

Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da amazônia

Larissa Ramos CHEVREUIL¹, José Francisco de Carvalho GONÇALVES², Adriana BARIANI³, João Victor Figueiredo Cardoso RODRIGUES⁴, Silvana Cristina PANDO⁵

RESUMO

Diferentes classes de proteínas são comuns em sementes de leguminosas, incluindo inibidores de tripsina e proteínas hemaglutinantes, as quais atuam sobre enzimas proteolíticas e sobre carboidratos da superfície celular, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi quantificar, detectar e caracterizar parcialmente a ocorrência dessas proteínas em sementes de *Tachigali plumbea*, *Sesbania exasperata* e *Ormosia costulata* var. *trifoliolata*. Sementes das três espécies foram moídas e submetidas à extração salina (NaCl 0,15M – 10 %, p/v). Os extratos totais obtidos foram utilizados para quantificar o conteúdo protéico, detectar a atividade residual da tripsina, a atividade hemaglutinante (AHE) e na obtenção do perfil protéico. A atividade residual da tripsina foi observada somente para *T. plumbea* e *S. exasperata*, cujos valores foram 4 e 19 %, respectivamente. A AHE foi detectada nos extratos das três espécies, sendo que os extratos totais de *T. plumbea* e *S. exasperata*, hemaglutinaram eritrócitos de rato, camundongo e hamster, enquanto que a espécie *O. costulata* hemaglutinou somente eritrócitos de hamster. O perfil protéico em SDS-PAGE revelou maior ocorrência de proteínas com massa molecular aparente de 10 a 30 kDa para *T. plumbea* e *S. exasperata*, enquanto que para *O. costulata* prevaleceram bandas protéicas com massa molecular variando entre 20-25 kDa. Conclui-se que os extratos totais de *O. costulata* e *S. exasperata*, pertencentes à subfamília Papilionoideae, apresentam menor conteúdo de inibidores de tripsina que *T. plumbea* (Caesalpinioideae) e, quanto à AHE, os resultados mostraram-se diferenciados, mesmo entre as espécies da mesma subfamília, tanto para a concentração mínima hemaglutinante quanto para a especificidade de interação com os eritrócitos.

PALAVRAS-CHAVE: Serinoproteinasas, Sementes, Lectinas, Eritrócitos.

Detection of trypsin inhibitors and hemagglutinating activity in tree leguminous seeds of amazonian

ABSTRACT

Different classes of proteins are common in Leguminosae seeds, including trypsin inhibitors and hemagglutinin proteins, which act on proteolytic enzymes and cell-surface carbohydrates, respectively. The aim of this work was to quantify, to detect and characterize partially these proteins in seeds of *Tachigali plumbea*, *Sesbania exasperata* and *Ormosia costulata* var. *trifoliolata*. Seeds of the three species were powdered and submitted to an extraction with a saline solution (NaCl 0.15M – 10%, p/v). The resulting total extracts were used to quantify proteins content, detect the residual trypsin activity, hemagglutinating activity (AHE) and the proteic profile. Residual trypsin activity was observed only for *T. plumbea* and *S. exasperata*, which values were 4 and 19% respectively. AHE was detected in extracts of all three species, total extracts of *T. plumbea* and *S. exasperata* hemagglutinated erythrocytes of rats, mice and hamsters, whereas *O. costulata* had this effect only on hamster erythrocytes. The proteic profile obtained by SDS-PAGE showed that *T. plumbea* and *S. exasperata* have a higher content of protein with an apparent molecular mass of 10 - 30 kDa, while *O. costulata* predominantly contains proteic bands with molecular masses varying between 20 to 25 kDa. It is concluded that total extracts of *O. costulata* and *S. exasperata*, species of the subfamily Papilionoideae, present less trypsin inhibitors than *T. plumbea* (Caesalpinioideae). AHE, both in form of minimum hemagglutinin concentration and the specified interaction with erythrocytes, differed even among species from the same subfamily.

KEYWORDS: Serine proteinases, Seeds, Lectins, Erythrocytes.

¹ Engenheira Florestal, mestrado em Ciências de Florestas Tropicais – INPA. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal CPST/INPA, e-mail: lchevreuil@inpa.gov.br

² Pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal CPST/INPA. Av. Ephigênio Sales, nº 2239. CEP: 69011-970 – Caixa postal: 478. e-mail: jfc@inpa.gov.br

³ Bolsista PCI-CNPq do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal da CPST/INPA. e-mail: bariani@inpa.gov.br

⁴ Biólogo, mestrado em Botânica – INPA. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal CPST/INPA e-mail: joaovictor@inpa.gov.br

⁵ Professora da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. e-mail: scpando@ufam.edu.br

INTRODUÇÃO

A família Fabaceae apresenta ampla distribuição biogeográfica e compreende um grande número de espécies economicamente importantes para a região devido ao seu potencial madeireiro, à participação na fixação biológica de nitrogênio, além de serem consideradas importantes fontes de proteínas vegetais (Souza *et al.*, 1994; Silva & Souza, 2002; Ferreira *et al.*, 2004).

As informações científicas sobre a composição química de sementes tropicais são úteis para a compreensão de sua fisiologia e obtenção de novos produtos a partir de reservas estocadas, como as proteínas, que corresponde em média, de 20 a 30% do peso seco das sementes de leguminosas, embora existam exceções como as sementes de soja que podem chegar a 40% (Vitale & Bollini, 1995).

Dentre as várias classes funcionais das proteínas, encontradas nas sementes de leguminosas, destacam-se os inibidores proteolíticos e proteínas com propriedades hemaglutinantes, como por exemplo, as lectinas. Essas moléculas compreendem de 2 a 15% do conteúdo de proteínas totais, e são consideradas metabólitos importantes, podendo atuar no mecanismo de defesa contra insetos e patógenos, como fonte de aminoácidos sulfurados, na regulação de proteinases endógenas e como sinais de respostas às condições ambientais (Chrispeels & Raikhel, 1991; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Rameshwaram & Nadimpalli, 2008; Wititsuwannakul *et al.*, 2008; Konarev *et al.*, 2008).

Os inibidores proteolíticos são proteínas que interagem específica e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas, promovendo sua inibição por meio da competição com o substrato pelo sítio ativo da enzima (Richardson, 1991; Laskowski Jr. & Qasim, 2000; Lingaraju & Gowda, 2008). Desta forma, essas proteínas são classificadas de acordo com a sua especificidade de interação e podem afetar a atividade de serinoproteinases, cisteinoproteinases, proteinases aspárticas e metaloproteinases, as quais compreendem os grandes grupos de enzimas proteolíticas (Richardson, 1991; Tremacoldi & Pascholati, 2004). As lectinas, por sua vez, são proteínas ou glicoproteínas que interagem especificamente com carboidratos de diferente natureza química, resultando na aglutinação de células animais e/ou vegetais e na precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos (Kennedy *et al.*, 1995; Babosha, 2008).

Adicionalmente, essas duas classes de proteínas têm sido investigadas pelas suas funções em diversos processos biológicos, como por exemplo, para diagnósticos clínicos, na caracterização de glicoconjugados das superfícies celulares; na elucidação da estrutura de proteínas e carboidratos e em estudos da sua toxicidade sobre várias espécies de fungos fitopatogênicos e de insetos (Kennedy *et al.*, 1995; Haq *et al.*, 2004; Rawlings *et al.*, 2004; Sharon, 2007).

Apesar do crescente interesse pelo isolamento e caracterização estrutural e funcional dessas proteínas, há poucos estudos com sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia a despeito do potencial bioquímico das espécies desta família. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram quantificar e caracterizar parcialmente os inibidores de tripsina e proteínas com atividade hemaglutinante nas espécies: *T. plumbea*, *S. exasperata* e *O. costulata*, representantes de duas sub-famílias das leguminosas, visando contribuir para a obtenção de princípios bioativos de modo a agregar valor às potencialidades não-madeireiras da floresta amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Sementes maduras de *Tachigali plumbea* Ducke (Fabaceae, Caesalpinioideae) e *Ormosia costulata* var. *trifoliolata* (Miq.) Klein. (Fabaceae, Papilionoideae) foram coletadas na Estação Experimental de Silvicultura Tropical (EEST/INPA), localizada na Br-174 (Manaus-Boa Vista) - 2°47'05"S e 60°11'51"W, e as sementes de *Sesbania exasperata* H. B. K. (Fabaceae, Papilionoideae) coletadas na várzea da Ilha da Marchantaria (Iranduba-Amazonas) - 3°16'7,60"S e 59°59'57,86"W, a partir de matrizes selecionadas, localizadas às margens do rio Solimões, Manaus - AM. Todo material biológico coletado das matrizes referentes às espécies estudadas foi devidamente depositado e identificado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCT - INPA).

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As sementes inteiras foram secas à temperatura ambiente e trituradas até a obtenção de material pulverizado, posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em solução salina (NaCl 0,15 M, 10 % p/v) durante duas horas à temperatura ambiente (26 ± 3°C). A suspensão foi centrifugada a 5000 x g durante 20 minutos a 4°C e, o sobrenadante, após diálise contra água destilada durante 48 horas, foi utilizado nas etapas posteriores.

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração relativa de proteínas dos extratos foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. A leitura das absorbâncias foram obtidas por meio de um espectrofotômetro Spectrum UV-VIS SP-2000 UV.

DETECÇÃO DE INIBIDOR DE TRIPSINA

A determinação da concentração efetiva de solução de enzima foi realizada envolvendo a formação de uma acil-enzima estável e a liberação de p-nitrofenil, medido espectrofotometricamente, conforme descrito por Chase & Shaw (1970) e Sampaio *et al.* (1984).

A atividade inibitória foi realizada por meio de ensaio enzimático com tripsina bovina e o substrato DL-BAPNA (DL-benzoyl-arginina-paranitroanilida). O meio de pré-incubação consistiu em tampão Tris/HCl 0,05 M (pH 8,0, tripsina bovina 50 µg, dissolvida em HCl 1 mM) e diferentes concentrações dos extratos totais, completando um volume final de 2 mL. A pré-incubação foi efetuada durante 10 minutos a 37°C. Após este período foi adicionado o substrato cromogênico DL-BAPNA (0,5 mM), prosseguindo-se a incubação 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 fotometricamente a 410 nm. O cálculo da atividade inibitória foi gerado a partir da determinação da atividade residual da tripsina no ensaio, de acordo com Erlanger et al. (1961).

DETECÇÃO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE (AHE)

Amostras de sangue de animais saudáveis (camundongo, hamster e rato branco), com idade de 2 a 3 meses, provenientes do biotério do INPA foram coletadas e homogêneas em solução anticoagulante (2,05% de glicose; 0,8% de citrato de sódio e 0,42% de NaCl, pH 6,1). Os eritrócitos foram lavados por quatro vezes com solução salina (NaCl 0,15 M, 10% p/v) a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso na mesma solução salina de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% (v/v).

O ensaio de hemaglutinação foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, os quais foram preenchidos com 50 µL de solução salina, 50 µL dos extratos totais e 50 µL de suspensão de eritrócitos a 2% (Pando et al., 2002).

ELETROFORESE EM SDS-PAGE

A análise do perfil protéico foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970), modificado. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8%. Para o gel de concentração a 5%, foi utilizado tampão Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, e para o gel de separação 12,5%, tampão Tris-HCl 1M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20%, sendo a polimerização conseguida pela adição de TEMED e PSA 10%.

As amostras (30 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. Como agente redutor foi utilizado o ditioteitol (DTT) a de 0,1M.

O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue em ácido acético 0,1%, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v) e descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de proteínas variaram cerca de 2 a 9% nas espécies estudadas e foram mais elevados nos extratos totais de *S. exasperata* e *O. costulata*, 5,1 e 8,9%, respectivamente, espécies pertencentes à sub-família Papilionoideae (Figura 1). Enquanto que em *T. plumbea* o conteúdo protéico foi de 2,4%. Estes resultados sugerem que as concentrações relativas dessas reservas podem variar entre as espécies e até entre espécies pertencentes à mesma família (Bewley, 1997, Corte et al., 2006). Adicionalmente, trabalhos realizados com sementes de leguminosas arbóreas demonstraram que as espécies *Andira parviflora*, *Parkia pendula* e *Hymenaea parviflora*, apresentaram composição de reservas diferenciadas com teores protéicos bem mais elevados quando comparados aos teores obtidos nas espécies estudadas (Gonçalves et al., 2002).

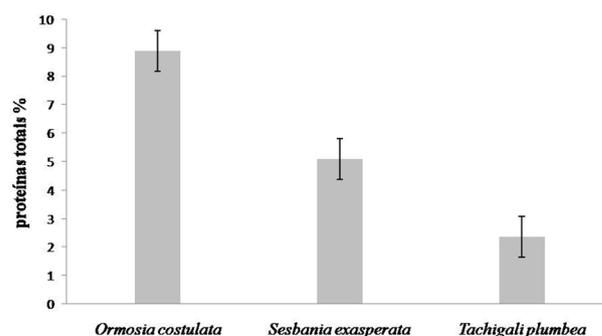


Figura 1 - Quantificação do teor de proteínas nos extratos totais de espécies de leguminosas arbóreas da Amazônia

A atividade inibitória dos extratos totais contra a tripsina bovina, uma serinoproteínase, foi detectada apenas nas espécies *T. plumbea* e *S. exasperata* (Tabela 1). No entanto, não se pode afirmar que no extrato protéico de *O. costulata* não há presença de inibidor de tripsina, uma vez que esta classe inclui outras enzimas proteolíticas como a quimotripsina e elastase, evidenciando, desta forma, a especificidade dos inibidores proteolíticos por determinadas enzimas proteolíticas. Essa especificidade de interação ocorre devido à presença de resíduos de aminoácidos no sítio reativo do inibidor que interagem específica e reversivelmente com os resíduos do sítio ativo da enzima alvo, permitindo a formação do complexo estável (Matheson et al., 1991; Bode & Huber, 2000). Este fato tem sido demonstrado por alguns autores, como por exemplo, para as espécies *Inga laurina* e *Lupinus albus*, onde seus inibidores proteolíticos inibiram a atividade da tripsina, mas não da quimotripsina (Macedo et al., 2007; Scarafoni et al., 2008).

Tabela 1 - Monitoramento da atividade enzimática na presença de, aproximadamente, 2,0 µg de proteínas dos extratos totais de espécies de leguminosas arbóreas da Amazônia.

| Espécies | Atividade residual da enzima (ARE) % |
|----------------------------|---|
| <i>Tachigali plumbea</i> | 4 |
| <i>Sesbania exasperata</i> | 19 |
| <i>Ormosia costulata</i> | Nd |

Nd: Não determinada.

De maneira mais específica, outros estudos com inibidores de proteinases têm evidenciado a presença dessas proteínas em várias espécies de leguminosas, incluindo: *Delonix regia*, *Peltophorum dubium*, *Archidendron ellipticum* (Pando *et al.*, 2001; Macedo *et al.*, 2003; Bhattacharyya *et al.*, 2006). No que diz respeito a estudos realizados com espécies de leguminosas pertencentes à flora Amazônica, Calderon *et al.* (2001) demonstraram que extratos de *Cassia brasselari*, *Cassia occidentalis*, *Dialium guianense*, *Inga rubiginosa*, *Inga umbratica*, *Inga velutina* e *Mimosa guilandinae*, apresentaram tanto inibidores de quimotripsina como de tripsina, enquanto que *Inga fagifolia* e *Cassia grandis* inibiram apenas a atividade da tripsina.

Com relação à atividade hemaglutinante, os extratos totais de *T. plumbea* e *S. exasperata*, promoveram a hemaglutinação de eritrócitos de camundongo, hamster e rato branco. Por outro lado, o extrato de *O. costulata* hemaglutinou apenas eritrócitos de hamster (Tabela 2).

Em experimentos de caracterização da AHE é comum ocorrer diferenças de hemaglutinação em eritrócitos distintos, como demonstra Silva *et al.* (2001a), ao estudar a especificidade de hemaglutinação, de frações purificadas de *Bauhinia pentandra* sobre eritrócitos de coelho, frango, pombo e de grupos sanguíneos humanos pertencentes ao sistema ABO, onde constatou forte hemaglutinação em eritrócitos de coelho e fracamente em eritrócitos do grupo sanguíneo humano tipo A. As frações purificadas de sementes de *Canavalia ensiformis* e *Dioclea grandiflora* apresentaram especificidade somente por glóbulos vermelhos humanos (Melgarejo *et al.*, 2005).

Os extratos totais de sementes de *Peltogyne venosa* hemaglutinaram eritrócitos de rato branco, camundongo e hamster, enquanto que os extratos de *Cedrelinga catenaeformis*

não hemaglutinaram eritrócitos de camundongo (Bariani, 2007). Isto ocorre porque, apesar de as espécies pertencerem à mesma família, a especificidade por carboidratos diverge para cada espécie, o que está diretamente relacionado à composição estrutural das proteínas e composição química dos eritrócitos, cujo padrão de glicosilação diferencia-se de acordo com a espécie e isto, conseqüentemente, implica se o extrato vegetal promoverá ou não a hemaglutinação, dependendo da ocorrência de lectinas (Moreira *et al.*, 1990; Chrispeels *et al.*, 1991; Martinez *et al.*, 2005).

Comparando os resultados obtidos para as espécies da mesma sub-família, observa-se que *S. exasperata* é capaz de promover hemaglutinação com concentrações protéicas inferiores a *O. costulata* (Tabela 2), sugerindo que apesar do alto teor protéico é possível que esta espécie contenha maior concentração de proteínas não pertencente à classe das lectinas (Tabela 2). Adicionalmente, muitas outras espécies leguminosas contêm proteínas que são claramente relatadas como lectinas, porém não são capazes de promover a hemaglutinação, uma vez que apresentam um único sítio de ligação a carboidratos, como as lectinas pertencentes à classe das merolectinas (Peumans & van Damme, 1995).

Esses dados demonstram a possível presença de lectinas nos extratos protéicos das espécies estudadas, uma vez que essas proteínas apresentam especificidade de interação com diferentes eritrócitos, devido à sua capacidade de reconhecer os carboidratos presentes nas superfícies celulares (Sharon, 1993). Contudo, mesmo que o método de detecção da AHE seja o mais utilizado para a verificação da presença de lectinas, esse ensaio pode apresentar resultado falso se a lectina coexistir com inibidores, com substâncias presentes no sangue, glicoproteínas contendo ácido siálico, amins heterocíclicas, carboidratos e certos íons metálicos, ou ainda, se os receptores para carboidratos presentes nas células não existirem em número suficiente ou estiverem inacessíveis (Toms, 1981). Nesse sentido, outros métodos devem ser utilizados em adição aos ensaios de hemaglutinação, como por exemplo, a precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas, bem como a submissão de extratos totais a métodos cromatográficos, visando o isolamento da proteína alvo (Kennedy *et al.*, 1995).

Tabela 2 – Atividade hemaglutinante dos extratos totais de diferentes espécies de leguminosas sobre diferentes eritrócitos de animais.

| Eritrócitos | Concentração mínima hemaglutinante | | |
|-------------|---|---|---|
| | <i>Tachigali plumbea</i> (µg mL ⁻¹) | <i>Sesbania exasperata</i> (µg mL ⁻¹) | <i>Ormosia costulata</i> (µg mL ⁻¹) |
| Camundongo | 0,8 | 0,33 | Nd |
| Hamster | 0,8 | 0,33 | 12,33 |
| Rato Branco | 0,8 | 0,33 | Nd |

Nd: Não determinada.

O perfil protéico dos extratos totais das espécies em estudo foi similar na presença e na ausência de DTT, revelando maior ocorrência de proteínas com massas moleculares aparentes de 10 kDa a 30 kDa para *T. plumbea* e *S. exasperata*. Entretanto, para a *O. costulata* observou-se intensa coloração de proteínas com massas moleculares aparentes variando entre 20-25 kDa, estando as proteínas com massa molecular menor que 20 kDa pouco evidentes (Figura 2).

Esses resultados sugerem a presença de lectinas, uma vez que a massa molecular das subunidades dessa classe de proteínas em leguminosas está em torno de 30 kDa, com a lectina completamente ativa, formando dímeros ou tetrâmeros com múltiplos sítios de ligação para carboidrato (Rüdiger, 1998). Adicionalmente, estudos têm comprovado que as lectinas isoladas de sementes de leguminosas como *Bauhinia pentandra*, *Crotalaria pallida*, *Talisia esculenta*, *Canavalia ensiformis* e *Dioclea grandiflora*, apresentam a prevalência de bandas protéicas com massas moleculares variando de 20-40 kDa (Silva *et al.*, 2001a; Rego *et al.*, 2002; Freire *et al.*, 2002; Melgarejo *et al.*, 2005).

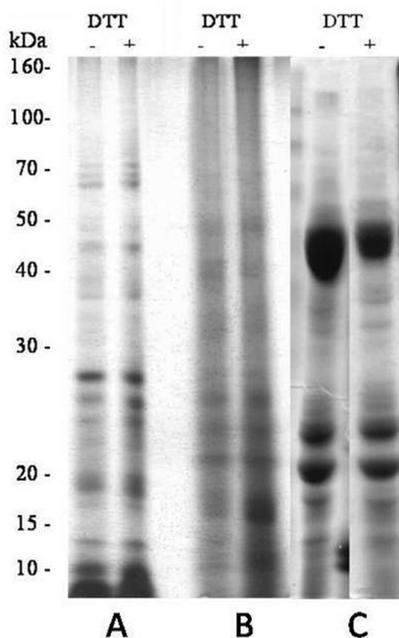


Figura 2 - Perfil eletroforético em SDS - PAGE (12,5%, 90V, 17h). A: 20 μ g de extrato protéico de *Sesbania exasperata*; B: 36 μ g de extrato protéico de *Tachigali plumbea* e C: 30 μ g de extrato protéico de *Osmosia costulata* var. *trifoliolata*, em condições não redutoras (-) e redutoras - DTT (+). Marcador de massa molecular: Bench Mark Protein Ladder (160kDa-10kDa).kDa: Kilo Dalton.

A estimativa da massa molecular é um critério importante para classificar os inibidores de proteínases, onde os inibidores tipo Kunitz apresentam massas moleculares em torno de 18-22 kDa e os tipo Bowman-Birk em torno de 8-10 kDa (Haq *et al.*, 2004). Nesse sentido, a prevalência de bandas protéicas com massas moleculares variando de 10 a 25 kDa, corroboram com a presença de inibidores de serinoproteínases nos extratos totais, conforme encontrado para as espécies *Archidendron ellipticum* e *Entada scandens*, onde os inibidores de tripsina tipo Kunitz apresentaram massa molecular de 20 kDa e de 24 kDa para *Copaiifera langsdorfii* (Silva *et al.*, 2001b; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Lingaraju & Gowda, 2008).

Portanto, sementes de *T. plumbea* e *S. exasperata*, apesar dos baixos teores de proteínas encontrados, quando comparados com outras espécies de leguminosas, apresentaram altos conteúdos de inibidores de serinoproteínases e, provavelmente, proteínas da classe das lectinas nos extratos totais das três espécies estudadas, ressaltando usos potenciais dessas espécies em estudos futuros, como por exemplo, no tratamento de disfunções metabólicas associadas às enzimas proteolíticas e lectinas, tais como em casos de pancreatites, enfisemas, inflamações e certos cânceres, bem como verificar o envolvimento dessas proteínas no mecanismo de defesa das plantas, ao ataque de diferentes patógenos e predadores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Ciência e Tecnologia / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, ao biotério do INPA, ao Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza (INPA-CPCA) e a toda a equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do INPA/LFBV. Os autores deste manuscrito também são gratos ao CNPq pelas concessões das bolsas de Iniciação científica (IC), de mestrado (MS) e de produtividade (PQ).

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Babosha, A.V. 2008. Induce lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. *Biochemistry*, 73(7): 812-825.
- Bariani, A. 2007. *Propriedades bioquímicas e biológicas de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 122p.
- Bewley, J.D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- Bhattacharyya, A.; Mazumdar, 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.

- 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. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Calderon, L.A.; Teles, R.C.L.; Leite, J.R.S.A.; Block, 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.
- Chase, T.; Shaw, E. 1970. Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl-p-guanidinobenzoate HCl. *Methods in Enzymology*, 19: 20 – 27.
- Chrispeels, M.J.; Raikhel, N.V. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3: 1-9.
- Corte, V.B.; Borges, E.E.L.; Pontes, C.A.; Leite, I.T.A.; Ventrella, M.C.; Mathias, A.A. 2006. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Árvore*, 30(6): 941-949.
- Erlanger, B.F.; Kolowsky, N.; Cohen, N. 1961. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278.
- Ferreira, G.C.; Hopkins, M.J.G.; Secco, R.S. 2004. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosae comercializadas no estado do Pará, como “angelim”. *Acta Amazonica* 34(2): 219-232.
- Freire, M.G.M.; Gomes, V.M.; Corsini, R.E.; Machado, O.L.T.; De Simone, S.G.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology Biochemistry*, 40: 61-68.
- Gonçalves, J.F.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.M.; Rodrigues, L.F.R.; Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(2): 139-142.
- 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.
- Kennedy, J.F.; Palva, P.M.G.; Corella, M.T.S.; Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B. 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, 26: 219-230.
- Konarev, A.V.; Lovegrove, A.; Shewry, P.R. 2008. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamensis* and other gymnosperms. *Phytochemistry*, 69 (13): 2482-2489.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Laskowski Jr., M.; Qasim, M.A. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 324-337.
- Lingaraju, M.H.; Gowda, L.R. 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfite bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784:850-855.
- Macedo, M.L.; 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.; Garcia, V.A.; Freire, M.G.; Richardson, M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfite bridge from seeds of *Inga laurina* (SW). *Wild. Phytochemistry*, 68: 1104-1111.
- Martinez, C.R.; Netto, A.M.; Figueiredo, M.V.B.; Cavada, B.S.; Lima, J.L. 2005. Kinetic sedimentation of Rhizobium-aggregates produces by leguminous lectins. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, 21(1): 75-82.
- Matheson, N.R.; van Halbeek, H.; Travis, J. 1991. Evidence for a tetrahedral intermediate complex during serpin-proteinase interactions. *The Journal Biology Chemistry*, 266(25): 13489-13491.
- Melgarejo, L.M.; Vega, N.; Pérez, G. 2005. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. Seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(3): 315-324.
- Moreira, R.A.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.A. de; Ainouz, I.L. 1990. Plant lectins. *Proceeding of the first Brazilian congress on proteins – COBRAP*, 90: 73-96.
- Pando, S.C., Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2002. *Journal of Protein Chemistry*, 21(4): 279-285.
- Pando, S.C.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Ciero, L.D.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2001. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*, 57: 625-631.
- Peumans, W.J.; van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109: 347-352.
- Rameshwaram, N.R.; Nadimpalli, S.K. 2008. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. *Journal of Chromatography B*, 861: 209-217.
- Rawlings, N.D.; Tolle, D.P.; Barret, A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378: 705-716.
- Rego, E.J.L.; Carvalho, D.D.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J.C. 2002. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry*, 60: 441-446.
- Richardson, M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, 5:259-305.
- Rüdiger, H. 1998. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica*, 161: 130-152.
- Sampaio, C.A.M.; Sampaio, M.U.; Prado, E.S. 1984. Active titration of horse urinary kallikrein. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie.*, 365: 297 – 302.

- 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.
- Sharon, N. 1993. Lectin – carbohydrate complexes of plants and animals: na atomic view. *Trends in Biochemical Sciences*, 18: 221-226.
- Sharon, N. 2007. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (5): 2753-2764.
- Silva, A.L.C.; Horta, A.C.G.; Moreira, R.A. 2001a. Isolation and parcial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. Steua. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(3): 262-269.
- Silva, J.A.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2001b. 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 Paraense Emílio Goeldi*, série Botânica, 18(1): 3-35.
- Souza, L.A.G.; Silva, M.F.; Moreira, F.W. 1994. Capacidade de nodulação de cem leguminosas da Amazônia. *Acta Amazonica*, 24(1/2): 9-18.
- Toms, G.C. 1981. Lectins in Leguminosae. In: Polhill, R.M.; Raven, P.H. (Eds). *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, 2: 561-577.
- Tremacoldi, C.R.; Pascholati, S.F. 2004. Inibidor de tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. *Fitopatologia Brasileira*, 29(2): 135-140.
- Vitale, A.; Bollini, R. 1995. Legume Storage Proteins. In: Kigel, J.; Galili, G. (Eds). *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York. p. 73-102.
- Wititsuwannakul, R.; Pasitkul, P.; Kanokwiroon, K.; Wititsuwannakul, D. 2008. A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochemistry*, 69: 339 – 347.

Recebido em 26/08/2008

Aceito em 26/10/2008

