

## ENZIMAS, INIBIDORES DE PROTEASES E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS AQUOSOS DE SEMENTES DE *Caesalpinia pyramidalis* Tul.

---

Tadeu dos Reis de Oliveira<sup>1</sup>, Márcia Deydina Silva dos Santos<sup>2</sup>, Marlene Feliciano Figueiredo<sup>3</sup>, Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle<sup>3</sup>, Lúcia Betania da Silva Andrade<sup>3,4</sup>

1. Graduando em Ciências Biológicas-Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)
2. Bacharel em Ciências Biológicas (UVA)
3. Professora do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Vale do Acaraú. Av. da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral-Ce, CEP 62.040-370.
4. ([lubetania@yahoo.com.br](mailto:lubetania@yahoo.com.br)).

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

---

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de amilases, celulasas, inibidores de papaína e tripsina e atividade antimicrobiana nos extratos protéicos de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). Esta espécie ocorre no Bioma Caatinga, onde é conhecida popularmente como catingueira. É utilizada na medicina popular devido as suas várias propriedades terapêuticas, principalmente no tratamento das infecções respiratórias e intestinais. As plantas são ricas em compostos com potencial para aplicações industriais e os resultados indicaram a presença de amilases, celulasas e inibidores da papaína e tripsina nos extratos protéicos avaliados. Além disso, os extratos apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Assim, sementes da catingueira avaliadas neste estudo possuem um bom potencial para a extração de proteínas que podem ser de grande utilidade em processos industriais, farmacêuticos e biotecnológicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobiano. Amilase. Celulase. Cistatina. Serpina.

### ENZYMES, PROTEASE INHIBITORS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Caesalpinia pyramidalis* Tul. SEEDS

### ABSTRACT

The aim of this work was to identify the presence of amylases, cellulases, papain and trypsin inhibitors and antimicrobial activities in the protein extracts of *Caesalpinia pyramidalis* seeds (Fabaceae). It occurs in Caatinga Biome, where is known as “catingueira”. This species is utilized in folk medicine due to its several therapeutic properties being used in the treatment of respiratory and intestinal infections. Plants are rich in compounds with potential for industrial applications and the results indicated the presence of the amylase, cellulase and papain/trypsin inhibitors in protein extracts. In addition, the extracts show antibacterial activities against *Staphylococcus aureus*. Thus, seeds from the “catingueira” evaluated in this study had a high potential for extraction of proteins that could be of large utility in the industrial and biotechnological process.

**KEYWORDS:** Antimicrobial. Amylase. Cellulase. Cystatin. Serpin.

## INTRODUÇÃO

Sementes de leguminosas usualmente são abundantes em proteínas que desempenham diversas atividades metabólicas, incluindo as funções de reserva, catalítica e de proteção natural da planta contra estresses bióticos e abióticos (CÂNDIDO et al., 2011, TAN-WILSON & WILSON, 2012). Dentre as proteínas presentes em sementes estão as glicosidasas (amilases e celulasas, por exemplo) que catalisam a quebra de polissacarídeos complexos tais como amido e celulose durante a germinação das mesmas (GIORGINI, 1992; KUMARI et al., 2010) e os inibidores de proteases, que desempenham papel na defesa da planta contra o ataque de pragas e patógenos (VALUEVA & MOSOLOV, 2004).

As amilases são amplamente distribuídas na natureza e sua ação catalítica promove a hidrólise do amido para produzir glicose e maltose. Estas enzimas são frequentes em sementes de diversas espécies de Fabaceae, podendo estar presentes de forma constitutiva ou serem induzidas durante as fases de germinação e estabelecimento das plântulas (ZEEMAN et al., 2010). Já as celulasas promovem a quebra da celulose, o biopolímero mais abundante na natureza e, embora a maioria das celulasas estudadas seja obtida de fungos, alguns estudos já identificaram e isolaram celulasas vegetais (GIORGINI, 1992; KANELLIS & KALAITZIS, 1992).

Os inibidores de proteases atuam no controle de proteases endógenas e/ou fazendo parte do arsenal de proteção de defesa vegetal. Deste modo, por serem proteínas de defesa, muitos apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos (VALUEVA & MOSOLOV, 2004).

Amilases, celulasas e inibidores de proteases estão entre as proteínas de grande interesse na pesquisa biotecnológica pelo potencial de aplicação nos setores industrial e farmacêutico (MARC et al., 2002, GOMES et al., 2007, PAULA et al., 2012). Amilases são utilizadas na fabricação de pães, bebidas e outros processos que envolvem a degradação enzimática do amido (MARC et al., 2002, RANA et al., 2013). As principais aplicações comerciais de celulasas são na indústria têxtil para a produção de tecidos e detergentes de lavanderia (LEGHLIMI et al., 2013) e grande atenção tem sido dada ao uso de celulasas para a produção de biocombustível (ZHANG et al., 2006). Os inibidores de proteases tem sido investigados quanto a sua atividade antibacteriana, antifúngica e anticancerígena constituindo-se moléculas de promissoras aplicações farmacêuticas (KIM et al., 2009, PAULA et al., 2012).

*Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae: Caesalpinoideae), conhecida popularmente como catingueira, é amplamente dispersa no Nordeste Semiárido Brasileiro. Considerada endêmica do Bioma Caatinga (ALVES et al., 2007) é uma espécie muito explorada pela população para fins forrageiros e medicinais sendo suas folhas, flores e cascas utilizadas no tratamento das infecções respiratórias e intestinais (ALBUQUERQUE et al., 2007). Os extratos aquosos e etanólicos das diversas partes da planta apresentaram atividades antibacteriana (LIMA et al., 2006, ALVIANO et al., 2008), antifúngica (CRUZ et al., 2007), antioxidante (ALVIANO et al., 2008) antinoceceptiva e antiinflamatória (SANTOS et al., 2011, SANTANA et al., 2012) e os estudos envolvendo à identificação e isolamento de compostos farmacologicamente ativos relacionam-se a identificação de metabólitos secundários tais como flavonoides e chalconas (MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005).

Frequentemente, as sementes de leguminosas apresentam em torno de 20% de proteínas e dados relativos à ocorrência e isolamento de proteínas em sementes

de *C. pyramidalis* são escassos. Deste modo, a prospecção destas biomoléculas em sementes de espécies ainda não estudadas para este propósito pode contribuir para a identificação de compostos com um amplo espectro de propriedades bioativas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos investigar a atividade de amilases, celulasas e inibidores de proteases em extratos aquosos de sementes de catingueira, bem como avaliar a atividade antibacteriana destes extratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Sementes

Sementes de *C. pyramidalis* foram coletadas no município de Sobral-CE, em fevereiro de 2013. A identificação foi realizada no Herbário da Universidade Estadual Vale do Acaraú (HUVA) onde foi incorporada exsicata sob o número 16720. As sementes foram acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas a 4°C até uso.

### Obtenção dos extratos aquosos

Os tegumentos das sementes foram retirados manualmente e os cotilédones triturados em moinho elétrico para a obtenção de uma fina farinha, que foi delipidada com acetona. Para verificar a melhor solução para a extração das enzimas amilases e celulasas e dos inibidores de proteases, foram usadas quatro diferentes soluções de extração: tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5, solução de cloreto de sódio 0,15 M, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,7 e água destilada.

Para a extração das proteínas, cinco gramas da farinha da semente foi mantida em contato com as diferentes soluções de extração, na proporção de 1:10 (m/v), sob agitação constante por uma hora, em temperatura ambiente. Após este processo, os extratos foram centrifugados a 10.000xg por 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram nomeados de extratos aquosos (EA) e usados como fonte de enzimas, inibidores de proteases e atividade antimicrobiana. Todas as extrações foram feitas em triplicata.

### Atividade enzimática

A atividade enzimática foi realizada qualitativamente pelo método de difusão radial em gel de ágar, em placas de Petri. Para a atividade da amilase, ágar a 2% (m/v) foi copolimerizado com o substrato amido solúvel de batata para uma concentração final de 1% (m/v) (FARIAS et al., 2010). Posteriormente a solidificação, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no gel e 50 µL dos extratos foram aplicados em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 12 horas. Após isto, 10 mL de uma solução de lugol (corante) foi aplicada sobre as placas e logo em seguida o excesso da solução corante foi removido através de três lavagens com água destilada. A atividade amilásica foi visualizada pelo aparecimento de um halo de hidrólise claro, sobre um fundo azul.

Para a atividade da celulase, foi utilizado o mesmo protocolo descrito para amilase, exceto pela utilização de carboximetilcelulose (CMC) como substrato (SALLES et al., 2010). Neste caso, para a detecção dos halos de hidrólise, foram aplicados em cada placa 10 mL de uma solução corante de vermelho congo a 0,1% (m/v). Após 30 minutos, o corante foi descartado e seu excesso removido com uma solução de NaCl 0,5 M até o aparecimento dos halos de hidrólise. Placas controles contendo apenas as soluções de extração foram feitas e todos os testes realizados em triplicatas, com duas repetições.

### **Deteccão de inibidor de tripsina**

A inibição da tripsina foi avaliada pelo método descrito por KAKADE et al. (1974) usando  $N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) como substrato. Quarenta microlitros de uma solução de tripsina (0,1 mg/mL em HCl 1mM) foi incubada por 10 minutos a 37°C com 560  $\mu$ L de tampão tris/HCl 50 mM pH 7,5 e 200  $\mu$ L dos extratos das sementes. Neste caso, foram utilizados apenas os extratos obtidos com o tampão tris/HCl 50 mM pH 7,5 e fosfato de sódio 0,1 M pH 6.7. A reação foi iniciada com a adição de 500  $\mu$ L de uma solução de BAPNA 1,25 mM preparada em dimetilsulfoxido (DMSO) a 1% (v/v) e tris/HCl 50 mM pH 7,5. Após 15 minutos a 37°C, a reação foi parada pela adição de 200  $\mu$ L de ácido acético 30%. Tubos controle da tripsina foram feitos na ausência dos extratos vegetais. Tubos controles (brancos), onde o substrato foi acrescentado após a reação ter sido parada, foram realizados para cada amostra. O desenvolvimento da cor foi medida em espectrofotômetro a 410 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição enzimática considerando a atividade da tripsina na ausência dos extratos vegetais como 100% de atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados calculados como a média dos valores.

### **Deteccão de inibidor de papaína**

Para o ensaio de inibição da papaína, foi usada a metodologia descrita por ABE et al.(1987). Em tubos de ensaio foram pipetados 40  $\mu$ L de uma solução de papaína (0,05 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio pH 6,0), 40  $\mu$ L de solução ativadora (EDTA 0,1M + DTT 2 mM), acrescentados 220  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 e 200  $\mu$ L dos extratos vegetais. Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos em banho-maria a 37°C, acrescentando-se 200  $\mu$ L de uma solução do substrato  $\alpha$ -N-benzoil-arginina-*p*-naftilamida (BANA) a 1 mM, preparada em DMSO a 1% (v/v) e em tampão fosfato de sódio pH 6,0. Vinte minutos depois, a reação foi parada com 500  $\mu$ L de uma solução de ácido clorídrico a 2% em etanol (v/v). Após cinco minutos em temperatura ambiente, foram acrescentados 500  $\mu$ L de *p*-dimetilcinamaldeído (DMACA) a 0,06%. Trinta minutos depois, o desenvolvimento da cor foi medido em espectrofotômetro a 540 nm. Tubos controles da papaína foram feitos na ausência dos extratos vegetais. Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados expressos conforme descrito para os inibidores de tripsina.

## **Atividade antimicrobiana**

### **Microrganismos**

Foram utilizadas cepas padrões de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), estocadas em ágar Mueller-Hinton e cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias e Biológicas da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. As cepas dos microrganismos foram diluídas em 10 mL de salina estéril onde se obteve uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml). Em seguida foi feita a inoculação na placa de Petri, com a utilização de um swab estéril.

### **Difusão em Agar**

A atividade dos extratos foi qualitativamente medida pelo método de difusão em agar Mueller-Hinton (FONTENELLE et al., 2007). Poços de 6 mm foram perfurados nas placas inoculadas com as cepas e em cada poço foi adicionado 50 µl dos extratos. O antibiótico tetraciclina foi utilizado como controle positivo e as soluções usadas na extração como controle negativo. As placas foram incubadas em estufa a 36°C por 24 horas. Logo após este período, o halo de inibição formado ao redor dos poços foi medido.

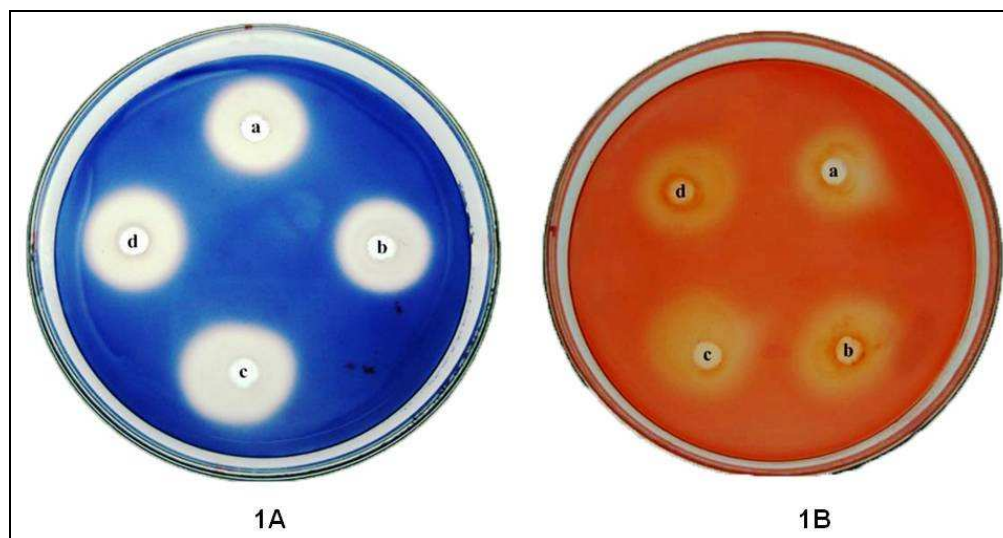
### **Microdiluição em caldo**

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos frente às cepas de *S. aureus* foi realizada de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003). Foi utilizado o método de diluição em placa de 96 poços em meio caldo Luria-Bertani broth (LB), usando-se concentrações decrescentes dos extratos que foram diluídos sequencialmente para concentrações que variaram de 25% a 0,025% (v/v). Em seguida, em cada poço das placas foram pipetados 50 µL de uma suspensão de *S. aureus* ( $\sim 10^8$  unidades formadoras de colônias-UFC). As placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 h. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, decorrido o tempo de incubação. Para confirmação dos resultados, 50 µL do conteúdo contido nos poços foram posteriormente inoculados para o meio de cultura Mueller-Hilton. A ausência de crescimento bacteriano após 24 horas confirmou a atividade antibacteriana dos extratos. Tetraciclina (30 a 0,029 µg/mL) foi usada como controle positivo. Os controles negativos utilizados foram o meio LB e o inóculo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Detecção de amilases e celulases**

Analisando os extratos protéicos das sementes de *C. pyramidalis* foi identificada atividade amilásica e celulásica em todos os extratos (figura 1), não havendo, aparentemente, diferenças qualitativas na capacidade de degradar amido e celulose, respectivamente, pelos extratos utilizados. Estes resultados indicam que, nas condições usadas nos ensaios, a atividade das enzimas não foi influenciada pelo pH das soluções usadas na extração.



**FIGURA 1:** Ensaio enzimático de difusão radial em gel de ágar para amilases (1A) e celulases (1B). Os extratos proteicos foram obtidos com as seguintes soluções de extração: (a) tampão tris/HCl 50mM pH 7,5 (b) solução salina 0,2 M (c) água destilada e (d) tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,7. A atividade enzimática é evidenciada pelo halo claro sobre o gel. Fonte: ANDRADE, L.B.S.

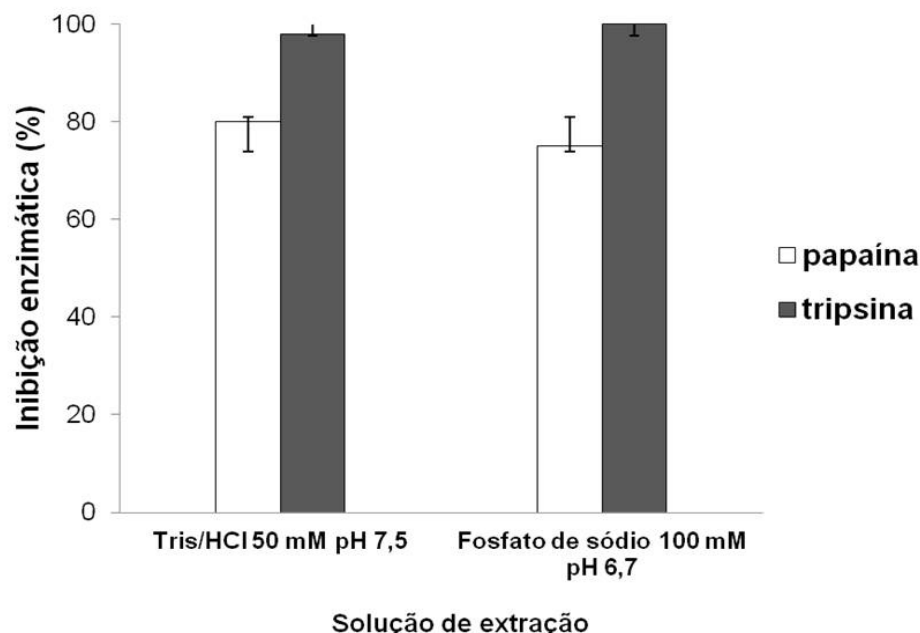
Amilases são abundantes em plantas, principalmente naquelas que possuem amido como principal carboidrato de reserva, tais como gramíneas e leguminosas. Estas enzimas desempenham importantes papéis na degradação enzimática dos polissacarídeos de reserva durante a germinação, fornecendo a energia necessária às etapas iniciais de desenvolvimento da plântula (ZEEMAN et al., 2010). Amilases já foram detectadas e/ou isoladas em sementes de leguminosas tais como jucá (CAVALHEIRO et al., 2009) e soja (KUMARI et al., 2010), sendo mais estudadas e caracterizadas em sementes de gramíneas (SRIVASTAVA & KAYASTHA, 2014).

As celulases parecem estar envolvidas nos eventos de amadurecimento e abscisão de frutos e germinação de sementes (GIORGINI, 1992; KANELIS & KALAITZIS, 1992; FRANKOVÁ & FRY, 2013). Porém, a maior parte das celulases estudadas é de origem microbiana, sendo poucos os relatos sobre a identificação e isolamento de celulases de fontes vegetais (LOPEZ-CASADO et al., 2008, BARATTO et al., 2011). Para muitos autores, a atividade de celulases em sementes pode ser devido à ocorrência de organismos endofíticos produtores destas enzimas presentes nestes órgãos (CAVALHEIRO et al., 2009). Portanto, torna-se necessário o isolamento e caracterização das celulases encontradas nestas sementes para a identificação de sua origem.

É interessante notar que todos os extratos apresentaram atividade para celulases e amilases e isto pode ser devido ao fato de que, com base em sua solubilidade em soluções aquosas, as proteínas são classificadas em albuminas (solúveis em água) e globulinas (solúveis em soluções salinas diluídas) (OSBORNE, 1924), sendo as enzimas hidrolíticas pertencentes à classe das albuminas e, portanto, solúveis em soluções aquosas (DURANTI & GIUS, 1997).

## Detecção de inibidores de tripsina e papaína

A capacidade dos extratos proteicos de sementes de *C. pyramidalis* em inibir papaína e tripsina está demonstrada no gráfico 1.



**GRÁFICO 1.** Inibição da papaína e tripsina por extratos proteicos de sementes de *Caesalpinia pyramidalis*.

Foi verificado que os extratos inibiram a atividade da tripsina em 100% e da papaína em aproximadamente 80%. A detecção de inibidores de papaína e tripsina com diferentes potenciais inibitórios indicam a existência de inibidores de mais de uma classe de proteases em sementes de *C. pyramidalis*. Em sementes de leguminosas, é relativamente comum a ocorrência de diferentes inibidores para papaína e tripsina, ou ainda inibidores bifuncionais, ou seja, um mesmo inibidor ser capaz de reduzir a atividade de ambas as enzimas (FRANCO et al., 2002). Por exemplo, em sementes de *Pithecelobium dumosum*, foi purificado um inibidor bifuncional de papaína e tripsina com atividade inibitória de enzimas de inseto-praga (OLIVEIRA et al. 2007) e em *Adenantha pavonina* foi identificado um inibidor com dupla atividade para papaína e tripsina (MIGLILO et al., 2010).

Inibidores de proteases isolados de sementes, folhas e raízes de leguminosas estão entre as proteínas de defesa mais bem estudadas e caracterizadas e estas pesquisas mostram que estes possuem ação efetiva contra insetos, nematoides e microrganismos patogênicos além de possuírem ação anticâncer (GOMES et al. 2005, ANDRADE et al., 2010, CÂNDIDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). A presença de inibidores de tripsina e papaína em sementes de *C. pyramidalis* ainda não havia sido reportada e, deste modo, está é uma espécie promissora para a extração e exploração da bioatividade destes inibidores.

### Atividade antibacteriana

Pelo método de difusão em ágar todos os extratos foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, sendo o maior halo de inibição observado no extrato obtido com o tampão fosfato, enquanto que o menor halo foi apresentado pelo extrato obtido com solução salina (tabela 1). A menor CIM foi observada no extrato obtido com água destilada, com uma concentração de 12,5 % (v/v) já o extrato obtido com salina não apresentou CIM nas concentrações testadas (tabela 1). Não foi observada atividade antimicrobiana contra os demais microrganismos avaliados.

**TABELA 1.** Atividade antimicrobiana de extratos proteicos de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* contra *Staphylococcus aureus*

Soluções de extração	Diâmetros dos halos de inibição (mm)	CIM Concentrações das soluções (v/v)
Água destilada	14 ± 0,8	12,5 %
Salina 0,15 M	12 ± 0,5	N.I.
Tris/HCl 50 mM pH 7.5	14 ± 1,0	25 %
Fosfato de sódio 100 mM pH 6,7	15 ± 0,9	25 %

CIM: Concentração Inibitória Mínima; N.I.: Não inibiu o crescimento do microrganismo.

A atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de diversas partes de *C. pyramidalis* contra bactérias e fungos já foi reportada na literatura. Extratos etanólicos de folhas desta espécie foram muito ativos contra cepas resistentes de *S. aureus* (LIMA et al., 2006) e há relatos do uso da infusão das folhas para o tratamento de micoses (CRUZ et al., 2007). Entretanto, não há relatos da atividade antibacteriana de extratos de sementes de *C. pyramidalis*, tornando este dado relevante para a investigação. Deste modo, o isolamento e caracterização do(s) composto(s) ativo(s) presente(s) no extrato torna-se um passo fundamental para a identificação do(s) agente(s) antimicrobiano(s).

### CONCLUSÃO

Foi verificado que extratos obtidos de sementes de *C. pyramidalis* apresentam amilases, celulasas, inibidores de proteases e compostos com atividade antibacteriana, todos com potencialidades de utilização e aplicações para fins biotecnológicos.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo auxílio concedido através do Programa de Bolsas de Produtividade e Interiorização (BPI).

### REFERÊNCIAS

ABE, K.; KONDO, H.; ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.5, n. 1, p. 2763-2768, 1987.



ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, Philadelphia, v. 114, p. 325–354, 2007.

ALVES, E. U.; CARDOSO, E. A.; BRUNO, R. L. A.; ALVES, A. U.; ALVES, A. U.; GALINDO, E. A.; JUNIOR, J. M. B. Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 31, n. 3, p. 405-415, 2007.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. A.; SOUZA, M. M. G.; BOLOGNESE, A. M. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, Amsterdam v. 53, p. 545– 552, 2008.

ANDRADE, L. B. S.; OLIVEIRA, A. S.; RIBEIRO, J. K. C.; KYIOTA, S. VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A.; SALES, M. P. Effects of a novel pathogenesis-related class 10 (PR-10) protein from *Crotalaria pallida* roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 4145-4152, 2010.

BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other Phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405, 2005.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v. 11, n. 2, p. 15-28, jul/dez 2011.

CÂNDIDO, E. S.; PINTO, M. F. S. P.; PELEGRINI, P. B.; LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; POGUE, R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FRANCO, O. L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms, **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 25, p. 3290-3305, 2011.

CAVALHEIRO. M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P., CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.19, n. 2, p. 586-591, abr./jun. 2009.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, Philadelphia, v. 53, p. 31-45, 1997.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Referência Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. 6 ed. Norma Aprovada M7-A6. v. 23, NCCLS,

Pennsylvania, USA, 2003.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JR, A. M.; MELO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, Philadelphia, v.111, p. 409-412, 2007.

FARIAS, D. F.; CARVALHO, A. F. U.; OLIVEIRA, C. C.; SOUSA, N. M.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; FERREIRA, P. M. P.; LIMA, G. P. G.; HISSA, D. C. Alternative method for quantification of alpha-amylase activity. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 2, p. 405-407, 2010.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 59, p. 934-940, 2007.

FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; SALES, M. P.; MELLO, L. V.; OLIVEIRA, A. S.; RIGDEN, D. J. Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. **Proteins**, USA, v. 49, n. 3, p. 335-341, 2002.

FRANKOVÁ, L.; FRY, C. Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 12, p. 3519–3550, 2013.

GIORGINI, J. F. Purification and partial characterization of two isozymes of cellulose from GA3-treated coffee endosperm. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 75-80, 1992.

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. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, Philadelphia, v. 43, p. 1095-1102, 2005.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

KANELLIS, A. K.; KALAITZIS, P. Cellulase occurs in multiple active forms in ripe avocado fruit mesocarp. **Plant Physiology**, England, v. 98, p. 530-534, 1992.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 51, p. 376-382, 1974.

KIM, J-Y.; PARK, S-C.; HWANG, I.; CHEONG, H.; NAH, J-W.; HAHM, K-S.; PARK, Y. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 10, p. 2860-2872, 2009.

KUMARI, A.; SINGH, V. K.; FITTER, J.; POLEN, T.; KAYASTHA, A. M.  $\alpha$ -Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds—Purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. **Phytochemistry**, Philadelphia, v. 71, p. 1657-1666, 2010.

LEGLIMI, H.; MERAIHI, Z.; BOUKHALFA-LEZZAR, H.; COPINET, E.; DUCHIRON, F. Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 12, n. 5, p. 465-475, 2013.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J-P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Philadelphia, v.105, p. 137–147, 2006.

LOPEZ-CASADO, B. R. U.; URBANOVICZ, B. R.; DAMASCENO, C. M.; ROSE, J. K. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 11, p. 329-337, 2008.

MARC, M. J. E. C.; VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the amylase family. **Journal of Biotechnology**, Philadelphia, v. 94, p. 137-155, 2002.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 71, p. 205-207, 2000.

MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, E.; FRANCO, O. L.; SALES, M. P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenantha pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cysteine-proteinases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 148-156, 2010.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; SALES, M. P. 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 Biochemistry**, Philadelphia, v. 45, n. 10-11, p. 858-865, 2007.

OLIVEIRA, J. P.; MAGLIARELLI, H. F.; PEREIRA, F. V.; GIANOTTI, A.; SOARES-COSTA, A.; SILVA, F. H.; WAKAMATSU, A.; SOARES, I. C.; NONOGAKI, S.; TRAVASSOS, L. R.; CARMONA, A. K.; PASCHOALIN, T. Sugarcane Cystatin CaneCPI-4 inhibits Melanoma Growth by Angiogenesis Disruption. **Journal Cancer Science & Therapy**, USA, v. 3, n. 7, p. 161-167, 2011.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. London, UK: Longmans Greens. 1924, 125 p.

PAULA, C. A. A.; COULSON-THOMAS, V. J.; FERREIRA, J. G.; MAZA, P. K.; SUZUKI, E.; NAKAHATA, M.; NADER, H. B.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. *Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases *in vitro* cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 287, n. 1, p. 170-182, 2012.

RANA, N.; WALIA, A.; GAUR, A.  $\alpha$ -amylases from microbial sources and its potential applications in various industries. **National Academy Science Letters**, New York, v. 36, n. 1, p. 9–17, 2013.

SALLES, H. O.; GOMES, G. M. F.; ANDRADE, L. B. S.; ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R.; EGITO, A. S. Ensaio alternativo para triagem de extrato proteico com atividade celulolítica. **Comunicado técnico**, p. 1-4, 2010. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/admin/pdf/00030013140.cot%20112.pdf>. Acesso em: 24. fev. 2013.

TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, USA, v. 145, p. 140–153, 2012.

SANTANA, D. G.; SANTOS, C. A.; SANTOS, A. D.C.; NOGUEIRA, P. C. L.; THOMAZZI, S. M.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; CAMARGO, E. A. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response in abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, Philadelphia, v. 142, p. 445–455, 2012.

SANTOS, C. A.; PASSOS, A. M. P. R.; ANDRADE, F. C.; CAMARGO, E. A.; ESTEVAM, C. S.; SANTOS, M. R. V.; THOMAZZI, S. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 21, n. 6, p 1077-1083, 2011.

SRIVASTAVA, G.; KAYASTHA, A. M.  $\beta$ -amylase from starchless seeds of *Trigonella foenum-graecum* and its localization in germinating seeds. **Plos One**, California, v. 9, n. 2, p. e88697- e88697, 2014.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.

ZEEMAN, C.; KOSSMANN, J; SMITH, A. M. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, California, v. 61, p. 209-234, 2010.

ZHANG; Y-H. P.; HIMMEL, M. E; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Philadelphia, v. 24, p. 452-481, 2006.