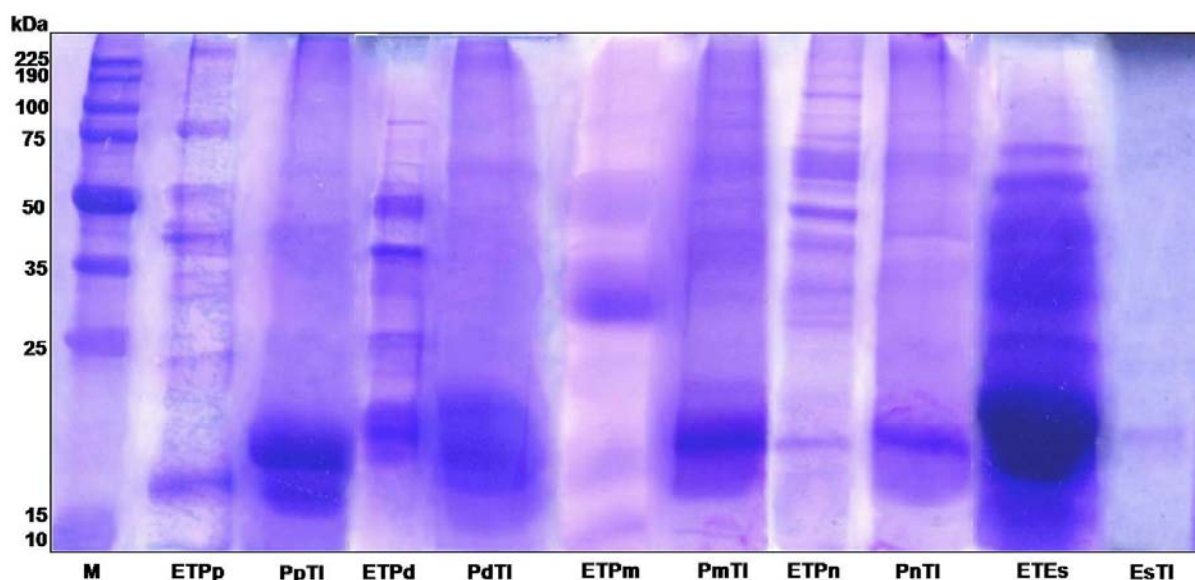
ND: Não detectado.

Esta variação da afinidade por diferentes enzimas proteolíticas também foi observada em estudos envolvendo o inibidor de tripsina isolado de sementes de *Poecilanthe parviflora* (Fabaceae) e o inibidor de tripsina-papaína de *Pithecelobium dumosum* (Mimosoideae), os quais demonstraram forte inibição contra a tripsina, com valores percentuais próximos a 100%, e fraca inibição contra a quimotripsina e papaína, sendo seus respectivos valores percentuais de 40% e 10% para *P. parviflora* e de 10% e 49% para *P. dumosum* (Garcia *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007).

A atividade inibitória dos inibidores do tipo Kunitz é variável, e poucos inibidores desta família são específicos para a quimotripsina e não para a tripsina. Contudo, alguns inibidores tipo Kunitz podem inibir tanto a tripsina quanto a quimotripsina, diferindo em relação à afinidade inibitória (Macedo *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005).

### 5.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

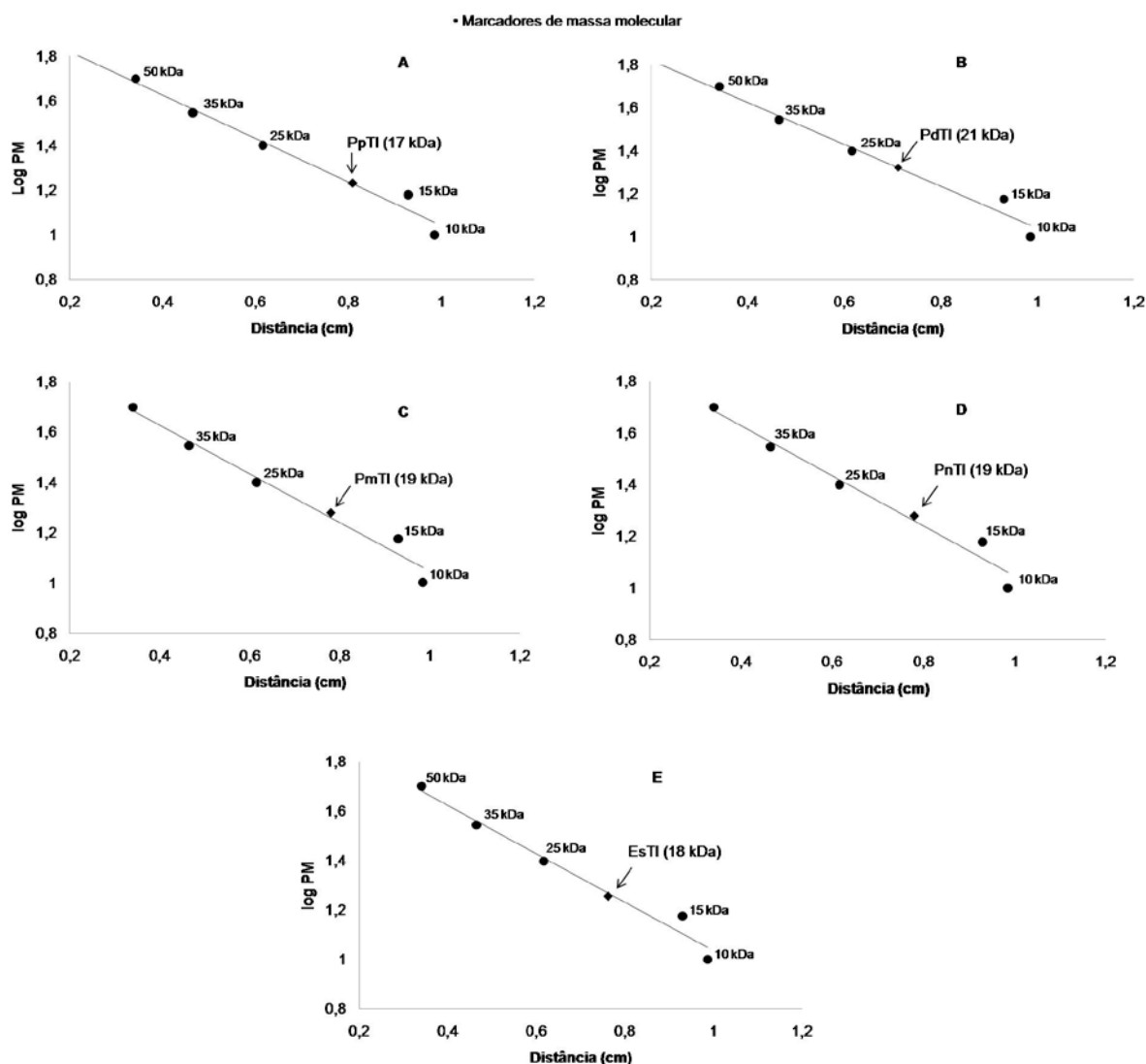
Em todas as espécies do gênero *Parkia* verifica-se a presença de uma banda principal, correspondente ao inibidor de tripsina. Contudo, são necessárias outras etapas cromatográficas para a obtenção de inibidores totalmente purificados (Figura 22).



**Figura 22** - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. M: Marcadores de massa molecular; ETPp: Extrato total de *P. pendula*; PpTI: Inibidor de *P. pendula*; ETPd: Extrato total de *P. discolor*; PdTI: Inibidor de *P. discolor*; ETPm: Extrato total de *P. multijuga*; PmTI: Inibidor de *P. multijuga*; ETPn: Extrato total de *P. nitida*; PnTI: Inibidor de *P. nitida*; ETEs: Extrato total de *E. schomburgkii*; EsTI: Inibidor de *E. schomburgkii*. Amostras: 50 µg.

No que diz respeito à espécie *E. schomburgkii* foi possível observar uma única banda protéica, o que significa maior grau de pureza, quando comparado às espécies *Parkia*. No entanto, esta banda apareceu pouco nítida no gel, indicando menor concentração da mesma (Figura 22).

Além do acompanhamento do grau de purificação dos inibidores, a eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu determinar a massa molecular aparente dos inibidores de tripsina presente nas sementes das espécies em estudo, sendo os valores encontrados de 17 kDa (PpTI), 21 kDa (PdTI), 19 kDa (PmTI e PnTI) e 18 kDa (EsTI) (Figura 23).



**Figura 23** - Determinação da massa molecular aparente do inibidor de *P. pendula* (A); *P. discolor* (B); *P. multijuga* (C); *P. nitida* (D) e *E. schomburgkii* (E).

Os valores das massas moleculares aparentes dos inibidores de tripsina das espécies em estudo variaram de 17 a 21 kDa, sugerindo que tais moléculas sejam inibidores do tipo Kunitz ou pertencente à família taumatina, sendo necessários estudos mais detalhados para confirmar estes resultados, como por exemplo, a sequência do N-terminal.

Estes resultados corroboram com a variação de massas moleculares de inibidores de tripsina do tipo Kunitz encontradas em outras leguminosas, como por exemplo, os inibidores de tripsina de sementes de *Entada scandens*, os quais apresentam massa molecular de aproximadamente 20 kDa (Lingaraju *et al.*, 2008). Resultados similares foram reportados em inibidores tipo Kunitz encontrados em sementes de *Dimorphandra mollis*, *Archidendron ellipticum*, *Inga laurina* e *Caesalpinia bonduc*, todas pertencentes à subfamília Mimosoideae (Macedo *et al.*,

2000; Mello *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2007; Bhattacharyya *et al.*, 2007). Em contraste, as sementes de *Copaifera langsdorfii* (Caesalpinioideae) e *Poecilanthe parviflora* (Faboideae) apresentaram inibidores de tripsina de 24 kDa e 16 kDa, respectivamente (Silva *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004).

Essa variedade estrutural é comum em espécies pertencentes ao mesmo gênero. Por exemplo, Pando *et al.* (1999) isolaram um inibidor de tripsina de *Crotalaria paulina*, que apresentou massa molecular de 20 kDa, enquanto Gomes *et al.* (2005) isolaram um inibidor de tripsina tipo Kunitz de *Crotalaria pallida*, caracterizado por apresentar massa molecular de 32,5 kDa.

Muitas sementes de leguminosas contêm vários tipos de inibidores proteolíticos, sendo estes, classificados em duas famílias principais: Kunitz e Bowman-Birk, considerando-se sua massa molecular e conteúdo de cisteína. Os inibidores pertencentes à família Kunitz, apresentam massa molecular em torno de 18 a 20 kDa e duas pontes dissulfeto, enquanto os inibidores Bowman-Birk possuem massa molecular de aproximadamente 8 kDa e, são caracterizados pelo alto conteúdo de cisteína, formando 7 pontes dissulfeto (Norioka *et al.*, 1988).

Estudos têm indicado que existe uma relação entre as famílias de inibidores proteolíticos encontradas em sementes de leguminosas e o grau de evolução dessas plantas, onde em espécies tropicais, por exemplo, os inibidores tipo Kunitz são encontrados principalmente nas subfamílias primitivas, como Caesalpinioideae e Mimosoideae, enquanto os inibidores Bowman-Birk são mais freqüentes na subfamília mais evoluída, a Faboideae (Norioka *et al.*, 1988; Macedo *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2007; Bhattacharyya e Babu, 2009).

Esta diferença, é explicada mediante a suposição de que as leguminosas, inicialmente, eram compostas apenas por inibidores tipo Kunitz e, gradualmente foram adquirindo inibidores Bowman-Birk, durante a sua evolução entre árvores e arbustos, como uma forma de adaptação à zona temperada. Nesse sentido, os inibidores Bowman-Birk são considerados bioquimicamente mais evoluídos, por suas estruturas serem mais compactas e rígidas, devido ao alto conteúdo de cisteína, ajudando, provavelmente, a prevenir sua digestão por proteases, sendo convenientes para um longo período de estocagem, necessários durante a dormência da semente (Norioka *et al.*, 1988).

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo foram detectados inibidores de tripsina bovina nas sementes de *P. pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga*, *P. nitida* e *E. schomburgkii*, enquanto que inibidores de quimotripsina, com inibição acima de 50%, foram encontrados apenas nas sementes de *P. nitida*.

A atividade inibitória foi reduzida após precipitação cetônica e precipitação por sulfato de amônio na etapa de 30-60% de saturação para a espécie *E. schomburgkii*, sendo que a extração por meio de NaCl foi o método que proporcionou maior rendimento e atividade inibitória contra a tripsina para todas as espécies estudadas.

Os inibidores de tripsina parcialmente purificados apresentaram inibição de, aproximadamente, 99% contra a tripsina e baixos percentuais contra a quimotripsina, exceto para o inibidor proveniente de *P. nitida*, onde a inibição foi de 88%.

Adicionalmente, os resultados mostram que os inibidores apresentam massas moleculares aparentes variando de 17 a 21 kDa, sugerindo a sua classificação como do tipo Kunitz.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, J.M.; Ingram, J.S.I. 1993. *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*, second edition. CABI. 240p.
- Antcheva, N.; Patthy, A.; Athanasiadis, A.; Tchorbanov, B.; Zakhariev, S.; Pongor, S. 1996. Primary structure and specificity of a serine proteinase inhibitors from paprika (*Capsicum annuum*) seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, 1298: 95 – 101.
- Barbosa, A.P.; Palmeira, R.C.F.; Nascimento, C.S.; Feitosa, D.S.; Cunha, M.S.C. 2006. Leguminosas Florestais da Amazônia Central I. Prospecção de compostos presentes na casca de espécies arbóreas. *Revista Fitos*, 1(3): 47-57.
- Bariani, A. 2008. *Propriedades Bioquímicas e Biológicas de Proteínas de Sementes de Leguminosas Arbóreas da Amazônia*. Dissertação (Mestrado: Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), Manaus, AM. 122p.
- Barret, A.J.; Rawlings, N.D.; Brien, E.A. 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol*, 14: 95 – 102.
- Barroso, G.M.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Guimarães, E.F.; Lima, H.C.de. 1991. *Sistemática de Angiospermas do Brasil, vol 2*. Imprensa Universitária, Minas Gerais. 377p.
- Batista, I.F.C.; Oliva, M.L.V.; Araujo, M.S.; Sampaio, M.U.; Richardson, M.; Fritz, H.; Sampaio, C.A.M. 1996. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*, 41(4): 1017-1022.
- Bayés, A.; Vega, R.; Vendrell, J.; Aviles, F.X.; Jongsma, M.A.; Beekwilder, J. 2006. Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 654-664.
- Bazock, R.; Barcic, I. J.; Edwards, C. R. 2005. Effects of proteinase inhibitors on western corn rootworm life parameters. *Journal of Economic Entomology*, 4:185-190.
- Behrens, M.D.; Tappin, M.R.R.; Favoreto, R.; Silva, V.P.; Nakamura, M.J.; Barbosa, A.P.; Sousa, L.A.; Siani, A.C. 2006. Estudo prospectivo de leguminosas da Amazônia Central II. Composição química das sementes. *Revista Fitos*, 1(3): 58-64.
- Belitz, H. D.; Weder, J. K. P. 1990. Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs.



*Food Reviews International*, 6(2): 151-211.

- Bhattacharyya, A.; Babu, C.R. 2009. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry*, 70(6): 703-712.
- Bhattacharyya, A.; Mazumar, S.; Leighton, S.M.; Babu, C.R. 2006. A kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization and kinetic properties. *Phytochemistry*, 67: 232 – 241.
- Bhattacharyya, A.; Rai, S.; Babu, C.R. 2007. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: Isolation, partial characterization and insecticidal properties. *Plant physiology and Biochemistry*, 45: 169 – 177.
- Birk, Y. 1994. Protein proteinase inhibitors in legume seeds-overview. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 44: 26-30.
- Birk, Y.1985. The Bowman-Birk Inhibitor. *Int. J. Pep. Prot. Res.*, 25:113-131
- Bode, W.; Huber, R. 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477:241-252.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochemistry*, 72: 248-254.
- Broadway, R.M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology*, 41(2): 107-116.
- Calderon, L.A.; Teles, R.C.L.; Leite, J.R.S.A.; Bloch, C. Jr; Astolfi-Filho, S.; Freitas, S.M. 2001. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: Purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. *Protein and Peptide Letters*, 8(6): 485-493.
- Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40:1515-1539.
- Cavalcanti, M.S.M.; Oliva, M.L.V.; Fritz, H.; Jochum, M.; Mentele, R.; Sampaio, M.; Coelho, L.C.B.B.; Batista, I.F.C.; Sampaio, C.A.M. 2002. Characterization of a kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291: 635-639.
- Chase, T.; Shaw, E. 1970. Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenil – p – guanidinobenzoate HCl. *Meth. Enzymol.*, 19: 20 – 27.
- Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Bariani, A.; Rodrigues, J.V.F.C.; Pando, S.C.

2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *Acta Amazonica*, 39(1): 189-196.
- Chou, K.C.; Cai, Y.D. 2006. Prediction of protease types in a hybridization space. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339: 1015 – 1020.
- Christeller, J.; Liang, W. 2005. Plant serine protease inhibitors. *Protein and Peptide Letters*, 12:439-447.
- Ee, K.Y.; Zhao, J.; Rehman, A.; Agboola, S. 2008. Characterisation of trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin inhibitors in Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Bentham). *Food Chemistry*, 107: 337-343.
- Ezeagu, I.E.; Petzke, J.K.; Metges, C.C.; Akinsoyinu, A.O.; Ologhobo, A.D. 2002. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. *Food Chemistry*, 78: 105-109.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1982. Food composition tables for the near East. *Food and Nutrition Paper*, 26. Rome: FAO/UN.
- Fear, G.; Komarnytsky, S.; Raskin, I. 2007. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 113: 354-358.
- Ferreira, G.C.; Hopkins, M.J.G.; Secco, R.S. 2004. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosas comercializadas no estado do Pará, como “angelim”. *Acta Amazonica*, 34 (2): 219 – 232.
- Fook, J.M.S.L.L.; Macedo, L.L.P.; Moura, G.E.D.D.; Teixeira, F.M.; Oliveira, A.S.; Queiroz, A.F.S.; Sales, M.P. 2005. A serine proteinase inhibitor isolated from *Tamarindus indica* seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. *Life Science*, 76: 2881-2891.
- Franco, O.L.; Rigden, D.J.; Melo, F.R.; Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases: Structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.*, 269: 397-412.
- Frokiaer, H.; Horlyck, L.; Sorensen, S.; Sorensen, H. 1994. Immunoaffinity chromatography purification and characterization of pea trypsin inhibitors. *Journal Sciences Food Agric*, 66: 61-69.
- Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Protein Journal*, 23(5): 343-350.

- Gariani, T.; Leatherbarrow, R.J. 1997. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *Journal of Peptide Research*, 49 (6): 467 – 475.
- Gomes, C.E.M. 2004. *Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de Crotalaria pallida*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Natal, RN. 74p.
- Gomes, C.E.M.; Barbosa, A.E.A.D.; Macedo, L.L.P.; Pitanga, J.C.M.; Moura, F.T.; Oliveira, A.S.; Moura, R.M.; Queiroz, A.F.S.; Macedo, F.P.; Andrade, L.B.S.; Vidal, M.S.; Sales, M.P. 2005. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 1095-1102.
- Gourinath, S.; Alam, N.; Srinivasan, A.; Betzel, C.; Singh, T.P. 2000. Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and  $\alpha$ -amylase from ragi seeds at 2.2 Å resolution. *Biological Crystallography*, 56: 287-293.
- Graham, J.S.; Ryan, C.A. 1997. Accumulation of metallocarboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 101: 1164 – 1170.
- Grzonka, Z.; Jankowska, E.; Kasprzykowska, R.; Lankiewicz, L.; Wiczak, W.; Wiezerek, E.; Ciarkowski, J.; Drabik, P.; Janowski, R.; Kozak, K.; Jaskólski, M.; Grubb, A. 2001. Structural studies of cysteine protease and their inhibitors. *Acta Biochem. Pol.*, 48: 1 – 20.
- Gvozdeva, E.L.; Volotskaya, A.V.; Sof'in, A.V.; Kudryavtseva, N.N.; Revina, T.A.; Valueva, T.A. 2006. Interaction of proteinases secreted by the fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani* with natural proteinase inhibitors produced by plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(5): 502-507.
- Habib, H.; Fazili, K.M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2 (3): 68 – 85.
- Hannapel, D.J. 1993. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 22 kDa cathepsin D inhibitor protein of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol.*, 101(2): 7034
- Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431:145-159.
- Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. 2005. Biochemical characterization, stability studies

- and N-terminal sequence of a bi-functional inhibitor from *Phaseolus aureus* Roxb. (Mung bean). *Biochimie*, 87: 1127 – 1136.
- Hass, G.M.; Hermodson, M.A. 1981. Amino acid sequence of a carboxipeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry*, 20: 2256 – 2260.
- Heitz, T.; Geoffroy, P.; Stintzi, A.; Fritig, B.; Legrand, M. 1993. cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco. *J. Biol. Chem.*, 268 (23): 16987 – 16992.
- Hopkins, H.C.F. 1986. *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae). Flora Neotropica Monograph. The New York Botanical Garden, New York. 124 p.
- Hopkins, M.J.G. 1983. Unusual diversities of seed beetles (Coleoptera: Bruchidae) on *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*, 19: 329-338.
- Joly, A.B. 1993. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. Ed. Nacional, São Paulo. 777p.
- José, M. O. de M. A. 2002. *Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos e seu papel na interação planta-inseto*. Tese (Doutorado em Agronomia: área de concentração – Genética e Melhoramento de plantas). Piracicaba, SP. 108p.
- Koiwa, H.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. 1997. Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science: Review*, 2 (10):379-384.
- Krauchenco, S. 2005. *Estudos cristalográficos de dois inibidores de proteinases tipo STI – Kunitz extraídos das sementes de Copaifera langsdorffi e de Delonix regia respectivamente*. Tese (Doutorado em Biologia funcional e Molecular – Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas), Campinas, SP. 322p.
- Kuroda, M.; Kiyosaki, T.; Matsumoto, I.; Misaka, T.; Arai, S.; Abe, K. 2001. Molecular cloning, characterization and expression of wheat cystatins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 22 – 28.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Laskowski, M.; Qasim, M. A. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochemical Biophysical Acta*, 1477: 324-337.
- Lawrence, P.K.; Koundal, K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic J. of Biotechnology*, 5 (1): 93 -109.

- Legowska, A.; Debowski, D.; Lesner, A.; Wysocka, M.; Rolka, K. 2009. Introduction of non-natural amino acid residues into the substrate – specific P<sub>1</sub> position of trypsin inhibitor SFTI-1 yields potent chymotrypsina and cathepsin G inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17: 3302-3307.
- Lewis, G.; Schire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanic Gardens, Kew, 577p.
- Liao, H.; Ren, W.; Kang, Z.; Jiang, J.H.; Zhao, X.J.; Du, L. F. 2007. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. *Biotechnol Lett*, 29: 653-658.
- Lima, H.C.; Correia, C.M.B.; Farias, D.S. 1994. Leguminosae. In: Lima, M.P.M.; R.R. Guedes – Bruni (Eds.). *Reserva Ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo – RJ: Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 167 – 228.
- Lima, L.C.P.; Garcia, F.C.P.; Sartori, A.L.B. 2007. Leguminosae nas florestas estacionais do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: ervas, arbustos, subarbustos, lianas e trepadeiras. *Rodriguésia*, 58(2): 331-358.
- Lingaraju, M.H.; Gowda, L.R. 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 850-855.
- Lorenzi, H. 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Platarum. 368p.
- Lorenzi, H. 2008. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Platarum. 5 ed. 384p.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Cabrini, E.C.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621: 170-182.
- Macedo, M.L.R.; Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Richarson, M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfite bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104 – 1111.
- Macedo, M.L.R.; Matos, D.G.G.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C. 2000. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry*, 54: 553-558.
- Machleidt, W.; Borchart, U.; Fritz, H.; Brzin, J.; Ritonja, A.; Truck, V. 1983. Protein

- inhibitors of cysteine proteinase II. Primary structure of stefin, a cytosolic inhibitor of cysteine proteinase from human polymorphonuclear granulocytes. *Hoppe – Seyler's Physiol. Chem.*, 364: 1481 – 1486.
- Marra, B.M; Souza, D.S.L.; Aguiar, J.N.; Firmino, A.A.P.; Sarto, R.P.D.; Silva, F.B.; Almeida, C.D.S.; Cares, J.E.; Continho, M.V.; Martins-de-Sá, C.; Franco, O.L.; Grossi-de-Sá, M.F. 2009. Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots. *Peptides*, 30: 825-831.
- Matheson, N.R.; van Halbeek, H.; Travis, J. 1991. Evidence for a tetrahedral intermediate complex during serpin – proteinase interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (21): 13489 – 13491.
- Mello, G.C. 2001. *Isolamento e caracterização bioquímica de um inibidor de serinoproteinase de sementes de Dimorphandra mollis e o estudo do seu efeito “in vitro” sobre o bruqueídeo Callosobruchus maculatus*. Dissertação (Mestrado: Biologia Funcional e Molecular – Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas), Campinas, SP. 94 p.
- Mello, G.C.; Desouza, I.A.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Antunes, E.; Macedo, M.L.R. 2006. Oedematogenic activity induced by Kunitz – type inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds. *Toxicon*, 47: 150 – 155.
- Mello, G.C.; Oliva, M.L.V.; Sumikawa, J.T.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Macedo, M.L.R. 2002. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *Journal of Protein Chemistry*, 20(8): 625-632.
- Mello, M.O.; Silva-Filho, M.C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.*, 14(2): 71-81.
- Mikola, J. 1983. Proteinases, peptidases and inhibitors of endogenous proteinases in Germinating seeds. In: Seeds proteins, 35-51. Daussant, J.; Mossé, J.; and Vaughan, J. eds. *Annual proceedings of the phytochemical society of Europe Academic Press*. 35-51.
- Miller, E. A.; Lee, M. C.; Atkinson, A. H.; Anderson, M. A. 2000. Identification of a novel four domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmans of *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.*, 42: 329-333.
- Misaka, T.; Kuroda, M.; Iwabuchi, K.; Abe, K.; Arai, S. 1996. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene

- organization from other cystatins of animal and plant origin. *Eur. J. Biochem.*, 240: 609 – 614.
- Morrison, J.F. 1982. The slow-binding and slow tight-binding inhibition of enzyme catalyzed reactions. *Trends Biochem. Sci*, 7: 102-105.
- Mosolov, V. V.; Valueva, T. A. 2005. Proteinase Inhibitors and their function in plants: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41 (3): 227-246.
- Mosolov, V.V.; Valueva, T.A. 2008. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(3): 261-269.
- Nascimento, W. M. O.; Ramos, N.P.; Carpi, V.A.F.; Scarpore Filho, J. A.; Cruz, E.D. 2003. Temperatura e substrato para germinação de sementes de *Parkia platycephala* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista de Agricultura Tropical*, 7(1): 119-129.
- Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, 224: 350-357.
- Norioka, N.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Abe, J. 1988. Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agric. Biol. Chem.*, 52(5): 1245-1252.
- Odani, S.; Ikenaka, T. 1978. Studies on soybean trypsin inhibitors. XII – Linear sequences of two soybean Double – headed trypsin inhibitors, DII and EII. *Journal of Biochemistry*, 83(3): 737 – 745.
- Oliveira, A.S.; Migliolo, L.; Aquino, R.O.; Ribeiro, J.K.C.; Macedo, L.L.P.; Andrade, L.B.S.; Bemquerer, M.P.; Santos, E.A.; Kiyota, S.; Sales, M.P. 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 858-865.
- Oliveira, A.S.; Xavier-Filho, J.; Sales, M.P.; 2003. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46 (1): 91 – 104.
- Oliveira, M.C.P.; Ferraz, I.D.K.; Oliveira, G.J. 2006. Dispersão e superação da dormência de sementes de *Parkia pendula* (Willd.) Walp. (visgueiro) na Amazônia Central, AM, Brasil. *Hoehnea*, 33(4): 485-493.
- Otlewski, J.; Krowarsch, D. 1996. Squash inhibitor family of serine proteinase. *Acta Biochim. Pol.*, 43 (3): 431 – 444.
- Pando, L. A. 2001. *Caracterização físico-química e biológica de proteínas isoladas de sementes de leguminosas: lectinas e inibidores de proteinases*. Tese (Doutorado: Biologia Funcional e Molecular– Bioquímica, Universidade Estadual

- de Campinas – UNICAMP), Campinas, SP. 100 p.
- Pando, L.A.; Di Ciero, L.; Novello, J.C.; Oliveira, B.; Weder, J.K.P.; Marangoni, S. 1999. Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. *IUBMB Life*, 48 (5): 519-523.
- Pando, S.C. 1999. *Purificação e caracterização parcial de um inibidor de serinoproteinases de sementes de Delonix regia (Flamboyant)*. Dissertação (Mestrado: Ciências Biológicas – Bioquímica. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP), Campinas, SP. 59p.
- Pando, S.C.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Di Ciero, L.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2001. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*, 57; 625-631.
- Parolin, P.; Adis, J.; Rodrigues, W.A.; Amaral, I.; Piedade, M.T.F. 2004. Floristic study of na igapó floodplain Forest in Central Amazonia, Brazil (Tarumã-Mirim, Rio Negro). *Amazoniana*, XVIII (1/2): 29-47.
- Peng, J.H.; Black, L.L. 1976. Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans*. *Phytopatol.* 66: 958 – 963.
- Pernas, M.; Sanchez, M.R.; Gomez, L.; Salcedo, G. 1998. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinase from closely related pests. *Plant Mol. Biol.*, 38: 1235 – 1242.
- Pernas, M.; Sanchez, M.R.; Gomez, L.; Salcedo, G. 2000. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS. Lett.*, 467 (2-3): 206 – 210.
- Pinedo, G.J.V.; Ferraz, I.D.K. 2008. Hidrocondicionamento de *Parkia pendula* [Benth ex Walp]: Sementes com dormência física de árvore da Amazônia. *Revista Árvore*, 31(1): 39-49.
- Polhill, R.M.; Raven, P. H. 1981. *Advances in Legume Systematics Part 1*. Royal Botanic Gardens, England: 425p.
- Powers, J.C.; Asgian, J.L.; Ekici, O.D.; James, K.E. 2002. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. *Chem. Rev.*, 102: 4639 – 4750.
- Prakash, B.; Murthy, M.R.N.; Sreerama, Y.N.; Rao; D.R.; Gowga, L.R.; 1996. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman – Birk inhibitors. *Journal of Molecular Evolution*, 42(5): 560 – 569.
- Ragg, E.M.; Galbusera, V.; Scarafoni, A.; Negri, A.; Tedeschi, G.; Consonni, A.; Sessa, F.; Duranti, M. 2006. Inhibitory properties and solution structure of a



- potent Bowman – Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds. *FEBS Journal*, 273: 4024 – 4039.
- Ramos, F.N.; Souza, A.F.; Loureiro, M.B.; Cruz, A.P.M.; Andrade, A.C.S. 2000. Comparação entre métodos de secagem de *Parkia multijuga* Benth. (Leguminosae Mimosoideae). *Revista Árvore*, 24(2): 175-179.
- Ramos, V.S.; Silva, G.S.; Freire, M.G.M.; Machado, O.L.T.; Parra, J.R.P.; Macedo, M.L.R. 2008. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 11348-11355.
- Rawlings, N.D.; Tolle, D.P.; Barret, A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378: 705 – 716.
- Reeck, G.R.; Kramer, K.J.; Baker, J.E.; Kanost, M.R.; Fabrick, J.A.; Behnke, C.A. 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. In: Carozzi, N.; Koziel, M. (Eds.). *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. Londres, Taylor and Francis, p. 157 – 183.
- Revina, T.A.; Gerasimova, N.G.; Kladnitskaya, G.V.; Chalenko, G.I.; Valueva, T.A. 2008. Effect of proteinaceous proteinase inhibitors from potato tubers on the growth and development of phytopathogenic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(1): 89-92.
- Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, 16: 159 – 169.
- Richardson, M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, 5:259-305.
- Rosa, R.C.T.; Cavalcanti, V.A.L.B. 2005. Queda de Folíolos em *Parkia pendula* Causada por *Pestalotiopsis* sp. no Brasil. *Fitopatol. bras.* 30 (6): 672.
- Sallai, R.C. 1993. *Caracterização de inibidores seletivos de serinoproteinases no gênero Bauhinia (Leguminosae: Caesalpinioideae)*. Dissertação (Mestrado: Biologia Molecular, Escola Paulista de Medicina – Unifesp), São Paulo, SP. 85p.
- Salvesen, G.; Parkes, C.; Abrahamson, M.; Grubb, A.; Barret, A.J. 1986. Human low – Mr kininogen contain three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem. J.*, 234: 429 – 434.
- Sampaio, C.A.M.; Sampaio, M.U.; Prado, E.S. 1984. Active titration of horse urinary kallikrein. *Hoppe- Seylers z. Physiol. Chem.*, 365: 297 – 302.

- Sasaki, M. 2008. *Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado*. Dissertação (Mestrado: Ciências – Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP), São Paulo, SP. 75p.
- Scarafoni, A.; Consonni, A.; Galbusera, V.; Negri, A.; Tedeschi, G.; Rasmussen, P.; Magni, C.; Duranti, M. 2008. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. *Phytochemistry*, 69: 1820-1825.
- Shee, C.; Sharma, A.K. 2008. Storage and affinity properties of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor. *Food Chemistry*, 107: 312-319.
- Shen, H.B.; Chou, K.C. 2009. Identification of proteases and their types. *Analytical Biochemistry*, 385: 153-160.
- Silva, J.A.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2001. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. *Journal of Protein Chemistry*, 20(1): 1-7.
- Silva, M.F.; Souza, L.A.G. 2002. Levantamento das leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, baixo Rio Negro, Amazonas. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica*, 18 (1): 3 – 35.
- Souza Filho, A.P.S.; Fonseca, M.L.; Arruda, M.S.P. 2005. Substâncias químicas com atividades alelopáticas presentes nas folhas de *Parkia pendula* (Leguminosae). *Planta Daninha*, 23 (4): 565 – 573.
- Souza, L.A.G.; Silva, M.F. 2003. Bioeconmical potencial of Leguminosae from the Lower Negro River, Amazon, Brazil. *Lyonia*, 5(1): 15-24.
- Souza, S. G.A.; Varela, V.P. 1989. Tratamentos pré – germinativos em sementes de faveira orelha de macaco (*Enterolobium schomburgkii*, Benth.). *Acta Amazonica*, 19 (único): 19 – 26.
- Souza-Pinto, J.C.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Damas, J.; Auerswald, E.A.; Limãos, E.; Fritz, H.; Sampaio, M.U. 1996. Effect of a serine proteinase inhibitor from *Leucaena leucocephala* on plasma kallikrein and plasmin. *Immunopharmacology*, 33: 330-332.
- Terada, S.; Fujimura, S.; Katayama, H.; Nagasawa, M.; Kimoto, E. 1994. Purification and characterization of two Kunitz family subtilisin inhibitors from seeds of *Canavalia lineate*. *J. Biochem.*, 115: 392 – 396.
- Tremacoldi, C. R.; Pascholati, S. F. 2004. Inibidor de Tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. *Fitopatologia Brasileira*, 29 (2):135-140.

- Tremacoldi, C.R.; Pascholati, S.F. 2002. Detection of trypsin inhibitor in seeds of *Eucalyptus urophylla* and its influence on the *in vitro* growth of the fungi *Pisolithus tinctorius* and *Rhizoctonia solani*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33:281-286.
- Tsunogae, Y.; Tanaka, I.; Yamane, T.; Kikkawa, J.; Ashida, T.; Ishikawa, C.; Watanabe, K.; Nakamura, S.; Takahashi, K. 1986. Structure of the trypsin – binding domain Bowman – Birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin. *J. Biochem.*, 100: 1637 – 1643.
- Turk, B.; Turk, V.; Turk, D. 1997. Structural and functional aspects of papain like cysteine proteinase and their protein inhibitors. *Biol. Chem. Hoppe – Seyler*, 378: 141 – 150.
- Valueva, T.A.; Mosolov, M.M. 1999. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure and properties. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46 (3): 307-321.
- Valueva, T.A.; Revina, T.A.; Mosolov, V.V. 1997. Potato tuber protein proteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family. *Biochemistry*, 62: 1367 – 1374. Translated from *Biokhimiya*.
- Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. 2000. *Fundamentos de Bioquímica*. Ed. Artmed. Porto Alegre. Trad. Arthur Germano Fett Neto “*et al.*”
- Walsh, T.A.; Strickland, J.A. 1993. Proteolysis of the 85 kDa crystalline cysteine proteinase inhibitor from tomato release functional cystatin domains. *Plant Physiol.*, 103 (4): 1227 – 1234.
- Wesolowska, O.; Krokoszynska, I.; Krowarsch, D.; Otlewski, J. 2001. Enhancement of chymotrypsin-inhibitor/ substrate interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1545: 78-85.
- Wingate, V.P.M.; Franceschi, V.R.; Ryan, C.A. 1991. Tissue and cellular localization of proteinase inhibitors I and II in fruit of the wild tomato, *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. *Plant Physiology*, 97: 490 – 495.
- Xavier-Filho, J. 1993. *Sementes e suas defesas contra insetos*. Imprensa da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE.
- Xavier-Filho, J. 1992. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plant. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 4(1): 1-8.

- Ye, X.Y.; Ng, T.B.; Rao, P.F. 2001. A Bowman-Birk – type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289: 91-96.
- Zhou, J.Y.; Liao, H.; Z. N.H.; Tang, L.; Xu, Y.; Chen, F. 2008. Identification of a Kunitz inhibitor from *Albizia kalkora* and its inhibitory effect against pest midgut proteases. *Biotechnol Lett*, 30: 1495-1499.