



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

SILVIO ASSIS DE OLIVEIRA FERREIRA

**Preparações de lectina pura (BmoLL) e de extrato de folhas de *Bauhinia monandra* para
aplicações biológicas**

RECIFE

2022

SILVIO ASSIS DE OLIVEIRA FERREIRA

Preparações de lectina pura (BmoLL) e de extrato de folhas de *Bauhinia monandra* para aplicações biológicas

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Área de concentração em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Ferreira, Silvio Assis de Oliveira
Preparações de lectina pura (BmoLL) e de extrato de folhas de *Bauhinia monandra*
para aplicações biológicas / Silvio Assis de Oliveira Ferreira. – 2022.

113 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologias. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia,
Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Proteínas. 2. Lectinas. 3. Testes de toxicidade. I. Coelho, Luana
Cassandra Breitenbach Barros (orientadora). II. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-124

SILVIO ASSIS DE OLIVEIRA FERREIRA

Preparações de lectina pura (BmoLL) e de extrato de folhas de *Bauhinia monandra* para aplicações biológicas

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Área de concentração em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 18 / 01 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Teresa dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
Universidade de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, à minha esposa e a todos os benfeitores que Ele colocou na minha longa e sinuosa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter colocado em meu caminho “anjos” que nunca me abandonaram nos momentos decisivos e sempre deram o seu melhor em todos os momentos que precisei.

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, que me guiou na estrada edificante do saber e disponibilizou valoroso tempo, paciência e dedicação para conduzir a realização desta Tese.

À minha paciente e dedicada Profa. Dra. Sandra Rodrigues de Souza, que mobilizou sua atenção e carinho no desenvolvimento desta tese.

À inestimável ajuda do Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo, pela sua contribuição nesta tese.

À amiga e querida Professora D^a Jeanne Claine de Albuquerque Modesto, pela sua valorosa ajuda e apoio científico no laboratório.

Ao amigo professor Dr^o Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, pela ajuda nos momentos decisivos e insetivo na conclusão desse trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia (PPGBF), pelo apoio ao desenvolvimento desse trabalho.

À secretaria do PPGBF, em especial a Fernanda, Clodoaldo e Talita, por terem me oferecido todo apoio e atenção no decorrer do Curso.

Aos amigos do Curso pelo apoio e dedicação, em especial a Benny Ferreira de Oliveira, pois sabemos que ninguém consegue caminhar e vencer as batalhas da vida só.

Ao Departamento de Biofísica, pelo apoio no desenvolvimento desta tese, em especial ao amigo Thierry Wesley de Albuquerque Aguiar, pela ajuda incalculável para realização deste trabalho.

Ao Departamento do Centro Acadêmico de vitória CAV, pelo uso de equipamentos e infraestrutura, essenciais para o desenvolvimento dos experimentos desta tese.

À minha mãe Conceição; pelo seu amor, carinho, sua torcida em todos os momentos.

Agradeço especialmente à minha esposa, companheira e amiga Andreza por ter dado todo apoio que precisei para desenvolver esta tese.

Enfim agradeço muitíssimo à instituição Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, por toda minha formação.

“A caridade é o processo de somar alegrias,
diminuir males, multiplicar esperanças e dividir a
felicidade para que a terra se realize na condição
do esperado Reino de Deus.”

“Chico Xavier”

RESUMO

As lectinas são proteínas que têm a capacidade de se ligar especificamente a carboidratos ou gliconjugados. *Bauhinia monandra* é um arbusto tropical de elevado valor econômico, e tem sido amplamente utilizada como espécie ornamental e principalmente medicinal. O objetivo do estudo foi realizar preparações de lectina (BmoLL) e de extrato de *B. monandra* para aplicações biológicas. A lectina de folhas de *B. monandra* (BmoLL) específica para galactose, foi purificada mediante fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em gel de guar e em gel da goma de sementes de *Leucaena leucocephala*. Para a avaliação da BmoLL foi desenvolvido um anticorpo policlonal (IgG anti-BmoLL) em coelho. O teste de imunodifusão dupla foi realizado para reconhecimento da BmoLL e de lectinas homólogas dos extratos de outros tecidos de *B. monandra* através de precipitação com o IgG anti-BmoLL. Utilizou-se o IgG anti-BmoLL na superfície do eletrodo de ouro para caracterização eletroquímica e piezoelétrica da interação anticorpo-BmoLL. Um imunossensor eletroquímico preparado com IgG anti-BmoLL na superfície do eletrodo de ouro estimou a ligação BmoLL e seu potencial eletroquímico. Também foi desenvolvido um imunossensor piezoelétrico com base em uma micro balança de cristal de quartzo (QCM) com uma superfície de ouro onde o IgG anti-BmoLL foi utilizado na caracterização do reconhecimento da BmoLL. Para as aplicações biológicas, a BmoLL foi avaliada em células de macrófagos J774A.1 e de sarcoma-180 (S-180) e o extrato de folhas de *B. monandra* foram utilizados para avaliação citotóxica em embriões e caramujos adultos (*Biomphalaria glabrata*) e ecotoxicidade de *Artemia salina* (bioindicador). A manufatura de uma matriz com ligação cruzada da goma de sementes da *L. leucocephala* mostrou-se eficiente na purificação da BmoLL. A produção da matriz foi simples, eficiente e de baixo custo para purificação quando comparada com as gomas comerciais. O sistema eletroquímico apresentou sensibilidade para avaliar interações anti-BmoLL IgG com diferentes concentrações de BmoLL. O imunossensor piezoelétrico com análise de injeção de fluxo (FIA) evidenciou uma diminuição de frequência (15 kHz) após a interação de BmoLL (454 µg/mL) com IgG anti-BmoLL (0,11mg/mL) indicando especificidade de anticorpo ao antígeno. O potencial eletroquímico e piezoelétrico da interação anticorpo-BmoLL evidenciou que o IgG anti-BmoLL não provocou nenhuma alteração na ligação de galactose pela BmoLL, indicando que ela purificada não tem afinidade pelos sítios de ligação de carboidrato de BmoLL. A BmoLL purificada apresentou citotoxicidade em uma relação dose dependente, principalmente no tempo de 24h, tanto nas células de macrófagos J774A.1 quanto nas células de sarcoma-180 (S-180). O extrato de folhas de *B. monandra* apresentou toxicidade sobre os

embriões de *B. glabrata* com 100% de inviabilidade dos embriões na concentração de 200 µg/mL. Para os caramujos adultos na concentração de 4000 µg/mL obteve-se 90% de inviabilidade. Na avaliação da ecotoxicidade do extrato de *B. monandra* em *A. salina* foram demonstrados elevados níveis de letalidade, inclusive, na menor concentração avaliada. Portanto, o extrato de *B. monandra* pode ser considerado uma alternativa eficiente e promissora para o controle de vetor no meio ambiente.

Palavras-chave: Proteínas; IgG Anti-BmoLL; Potencial eletroquímico; Citotoxicidade; Ecotoxicidade.

ABSTRACT

Lectins are proteins that have the ability to specifically bind to carbohydrates or glycoconjugates. *Bauhinia monandra* is a tropical shrub of high economic value, and has been widely used as an ornamental and mainly medicinal species. The aim of the study was to carry out lectin (BmoLL) and *B. monandra* extract preparations for biological applications. The galactose-specific *B. monandra* leaf lectin (BmoLL) was purified by ammonium sulfate fractionation and affinity chromatography on guar gel and on *Leucaena leucocephala* seed gum gel. For the evaluation of BmoLL, a polyclonal antibody (anti-BmoLL IgG) was developed in rabbits. The double immunodiffusion test was performed to recognize BmoLL and homologous lectins from extracts from other tissues of *B. monandra* through precipitation with anti-BmoLL IgG. Anti-BmoLL IgG was used on the surface of the gold electrode for electrochemical and piezoelectric characterization of the antibody-BmoLL interaction. An electrochemical immunosensor prepared with anti-BmoLL IgG on the gold electrode surface estimated BmoLL binding and its electrochemical potential. A piezoelectric immunosensor was also developed based on a quartz crystal microbalance (QCM) with a gold surface where anti-BmoLL IgG was used in the characterization of BmoLL recognition. For biological applications, BmoLL was evaluated in macrophage J774A.1 and sarcoma-180 (S-180) cells and *B. monandra* leaf extract was used for cytotoxic evaluation in embryos and adult snails (*Biomphalaria glabrata*) and ecotoxicity of *Artemia salina* (bioindicator). The manufacture of a matrix with cross-linked gum from seeds of *L. leucocephala* proved to be efficient in the purification of BmoLL. The matrix production was simple, efficient and low cost for purification when compared to commercial gums. The electrochemical system showed sensitivity to evaluate anti-BmoLL IgG interactions with different concentrations of BmoLL. The piezoelectric immunosensor with flow injection analysis (FIA) showed a decrease in frequency (15 kHz) after the interaction of BmoLL (454 µg/mL) with anti-BmoLL IgG (0.11 mg/mL) indicating antibody specificity to the antigen. The electrochemical and piezoelectric potential of the antibody-BmoLL interaction showed that anti-BmoLL IgG did not cause any change in galactose binding by BmoLL, indicating that purified BmoLL has no affinity for BmoLL carbohydrate binding sites. Purified BmoLL showed cytotoxicity in a dose-dependent relationship, mainly in the 24h time, both in J774A.1 macrophage cells and in sarcoma-180 (S-180) cells. The extract of leaves of *B. monandra* showed toxicity on the embryos of *B. glabrata* with 100% of inviability of the embryos in the concentration of 200 µg/mL. For adult snails at a concentration of 4000 µg/mL, 90% of -

inviability was obtained. In the evaluation of the ecotoxicity of the extract of *B. monandra* in *A. salina*, high levels of lethality were demonstrated, even at the lowest concentration evaluated. Therefore, the extract of *B. monandra* can be considered an efficient and promising alternative for vector control in the environment.

Keywords: Proteins; Anti-BmoLL IgG; Electrochemical potential; Cytotoxicity; Ecotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A árvore <i>Bauhinia monandra</i> e as diferentes partes da planta.....	23
Figura 2 – Imagens de aglutinação (100 x) de eritrócitos glutarizados por lectinas e inibição da atividade por carboidratos.....	24
Figura 3 – Atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais, empregado para detecção da presença de lectinas em determinada amostra (A). Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante realizado em presença de carboidratos livres com o objetivo de confirmar a presença de lectinas em amostras contendo atividade hemaglutinante, ou de determinar a especificidade das lectinas detectadas (B).....	24
Figura 4 – Visualização do ensaio para detecção da presença de lectinas utilizando eritrócitos de coelho mostrando a ausência de atividade hemaglutinante e a formação de uma rede de hemaglutinação.....	25
Figura 5 – Esquema representativo da classificação estrutural das lectinas. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.....	26
Figura 6 – Molécula de imunoglobina (Ig).....	28
Figura 7 – Esquema representando a célula eletroquímica eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e solução eletrolítica.....	30
Figura 8 – Desenho de cristal de quartzo (cinza) com eletrodos (amarelo) (A); Uma ilustração esquemática da deformação induzida em um cristal na aplicação de uma corrente alternada (B).....	34
Figura 9 – Uma representação esquemática das descobertas de Sauerbrey: (a) o cristal de quartzo oscila a uma frequência constante quando a voltagem apropriada é aplicada, (b) a frequência de oscilação começa a diminuir conforme as moléculas começam a se depositar na superfície do cristal, e (c) a frequência diminui ainda mais à medida que mais moléculas se depositam.....	34
Figura 10 – Estrutura parcial do Sephadex apresentando o polímero de glicose conectado por moléculas de epícloridrina.....	36
Figura 11 – (A) Celulose; (B) Dietilaminoetil-celulose (DEAE-Celulose); (C) Carboximetil-celulose (CM-celulose)	37
Figura 12 – Exemplo de aplicação da amostra e seleção das moléculas que tem afinidade a matriz cromatográfica.....	38

ARTIGO 1

Figura 1 – Representação esquemática da reação de ativação da superfície dourada coberta pelo Dextran e CNBr para estabelecer a imobilização covalente do IgG anti-BmoLL na superfície alterada.....49

Figura 2 – Cromatograma da purificação de IgG anti-BmoLL, em coluna de afinidade proteína A Sepharose CL-4B. O antissoro (3 mL) foi aplicado em uma coluna de 4,5 mL e as frações (1mL) foram coletadas a 33 mL/h. As proteínas não ligadas foram lavadas com pH tampão de fosfato de sódio de 0,1M (evento 1), seguida pela eluição do IgG com 0,1M de glicina pH 4 (evento 2). Frações eluídas de $A_{280} \times 1$ foram agrupadas e armazenadas a -20°C52

Figura 3 – Ensaio de imunodifusão dupla em géis de agarose. Reações cruzadas de soro anti-BmoLL (A) ou anti-BmoLL IgG (I) com lectinas (a), com lectina (s) em extratos de tecido de *B. monandra* (b) e em frações de sulfato de amônio de 0-60% derivadas a partir daí (c). Poços laterais: 1, BmoLL; 2, *B. purpurea* lectina; 3, *Ulex europaeus* lectin I; 4, *U. europaeus* lectin II; 5, *Bandeiraea simplicifolia* lectin II; 6, *Dolichos biflorus* lectin; 7, *Triticum vulgare* lectin; 8, *Lens culinaris* lectina; 9, folhas; 10, flores; 11, hastes; 12, raízes; 13, pecíolos; 14, sementes; 15, botões; e 16, ramos de haste.....52

Figura 4 – Proporção de IgG/área anti-BmoLL/área de imobilização em placas de ouro ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) nas concentrações anti-BmoLL IgG de 0 (■), 0,11 (●) e 0,22 (∇) mg/mL. O IgG foi medido pelo método de quantificação de proteínas e os valores calculados do IgG anti-BmoLL imobilizado são mostrados.....53

Figura 5 – Potenciais eletroquímicos gerados pela interação do IgG anti-BmoLL com diferentes concentrações de BmoLL no electrodo de ouro.....54

Figura 6 – Potenciais eletroquímicos estáveis gerados pela interação do IgG anti-BmoLL com BmoLL (400 g/mL) em eletrodos de ouro, na presença e ausência de 0,2 M de galactose.....55

Figura 7 – Potenciais eletroquímicos gerados pela interação de Con A e BmoLL com anti-BmoLL IgG imobilizados no eletrodo de ouro.....56

Figura 8 – O ensaio piezoelétrico mostrou ligação BmoLL (91 mg/ml) ao IgG anti-BmoLL imobilizado, 0,11 mg/ml (∇). O controle sem IgG imobilizado não mostrou reação quando incubado com BmoLL (●). O sistema também foi incubado com PBS (símbolos abertos)56

ARTIGO 2

Figura 1 – Cromatografia de afinidade com a coluna de 10 mL CLLSG. (Esferas pretas absorvância 280 nm; quadrado vermelho log AH) 25,8mg da fração 0-60%(P₂) foi aplicado na

coluna de 10 mL sobre um fluxo de 36 mL/h⁻¹ e eluída com 30 mM de galactose, alíquotas de 2mL (P₃) e liofilizada. A coluna foi lavada com uma solução de 1 M de NaCl e posteriormente equilibrada com tampão fosfato citrato 100 mM com 150 mM de NaCl.....69

Figura 2 – Eletroforese da BmoLL em condições desnaturantes com β-mercaptoetanol SDS-PAGE gel 3-12% (faixa A) e em condições naturais PAGE gel 3-12% (faixa B), as proteínas usadas como padrão: β-fosforilase (1), albumina (2), ovoalbumina (3), anidrase carbônica (4). Todas foram coradas com azul de Coomassie Brilhante G 250.....71

Figura 3 – Viabilidade celular da BmoLL em Sarcoma 180 (S-180) (A) e J774A.1 (B). Diferenças estatísticas com o controle foram determinadas pela ANOVA seguido de Bonferroni, *P < 0,05 vs Controle. Cada valor determina a média ±SD de três experimentos independentes. Incubações de 24 h (coluna preta) 48 h (coluna cinza)72

ARTIGO 3

Figura 1 – Embriotoxicidade do extrato sobre embriões no estágio de blástula.....84

Figura 2 – Mortalidade dos caramujos adultos *B. glabrata* pelo extrato de *B. monandra*.....85

Figura 3 – Total de embriões de *B. glabrata* após 7 dias pós-exposição ao extrato salino.....86

Figura 4 – Ecotoxicidade do extrato de *B. monandra* sobre *Artemia salina*.....87

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante (AH) foi determinado em eritrócitos glutarizados de coelho 2,5%. Atividade hemaglutinante específica (AHE) corresponde a divisão da AH pela concentração de proteína. Purificação corresponde a atividade específica das frações dividida pela atividade específica hemaglutinante do extrato.....68

ARTIGO 3

Tabela 1 – Condições cromatográficas para identificação do perfil químico por CCD.....81

Tabela 2 – Perfil fotoquímico obtido da cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato das folhas de *B. monandra*.83

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade Hemaglutinante
AHE	Atividade Hemaglutinante Específica
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
BmoLL	Lectina de <i>Bauhinia monandra</i>
F	Fração
Eb	Extrato Bruto
Ig	Imunoglobulina
M	Concentração Molar
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SDS	Sulfato Sódico de Dodecila
PBS	Tampão fosfato de sódio
QCM	Microbalança de cristal de quartzo
BmoLL	Lectina das folhas da <i>Bauhinia monandra</i>
Con A	Lectina Concanavalina A
CNBr	Brometo de cianogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	20
2.1.1	<i>Bauhinia monandra</i>	22
2.1.2	Características gerais.....	22
2.2	LECTINAS	23
2.2.1	Aspectos gerais das Lectinas.....	23
2.2.2	Classificação estrutural das lectinas.....	26
2.2.3	Aplicações biológicas das lectinas.....	27
2.2.4	Molécula de anticorpo	27
2.2.5	Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra lectinas de plantas.....	28
2.2.6	Métodos eletroquímicos	29
2.2.7	Célula Eletroquímica	29
2.2.8	Potenciometria	31
2.2.9	Voltametria cíclica	32
2.3	BIOSSENSORES.....	32
2.3.1	Biossensores Piezoelétricos	33
2.3.2	Purificação de proteínas	35
2.3.3	Cromatografia de afinidade.....	38
2.3.4	Esquistossomose	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	ARTIGO 1	42
4.2	ARTIGO 2	62
4.3	ARTIGO 3	77
5	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS.....	94
	ANEXO A.....	105
	ANEXO B.....	113

1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas desde a pré-história devido a suas propriedades medicinais e nas últimas décadas têm despertado cada vez mais o interesse da comunidade científica em desenvolver estudos acerca dos derivados das espécies vegetais (CAGLIARI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020). Dentre os vários tipos de plantas, o gênero *Bauhinia* pertencente a subfamília das Caesalpinioideae, tem se destacado devido as potenciais atividades bioativas. Esse gênero compreende cerca de 300 espécies, dentre essas *Bauhinia monandra* Kurz, conhecida popularmente na região norte e nordeste como “Pata-de-Vaca” ou “Unha-de-Vaca”, a qual é considerada uma espécie vegetal de grande valor econômico (BORGES; MENDONÇA, 2009). É uma árvore perene que apresenta uma copa arredondada e cresce entre 3 e 15 m de altura. Apresenta flores róseas ou brancas constituídas de apenas um estame, sendo essa a característica que nomeou a espécie (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). evidencia várias indicações populares, sobretudo como adstringente, cicatrizante, atividade anti-inflamatória, hipoglicemiante, efeito diurético, antioxidante e inseticida (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; ALBUQUERQUE, 2014).

Dentre os constituintes das folhas de *B. monandra*, tem-se a lectina BmoLL (*B. monandra Leaf Lectin*), um tipo de proteína que apresenta característica de se ligar de forma específica e não covalente a resíduos de carboidratos (COELHO; SILVA, 2000) e são conhecidas geralmente como aglutinina, pela habilidade de aglutinar eritrócitos (SHARON; LIS, 2004; BADR et al., 2014).

As lectinas junto com imunoglobulinas antiglicanos são eficientes para revelar as estruturas de glicanos, devido a sua elevada especificidade aos respectivos carboidratos constituintes (CUMMINGS; ETZLER, 2009). Um anticorpo de coelho foi produzido em resposta à lectina de *Wistaria floribunda* (WFM) e usado para determinar fragmentos de carboidrato em ensaios de ligação fluorimétricas em outras lectinas (KALADAS et al., 1983). Alguns trabalhos foram publicados centralizando a produção e caracterização de anticorpos policlonais contra lectinas de plantas. ASHFORD et al. (1982) produziram antissoro de coelho contra a lectina de batata (*Solanum tuberosum*).

A caracterização de macromoléculas lectinas envolve vários passos analíticos, reagentes de alto grau de pureza e aparelhamentos sofisticados (CHEN et al., 2019); os métodos utilizados

são muitas vezes dispendiosos. Os biossensores eletroquímicos tem se destacado por serem econômicos, uma vez que utilizam quantidades mínimas de amostras, podem reduzir o uso de reagentes e simplificar procedimentos, são sistemas analíticos que produzem respostas rápidas e detectam as amostras com elevada sensibilidade (LI et al., 2011; SILVA et al., 2016; TAKALOO et al., 2021). São instrumentos analíticos que integram materiais biológicos ativos adsorvidos em uma superfície de transdução, quantificando ou qualificando as amostras, indicando transformações químicas ou bioquímicas na superfície do sensor (BETTAZI et al., 2017). Biossensores para lectinas são capazes de detectar carboidratos simples, glicoconjugados, células e microrganismos (ABREU et al., 2017) portanto, já foram utilizados na diferenciação de alterações nos padrões de glicosilação exibidos por células tumorais (SILVA et al., 2016), no diagnóstico da dengue (ANDRADE et al., 2011) e seleção de patógenos de importância médica (OLIVEIRA, 2011; SÁ et al., 2020).

Lectinas podem ser purificadas através da utilização de polissacarídeos, como a galactomanana presente em diversas espécies vegetais inclusive nas sementes de *Leucaena leucocephala* a qual é considerada economicamente viável e promissora para a manufatura de matriz cromatográfica de afinidade, devido ao custo reduzido, fácil manipulação e considerável eficiência na purificação de lectinas que se ligam a galactose (SESHAGIRIRAO et al., 2005). As purificações de novas lectinas e descobertas de suas funções biológicas aumentam o interesse de estratégias de purificações com cromatografia de afinidade como padrão de purificação simples e de fácil processo operacional (SCOPES, 1994).

A lectina BmoLL já foi utilizada para diferentes caracterizações estruturais e biológicas, tais como a afinidade de forma seletiva os diferentes sorotipos de dengue, atribuindo-se aos diferentes padrões de glicoproteínas nos soros produzidos pela resposta imune a partir de pacientes infectados pelo vírus da dengue (ANDRADE et al., 2011), apresentando ação inseticida contra larvas de *Zabrotes subfasciatus* e *Anagasta kuehniella* (MACEDO et al., 2007) e possível efeito antioxidante não apresentando genotoxicidade nem citotoxicidade em células e bactérias (SISENANDO et al., 2009). Apresentou atividades biocidas promissoras no controle populacional de pragas ou microrganismos indesejáveis, contudo, ainda não há estudos que reportem a toxicidade de preparações de folhas contendo a BmoLL no controle populacional de caramujos da *Biomphalaria glabrata* o qual é hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose. Dessa forma, o objetivo do estudo foi realizar

a purificação da lectina das folhas de *B. monandra* (BmoLL) em suportes cromatográficos por afinidade, caracterizar através das interações eletroquímicas entre a BmoLL, soro e IgG anti-BmoLL, avaliar o perfil de citotoxicidade dessa proteína em células normais, cancerígenas, avaliar o extrato salino das folhas da *B. monandra* em embriões e caramujos *Biomphalaria glabrata* e ecotoxicidade em *Artemia salina*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas como fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JUNIOR, PINTO; MACIEL, 2005). Desde cedo as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em suas essências, princípios ativos os quais ao serem experimentados no combate às doenças revelaram empiricamente seu poder curativo (BADKE et al., 2011). Os primeiros registros datam do período de 2838- 2698 a.C. quando o imperador chinês Shen Nung catalogou 365 ervas medicinais e venenos que eram usados sob inspiração taoísta de Pan Ku, considerado deus da criação (VALE, 2002).

O emprego de plantas medicinais para a manutenção e a recuperação da saúde tem ocorrido ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local até as formas mais sofisticadas de fabricação industrial de medicamentos (HAMILTON, 2004; LORENZI; MATOS;2008).

A percepção sobre o poder curativo de algumas plantas é uma das formas de relação entre populações humanas e plantas, e as práticas relacionadas ao uso tradicional de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa para a manutenção da saúde ou o tratamento de doenças. (AMOROZO, 2002). No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (OMS,1990).

No entanto, sua continuidade pode ser ameaçada pela interferência de fatores como: maior exposição das comunidades à sociedade urbano-industrial e, conseqüentemente, às pressões econômicas e culturais externas; maior facilidade de acesso aos serviços da medicina moderna devidos aos avanços ocorridos no meio técnico-científico, sobretudo no âmbito das ciências da saúde com o uso de medicamentos industrializados, gradativamente introduzidos no cotidiano das pessoas modernas, através de campanhas publicitárias que prometem curar as mais diversas doenças (AMOROZO, 2002).

A toxicidade dos medicamentos preparados com plantas pode parecer trivial quando comparada com os tratamentos convencionais, entretanto, um problema sério de saúde pública. Plantas medicinais podem desencadear reações adversas pelos seus próprios constituintes, devido a interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do paciente (idade, sexo, condições fisiológicas, características genéticas, entre outros). Erros de diagnóstico, identificação incorreta de espécies de plantas e uso diferente da forma tradicional podem ser perigosos, levando a superdose, inefetividade terapêutica e reações adversas (WHO, 2002). Além disso, o uso desses produtos pode comprometer a eficácia de tratamentos convencionais, por reduzir ou potencializar seu efeito (CAPASSO et al., 2021).

Por outro lado, a introdução da medicina moderna traz outra opção para as práticas de saúde em locais já estabelecidos e pode não eliminar o uso da medicina popular. Ao invés disso, em muitas instâncias, procedimentos da medicina moderna e da medicina popular são complementares (AMOROZO, 2004).

A atenção dirigida pelas autoridades e administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos, por diferentes razões e em diferentes setores. Incentivos em investimentos públicos em plantas medicinais tem sido feito pela OMS desde 1978, observando-se crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica, assim como a observação do aumento de seu uso pela população (OMS, 1978).

Atualmente, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural. Acredita-se, que o cuidado realizado por meio das plantas medicinais seja favorável à saúde humana, desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios. O profissional de saúde, deve considerar tal recurso de origem popular na sua prática de cuidar, viabilizando um cuidado singular, centrado nas crenças, valores e estilo de vida das pessoas cuidadas (ISERHARD et al., 2009). No Brasil, foi publicada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), que visa ampliar as opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS, com garantia de acesso as plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados, com segurança, eficácia e qualidade (Brasil; 2006a).

2.1.1 *Bauhinia monandra*

2.1.2 Características gerais

A família das Fabaceas é uma das mais importantes no reino vegetal, com abundante número de gêneros e espécies distribuídos nas suas três subfamílias, Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae (ENGLER, 1964). Nesta última está presente o gênero *Bauhinia*, constituído aproximadamente 300 espécies, sendo no Brasil, ocorrem cerca de 20% destas (HAVER, 2002), onde são utilizadas na medicina tradicional, vendidas em feiras livres ou encontradas na composição de diversos fitoterápicos (MELO et al., 2011).

Estas espécies apresentam diversas indicações populares, principalmente como adstringente, cicatrizante, anti-inflamatória (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002) tônico, expectorante, hipocolesterolemiantes, hipoglicemiantes (ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007) efeito diurético, anti-hipertensiva, anti-inflamatório, antioxidante, inseticida e tendo as flores ação laxativa suave (MACEDO et al., 2007).

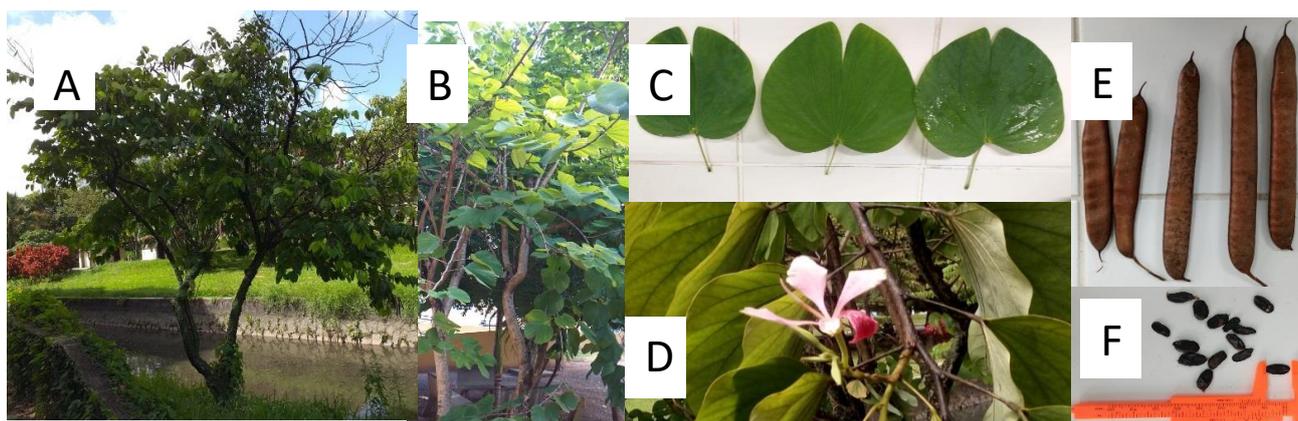
A espécie *Bauhinia monandra* Kurz, possui grande valor econômico, é conhecida vulgarmente como “Pata-de-Vaca” e por “Unha-de Vaca” (BORGES; MENDONÇA, 2009), utilizada com fins ornamental, forrageiro e principalmente medicinal (MARTINS et al., 1995). É um arbusto ou uma árvore perene com uma copa arredondada e que chega a crescer entre 3 e 15 metros de altura. Apresentam flores róseas ou brancas que possuem apenas um estame, sendo essa a característica que nomeou a espécie (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002) (Figura 1). Muitas vezes é cultivada por suas flores serem elegantes e folhagens ornamentais. É popularmente plantada em jardins de rua nas regiões tropicais da Austrália, América, Ásia e na Índia ocidental (KEAY, 1989). Crescem em solos secos e pouco ricos em nutrientes e seu fruto é tipicamente um legume, chamado de vagem (ALVES; BRETT, 2002). No Estado de Pernambuco, podem ser encontradas espécies nativas como *B. chelantha* Stend, *B. forficata* Link, *B. heterandra* Benth, *B. membranacea* Benth, *B. monandra* Kurz (ALVES et al., 2000).

As sementes de *B. monandra* são fontes ricas de vitamina A e contêm uma quantidade elevada de ácido linoleico e baixa quantidade de ácido mirístico (KEAY, 1989). Segundo pesquisas, a *B. monandra* tem potencial antidiabético contra diabetes induzida experimentalmente em ratos (MCCUNE; JOHNS, 2002) e este potencial antidiabético tem sido

ligado à presença de componentes antioxidante (ANOSIKE; BIDOÁ; EZEANYIKA, 2012). Estudos demonstraram o potencial antioxidante do extrato de folhas de *B. monandra* por meio de suas ações inibitórias *in vitro* sobre radicais livres de DPPH, radicais de peróxido de hidrogênio e radicais livres de íons ferrosos (NWORIE; OKORIE,2018).

Argolo et al. (2004), demonstram que os extratos clorofórmicos e acetato de etila das folhas de *B. monandra* Kurz contêm compostos com significantes efeitos antioxidantes (flavonoides e esteroides). Já o extrato etanoico apresentou atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes tipo 2 induzida e acredita-se que essa atividade esteja relacionada com a forte ação antioxidante demonstrada nos experimentos. Fernandes et al. (2012) detectaram a presença de rutina no extrato hidroetanólico das folhas de *B. monandra*.

Figura 1 – A árvore *Bauhinia monandra* e diferentes partes da planta.



Aspectos da *B. monandra*: A, árvore; B, caule; C, folhas; D, flores; E, frutos; F, sementes.

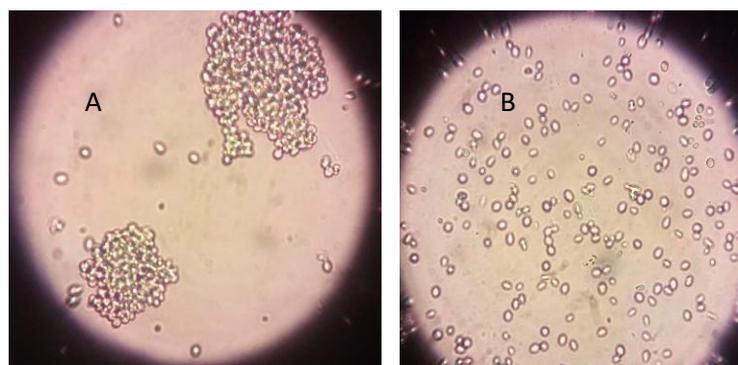
2.2 LECTINAS

2.2.1 Aspectos gerais das Lectinas

As lectinas estão dentro de um sistema que classificam todas as proteínas e peptídeos que se ligam de maneira específica e reversível a carboidratos e não possui origem de sistema

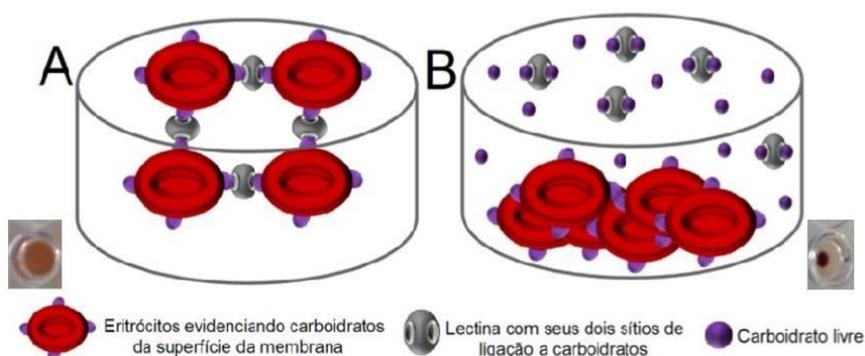
imunológico conhecido (COELHO et al., 2017). Elas têm sido usadas como uma nova ferramenta para decifrar e mapear a diversidade das estruturas dos glicanos, assim como os aminoácidos e nucleotídeos pertencente aos códigos biológicos (LUDWIG et al., 2019). As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e são encontradas nas bactérias, fungos, algas, plantas, animais invertebrados e vertebrados, no entanto, só nas plantas encontramos em maior disponibilidade de quantidade e diversidade (COELHO et al., 2017; GAUTAM et al., 2019); a sua atividade pode ser revelada pelos ensaios de hemaglutinação (AH) (Figura 2A), e (Figura 3A) que consiste em ligações específicas entre as lectinas e os carboidratos presente no glicocálix das membranas plasmáticas dos eritrócitos formando uma rede de conexão que pode ser inibida na presença de um ou mais carboidratos ou glicoproteínas específicas, Figura 2B e Figura 3B.

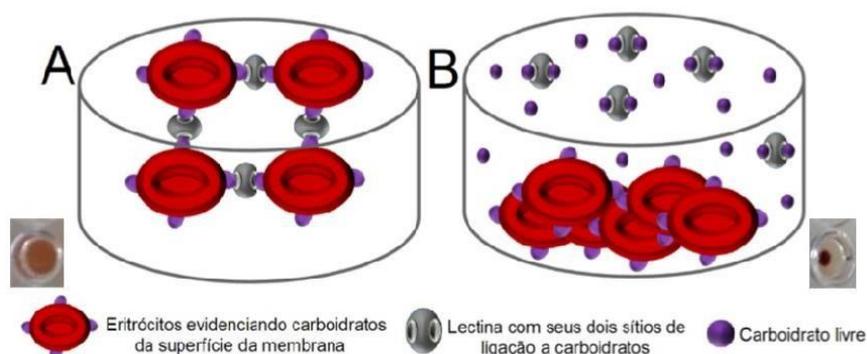
Figura 2 – Aglutinação de eritrócitos glutarizados por lectinas (A) e inibição da atividade por carboidratos (B), Imagens (100 x).



Fonte: Ferreira, 2021.

Figura 3 – Atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais, empregado para detecção da presença de lectinas em determinada amostra (A). Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante realizado em presença de carboidratos livres com o objetivo de confirmar a presença de lectinas em amostras contendo atividade hemaglutinante, ou de determinar a especificidade das lectinas detectadas (B).





A determinação da atividade hemaglutinante das lectinas em solução salina, pode ser através de um extrato bruto, fração e em lectinas puras, onde se observa a capacidade das lectinas em aglutinar eritrócitos, os quais podem ser tratados enzimaticamente por tripsina, como também quimicamente por glutaraldeído ou formaldeído (MO et al., 2000). Os ensaios de hemaglutinação possibilitam a avaliação da estabilidade da lectina a valores de pH, temperatura e presença ou ausência de cofatores e guia as condições a serem usadas na aplicação biotecnológica da Lectina (PAIVA et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4 – Visualização do ensaio para detecção da presença de lectinas utilizando eritrócitos de coelho mostrando a ausência de atividade hemaglutinante e a formação da malha de hemaglutinação.



Fonte: Ferreira, 2020

As interações Lectinas/carboidrato acontecem em um local específico, no qual as ligações envolvidas são do tipo pontes de hidrogênio (GAJDOS et al., 2021) van der Waals e interações hidrofóbicas, essas ligações não envolvem reações catalíticas, são reversíveis e possuem elevada especificidade (COELHO et al., 2017).

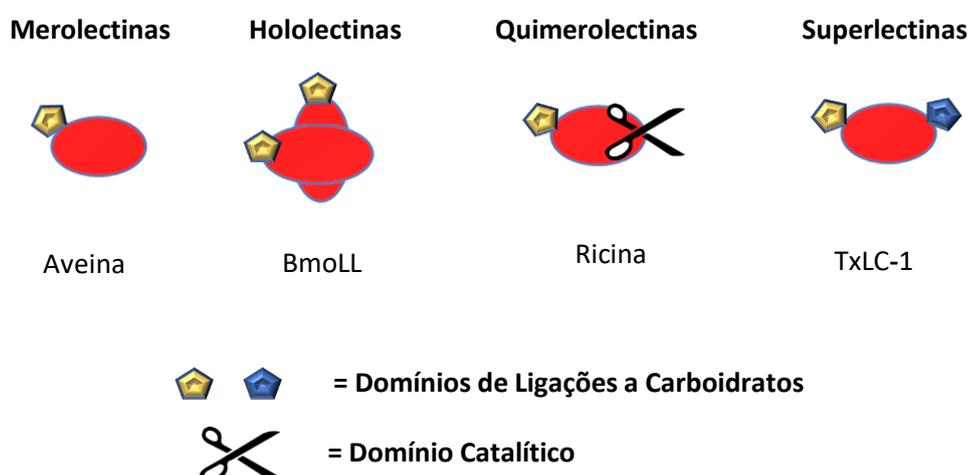
As lectinas podem ser agrupadas de acordo com o organismo ou microrganismo de origem como por exemplo: lectinas de algas, de plantas, animais e bactérias. Lectinas de plantas possuem como característica a presença de ao menos, um local de ligação ao carboidrato, que

não possui função catalítica e que se liga reversivelmente a carboidratos simples e dissacarídeos (DAMME et al., 1998; VAN DAMME, 2007; MISHRA et al., 2019; NIVETHA et al., 2021).

2.2.2 Classificação estrutural das lectinas

As lectinas formam uma classe heterogênea de proteínas. Quanto a sua classificação, podem ser agrupadas de acordo com a organização estrutural sendo subdivididas em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, superlectinas e multilectinas. As merolectinas são lectinas que apresentam apenas um domínio de ligação a carboidrato, quer dizer, são monovalentes e por isso não tem a capacidade de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas são proteínas que possuem dois ou mais domínios que interagem com carboidratos iguais ou similares estruturalmente, e como são divalentes ou multivalentes pode precipitar glicoconjugados e aglutinar células. As quimerolectinas são lectinas com um domínio ligante a carboidrato e mais um domínio catalítico ou atividade biológica distinta atuando independente do domínio de ligação a carboidrato. As superlectinas são consideradas uma classe de hololectinas que tem, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos. Contudo, estes domínios, diferentes das hololectinas, não são iguais e nem similares o que confere a capacidade de reconhecerem carboidratos com estruturas diferentes. E as multilectinas são proteínas que apresentam dois domínios de ligação a carboidratos idênticos, porém, podem formar ligações com carboidratos distintos (BUNN-MORENO et al., 1981; VAN DAMME et al., 1998; LACERDA, 2015; VIEIRA et al., 2016; MISHRA et al., 2019).

Figura 5 – Esquema representativo da classificação estrutural das lectinas. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e multilectina.



Fonte: Adaptada de referência (VAN DAMME et al., 1998)

2.2.3 Aplicações biológicas das lectinas

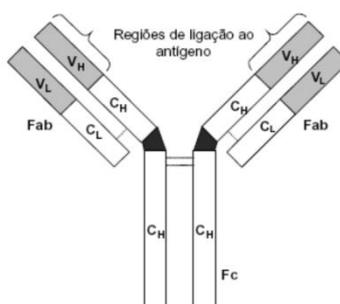
As lectinas são instrumentos eficazes e amplamente usadas em aplicações biológicas e biomédicas (COELHO et al., 2017), têm a capacidade de interagir de modo específico e reversível a glicoconjugados, carboidratos, tanto livres quanto aderidos à superfície de celulares, permitindo que essas proteínas reconheçam padrões anormais de carboidratos exibidos por células cancerígenas (SILVA et al., 2016), no qual elas podem ser utilizadas no diagnóstico e em terapia (GAUTAM et al., 2019). Desse modo as lectinas são moléculas que têm exibido diversas aplicações (VINCENT et al., 2014; CAVADA et al., 2021), na revelação e seleção de microrganismos causadores de infecções (CESEWSKI et al., 2020), atuando e auxiliando no combate de vírus patogênicos (EL-MARADNY et al., 2021; RATHNASAMY et al., 2021); ainda podem ter atividade antibacteriana (CORIOLANO et al., 2019), podem auxiliar na reconstrução de tecidos ósseos (OLIVEIRA et al., 2018), e atividade inseticida (PAIVA et al., 2014; CHEN et al., 2021) e como marcadores histoquímicos (TOMIYASU et al., 2018); lectinas têm sido utilizadas em cromatografias de afinidade para o monitoramento em processo da concentração de proteínas glicosiladas (STANTIČ et al., 2021), ainda podem atuar na indução da multiplicação celular, na ativação do sistema imune (CLEMENT et al 2010; RATHNASAMY et al 2021; BUTLE et al., 2021), e também podem ser aplicadas como biossensores (SÁ et al., 2020).

2.2.4 Molécula de anticorpo

As imunoglobulinas, anticorpos, têm um papel importante no reconhecimento de diversos agentes infecciosos, fazem parte do sistema de defesa dos organismos contra moléculas estranhas com capacidade de reconhecer e neutralizá-las (XIAOJIE et al, 2021). Têm sua origem no sistema imunológico modulado pela ativação de células de defesa (linfócitos B),

possuem a capacidade de ligar-se de caráter reversível e com ampla afinidade a epítomos da molécula alvo (LIPMAN et al., 2005), em mamíferos podem ser classificados em cinco classes de anticorpos: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE (HANLY et al 1996). As Igs são glicoproteínas composta de quatro cadeias polipeptídicas, com unidades estruturais básicas formadas por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) também idênticas, unidas entre si por pontes dissulfeto (BENJAMINI et al., 1996). Análise da cadeia polipeptídica demonstra que ela possui uma região altamente variável, ou região-V, é responsável pelo reconhecimento do antígeno, e uma região constante, ou região- C, responsável por uma série de funções efetoras, como fixação do complemento e ligação a outros receptores celulares do sistema imunológico, Fig. 6. Os anticorpos podem ser do tipo monoclonais, clones de um linfócito B específico ou policlonais quando originados por clones de diversos linfócitos B (LEENAARS et al., 2005).

Figura 6 – Molécula de imunoglobulina (Ig).



Fonte: Bittencourt, 2008

A molécula é simétrica possuindo dois sítios idênticos de ligação ao antígeno (Fab) e um sítio (Fc) que se liga aos receptores em células efetoras, ou proteínas do complemento. L e H referem-se as cadeias leves e pesadas, respectivamente.

2.2.5 Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra lectinas de plantas

A produção de anticorpos policlonais é realizada em condições laboratoriais através da hiperimunização de animais com a utilização de adjuvantes. Para esse processo, são necessários protocolos que quando aplicáveis possam resultar em um título de anticorpos altos e com elevada especificidade. É importante destacar que, essas biomoléculas são muito utilizadas em

vários âmbitos tais como, imunização contra doenças causadas por vírus, controle de qualidade na indústria de alimentos e testes diagnósticos. As lectinas por sua vez, podem produzir anticorpos eficientes no reconhecimento de estruturas homólogas de outras lectinas, apresentando potencial promissor na fabricação de biossensores eletroquímicos de caracterização dos domínios de ligação a carboidratos (ASHFORD et al., 1982; LEENAARS et al., 2005; STOCK et al., 2015; DELAHAUT et al., 2017; STEIN et al., 2017; KHURTSIDZE et al., 2017; SOUZA et al., 2019).

2.2.6 Métodos eletroquímicos

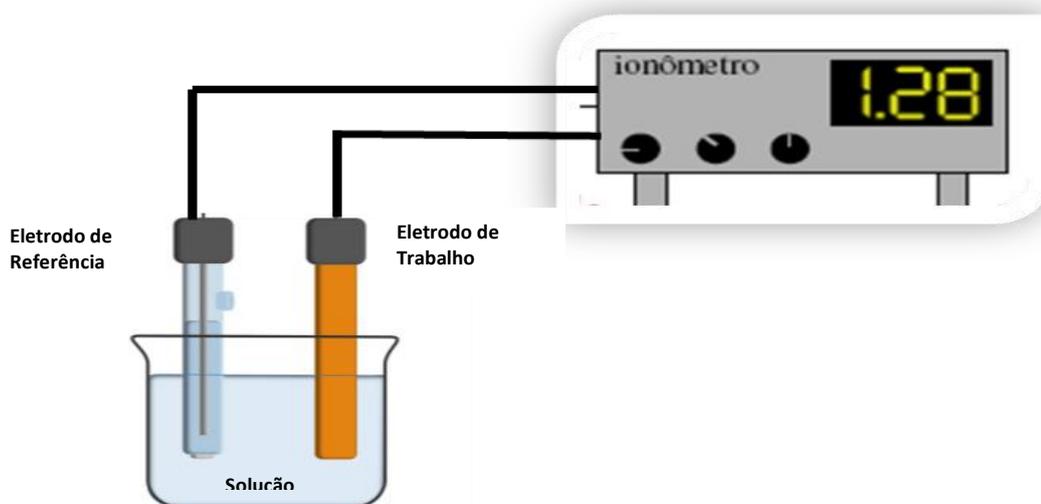
A eletroquímica caracteriza-se por ser uma das áreas da físico-química responsável pelo estudo das interações que existem entre as reações químicas e os elétrons podendo ser avaliada as cargas e os potenciais elétricos, além de sua relação com aspectos biológicos, químicos e físicos do analito. A técnica eletroquímica é considerada uma eficaz ferramenta de monitoramento tanto industrial quanto ambiental, além disso, também fazem parte de aplicações biomédicas (ZHU et al., 2019; OMAÑA-SANZ et al., 2020; SHU et al., 2020; TANG et al., 2020). De forma relativa é uma técnica prática que possui instrumentação variada por isso, cada vez mais, tem sido evidenciado o aumento do número de plataformas para desenvolvimento de monocamadas, transdutores, conexões e microelétrodos com elementos biológicos. As reações acontecem em célula eletroquímica no sistema que avalia as interações da interface entre o eletrodo e a solução (GIL et al., 2019).

2.2.7 Célula Eletroquímica

A célula eletroquímica pode ser construída por dois eletrodos: um de trabalho e o outro de referência acoplados a um transdutor eletrônico (Figura 7). O potencial elétrico gerado por reações de oxidação, pode ser quantificado (PIMENTEL, 2009). As células eletroquímicas são dispositivas classificadas de acordo com espontaneidade do processo de transferência de elétrons em questão. Quando a reação química produz a energia elétrica (processo espontâneo), a célula eletroquímica é denominada de célula galvânica e quando a reação química requer uma fonte externa de energia elétrica (processo não espontâneo) a célula eletroquímica classifica-se

como eletrolítica (KIM et al., 2019; DASSAA et al., 2020). Esses dispositivos podem ser utilizados em estudos de compostos de ampla abrangência como, líquidos orgânicos, compostos orgânicos e macromoléculas biológicas (SUN et al., 2019; TANG et al., 2020; ZHOU et al., 2021).

Figura 7 – Esquema representando a célula eletroquímica, eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e solução eletrolítica.



Fonte: Adaptado de Gil et al., 2019

A condução iônica e a condução elétrica formam a superfície do eletrodo, e cada componente de um par redox forma uma semi-célula, o eletrodo utilizado como referência ou padrão é o hidrogênio. Esse eletrodo é formado pelo gás hidrogênio a 1 atm em solução com pH igual a 0. Com base no eletrodo de referência, a transferência de elétrons pode ser realizada em semi-células de forma individual, pois, o eletrodo possui um potencial constante e estável, independente das características da solução (JARDIM, 2014; WANG, 2019).

No entanto, o eletrodo de hidrogênio, foi substituído nas reações químicas por outros eletrodos de referências, por não ser considerada uma meia-célula padrão prática. Dentre os eletrodos de referências mais utilizados estão o de calomelano saturado (Hg/HgCl_2) e o de

prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), estes eletrodos são ajustados conforme o padrão hidrogênio (JARDIM, 2014).

O eletrodo de trabalho, o qual corresponde a outra metade da semi-célula, realiza a interação com o analito e mensura as respostas das substâncias ou componentes químicos analisados. Geralmente, consiste em uma tira metálica de platina a qual é fundida em um bastão de vidro, o ouro também é um tipo de metal que pode ser utilizado. Esses metais interagem diretamente com a solução e junto com a meia-célula formam o sistema redox. A transferência de elétrons na reação de oxidação-redução de uma proteína imobilizada ou adsorvida ocorre em função de algumas variáveis como, estrutura conformacional da biomolécula e propriedades físico-químicas da região de interfaces (PIMENTEL, 2009; JARDIM, 2014; WANG, 2019).

2.2.8 Potenciometria

A técnica de potenciometria baseia-se na utilização de eletrodos para a medição de potenciais elétricos que geram informações químicas. Utiliza-se o potencial do eletrodo para viabilizar uma reação de transferência de elétrons. Os sensores potenciométricos são dispositivos que transformam um sinal de bioreconhecimento em potencial elétrico, de modo que este seja proporcional à porcentagem da concentração dos compostos ativos, consumidos ou produzidos na reação química (GIL et al., 2019; CLARKE et al., 2020). A reação de transferência de elétrons ocorre devido à força do movimento de cargas; quando um potencial é gerado no eletrodo de medição, esse potencial resulta da desigualdade distributiva de íons em análise no sistema de interfaces, que podem ser comparados ao valor invariável do eletrodo de referência e da inatividade do íon na solução interna. Desse modo, o potencial do eletrodo de trabalho é proporcional à concentração ou atividade do analito na solução (WANG, 2019; 2005; ZHU et al., 2019). A força do movimento das cargas elétricas resulta na reação de transferência de elétrons. Quando um potencial é produzido no eletrodo de medição, ocorre uma distribuição desigual de íons em análise no sistema de interfaces, podendo ser comparado ao valor invariável do eletrodo de referência e à inatividade do íon na solução interna da amostra, dessa forma, o potencial do eletrodo de trabalho é diretamente proporcional à concentração ou atividade do analito na solução (WANG, 2019; 2005; ZHU et al., 2019). A avaliação do potencial de proteínas como: enzimas, anticorpos e lectinas são importantes, pois viabilizam o mapeamento

de destruição das cargas elétricas de área superficial. Um estudo evidenciou através de um sistema potenciométrico que as lectinas apresentaram modificações em sua estrutura na presença de íons mesmo em amostras com maior complexidade (PIMENTEL, 2009; SANTANA et al., 2012). As informações sobre o processo de óxido-redução em lectinas fazem parte da primeira etapa para o entendimento de seus potenciais de atividades biotivas (SOUZA et al., 2001).

2.2.9 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é geralmente utilizada para a aquisição de informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos (LI et al., 2020). É considerada a primeira etapa para a avaliação das propriedades elétricas de um analito em solução. Esta técnica fornece informações sobre termodinâmica de processo redox, cinética de reações químicas complexas de transferência de elétrons e reações químicas com mecanismos adsorptivos. Esta técnica permite localizar de forma rápida o potencial redox das moléculas carregadas, por meio da caracterização da passagem dos elétrons obtida mediante uma leitura do potencial do eletrodo de trabalho, aplicando-se um formato de onda triangular para que seja realizada a medição da corrente resultante (SOUZA et al., 2017; WANG, 2019). A obtenção das características do analito ocorre por meio da determinação da amplitude da corrente elétrica, a qual resulta da relação entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, quando uma tensão elétrica é realizada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. Podem ser necessários um ou mais ciclos durante o processo conforme os dados a serem obtidos. O potenciostato é o dispositivo utilizado para medir a corrente medir a corrente resultante e o gráfico de voltamograma é obtido através da curva corrente versus potencial (PACHECO et al., 2013; WANG, 2019).

2.3 BIOSSENSORES

Os biossensores são sensores eletroquímicos que oferecem várias vantagens incluindo alta sensibilidade e rapidez. Também são considerados econômicos, com capacidade de identificar moléculas-alvo em substâncias heterogêneas, utilizando uma reduzida quantidade de amostra (BETTAZZI et al., 2017; RAWAT et al., 2017). Esses sistemas funcionam com base

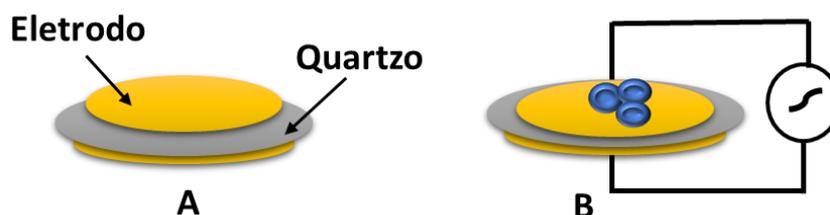
na imobilização de biomoléculas sobre a superfície do eletrodo, que ao entrarem contato com seus ligantes convertem o sinal biológico em uma corrente elétrica mensurável (SILVA et al., 2018). Entre algumas reações que podem ser avaliadas utilizando estes sistemas incluem-se as interações proteínas/carboidratos, anticorpos/antígenos, enzimas/substratos (MEHROTRA et al., 2016).

Os biossensores têm sido utilizados de forma promissora para diagnóstico microbiológico de importância global (ABID et al., 2021), identificação de contaminantes da água (RENGARAJ et al., 2018; FRUHMANN et al., 2018) e monitoramento de alimentos processados (PUNDIR et al., 2019). De forma ampla, também têm sido úteis para o reconhecimento de células cancerígenas, através da utilização de lectinas como moléculas de bioreconhecimento devido à capacidade de diferenciação de padrões específicos de carboidratos em células tumorais. A utilização desse sistema também abrange a caracterização da distribuição de cargas na superfície das lectinas e os parâmetros de ligação as moléculas de carboidratos (SOUZA et al., 2001; SOUZA et al., 2003; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2017; FALKOWSKI et al., 2020).

2.3.1 Biossensores Piezoelétricos

A relação entre pressão mecânica e corrente elétrica em alguns materiais específicos, recebe o nome de piezoelectricidade. Experimentos realizados com cristais de quartzo demonstraram que o potencial elétrico é diretamente proporcional a deformação sofrida nas faces opostas. Esse processo ficou conhecido como efeito piezoelétrico (Figura 8) (CURIE, 1980), possibilitou o desenvolvimento da Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*). É usada em diversos biossensores piezoelétricos para quantificar a variação de massa em escala micrograma e nanograma por unidade de área; o quartzo pode ser confeccionado para vibrar em uma certa frequência definida pela aplicação de uma diferença de potencial, gerado por eletrodo metálico. A frequência é afetada pela adição ou subtração de pequenas quantidades de massa na superfície do eletrodo que pode ser acompanhada em tempo real e sem ajuda de marcadores (*label-free*) para obter dados úteis sobre interações moleculares, reações de oxirredução e crescimento de filmes, tornando a técnica QCM de baixo custo e de baixa complexidade (LU, 1984).

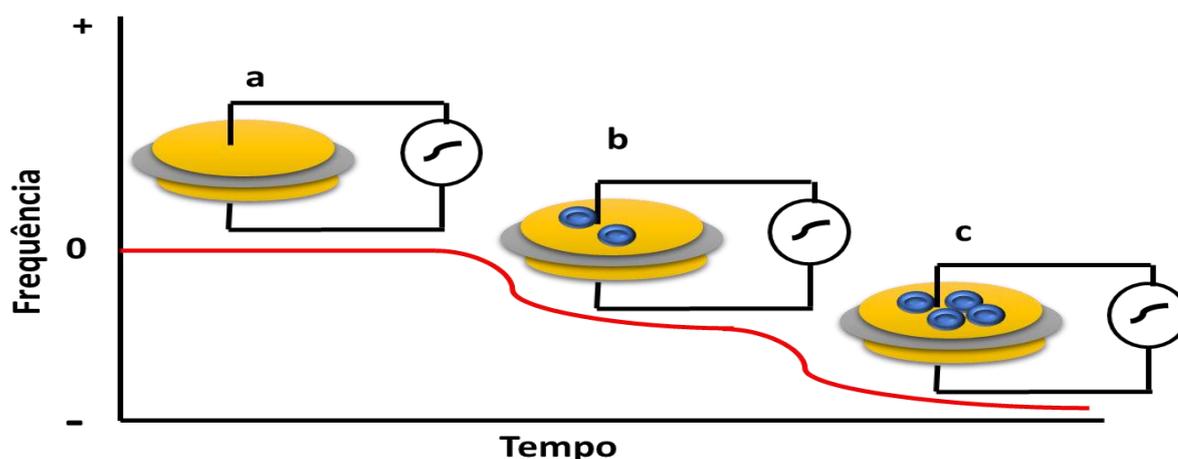
Figura 8 – Desenho de cristal de quartzo (cinza) com eletrodos (amarelo)(A); uma ilustração esquemática da deformação induzida em um cristal na aplicação de uma corrente alternada (B).



Fonte: Ferreira, 2021

O quartzo é bastante utilizado por ter uma deformação elástica onde a polaridade no sentido oposto é detectada na outra face do cristal, é revestido por uma camada fina de ouro o qual é acoplado a um oscilador que induz uma corrente alternada levando a uma deformação via efeito piezoelétrico reverso, levando à formação de um dipolo (BUTTY, WARD, 1992). No circuito oscilador é inserido um medidor de frequência que se altera quando uma massa é depositada na superfície do cristal conduzindo uma redução da amplitude acústica e como consequência uma redução da frequência de ressonância do cristal (figura 9) (SAUERBREY, 1959).

Figura 9 – Uma representação esquemática das descobertas de Sauerbrey: (a) o cristal de quartzo oscila a uma frequência constante quando a voltagem apropriada é aplicada, (b) a frequência de oscilação começa a diminuir conforme as moléculas começam a se depositar na superfície do cristal, e (c) a frequência diminui ainda mais à medida que mais moléculas se depositam.



Fonte: Ferreira, 2021

Nos últimos anos a QCM tem sido utilizada para várias aplicações biotecnológicas incluindo pesquisas em estudos de adsorção de proteínas, biorreconhecimento de moléculas específicas, diagnóstico de patógenos, estudo de hibridação de ácidos nucleicos, reconhecimento de vírus e na identificação do vírus Zika (FELGUEIRAS, et al., 2016; KAUSHIK, A. et al., 2018; MIRANDA, et al., 2019; DOLAI S; SHIBATA, et al., 2020; TABIB-AZAR, 2020).

2.3.2 Purificação de proteínas

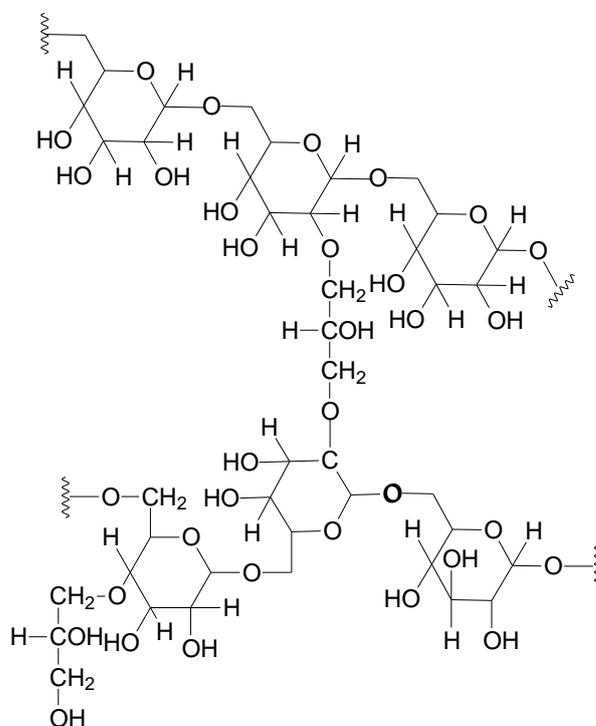
O processo de isolamento de proteínas, inicia-se com a preparação do extrato bruto em soluções ao qual tem afinidade. Os métodos mais comuns de purificar as lectinas têm como referência as suas características, tais como carga elétrica, tamanho, solubilidade, e seus aspectos peculiares, como um grupo de proteínas com afinidade por carboidratos e glicoconjugados. Os métodos mais comuns usados na purificação de proteínas na área da biotecnologia são: precipitação salina (SILVA et al.; 2012), cromatografia de afinidade e gel filtração (KUMAR et al.; 2017), cromatografia de troca iônica (IHUOMA et al., 2013), extração líquido-líquido com micelas invertidas (JIANG et al.; 2019).

A cromatografia é uma técnica que separa os componentes de uma amostra, compreende uma fase móvel e uma fase estacionária (partículas esféricas empacotadas numa coluna). A mistura é aplicada na fase estacionária e migra através da coluna. A maior ou menor interação para a fase afeta a sua separação (FORNSTEDT et al., 2015). A eficiência da cromatografia é influenciada pela qualidade do suporte cromatográfico, a dispersão axial e a dificuldade de estabelecimento de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária (ROBARDS, RYAN, 2021). Diferentes suportes são utilizados em cromatografia, incluindo-se polissacarídeos (dextrana, agarose e celulose), polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliestireno), materiais inorgânicos (sílica porosa, hidroxiapatita e vidro poroso) e materiais compósitos (poliacrilamida-agarose, dextrana-bisacrilamida, sílica porosa- dextrana). Dependendo do tipo de interações envolvidas, os processos cromatográficos podem ser

classificados em gel filtração, troca iônica, interação hidrofóbica, fase reversa e afinidade (CABRAL, AIRES-BARROS, 2003).

O método cromatográfico realizado em gel filtração utiliza a matriz para promover a separação das proteínas por peso molecular. Usualmente, o Sephadex (Figura 10) polímero de glicose formado por “cross-linked” com epícloridrina, é o gel de escolha utilizado para esses fins. No entanto, o mesmo pode ser empregado também como matriz de afinidade, devido aos radicais hidroxilas livres nas cadeias de dextranas (ROBARDS, RYAN, 2021).

Figura 10 – Estrutura parcial do Sephadex apresentando o polímero de glicose conectado por moléculas de epícloridrina.



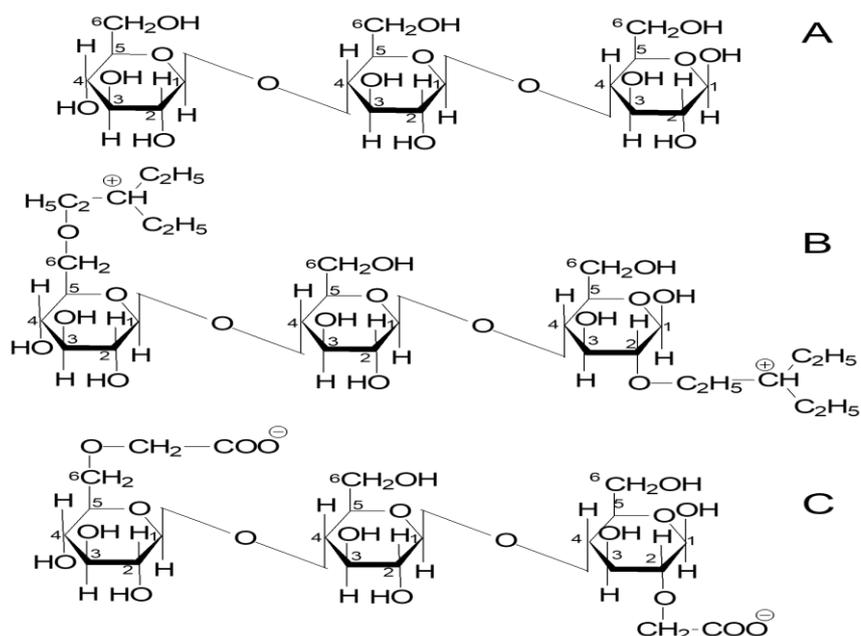
Fonte: Ferreira, 2021

A cromatografia de troca iônica é um método de separação que se baseia nas cargas líquidas das proteínas. Separa as moléculas de acordo com a sua carga superficial, resultante dos diferentes resíduos de aminoácidos que são capazes de ionização do hidrogênio da água. Resíduos de ácidos aspártico (Asp) ou glutâmico (Glu) acrescentam carga negativa enquanto

os resídeos básicos de histidina (His) lisina (Lys) e arginina (Arg) contribuem para as cargas positivas (KADAKERI et al., 2020). A fase estacionária é altamente carregada, sendo que os componentes com cargas de sinais contrários a essas são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os componentes adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. A afinidade entre íons da fase móvel e a matriz podem ser controlados utilizando fatores como pH e a força iônica (KORKISCH, 2013).

Dentre as matrizes mais amplamente utilizadas destacam-se aquelas derivadas da celulose figura. 11A figura 11B apresenta a matriz de Dietilaminoetil-celulose (DEAE-Celulose), um trocador aniônico carregado positivamente, e a figura 9C apresenta a matriz de Carboximetil-celulose (CM-Celulose), um trocador catiônico carregado negativamente.

Figura 11 – (A) Celulose; (B) Dietilaminoetil-celulose (DEAE-Celulose); (C) Carboximetil-celulose (CM-celulose).



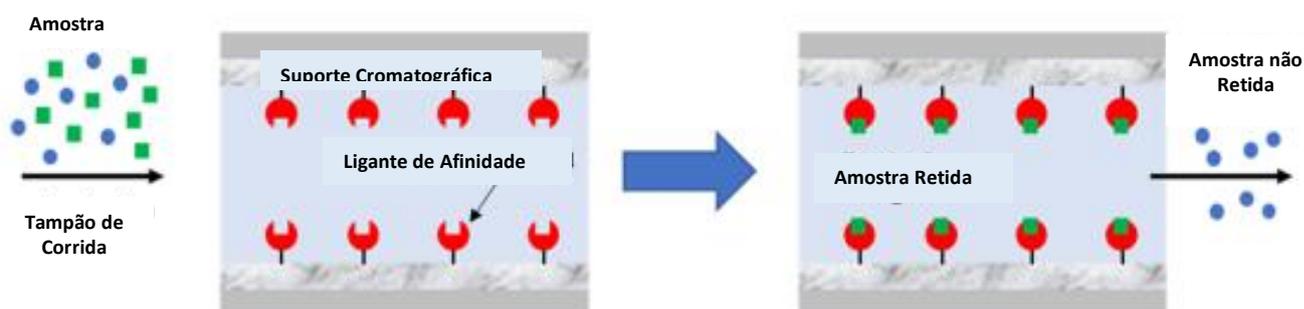
Fonte: Ferreira, 2021

2.3.3 Cromatografia de afinidade

Cuatrecasas et al. (1968), foram os primeiros a introduzir a técnica de cromatografia de afinidade no final dos anos de 1960. Na atualidade é usado para purificar proteínas, carboidratos, drogas ou outro analito que se ligue a matrizes cromatográficas (ARCY et al., 2017).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada, a cromatografia de afinidade é definida uma técnica cromatográfica líquida que usa uma interação biológica para separar analitos de interesse em amostras; baseia-se no reconhecimento entre as moléculas naturais ou artificiais, classificadas de ligantes. Desse modo, um dos ligantes é fixado em um carreador polimérico que pode interagir de maneira seletiva ao seu alvo que está em um extrato celular que passa pela coluna sob condições favoráveis para que o reconhecimento ocorra de maneira efetiva (figura 12). O ligante retido é eluído com mudanças das condições de força iônica, pH, solventes e temperaturas obtendo a molécula de interesse de forma pura (ANDJELKOVIĆ, et al 2017).

Figura 12 – Exemplo de aplicação da amostra e seleção das moléculas que têm afinidade à matriz cromatográfica.



Fonte: adaptado de Elliott et al., 2020.

Nos últimos anos, a cromatografia de afinidade foi realizada com partículas esféricas com diâmetros de 50 a 400 μm e em condições de baixa pressão, resultando em muitos suportes de micropartículas comerciais para o uso como cromatografia de afinidade. E o suporte mais

usado é a agarose, pela sua qualidade na purificação e as primeiras a serem usadas nos estágios iniciais da técnica (WILCHEK, et al 1999).

A purificação das lectinas usando uma única etapa de cromatografia de afinidade só foi possível pelo fato delas possuírem ligações específicas aos carboidratos da matriz cromatográfica. Existem várias matrizes de afinidade comerciais que são acopladas a diferentes ligantes para isolar diferentes lectinas. As lectinas específicas de galactose estão sendo isoladas por cromatografia de afinidade em Sepharose (uma forma modificada de ágar) ou ágar reticulado com açúcares contendo galactose (GABIUS, GABIUS, 1993).

A busca de ligantes mais seletivos, vigorosos ou reproduzíveis tem sido uma constante (HAGE, 1999). A prospecção de proteínas que tem afinidade a diferentes polissacarídeos e uso desses açúcares em técnicas cromatográficas têm sido reportados (SORCI *et al.*, 2006). Esses materiais têm as vantagens de serem economicamente viáveis, de fácil uso e atóxicos; logo, o protocolo de separação é compatível com a aplicação da proteína alvo (ROY; SARDAR; GUPTA, 2005).

2.3.4 Esquistossomose

A esquistossomose acomete mais de 220 milhões de pessoas em 78 países e territórios no mundo (WHO, 2020). No Brasil a doença é endêmica em 19 Estados com estimativa entre 4-6 milhões de infectados, é transmitida por moluscos do gênero *Biomphalaria* sendo o *B. glabrata* o principal vetor por liberar milhares de cercárias diariamente no ambiente aquático, e em 3 meses um único molusco gera 10 milhões de descendentes (SCHOLTE et al., 2012; COELHO E CALDEIRA, 2016). O Estado de Pernambuco é um dos que apresenta a maior taxa de prevalência com mortalidade cinco vezes superior a média nacional (PERNAMBUCO, 2014; BARBOSA, et al., 2014).

A OMS recomenda o controle populacional dos moluscos com a aplicação do moluscicida niclosamida (Baylucide, Bayer®) apenas em localidades que apresentam elevada prevalência da esquistossomose, devido à sua alta toxicidade para espécies não-alvo, como peixes, plantas e outros organismos presentes no ecossistema aquático (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; WHO, 2017). Assim, há uma urgente necessidade de investimento em pesquisas que possam contribuir com novas alternativas moluscicidas com ação eficaz, biossegura e alta seletividade. Esse cenário encoraja nosso Grupo de Pesquisa por produtos

naturais bioativos no controle populacional dos moluscos *B. glabrata*, agente infeccioso (cercárias de *S. mansoni*) e avaliação da ecotoxicidade ambiental com bioindicadores de referências (ALBUQUERQUE et al., 2014; ROCHA-FILHO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2019; SILVA et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar preparações de lectina pura (BmoLL) e de extrato de *Bauhinia monandra* para aplicações biológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a BmoLL com uso de uma matriz cromatográfica gel de Guar;
- Desenvolver antissoro de coelho contra a lectina de folhas de *B. monandra* (BmoLL);
- Purificar IgG anti-BmoLL utilizando cromatografia de afinidade em proteína A-Sepharose;
- Caracterizar IgG anti-BmoLL através de ensaio de imunodifusão e ensaio eletroquímico;
- Purificar a BmoLL com uso de uma matriz cromatográfica de afinidade utilizando a goma das sementes da *L. leucocephala*;
- Avaliar a citotoxicidade em linhagem de células cancerígenas e saudáveis;
- Obter a preparação do extrato salino de folhas de *B. monandra*;
- Avaliar a atividade moluscicida do extrato salino sobre embriões e caramujos adultos da *B. glabrata*;
- Avaliar a segurança ambiental da preparação com o bioindicador *Artemia salina*.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

In: Hemagglutinin (HA): Structure, Function and Mechanisms

Editor: Ng Tzi Bun

Research Chapter

***Bauhinia monandra* LEAF LECTIN (BmoLL) is IMMUNOGENIC:
ELECTROCHEMICAL and PIEZOELECTRIC BIOSENSOR RECOGNIZED
INTERACTIONS LECTIN/IgG ANTI-BmoLL**

***Sandra R. Souza¹, Priscila M. S. Silva², Rosa Amália F. Dutra³, Nicolaas J. Haver², Sílvia
A. O. Ferreira², José Luiz de Lima Filho⁴, Maria Tereza S. Correia², Luana Cassandra
Breitenbach B. Coelho^{2*}***

¹Departamento de Educação,

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil

²Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de
Biociências,

Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

³Departamento de Engenharia Biomédica, Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade
Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
Brazil

* Corresponding author: Luana C. B. B. Coelho. E-mail: lcbbcoelho@gmail.com

Tel: +55 81 999455897.

ABSTRACT

Highly purified galactose-binding lectin from *Bauhinia monandra* leaves (BmoLL) was intradermally injected into rabbit to evaluate the protein immune response. Antiserum developed against BmoLL (anti-BmoLL serum) revealed the immunogenicity of the lectin. Anti-BmoLL IgG was purified from the antiserum on a Protein A-Sepharose CL-4B column. BmoLL and extracts from *B. monandra* different tissues, with previously detected lectin activity, interacted with anti-BmoLL serum and anti-BmoLL IgG; protein precipitation lines were visualized by double immunodiffusion assay. Anti-BmoLL IgG was immobilized on gold surface for electrochemical and piezoelectric characterization of BmoLL antibody-antigen interaction. An electrochemical immunosensor performed with anti-BmoLL IgG and gold electrode surface estimated BmoLL binding and its electrochemical potential. A piezoelectric immunosensor was also carried out based upon a quartz crystal microbalance (QCM) with a gold surface where anti-BmoLL IgG was immobilized to characterize BmoLL recognition. The electrochemical system was sensitive to evaluate anti-BmoLL IgG interactions with different concentrations of BmoLL. The piezoelectric immunosensor with flow injection analysis (FIA) revealed a frequency decrease (15 kHz) after the interaction of BmoLL (454 µg/ml) with anti-BmoLL IgG (1.1 mg/mL) indicating antigen-antibody specificity. Then the piezoelectric assay was a potent tool for detection of antigen-antibody recognition.

Keywords: *Bauhinia monandra*; leaf lectin; polyclonal IgG; electrochemical biosensor; piezoelectric biosensor.

1. INTRODUCTION

Lectins, carbohydrate-binding proteins of non-immune origin and ubiquitous distribution in nature, participate of many cellular events such as cell recognition, cell-cell communication and metastasis (Santos et al., 2014). Hundreds of lectins have been isolated from nature with different carbohydrate-binding specificities and broad applications in biological research.

A galactose-specific lectin named BmoLL has been obtained from leaf powder of *Bauhinia monandra*, “pata de vaca” (Coelho and Silva, 2000). The genus *Bauhinia* belongs to the family *Fabaceae*; in Northeastern Brazil the leaves of *B. monandra* are largely used in folk medicine to reduce blood glucose levels. Argolo et al. (2016) conducted a study with a leaf ethanolic extract of *B. monandra*, which induced insulin secretion in rats and hypoglycemic effect. BmoLL was purified with high yield (milligram quantities) from *B. monandra* leaf extract by ammonium sulfate fractionation and guar gel affinity chromatography (Coelho and Silva, 2000). Biological activities have already been reported for BmoLL, such as insecticidal activity against *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* and *Anagasta kuehniella* larvae, producing ca. 50% mortality to *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*, and a decrease of 40% in *A. kuehniella* larvae weight (Macedo et al., 2007). The negative effects of BmoLL on insect’s development can be attributed for binding to chitin components in the insect gut, interacting with glycoconjugates along the digestive tract or with sugar residues linked to digestive enzymes and decrease of α -amylase activity (Macedo et al., 2007).

Another study revealed that BmoLL does not induce genotoxic or cytotoxic effect in cell-free and bacteria and promoted a decrease in the spontaneous mutation frequency in *Escherichia coli* strains, indicating the nonmutagenic and antioxidant activity of BmoLL (Sisenando et al., 2009), suggesting a protective effect of BmoLL in bacteria against endogenous oxidative damage.

Anti-lectin immunoglobulin (anti-lectin IgG) has been produced based in the *in vivo* immune response of vertebrates, such as mice and rabbits, antigen-specific adaptive. Anti-lectin IgG has been used to evaluate the specific interaction antigen-antibody *in vitro* and to search homology of specific antigen in extracts, protein preparations, purified antigens and unknown solutions (Traini et al., 2014; Denis et al., 2017; Utarabhand et al., 2017).

The antigen-antibody detection used immunological assays, such as the double immunodiffusion assay, through the diffusion of the antigen across a gel, followed by the addition of the antiserum/antibody. The immunological interaction resulted in a precipitation band in the place of antigen-antibody complex formation (Barrs et al. 2015; de Azevedo et al., 2015).

Detection of the antibody-antigen interactions have been also evaluated by biosensing methods, which are rapid, simple to perform and sensitive. Biosensors based on specific antibody-antigen, known as immunosensors, integrate immunological reactions with a

transducer device for signal transfer in the biological/ electrical interface, providing specific and quantitative detection of an analyte (Zapp et al., 2014; Kokkinos et al., 2016). Potentiometric sensors and immunosensors are considered attractive tools for the study of immunochemical interactions due to their properties as simple instrumentation, diversity of designs and materials, sensitivity, rapid response and low cost (Daems et al., 2014; Moraes and Kubota, 2016). Currently, many electrochemical immunosensors have been developed for specific detection of proteins, biomarkers and pathogens such as bovine albumin serum (Rawat et al., 2017), dengue NS1 protein (Sinawang et al., 2016) myoglobin (Zapp et al., 2014), and pathogenic *Escherichia coli* O157: H7 (Pandey et al., 2017).

A piezoelectric immunosensor developed based on quartz crystal microbalance (QCM) is a mass-sensitive transducer comprised by the quartz crystal and two gold films coating both sides of the crystal pairing to an oscillator circuit. QCM measures mass change through the alterations in the resonance oscillation frequency on the surface with the adsorption of biomolecules, since it oscillates in a resonant shear mode at an electric field of high frequency (Ramos-Jesus et al., 2016; Yoshimoto et al., 2016). Antibodies can be adsorbed on the crystal surface to specific binding (Lederer et al., 2011; Della Ventura et al., 2017). The recognition of an antigen results in mass change on the surface, leading to increase of the dielectric strength of the crystal and reduction of the oscillation of electric frequency (Kasper et al., 2016). The use of piezoelectric QCM-based immunosensors constitute an alternative to common immunological techniques, as a diagnosis approach of great interest with low cost and real-time analysis. Some QCM-based immunosensors have been developed to evaluate the antibody-antigen binding, such as human cardiac troponin T (Mattos et al., 2012), aflatoxin B1 (Chauhan et al., 2015), *Leishmania infantum* antibodies in canine serum (Ramos-Jesus et al., 2016), ATP6AP1 autoantibodies in saliva for detection of breast cancer (Arif et al., 2015), HPV16 DNA (Jearaneukoon et al., 2016) and organophosphorus analysis (Tang et al., 2016). Another example of analytical application of QCM-based immunosensors was performed by Kim et al. (2015) that evidenced the need for the rapid detection of CPV with the objective of reducing morbidity and mortality of infected dogs. They developed a QCM-based immunosensor with anti-CPV monoclonal antibody immobilized on the surface device, which showed high sensitivity, specificity and rapidity to the diagnosis.

In the present work, BmoLL was used as a potential immunogen to promote the development of antiserum in rabbit followed by purification of anti-BmoLL IgG by Protein A- Sepharose

CL-4B column. Double immunodiffusion assay was applied for detection of BmoLL or homologous lectins, and epitope recognition in preparations of *B. monandra* tissues with lectin activity, using anti-BmoLL serum and anti-BmoLL IgG. Electrochemical and piezoelectric QCM-based immunosensor were also developed to evaluate BmoLL-anti-BmoLL IgG interaction, established on signal transference through electron exchange from molecular conformational changes caused by specific analyte binding.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1 Isolation of BmoLL lectin

BmoLL lectin was isolated from *B. monandra* leaves by guar gel affinity chromatography (Coelho and Silva, 2000). Briefly, 10 % (w/v) extract in 0.15 M NaCl from leaf powder were submitted to 60% ammonium sulfate fractionation followed by guar gel column and eluted with 0.33 M galactose in 0.15 M NaCl.

2.2 Development and purification of anti-BmoLL IgG

Purified BmoLL (150 μ g) was dissolved in 1 ml of 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.8, containing 0.15 M NaCl and emulsified with 1 ml of *Freund's complete adjuvant* to the first intradermal inoculation). One millilitre of *Freund's incomplete adjuvant* was used with the four following inoculations, being intradermally injected into a male New Zealand breed white rabbit within a fortnight interval (Correia and Coelho, 1995). Ten milliliters of blood were collected from the ear central artery, before each inoculation. The collected blood was taken to coagulate in glass tubes (45° angle at room temperature, for 1 h) and kept at the 4°C, overnight. The serum obtained was centrifuged three times at 1300 x g, for 5 min, at room temperature. The aliquots were stored at -20°C.

Three milliliters of the antiserum obtained after the third inoculation was inserted in a Protein A-Sepharose CL-4B column (6.5 x 1.0 cm, 4.5 mL matrix), from Sigma-Aldrich, for anti-BmoLL IgG purification, and recycled three times. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 0.15 M NaCl, until the absorbance 280 nm < 0.01. Then, rabbit antiserum (containing anti-BmoLL IgG) was diluted with 0.1 M

phosphate citrate buffer, pH 2.8. The unbound serum molecules were washed by the same buffer and bound anti-BmoLL IgG was eluted. The fractions were collected in manual flow of 33 ml/h monitored at absorbance 280 nm >1 and maintained in 1N NaOH between pH 7 and 8. Following fractions were stored in aliquots at -20°C (Correia and Coelho, 1995).

2.3 Double immunodiffusion assay

Anti-BmoLL serum and purified anti-BmoLL IgG were evaluated by Ouchterlony double-diffusion analysis (Ouchterlony, 1958). A 1% agarose gel (w/v, 2.5 mL) in 0.5 M NaCl was performed on petri plates (2.5 x 7.5cm). The assay aimed to detect the presence of protein(s) homologous to BmoLL in preparations. Central wells were made for addition of twenty μL of serum/ IgG, and four lateral wells were made around each central well for addition of 20 μL of pure BmoLL, commercial lectins, and *B. monandra* tissue preparations (extracts and 0-60% ammonium sulphate fractions) from dried leaves (blades), flowers, stems, secondary roots, petioles, seeds, buds and branches of stems. The 10 % (w/v) extracts were obtained by overnight gentle shaking at 4°C in a 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.15 M sodium chloride. The extracts were submitted to 60% (w/v) ammonium sulphate fractionation (F 0–60%) by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the resuspended precipitate was dialysed against distilled water, followed by the 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.15 M sodium chloride, according to Coelho and Silva (two thousand). The diffusion was performed in humid chambers for 36 h at 4°C . The gels, after diffusions, were washed several times with 0.15 M NaCl for two days and with distilled water in the last wash, followed of drying overnight at room temperature. Dried gels were stained for 10 min in 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in water and destained in 10% (v/v) acetic acid in ethanol solution.

2.4 Electrochemical potential response to BmoLL lectin

To evaluate the electrochemical response of the immunosensor to BmoLL, the modified gold electrodes were incubated with the lectin at different concentrations (400, 300, 200, 100, 50 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the electrochemical potentials were measured. The electrochemical potential of anti-BmoLL IgG-BmoLL binding was obtained into an electrochemical cell

containing a gold electrode, working electrode, and a silver/silver chloride electrode (Ag/AgCl) used as reference. Both were coupled to a high impedance multimeter to register electrochemical potentials generated by the interaction of BmoLL with anti-BmoLL IgG immobilized on the gold electrode, in the electrolytic medium, 150 mM NaCl, containing BmoLL. Assays were performed in the absence and presence of 0.2 M galactose.

2.5 Anti-BmoLL IgG immobilization and yield evaluation

The immobilization of anti-BmoLL IgG was performed on quartz crystal surface for piezoelectric assay in a Quartz Cristal Microbalance (QCM) to evaluate anti-BmoLL IgG-BmoLL binding.

The quartz crystals (AT-cut, quartz plate \square 14 mm, gold electrode \square 8 mm on both sides, 10 MHZ frequency) were purchased from Universal Sensors (New Orleans, USA) and gold electrodes (10 mm x 10 mm x 0.5 mm) obtained in a goldsmith's workshop. These surfaces were previously cleaned with a solution containing a 7:3 mixture of concentrated sulfuric acid (H_2SO_4) and 30% (v/v) hydrogen peroxide (H_2O_2) for 10 min, followed by rinsing with ultrapure water and dried with dry air. Then, one hundred μ L of a solution containing 30% (w/v) dextran in 0.1 mM NaOH was added to surfaces during 20 h at 25 \square C. The dextran layer was sensitized with 100 mM cyanogen bromide (CNBr) and 2 mM NaOH for 8 h at 25 \square C, pH 11, after washing three times with 100 μ L of PBS (10 mM, pH 7.5). According to Hage and Caze (2005) CNBr in alkaline conditions induces the formation of cyanate ester radicals, and it is also possible to form imidocarbonate, a compound of lower reactivity. Both compounds allow covalent binding to amide groups; anti-BmoLL IgG on gold surface is represented in Figure 1.

Purified anti-BmoLL IgG was incubated on QCM (25 μ L) and gold plates (100 μ L) using concentrations of 0, 1.1 or 2.2 mg/mL for at least 3 h at room temperature. After the immobilization on the above-mentioned surfaces, 50 \square L of 3% (w/v) casein solution was applied on the surfaces for 3 h to block remaining reactive free groups and minimize nonspecific binding.

In order to evaluate the immobilization yield on gold plates, 100 \square L was collected after each IgG incubation step to measure unbound IgG (U). After the incubation, gold plates were also washed three times with 100 \square l of PBS (10 mM, pH 7.2) to measure the unbound IgG after washes (W1, W2 and W3, respectively). Protein concentrations of U, W1, W2 and

W3 were calculated by a standard protein quantification test using Coomassie brilliant blue G250 (Sedmak and Grossberg, 1977). Knowing the initial quantity of IgG (I) incubated on gold plates prior immobilization in each IgG concentration, the immobilization yield was calculated by the formula $[I - (\text{unbound IgG}) / I] \times 100\%$. The relation immobilization/area was also calculated.

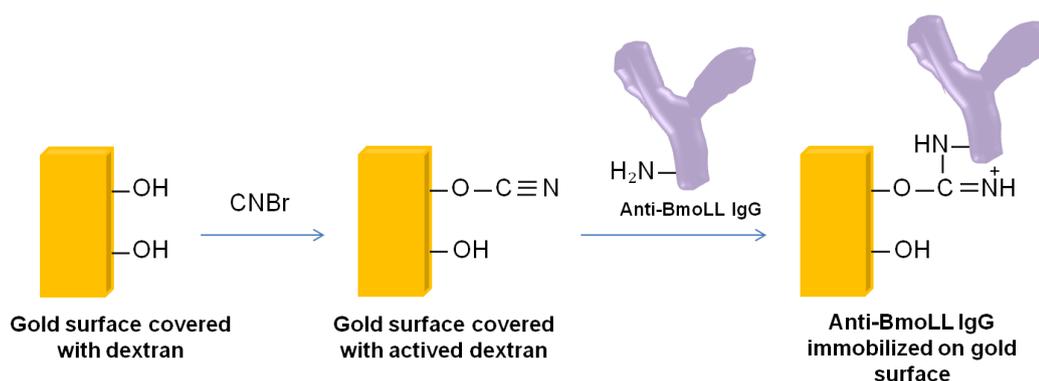


Figura 1 – Schematic representation of activation reaction from gold surface covered with dextran and CNBr to establish the covalent immobilization of anti-BmoLL IgG on altered surface.

2.6 Analyses of BmoLL binding to immobilized anti-BmoLL IgG in the piezoelectric assay system

A piezoelectric assay based in QCM immunosensor integrated in a flow injection analysis (FIA) system was elaborated to determine the QCM responses to BmoLL. The experimental set-up consisted of one peristaltic pump and an oscillator circuit coupled to a frequency counter (GFC-8131, Good Will), which contained a reference crystal with the same characteristics as the QCM immunosensor crystal. An acrylic flow cell was used to support the QCM immunosensor, maintaining one gold surface in contact with the liquid. BmoLL was introduced into system in a flow of 330 $\mu\text{L}/\text{min}$ at concentration of 454 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or in 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 5^{-1} and 2^{-1} dilutions, corresponding to the concentrations of 0.04, 0.4, 40, 200 and 91 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

3. RESULTS AND DISCUSSION

BmoLL was isolated in milligram amounts from *B. monandra* leaves following a protocol previously established. Purified BmoLL is in fact a lectin since its hemagglutinating activity was galactose inhibited. BmoLL has been partially characterized by electrophoretic techniques, as containing a glycosylated polypeptide subunit of 33 kDa, and a non-glycosylated polypeptide of 26 kDa (Coelho and Silva, 2000).

A range of biological applications has been reported for BmoLL. The lectin was used for composition of lectin-decorated and lectin-loaded nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone) and dextran. BmoLL was incorporated into the nanoparticles and adsorbed onto nanoparticle surfaces; the biorecognition activity of lectin was maintained. It suggested that BmoLL could recognize and interact with the nanoparticles' polymers, resulting in BmoLL-based nanoparticles (Rodrigues et al., 2003).

BmoLL leaf lectin was able to agglutinate an endophytic active strain of *Pseudomonas aeruginosa* from *B. monandra* leaves, suggesting a defense mechanism against phytopathogenic microorganisms in plants (Ramos et al., 2016). The lectin also showed anti-inflammatory and antinociceptive effects in mice, reducing paw edema, leukocyte migration, and animal contortions (Campos et al., 2016). Similar to other anti-inflammatory lectins, BmoLL can inhibit the vascular inflammation by a reduction of rolling and adhesion of immune cells to endothelium, as well as a decrease in leukocyte migration and cytokines involved. The antinociceptive effect of BmoLL has been associated with its anti-inflammatory activity, and a direct action of BmoLL on specific central nervous system receptors to promote pain relieve (Campos et al., 2016).

The production of anti-BmoLL IgG in the rabbit serum (anti-BmoLL serum) was detected after the third inoculation of BmoLL, using double immunodiffusion assay on agarose gel plate. The reactivity of anti-BmoLL serum with BmoLL was confirmed by the appearance of a single immunoprecipitation band in the agarose gel. These results revealed the immunogenic response of BmoLL in rabbit, showing that the lectin was recognized as an antigen by leucocytes and induced the production of antibodies in the rabbit serum (Denis et al., 2017).

BmoLL antiserum was successively used for purification of anti-BmoLL IgG on a protein A-Sepharose CL-4B column (Figure 2). The immunoprecipitation patterns of anti-BmoLL serum

and anti-BmoLL IgG with BmoLL, commercial lectins and *B. monandra* tissue preparations interacting with anti-BmoLL serum and anti-BmoLL IgG in double immunodiffusion assay were revealed in Figure 3. Leaf extract and 0-60% ammonium sulphate fraction exhibited double immunoprecipitation bands after reaction with anti-BmoLL antiserum or anti-BmoLL IgG, indicating the existence of two populations of antibodies, one specific for the lectin, and another that recognized the presence of a lectin isoform. The reactivity antigen-antibody was also confirmed for the extracts from different *B. monandra* tissues; the immunoprecipitation bands were more remarkable in the reactions with anti-BmoLL serum (Figure 3).

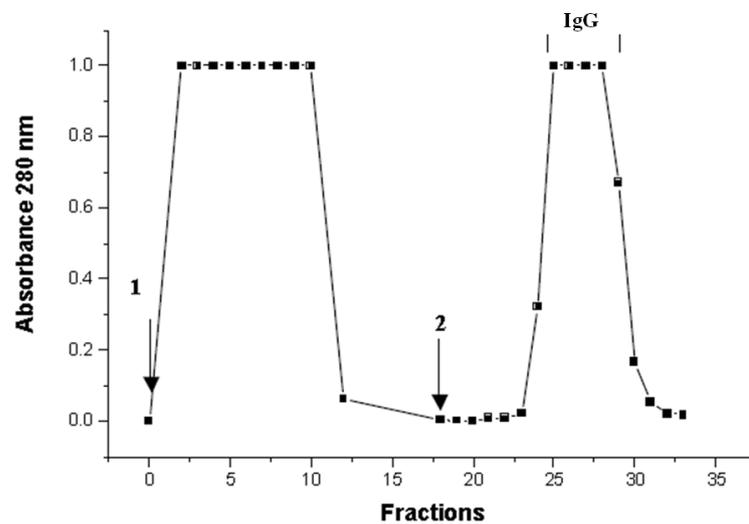


Figure 2 – Protein A affinity chromatogram of anti-BmoLL IgG preparation. Antiserum (3 mL) was applied to a 4.5 mL column and fractions (1mL) were collected at 33 mL/h. Unbound proteins were washed off with 0.1M sodium phosphate buffer pH 8.0 (event 1), followed by the elution of the IgG with 0.1M glycine pH 2.8 (event 2). Eluted fractions of $A_{280} \square 1$ were pooled and stored at -20°C .

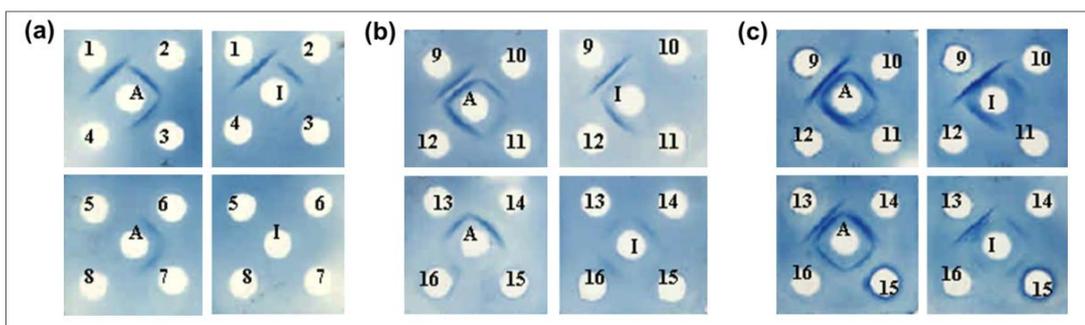


Figura 3 – Double immunodiffusion assay on agarose gels. Cross-reactions of anti-BmoLL serum (A) or anti-BmoLL IgG (I) with lectins (a), with lectin(s) in tissue extracts from *B. monandra* (b) and in 0-60% ammonium sulphate fractions derived therefrom (c). Lateral wells: 1, BmoLL; 2, *B. purpurea* lectin; 3, *Ulex europaeus* lectin I; 4, *Ulex europaeus* lectin II; 5, *Bandeiraea simplicifolia* lectin II; 6, *Dolichos biflorus* lectin; 7, *Triticum vulgare* lectin; 8, *Lens culinaris* lectin; 9, leaves; 10, flowers; 11, stems; 12, roots; 13, petioles; 14, seeds; 15, buds; and 16, branches of stem.

The interactions between BmoLL and anti-BmoLL IgG were also evaluated by electrochemical and piezoelectric techniques, immobilizing the anti-lectin antibody on the metal surface and evaluating the signals generated by the sensing interfaces. Despite electroactive proteins exhibit adsorption on metallic surfaces, factors such as temperature, pH, ionic strength, protein conformation and concentration in the electrolytic medium can affect this process (Smiechowski et al., 2006).

In this context, the anti-BmoLL IgG immobilization and its yield were evaluated on gold plates. Measurement of the immobilization yield is important for estimating the maximal antigen binding capacities of the biosensor. Anti-BmoLL IgG was immobilized in initial quantities of 0, 110 and 220 μg from the solutions of 0, 1.1 and 2.2 mg/mL, respectively. Immobilization of the anti-lectin antibody on the gold plates provided at least two advantages. Firstly, the presence of lectin can be detected in distinct plant tissues; secondly, direct immobilization of the lectin may reduce its activity by severe changes of the conformation during the immobilization process. The concentrations of unbound IgG were measured after immobilization and washes with PBS with a protein quantification method according to Sedmak and Grossberg (1977).

Yield immobilizations anti-BmoLL IgG of 51 mg (46%) and 73 mg (33%) was observed when the initial quantities of 110 and 220 μg were immobilized, respectively. However, the concentration of 1.1 mg/mL (110 μg) was more stable after the PBS wash-steps (Figure 4), according to the anti-BmoLL IgG/ area immobilization ratio on gold plate calculated after each PBS wash-steps. A low removal of IgG was observed at a concentration of 1.1 mg/mL, showing an immobilization ratio of 1.4 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ from anti-BmoLL IgG on gold plates after the third PBS wash-step. Considerable and continuous IgG releasing occurred at a concentration of 2.2

mg/mL along the washes, resulting in an immobilization area of 1.8 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ after the third wash.

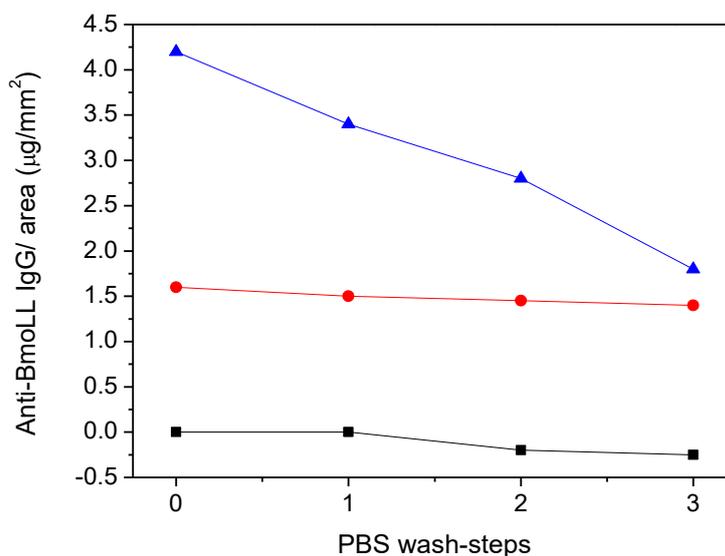


Figura 4 – Anti-BmoLL IgG/ area ratio of immobilization on gold plates ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) in the anti-BmoLL IgG concentrations of 0 (■), 1.1 (●) and 2.2 (▲) mg/mL. IgG washed-off was measured by protein quantification method and calculated values of immobilized anti-BmoLL IgG are showed.

Electrochemical biosensors have been developed to detect analytes through enzymatic reactions, interaction of antibodies and antigens (immunosensors), process of recognition of whole cells, as well as different interactions between biomolecules (Liu, 2012). The potentiometric technique has been used for electrochemical analysis to evaluate the maintenance of the biomolecule activity after the immobilization through the recognition of specific ligand. Souza et al. (2001) constructed the first potentiometric biosensor with Cramoll 1,4 lectin immobilized to active glass surface with aminopropiletoxisilane (APTES) to define analytical and quantitative forms of lectin interaction with glucose. According to Souza et al. (2003) the development of techniques to define biomolecule/electrode interface parameters will be able to provide information on charged groups adsorbed or immobilized to the electrode surface revealing specific interactions in biological systems. Cramoll 1,4 was also adsorbed on

nafion beads to characterize their interaction with glucose using potential measurements (Souza et al., 2017).

Here in, an electrochemical immunosensor based on anti-BmoLL IgG was developed onto gold electrodes and the maintenance of anti-BmoLL IgG activity was evaluated in the presence of BmoLL lectin by potential measurements. The interaction anti-BmoLL IgG with BmoLL generated electrochemical potentials increasing proportionally to concentration of lectin (Figure 5). A potential signal of 48 mV was obtained for BmoLL at 200 $\mu\text{g/mL}$, increasing significantly to 115 mV for the lectin concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$.

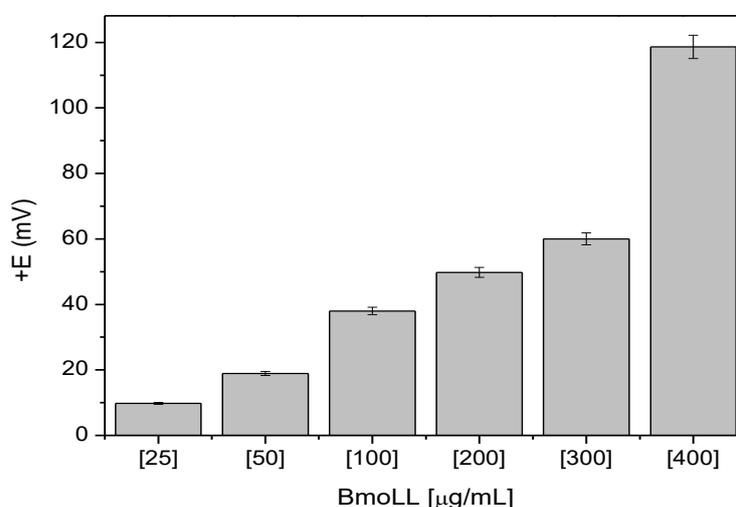


Figura 5 – Electrochemical potentials generated by the interaction of anti-BmoLL IgG with different BmoLL concentrations on the gold electrode.

The electrochemical potentials measured were compared for interactions in the absence or presence of 0.2 M galactose. The responses were similar, suggesting that BmoLL-anti-BmoLL IgG interaction is independent of BmoLL carbohydrate binding site (Figure 6). To determine the specificity of anti-BmoLL IgG, the electrochemical potential was also measured in the presence of Concanavalin A (Con A) under the same conditions of BmoLL. The signal obtained was insignificant, corresponding to approximately 5% of signal from BmoLL interaction (115 mV) (Figure 7). Con A is a lectin from *Canavalia ensiformis* seeds, specific to glucose and mannose and commonly used for recognition of glucose/mannose residues on cell

surfaces and biomolecules, being a tool in the development of biosensors for disease detection (Lei and Chang, 2007).

The variations of the electrochemical potentials resulting from the interaction between biomolecules are intrinsically related to the immobilization process on the metallic surface and the conformational changes occurring on molecule surfaces (Souza et al 2001; Smiechowski et al, 2006; Bueno et al., 2014). The construction of an electrochemical biosensor must consider the choice of reference and working electrodes as well as immobilization process of the biomolecules and is intrinsically dependent upon electron-transferring ability (Liu, 2012; Chokkareddy et al., 2017).

The analyzes using the piezoelectric system revealed a reduction of the frequency of 5 KHZ (22.5 to 17.5 KHZ) observed with 91 $\mu\text{g/ml}$ BmoLL interacting with 1.1 mg/ml anti-BmoLL IgG, showing a strong recognition of the lectin by the immobilized ligand (Figure 8). The change in piezoelectric assay frequency generated by adsorption of substances on the surface of a quartz crystal exhibits an analytical potential. This ability is disclosed by researchers, detecting organophosphorus (Tang et al., 2016), human papillomavirus (HPV) type58 DNA (Jearanaikoon, 2016) breast cancer (Arif et al, 2015), and antibody-antigen interactions (Kim et al, 2015).

A delay in response of 3.5 min occurred; the time the sample needed to pass the FIA-system before entering the reaction chamber of QCM (Figure 8). The control show frequency of 19.5 KHZ, without immobilized IgG with different concentrations of BmoLL. There was no reduction of the frequency to incubation with 0.04, 0.4, 40, 200 and 454 $\mu\text{g/ml}$ BmoLL.

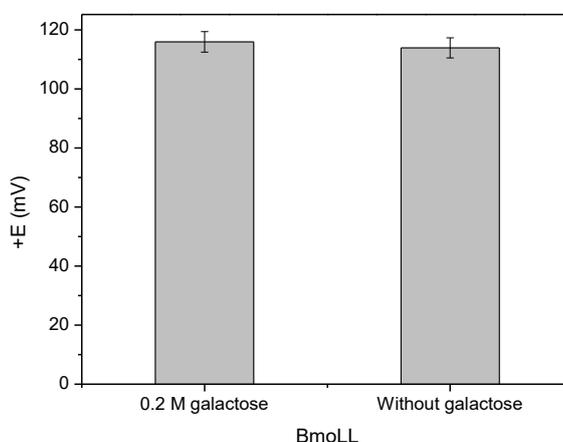


Figura 6 – Stable electrochemical potentials generated by the interaction of anti-BmoLL IgG with BmoLL (400 μ g/mL) on gold electrodes, in the presence and absence of 0.2 M galactose.

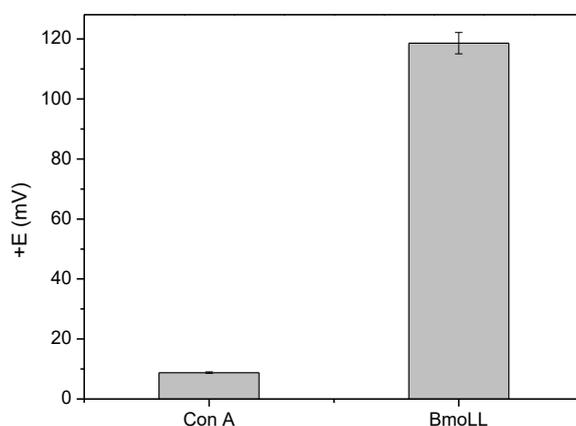


Figura 7 – Electrochemical potentials generated by the interaction of Con A and BmoLL with anti-BmoLL IgG immobilized on gold electrode.

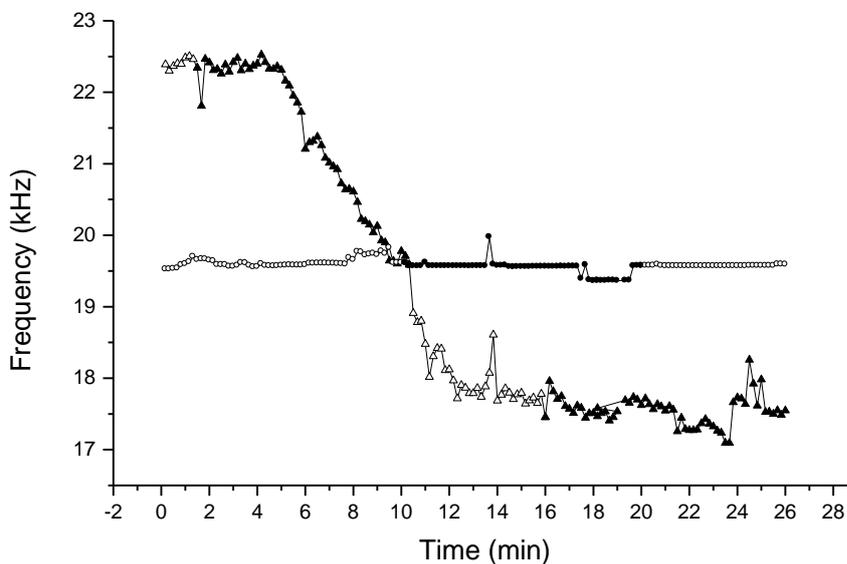


Figura 8 – The piezoelectric assay showed BmoLL (91 μ g/ml) binding to immobilized anti-BmoLL IgG, 1.1 mg/ml (\blacktriangle). The control without immobilized IgG showed no reaction when incubated with BmoLL (\bullet). The system was also incubated with PBS (open symbols).

These data reveals that due to the use of small amounts of antibodies and antigens and in real response time, the piezoelectric system was a powerful analytical tool for immunological determinations.

4. CONCLUSIONS

BmoLL was highly immunogenic, inducing the development of anti-BmoLL IgG in rabbit serum. The appearance of immunoprecipitation bands in the double immunodiffusion assay confirmed the reactivity of anti-BmoLL serum and anti-BmoLL IgG for BmoLL, tissue preparations with lectin activity, and homologous lectins. The immobilization yield assay was effective to detect immobilized anti-BmoLL IgG on gold surface; the concentration of 1.1 mg/mL was more stable after wash-steps. The electrochemical immunosensor based on anti-BmoLL IgG was sensitive to reveal the conformational changes occurring in different concentrations of BmoLL after interacting with anti-BmoLL IgG. The system was specific to recognize BmoLL, showing no significant interaction between anti-BmoLL IgG and Con A lectin. The assay conducted with piezoelectric biosensor based on anti-BmoLL IgG revealed changes in the frequency signals after the interaction of the antibody with BmoLL, confirming the reactivity antibody-antigen.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, for grants and fellowships (JLLF, RAFD, MTSC and LCBBC), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)*. Authors acknowledge Dr. Kátia Cristina Silva Freitas (UFRPE) for discussion of Figure 1.

REFERENCES

Argolo, A. C. C.; Dantas, V. C. R.; Saturnino, A. C. R. D.; Santos, A. F. S.; Brandão-Neto, J.; Paixão, A. D. O.; Coelho, L. C. B. B. (2016) Leaf ethanolic extract of *Bauhinia monandra*

increases insulin secretion in rats subjected to intrauterine malnutrition. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 9(IV), 1-9. doi: 10.9734/IJBCRR/2016/22434.

Arif, S.; Qudisia, S.; Urooj, S.; Chaudry, N.; Arshad, A. (2015) Blueprint of quartz crystal microbalance biosensor for early detection of breast cancer through salivary autoantibodies against ATP6AP1. *Biosensors and Bioelectronics*, 65, 62 – 70. doi: 10.1016/j.bios.2014.09.088.

Barrs, V. R.; Ujvari, B.; Dhand, N. K.; Peters, I. R.; Talbot, J.; Johnson, L. R.; Billen, F.; Martin, P.; Beatty, J. A.; Belov, K. (2015) Detection of *Aspergillus*-specific antibodies by agar gel double immunodiffusion and IgG ELISA in feline upper respiratory tract aspergillosis. *The Veterinary Journal*, 203(III), 285-289. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.12.020.

Bueno, L.; El-Sharif, H. F.; Salles, M. O.; Boehm, R. D.; Narayan, R. J.; Paixão, R. L. C.; Reddy, S. M. (2014) MIP-based electrochemical protein profiling. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, 88-95. doi: 10.1016/j.snb.2014.07.100.

Campos, J. K. L.; Araújo, C. S. F.; Araújo, T. F. S.; Santos, A. F. S.; Teixeira, J. A.; LIMA, V. L. M.; Coelho, L. C. B. B. (2016) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. *Biochimie Open*, 2, 62-68. doi: 10.1016/j.biopen.2016.03.001.

Chauhan, R.; Solanki, P. R.; Singh, J.; Mukherjee, I.; Basu, T.; Malhotra, B. D. (2015) A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in groundnut. *Food Control*, 52, 60-70. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.009.

Chokkareddy, R.; Bhajanthri, N. K.; Redhi, G. G. (2017) An enzyme-induced novel biosensor for the sensitive electrochemical determination of isoniazid. *Biosensors*, 7(XXI), 2-12. doi: 10.3390/bios7020021.

Coelho, L. C. B. B.; Silva, M. B. R. (2000) Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, 11, 295–300. doi: 10.1002/1099-1565(200009/10)11:53.0.CO;2-S.

Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B.B. (1995) Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry Biotechnology*, 55, 261-273. doi: 10.1007/BF02786865.

Daems, D.; De Waela, K.; Vissenbergc, K.; Van Campb, G.; Nagelsa, L. (2014) Potentiometric sensors doped with biomolecules as a new approach to small molecule/biomolecule binding kinetics analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 515-520. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.045.

de Azevedo, P. Z.; Sylvestre, T. F.; Cavalcante, R. S.; de Carvalho, L. R.; Moris, D. V.; de Oliveira, M. L. C. S.; Mendes, R. P. (2015) Evaluation of the double agar gel immunodiffusion test and of the enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and follow-up of patients with chronic pulmonary aspergillosis. *PLoS ONE*, 10(VIII), e0134841. doi: 10.1371/journal.pone.0134841.

Della Ventura, B.; Iannaccone, M.; Funari, R.; Ciamarra, M. P.; Altucci, C.; Capparelli, R.; Roperto, S.; Velotta, R. (2017) Effective antibodies immobilization and functionalized nanoparticles in a quartzcrystal microbalance-based immunosensor for the detection of parathion. *PLoS ONE*, 12(II), e0171754. doi: 10.1371/journal.pone.0171754.

Denis, M.; Ramasamy, S. M.; Thayappan, K.; Munusamy, A. (2017) Immune response of anti-lectin Pjlec antibody in freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104(Pt A), 1212-1222. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.034.

Hage, D. S.; Cazes, J. (2005) *Chromatografic Science*. Handebook of affinity chromatography. University of Nebraska. Linoln, Nebraska, U.S.A. Taylor & Francis Group. v. 92.

Jearanaikoon, P.; Prakrankamanant, P.; Leelayuwat, C.; Wanram, S.; Limpai boon, T.; Promptmas, C. (2016) The evaluation of loop-mediated isothermal amplification-quartz crystal microbalance (LAMP-QCM) biosensor as a real-time measurement of HPV16 DNA. *Journal of Virological Methods*, 229, 8 – 11. doi: 10.1016/j.viromet.2015.12.005.

Kasper, M.; Traxler, L; Salopek, J.; Grabmayr, H.; Ebner, A.; Kienberger, F. (2016) Broadband 120 MHz impedance quartz crystal microbalance (QCM) with calibrated resistance and quantitative dissipation for biosensing measurements at higher harmonic frequencies. *Biosensors*, 6, 23-35. doi: 10.3390/bios6020023.

Kim, Y. K.; Lim, Seong-Lin; Choi, S.; Cho, I.; Park, E.; An, D. (2015) A novel assay for detecting canine parvovirus using a quartz crystal microbalance biosensor. *Journal of Virological Methods*, 219, 23-24. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.03.015.

Kokkinos, C.; Economou, A.; Prodromidis, M. I. (2016) Electrochemical immunosensors: critical survey of different architectures and transduction strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 79, 88–105. doi: 10.1016/j.trac.2015.11.020.

Lederer, T.; Steher, B. P.; Bauer, S.; Jakoby, B.; Hilber, W. (2011) Utilizing a high fundamental frequency quartz crystal resonator as a biosensor in a digital microfluidic platform. *Sensors and Actuators A*, 172, 161 – 168. doi: 10.1016/j.sna.2011.04.032.

Lei, H. -Y.; Chang, C. -P. (2007) Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. *Autophagy*, 3(IV), 402–404. doi: 10.4161/auto.4280.

Liu, C. C. (2012) Electrochemical based biosensors. *Biosensors*, 2, 269-272. doi: 10.3390/bios2030269.

Macedo, M. R. L.; Freire, M. G. M.; da Silva, M. B. R.; Coelho, L. C. B. B. (2007) Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 146, 486-498. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.01.020.

Mattos, A. B.; Freitas, T. A.; Silva, V. L.; Dutra, R. F. (2012) A dual quartz crystal microbalance for human cardiac troponin T in real time detection. *Sensors and Actuators B*, 161, 439–446. doi: 10.1016/j.snb.2011.10.058.

Moraes, A. C. M.; Kubota, L. T. (2016) Recent trends in field-effect transistors-based immunosensors. *Chemosensors*, 4(IV), 20. doi: 10.3390/chemosensors4040020.

Ouchterlony, O. (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progress in Allergy*, 5, 1-78. doi: 10.1159/000391318.

Pandey, C. M.; Tiwari, I.; Singh, V. N.; Sood, K. N.; Sumana, G.; Malhotra, B. D. (2017) Highly sensitive electrochemical immunosensor based on graphene-wrapped copper oxide-cysteine hierarchical structure for detection of pathogenic bacteria. *Sensors and Actuators B Chemical*, 238, 1060–1069. doi: 10.1016/j.snb.2016.07.121.

Ramos, S. A. F.; Silva, L. C. N.; Correia, M. T. S.; Araújo, J. M.; Coelho, L. C. B. B. (2016) Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. *African Journal of Microbiology Research*, 10(XVII), 600-607. doi: 10.5897/AJMR2015.7896.

Ramos-Jesus, J.; Pontes-de-Carvalho, L. C.; Melo, S. M. B.; Alcântara-Neves, N. M.; Dutra, R. F. (2016) A gold nanoparticle piezoelectric immunosensor using a recombinant antigen for detecting *Leishmania infantum* antibodies in canine serum. *Biochemical Engineering Journal*, 110, 43–50. doi: 10.1016/j.bej.2016.01.027.

Rawat, A.; Singh, K. P.; Vasmatkar, P.; Baral, P. (2017) Highly sensitive gold nanoparticle based electrochemical biosensor for detection of antigen antibody interactions. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 10(I), 83-90.

Rodrigues, J. S.; Santos-Magalhães, N. S.; Coelho, L. C. B. B.; Couvreur, P.; Ponchel, G.; Gref, R. (2003) Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *Journal of Controlled Release*, 92, 103–112. doi: 10.1016/S0168-3659(03)00296-7.

Santos, A. F. S.; da Silva, M. D. C.; Napoleão, T. H.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. (2014) Lectins: function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research*, 15, 41-62.

Sedmak, J. J.; Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 79(I-II), 544-552. doi: 10.1016/0003-2697(77)90428-6.

Sinawang, P. D.; Rai, V.; Ionescu, R. E.; Marks R. S. (2016) Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 400–408. doi: 10.1016/j.bios.2015.09.048.

- Sisenando, H. A. A. C. N.; Macedo, M. F. S.; Saturnino, A. C. R. D.; Coelho, L. C. B. B.; de Medeiros, S. R. B. (2009) Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). *Food and Chemical Toxicology*, 47, 303-308. doi: 10.1016/j.fct.2008.11.010.
- Smiechowski, M. F.; Lvovich, V. F.; Roy, S.; Fleischman, A.; Fissell, W. H.; Riga, A. T. (2006) Electrochemical detection and characterization of proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 670 – 677. doi: 10.1016/j.bios.2006.02.008.
- Souza, S. R.; Correia, M. T. S.; Pessoa, M. M. A.; Kennedy, J. F.; Lima-Filho, J. L.; Coelho, L. C. B. B. (2001) A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. *Carbohydrate Polymers*, 46, 191-193. doi: 10.1016/S0144-8617(00)00299-X.
- Souza, S. R.; Dutra, R. F.; Correia, M. T. S.; Pessoa, M. M. A.; Lima-Filho, J. L.; Coelho, L. C. B. B. (2003) Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresource Technology*, 88, 255-258. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00011-7.
- Souza, S. R.; Santana, E. G.; Souza, J. E. G.; Silva, P. M. S.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. (2017) Charge transference detection through cyclic voltammograms in the interaction of *Cratylia mollis* seed lectin-carbohydrate inhibitor. *Biotechnology Journal International*, 18(III), 1-8. doi: 10.9734/BJI/2017/32672.
- Tang, S; Ma, W.; Xie, G.; Su, Y.; Jiang, Y. (2016) Acetylcholinesterase-reduced graphene oxide hybrid films for organophosphorus neurotoxin sensing via quartz crystal microbalance. *Chemical Physics Letters*, 660, 199 – 204. doi: 10.1016/j.cplett.2016.08.025.
- Traini, S.; Piccolo, E.; Tinari, N.; Rossi, C.; La Sorda, R.; Spinella, F.; Bagnato, A.; Lattanzio, R.; D'Egidio, M.; Di Risio, A.; Tomao, F.; Grassadonia, A.; Piantelli, M.; Natoli, C.; Iacobelli, S. (2014) Inhibition of tumor growth and angiogenesis by SP-2, an anti-lectin, galactoside binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP) antibody. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(IV), 916-925. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1117.
- Utarabhand, P.; Rittidach, W.; Rattanaporn, O.; Runsaeng, P.; Hedrick, J. L. (2017) Sialic acid-specific lectin participates in an immune response and ovarian development of the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 203, 132-140. doi: 10.1016/j.cbpb.2016.10.005.
- Yoshimoto, M.; Matsunaga, T.; Tanaka, M.; Kurosawa, S. (2016) Determination of thermodynamic parameters for enolization reaction of malonic and methylmalonic acids by using quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry Research*, 8, 9-15. doi: 10.1016/j.ancr.2016.03.002.
- Zapp, E.; Westphal, E.; Gallardo, H.; de Souza, B.; Vieira, I. C. (2014) Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, 59, 127–133. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.026.

4.2 ARTIGO 2

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

Anais da Academia Brasileira de Ciências

Purificação da lectina das folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) com uso de matriz cromatográfica de afinidade de baixo custo e avaliar sua atividade citotóxica

Silvio Assis de Oliveira Ferreira¹, Marllyn Marques da Silva², Wesley Felix de Oliveira³,
Maria Tereza dos Santos Correia¹, Mariane Cajubá de Britto Lira², Luana Cassandra
Breitenbach Barroso Coelho¹

1 Depto de Bioquímica, Universidade Federal de pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil; 2 Centro Academico de Viória, UFPE, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil; 3 Depto de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, Recife, PE, Brasil.

Resumo

Uma lectina com afinidade a galactose (BmoLL) foi purificada, da folha de *Bauhinia monandra*. As folhas dessa arvore é usada na medicina popular para baixar a glicemia. A manufatura de uma matriz com ligação cruzada da goma de sementes de *Leucaena leucocephala* (CLLSG), mostrou-se eficiente na purificação da BmoLL. A confecção da matriz foi simples, eficiente e de baixo custo na purificação comparado com as gomas comerciais. Sementes que têm na sua composição abundância de galactomananas possuem um elevado potencial de confecção de matrizes cromatográficas para purificação de lectinas que tenham afinidade a galactose. A BmoLL purificada teve ação citotóxica em uma relação de dose dependente, principalmente no tempo de 24 h, tanto nas células de S-180 quanto nas células J774.1, pesquisas com outras linhagens de células são necessários para aprofundar os o entendimento da ação da lectina.

Palavras-chave: *Bauhinia monandra*; lectina de folhas; cromatografia de afinidade; citotoxicidade.

1. Introdução

Os polissacarídeos e seus derivados são considerados um dos polímeros naturais de maior abundância na natureza, esses, devido à ampla variedade química são de significativo interesse para as indústrias (química, farmacêutica e alimentar), uma vez que, elas utilizam para o preparo de géis solúveis ou viscosos, dispersão e emulsões, conhecidos como gomas (MILLER, 1987). As gomas são basicamente polissacarídeos heterogêneos de cadeia longa, de elevado peso molecular com ou sem caráter iônico. Extraídas de sementes, exsudados de árvores e fermentação de microrganismos, além disso, algumas podem ser resultantes de alterações de polissacarídeos homogêneos (RODRIGUES, et al., 1993). Possuem características químicas atóxicas e organolépticas inodora, incolor e insípida (SILVA, et al., 1998). De modo geral, as gomas apresentam baixo teor calórico e causam pouca ou nenhuma modificação no trato digestivo auxiliando consequentemente na mobilidade e digestão dos alimentos (WHISTLER, 1973).

No âmbito biotecnológico, as gomas são utilizadas em reações químicas com a epiclorigrina para o preparo de matriz de colunas cromatográficas de afinidade com gel de agarose visando a purificação de proteínas como as lectinas quem possuem afinidade pelos seus respectivos carboidratos (MATSUMOTO, et al., 1981).

Alguns estudos indicam a utilização das gomas para a purificação das lectinas. Em especial, a goma de sementes de *Leucaena leucocephala* (lam.) Wit (*Leucaena*) foi empregada para produzir uma matriz de baixo custo a ser utilizada na purificação da lectina de sementes de *Trichosanthes anguina* que tem afinidade com a galactose (SESHAGIRIRAO, et al., 2005). A *L. leucocephala* pertence à família das Mimosaceae e é amplamente distribuída na maioria dos continentes (FREITAS, et al., 2001). O principal polissacarídeo das sementes de *L. leucocephala* é a galactomanana, polímero de cadeia principal que tem como componentes majoritários os monômeros de manose e nas suas ramificações galactoses em uma razão de 1:5 de manose/galactose (BUCKERIDGE, et al., 1987), ideal para a manufatura de matriz cromatográfica de afinidade com custo reduzido, fácil manipulação e considerável eficiência na purificação de lectinas que se ligam a galactose.

Devido à sua composição química e propriedades bioativas, as plantas com fins medicinais são muitas vezes o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos. Dentre essas, *Bauhinia monandra* é considerada uma conhecida planta medicinal; essa espécie

vegetal é amplamente distribuída no Brasil sendo utilizada principalmente no controle da glicemia, processos inflamatórios, além de ter ação diurética. Nas suas folhas foi encontrada uma lectina com duas subunidades, a maior uma glicoproteína de 33kDa e a menor um peptídeo de 26 kDa, galactose-específica, a qual foi denominada de BmoLL (*Bauhinia monandra* Leaf Lectin); essa proteína é correlacionada com suas atividades biológicas (COELHO; SILVA, 2000).

As lectinas em geral são vastamente distribuídas na natureza e em particular as de origem vegetal, são proteínas não imunológicas que aglutinam de maneira seletiva as hemácias, devido à sua elevada capacidade de se ligar reversivelmente aos seus respectivos carboidratos (SANTOS, et al., 20014; COELHO, et al., 2012). Participam de diferentes processos biológicos relacionados às estruturas das superfícies das células (SHARON; LIS, 1989). As propriedades farmacológicas das lectinas têm sido amplamente exploradas e diversos estudos têm evidenciado seus potenciais ações biológicas (MACEDO, et al., 2012), tais como efeito contra tumores cancerígenos (MEJÍA; PRISECARU, 2005). As lectinas estão sendo apreciadas como uma promissora terapia no combate ao câncer (LIU; BIAN; BAO, 2010), com propriedades de se ligarem a carboidratos das membranas das células cancerígenas, estimulando apoptose, citotoxicidade e como consequência inibição do crescimento do tumor (MEJÍA; PRISECARU, 2005).

Tendo em vista a necessidade de buscar novos compostos naturais para terapia de células cancerígenas, uma vez, que existem linhagens de células tumorais que apresentam resistência aos quimioterápicos comerciais, este estudo teve como objetivo produzir uma matriz cromatográfica de afinidade de baixo custo a partir das sementes da *L. leucocephala* a fim de purificar a lectina BmoLL e avaliar suas propriedades biológicas de hemaglutinação e capacidade citotóxica em células tanto saudáveis quanto tumorais.

2. Materiais e métodos

2.1 Preparo do Extrato e das Frações das folhas da *B. monandra* Kurz

As folhas da *B. monandra* Kurz foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco, sendo inicialmente lavadas em água corrente, com posterior lavagem com água destilada. Após lavagem as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar durante três dias a 30 °C. O material seco foi então triturado em moinho de lâmina cega e peneirado com malha de 20 Mesh, para uniformização. O pó foi submetido a uma extração em tampão citrato fosfato 10 mM em pH 6,5 e NaCl 15 mM (10% w/v) durante 12 h em agitação branda a temperatura de 4 °C. Posteriormente, o extrato obtido foi filtrado e centrifugado (12.000 g por 15 min). O sobrenadante foi submetido a uma extração utilizando sulfato de amônio (F 0-60%) sob agitação magnética moderada durante 4 h em temperatura ambiente. O material foi submetido a nova centrifugação (12.000 g por 15 min) e o precipitado coletado foi ressubilizado com o tampão de extração. Finalmente, o material foi dialisado primeiramente com água destilada (1 h), e em seguida com tampão citrato fosfato em pH 6,5 com NaCl 15 mM (3 h), sendo realizada a troca do meio a cada hora.

2.2 Preparo de uma matriz de afinidade com reticulado (cross-linked) da goma de sementes de *Leucena leucocephala*, CLLSG

Para o preparo da matriz as sementes foram submetidas ao processo de escarificação química com ácido sulfúrico concentrado (PA) durante 6 min. Em seguida, foram lavadas com água corrente em abundância e secas em estufa a 35 °C durante três dias. O material foi então triturado, em moinho de lâmina cega, durante 20 s em potência média. O triturado (10 g) foi homogeneizado com 30 mL de NaOH (3 M) seguido de 3,0 mL de epicloridrina (99%). A mistura foi levada para estufa permanecendo por 24 h a 40 °C seguida de 6 h a 70 °C (MATSUMOTO, et al., 1981)]. Os grumos insolúveis foram lavados com água destilada exaustivamente com ajuda de uma peneira de 30 Mesh. Em seguida os grumos foram equilibrados com uma solução de tampão fosfato de sódio 10 mM em pH 7,2, NaCl 15 mM e 0,02% de azida de sódio, posteriormente usado na cromatografia de afinidade.

2.3 Purificação da BmoLL

No preparo da coluna de cromatografia de afinidade, usou-se 10 mL do suporte insolúvel da goma das sementes da *L. leucocephala*, o qual foi equilibrado com tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,5 até alcançar a absorvância zero a 280 nm. Adicionou-se então 148,2 mg da fração de 0-60% das folhas de *B. monandra* na coluna e procedeu uma lavagem com o mesmo tampão até a absorvância zero a 280 nm. Para eluição foi usado uma solução de 50 mM de galactose em água destilada. Foram coletadas as alíquotas de 2 mL das frações e separando os que tiveram maior pico de absorvância 280 nm. Seguido de diálise com tampão citrato fosfato (pH 6,5) nas seguintes proporções: para cada 1 mL da alíquota de maior pico se usou 100 mL de tampão por 1 h.

2.4 Dosagem de proteína total

A dosagem proteica foi realizada pelo método Lowry et al. (1951). Para cada 200 µL da amostra e padrão, adicionou-se 1 mL da solução C (50 mL da solução de 2% NaCO₃ em 0,1 N NaOH com 1 mL da solução 0,5 % de CuSO₄ em 1 % de C₆H₅Na₃O₇), agitou-se e deixou-se em repouso por 10 min. Em seguida, adicionou-se 100 µL da solução E (reativo de Folin diluído em água destilada na proporção de 1:1) agitou-se bem e se deixou em repouso em temperatura ambiente protegido da luz por 30 min. A absorvância foi mensurada em 750 nm no espectrofotômetro (Shanghai Spectrum Instruments SP-22). Albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

2.5 Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida nas condições desnaturantes foi feita de conformidade com a literatura (LAEMMLI, 1970). As proteínas usadas como padrão foram a fosforilase b (97 KDa), albumina do soro bovino (66 KDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20,1 KDa) e α- lactoalbumina (14,4 KDa), adquiridas pela *GE Healthcare*. Os géis foram corados com azul de Coomassie brilhante G 250.

2.6 Teste de atividade hemaglutinante

Os eritrócitos foram adquiridos de coelhos machos da raça Nova Zelândia e processados com glutaraldeído conforme descrito por (BING; WEYAND; STAVITSKY, 1966). A determinação da atividade hemaglutinante (AH) foi realizada em placas de 96 poços com fundo U definida com a diluição da amostra mais baixa que mostrou atividade hemaglutinante (CORREIA; COELHO, 1995). A atividade hemaglutinante específica (AHE) corresponde a AH dividida pela concentração de proteínas em miligramas.

2.7 Ensaio de citotoxicidade

As duas linhagens de células utilizadas foram macrófagos J774A.1 e sarcoma-180 (S-180), linhagem maligna, heterogênea, de células de tumor de camundongos de origem mesodérmica (Debnath et al., 2017). As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%) e penicilina-estreptomicina (1%) a 37°C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada a partir do ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (Alley, et al., 1988; MOSMANN, 1988). As células foram inoculadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1x10⁴ (J774A.1) e 1x10⁶ (S-180) células/mL em cada poço e incubadas por 24h. Em seguida, a BmoLL foi diluída em meio de cultura não suplementado obtendo concentrações finais de 1,09; 2,18; 4,37; 8,75 e 17,5 µg/mL, foi adicionada e incubada por 24 h. Em seguida, 25 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço, e a placa incubada durante 3 h. Posteriormente o sobrenadante foi removido e 100 µL de DMSO (dimethylsulfoxide) foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan formados pelas células viáveis. A absorbância foi medida em Leitor de Microplaca (BioteK Elx808) no comprimento de 630 nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular: (A_{bs} da população celular tratada X 100 / A_{bs} da população celular não tratada).

2.8 Análises estatísticas

Os resultados da análise citotóxica estão dispostos como média ± SD, p<0,05 e foram submetidos a ANOVA seguido pelo Bonferroni utilizando-se o programa *GraphPad Prisma* 5.0.

3. Resultados e Discussão

3.1 Purificação da BmoLL

A BmoLL mostrou-se uma lectina com uma elevada afinidade pela matriz da goma da *L. leucocephala*, com uma purificação de proteína estimada de 0.297 mg/mL, o que equivale a um grau de pureza 275 vezes a mais em relação ao extrato bruto e mantendo a sua atividade hemaglutinante específica de 6895 como está exposto na Tabela 1. A goma das sementes da *L. leucocephala* possui a galactomanana como principal carboidrato, o qual tem cadeia principal constituído de β -(1 \rightarrow 4) D- manopiranosil com ramificações α (1 \rightarrow 6) D-galactopiranosil em uma proporção de 1:5 (FAROQUI, et al., 1985). A mesma proporção de monômeros encontramos na goma das sementes da *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub., a qual tem a goma guar como o produto mais usado na biotecnologia (Anderson, 1949). No entanto, a quantidade de galactomananas nas sementes da *C. tetragonolobus* é mais do que três vezes a quantidade das sementes de *L. leucocephala* (BUCKERIDGE, et al., 1987); essa diferença não é um obstáculo uma vez que as sementes da *L. leucocephala* é abundante e perene durante as estações do ano (CHRISPEELS, et al., 1986).

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante (AH) foi determinada em eritrócitos glutarizados de coelho 2,5%. Atividade hemaglutinante específica (AHE) corresponde a divisão da AH pela concentração de proteína. Purificação corresponde à atividade específica das frações dividida pela atividade específica hemaglutinante do extrato.

Amostra	HA (titer ⁻¹)	Proteína (mg/mL)	Específica HÁ	Purificação (vezes)
Extrato (P ₁)	512	20	25	1.0
Fração 0-60% (NH ₄) ₂ SO ₂ (P ₂)	1024	2.15	476	19,04
BmoLL (P ₃)	2048	0.297	6895	275,8

Um dos métodos mais empregado para purificação de lectinas é a cromatografia de afinidade, posto que explora a sua capacidade de se ligarem por interações eletrostáticas e forças de Van Der Waals, de maneira reversível aos seus carboidratos em sua fase estacionária pela qual tem

afinidade (LEHR, 2000). Os dados obtidos na purificação e apresentados na Tabela 1 estão de acordo com os resultados obtidos anteriormente por Coelho e Silva (2000).

Uma alíquota de 25,8 mg da fração 0-60% (P₂) foi aplicada em uma coluna de 1,5 x 10 cm com CLLSG (*cross-linked Leucaena seed gum Matrix*) Fig.1 alcançando 0,297 mg/mL de BmoLL com uma atividade hemaglutinante específica de 6895.

Os resultados mantiveram os patamares durante três repetições de purificação com a mesma coluna e que posteriormente verificou-se uma diminuição da eficiência da coluna de cromatografia de afinidade, fato esse que pode ser explicado pela saturação dos resíduos de galactose. A melhor adsorção seletiva foi com uma solução de 30 mM de galactose em água destilada.

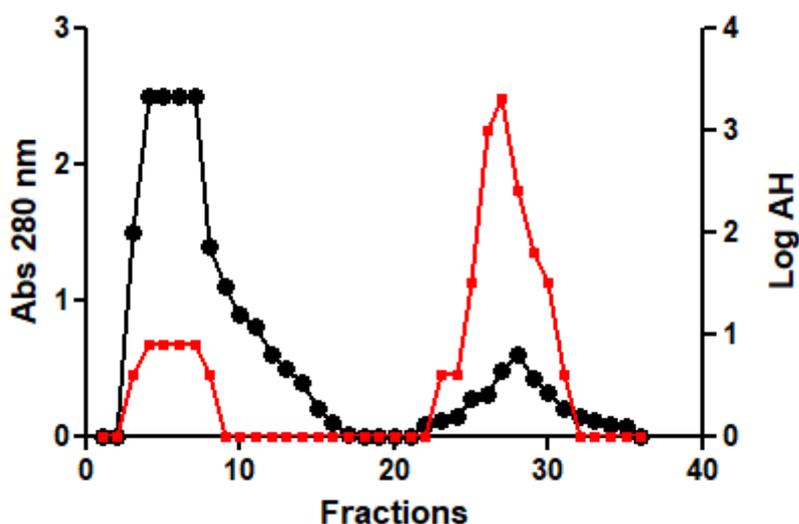


Figura 1 – Cromatografia de afinidade com a coluna de 10 mL CLLSG. (Esferas pretas, absorvância 280 nm; quadrados vermelhos log AH) L25,8mg da fração 0-60%(P₂) foram aplicados na coluna de 10 mL sobre um fluxo de 36 mL/h e eluída com 30mM de galactose, alíquotas de 2mL (P₃) e liofilizada. A coluna foi lavada com uma solução de 1 M de NaCl e posteriormente equilibrada com tampão fosfato citrato 100 mM com 150 mM de NaCl.

3.2 Eletroforese de SDS-PAGE

A eletroforese da BmoLL, em condições de tempo e pH controlados, a partir de gel de SDS PAGE revelou uma única banda como pode ser observado na Figura 2. Em proteínas nativas com peso relativo de 33 KDa, essa condição é aparente uma vez que em condições desnaturantes com β -mercaptoethanol SDS-PAGE nos revelou uma segunda banda de aproximadamente 26 KDa (Fig. 3); esses mesmos resultados estão alinhados com a literatura (COELHO; SILVA, 2000), onde revela que a porção de maior peso é glicosilada, desse modo sugerindo que ela seja conjugada. Em sua maioria as lectinas vegetais são compostas de mais de uma subunidade, variando de dois a quatro monômeros e as formas monoméricas são raras (POVINELI; FINARDI, 2002). Algumas lectinas têm duas subunidades, um exemplo é a lectina do germe de trigo (WGA) que tem duas cadeias idênticas com peso molecular de 35 KDa em pH neutro (NAGATA; BURGER, 1974). No entanto as formas mais encontradas são de quatro subunidades, como na lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) (CHRISPEELS, et al.,1986).

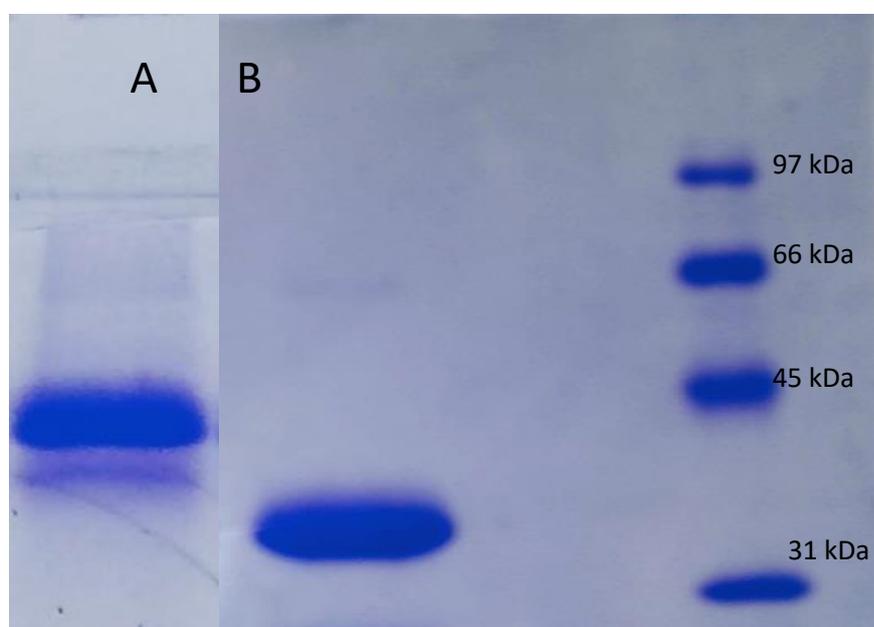


Figura 2 – Eletroforese de BmoLL em condições desnaturantes com β -mercaptoetanol SDS-PAGE gel 3-12% (faixa A) e sem β -mercaptoetanol PAGE gel 3-12% (faixa B), as proteínas

usadas como padrão: β -fosforilase (1), albumina (2), ovoalbumina (3), anidrase carbônica (4). Todas foram coradas com azul de Coomassie Brilhante G 250.

3.3 Ensaio de citotoxicidade

No presente estudo, os resultados mostram que houve uma relação dose-dependente, principalmente no tempo de 24 h, tanto nas células de S-180 quanto nas células J774.1, ou seja, quanto maior a concentração menor a viabilidade celular (Figura 4). O segmento dose dependente da BmoLL também foi notado em seus efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (CAMPOS, et al., 2016). Esse método colorimétrico mede a atividade metabólica das células. Portanto, células viáveis convertem o MTT, de cor amarela, em cor púrpura (SILVA, et al., 2019)

Nas células de S-180, os resultados de viabilidade celular foram de 94.5, 89.9, 71.3, 59.4, 56.1% no tempo de 24 h nas concentrações de 1.0, 2.1, 4.3, 8.7 e 17.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Esses resultados foram significativos na concentração de 4.3, 8.7 e 17.5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3A). É importante destacar que mesmo em concentrações tão baixas, a BmoLL foi capaz de inibir de forma conveniente as células tumorais do S-180. Sendo assim, é possível que com o aumento da concentração da BmoLL, além de 17.5 $\mu\text{g/mL}$, haja uma redução maior na viabilidade celular promovendo atividade ainda mais eficiente, assim sendo um agente promissor no combate a essas células.

Os dados apresentados na figura 3A estão de acordo com uma lectina extraída a partir do rizoma de *Setcreasea purpurea*. Ela apresentou viabilidade de 50% na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ na célula de CNE-1 (uma célula do carcinoma nasofaringe humano bem diferenciada em 24 h de incubação (Yao et al. 2010) consideraram esses resultados como potente efeito inibidor.

Entretanto, nas células J774.1, a porcentagem de células vivas foi de 72.3, 66.4, 65.8, 59.2, 50.8% no tempo de 24 h nas concentrações de 1.0, 2.1, 4.3, 8.7 e 17.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Figura 3B). Moléculas tóxicas para macrófagos são importantes para combater infecções intracelulares. Por exemplo, no caso da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis* (patógeno intracelular) invade macrófagos e causa tuberculose (LIRA, et al., 2009). Em outros estudos, a citotoxicidade da BmoLL foi avaliada em cepas de *Escherichia coli* e não apresentou citotoxicidade contra elas (SISENANDO, et al., 2009). Lectinas das

sementes de *Bauhinia forficata* BfL foi eficaz em células malignas de câncer de mama humano MCF7 na concentração de 10 μ M no tempo de 48 h o que não aconteceu com concentrações menores onde houve um aumento de células viáveis (SILVA, et al., 2009). Essa mesma lectina não se mostrou eficaz em células benignas de câncer de mama MCF 10A. Lectinas têm mais afinidade por células tumorais pelo fato destas apresentarem muitos receptores glicoproteínas e glicolipídios alterados na superfície celular (FAHEI NA-MARTINS, et al.,2011; HEINRICH, et al. 2005).

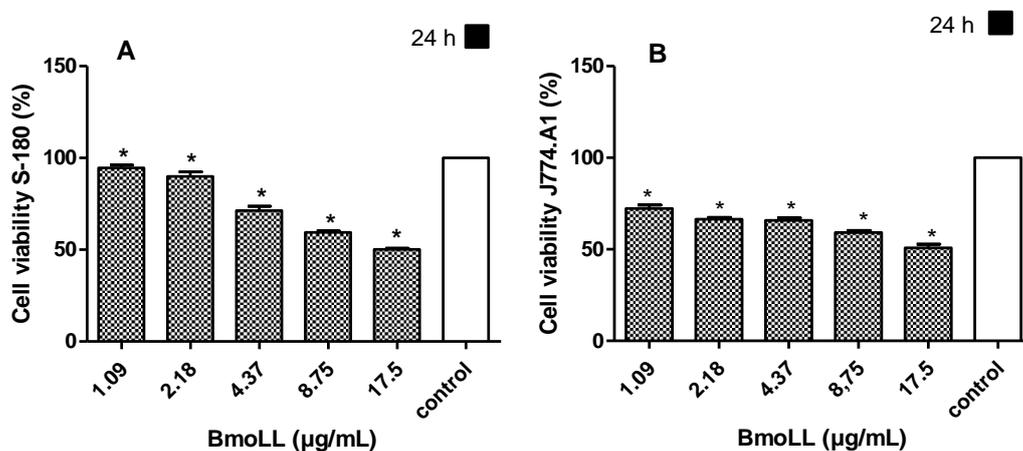


Figura 3 – Viabilidade celular da BmoLL em Sarcoma 180 (S-180) (A) e J774A.1 (B). Diferenças estatísticas com o controle foram determinadas pela ANOVA seguido de Bonferroni, $*P < 0,05$ vs Controle. Cada valor determina a média \pm SD de três experimentos independentes. Incubações de 24 h.

4. Conclusão

A manufatura da matriz com a goma da semente da *Leucaena* e sua aplicação na purificação de lectinas, que se ligam em especial a galactose, mostrou-se eficiente na purificação da BmoLL em quantidades de miligramas e de baixo custo. Sementes que tenham galactomananas, em especial as leguminosas, com quantidade elevadas de galactose em suas ramificações, podem ser usadas na fabricação de novas matrizes para cromatografia de

afinidade. A BmoLL mostrou citotoxicidade frente às linhagens de células J774A.1 e S-180 nas concentrações de 17,5 µg/mL reduzindo a sua viabilidade celular no tempo de 24 h em aproximadamente 50%.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por auxílios e bolsas de Desenvolvimento Científico (MTSC e LCBBC), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Referências

ALLEY, M.C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A; HURSEY, M.; CZERWINSKI, M.J.; FINE, D.L.; ABBOTT, B.J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R.; BOYD, M.R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay, *Cancer Res.* 48 (1988) 584–588.

ANDERSON, E. Endosperm Mucilages of Legumes, *Ind. Eng. Chem.* 41 (1949) 2887–2890. <https://doi.org/10.1021/ie50480a056>.

BE MILLER, J. N. Industrial Gums, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, John Wiley & Sons, 7 (1987) 589.

BING, D.H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. H. Hemagglutination with aldehyde-oxidized erythrocytes for assay of anti-gens and antibodies, *Proc Soc Exp Biol Med* 124 (1966) 1166–1170.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C.; LIMA, D.U.; Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds, *Dev. Crop Sci.* 26 (2000) 283–316. [https://doi.org/10.1016/S0378-519X\(00\)80015-X](https://doi.org/10.1016/S0378-519X(00)80015-X).

BUKANTZ C. S. C.; REIN L. C. C. R, KENT J. F. Studies in complement fixation. II. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *J Lab Clin Med.* 31 (1946) 349-399.

CAMPOS, J.K.L.; ARAÚJO, C.S.F; ARAÚJO, T.F.S.; SANTOS, A.F.S; TEIXEIRA, J.A.; LIMA, V.L.M.; COELHO, L.C.B.B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin, *Biochim. Open.* 2 (2016) 62–68.

- CHRISPEELS, M.J.; HARTL, P.M.; FAYE, Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. Partial amino acid sequence and lectin activity, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 10021–10024. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67483-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67483-6).
- COELHO, L. C. B. B.; SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G. Protein Purification by Affinity Chromatography, *Protein Purif.* (2012).’
- COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R.; Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia Monandra*, *Phytochem. Anal.* 11 (2000) 295–300. [https://doi.org/10.1002/1099-1565\(200009/10\)11:5<295:AID-PCA517>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<295:AID-PCA517>3.0.CO;2-S).
- CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55 (1995) 261–273. <https://doi.org/10.1007/BF02786865>.
- DEBNATH, S.; KARAN, S.; DEBNATH, M.; DASH, J.; CHATTERJEE, T. K. Poly-l-lysine inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis in ehrlich ascites carcinoma and in sarcoma S-180 tumor. *Asian Pac. Organ. Canc. Prev.* 18 (2017) 2255–2268. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.8.2255>.
- FAROQUI, M. L. H.; KAPOOR, V. P.; KHAN, P.S.H. *Res. hidustry*, 30 (1985) 144.
H.A.A.A.C.N. Sisenando, M.F.S. Macedo, A.C.R.D. Saturnino, L.C.B.B. Coelho, S.R.B. de Medeiros, Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL), *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.010>.
- HEINRICH, E. L.; WELTY, L. A. Y.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B., Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach, *Acta Histochemical*, Volume 107, Issue 5, 2005, Pages 335-344.
- HELENA, L.; FREITAS, C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Variabilidade intra e intergenotípica em uma população de híbridos *Material e Métodos*, (2001) 1069–1076.
LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680- 685.
- LEHR, C. Lectine-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives, *Journal of Controlled Release*, 65 (2000) 19.
- LIRA, M.C.B.; MOURA, M.P. S; SANTOS, H.M.L. R.; GALETTI, F.C.S.; SIMIONI, A.R.; SANTOS, N.P.; EGITO, E.S. T.; SILVA, C.L.; TEDESCO, A.C.; MAGALHÃES, N.S., In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation, *J. Liposome Res.* 19 (2009) 49–58.
- LIU, B.; BIAN, H. J.; BAO, J. k. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic, *Cancer Lett.* 287 (2010) 1–12.
- LOWRY, O. H; ROSEBROUGH, A. L.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 165-175.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146 (2007) 486–498. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.020>.

MARTINS, G.V. F.; SILVEIRA, A.L.; RAMOS, M.V.; SANTOS, L.F. M.; ARAUJO, D.A.M., Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25 (2011) 290–296. <https://doi.org/10.1002/jbt.20388>.

MATSUMOTO, I.; KITAGAKI, H.; AKAI, Y.; ITO Y.; SENO, N. Derivatization of epoxy-activated agarose with various carbohydrates for the preparation of stable and high-capacity affinity adsorbents: Their use for affinity chromatography of carbohydrate-binding proteins, *Anal. Biochem.* 116 (1981) 103–110.

MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V.I. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 (2005) 425–445. <https://doi.org/10.1080/10408390591034445>.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, 65 (1983) 55–63.

NAGATA, Y.; BURGER, M. M., Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem.* 249 (1974) 3116-3122.

RAMOS, D. B. M.; ARAÚJO, M.T. M. F.; ARAÚJO, T.C. L.; NETO O.G. D. S.; SILVA, M.G. E.; SILVA, Y.A.; TORRES, D. J. L.; PATRIOTA, S. L0.L.; MELO, C.M.L.; LORENA, V.M.B., PAIVA G. P.M.; MENDES, R.L.; NAPOLEÃO, T. H. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. *J Ethnopharmacol.* 2019 Apr 6; 233:148-157. doi: 10.1016/j.jep.2019.01.011. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30658183.

RODRIGUES, J. F.; R.C.M. De Paula, S.M.O. Costa, Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L), *Polim. E Tecnol.* 3 (1993) 31–36.

SANTOS, A. F. S.; SILVA, M. D. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; Lectins: Function, structure, biological properties, and potential applications, *Curr. Top. Pept. Protein Res.* 15 (2014) 41–62.

SESHAGIRIRAO, K.; LEELAVATHI, C.; SASIDHAR, V. Cross-linked leucaena seed gum matrix: An affinity chromatography tool for galactose-specific lectins, *J. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2005) 370–372. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.3.370>.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Scien.* 246 (1989) 227–234.

SILVA, A.G.; RODRIGUES, J.F.; PAULA, R.C.M. Composição e propriedades reológicas da goma do angico (*Anadenanthera macrocarpa* benth), *Polímeros*. 8 (1998) 34–40. <https://doi.org/10.1590/s0104-14281998000200006>.

SILVA, M. C.C.; PAULA, C. A. A.; FERREIRA, J. G.; GAMERO, E. J. P.; VAZ, A. M. S.F; SAMPAIO, M. U.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M. L. V.; *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840 (2014) 2262–2271.

SILVA, M.M.; ROCHA, T.A.; MOURA, D.F.; CHAGAS, C.A.; JÚNIOR, F.C.A.A; SANTOS, N.P.S.; SOBRAL, R.V. S.; NASCIMENTO, J.M.; LEITE, A.C. L.; PASTRANA, L.; COSTA, R.M.P.B.; NASCIMENTO, T. P.; PORTO, A.L.F.; Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 103 (2019) 282–291.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; and ROUGÉ, P. (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plt. Sci.*, 17: 575–692.

VEIGA, J. B.; NETO, M. S. Leucena na alimentação animal: recomendações básicas. Belém, PA: EMBRAPA Amazônia Oriental. 4p. (EMBRAPA - CPATU. Recomendações básicas, 019) (1992).

WHISTLER, R. L. "Industrial Gums-Polysaccharides and their Derivatives", Editor R.L Whistler, 2^a ed., Academic Press, Londres, capo 1,1973.

YAO, Q.; FANG WU, C.; LUO, P.; CONG XIANG, X.; JIE LIU, J.; MOU, L.; KU BAO, J., A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities, *Process Biochem.* 45 (2010) 1477–1485.

4.3 ARTIGO 3

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

Anais da Academia Brasileira de Ciências

Toxicidade de extrato de folhas de *Bauhinia monandra* contendo a lectina BmoLL: embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina*

Silvio Assis de Oliveira Ferreira¹; Thierry Wesley de Albuquerque Aguiar¹; José Josenildo Batista¹; Magda Rhayanny Assunção Ferreira²; Luiz Alberto Lira Soares²; Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo³; Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque⁴; Hallysson Douglas Andrade de Araújo¹; André de Lima Aires⁴; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹

1 Depto de Bioquímica, Universidade Federal de pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil; 2 Depto de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, PE, Brasil; 3 Depto de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, Recife, PE, Brasil; 4 Depto de Medicina Tropical, UFPE, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Caramujos *Biomphalaria glabrata* são os principais vetores de esquistossomose no Brasil e a busca por moluscidas naturais interrompendo o ciclo evolutivo do parasita é necessário. As plantas do gênero *Bauhinia* são amplamente encontradas em continentes endêmicos para a doença e folhas de *B. monandra* contêm a lectina BmoLL com ação biocida. O rastreamento de substâncias naturais que apresentem potencial moluscicida e embriotóxico e que não tenha impacto no meio ambiente, é muito relevante para o controle da esquistossomose. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extrato salino de *B. monandra* sobre embriões em blástula de *B. glabrata*, e caramujos adultos e monitoramento ambiental com *Artemia salina*. Cromatografia em Camada Delgada detectou derivados cinâmicos, flavonóides e saponinas; concentração de proteína (21,2 mg/mL) e atividade hemaglutinante específica, AHE (96,6)

confirmaram a presença de lectina. Na concentração de 100 µg/mL, o extrato obteve 88,7% de inviabilidade, enquanto a 200 µg/mL, 100% de embriões inviáveis. Para os caramujos adultos, a concentração de 4000 µg/mL obteve 90% de mortalidade, porém de forma acumulativa ao longo de 96 h. Na avaliação da ecotoxicidade, o extrato demonstrou elevada mortalidade em *A. salina* mesmo nas menores concentrações. Em conclusão, o extrato salino de *B. monandra* poderá ser utilizado como alternativa no controle populacional do vetor, porém de forma pontual em localidades com alta endemicidade devido seu impacto no meio ambiente.

Palavras-chaves: Efeito embriotóxico, Esquistossomose mansônica, Potencial Moluscicida, Lectina, Ecotoxicidade.

1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido usadas como fontes de matéria prima desde a Pré-História; é perceptível que nas últimas quatro décadas tem havido um ressurgimento do interesse no estudo e utilização de produtos derivados de plantas (Cagliari et al., 2018; Oliveira et al., 2020). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 85% de toda população mundial fazem uso de extratos de plantas para resolução de problemas direcionados para atenção primária à saúde (Brasil, 2012) por exemplo, atividade moluscicida de plantas como alternativa profilática na transmissão da esquistossomose (Albuquerque et al., 2014; Rocha-Filho et al., 2015).

A esquistossomose acomete mais de 220 milhões de pessoas em 78 países e territórios no mundo (WHO, 2020). No Brasil a doença é endêmica em 19 Estados, com estimativa entre 4-6 milhões de infectados; a esquistossomose é transmitida por moluscos do gênero *Biomphalaria* sendo o *B. glabrata* o principal vetor por liberar milhares de cercárias diariamente no ambiente aquático, e em 3 meses um único molusco gera 10 milhões de descendentes (Scholte et al., 2012; Coelho e Caldeira, 2016). O Estado de Pernambuco é um dos que apresenta a maior taxa de prevalência com mortalidade cinco vezes superior à média nacional (Pernambuco, 2014; Barbosa et al., 2014).

A OMS recomenda o controle populacional dos moluscos com a aplicação do moluscicida niclosamida (Baylucide, Bayer®) apenas em localidades que apresentam elevada prevalência da esquistossomose, devido à sua alta toxicidade para espécies não-alvo, como

peixes, plantas e outros organismos presentes no ecossistema aquático (Oliveira-Filho; Paumgarten, 2000; WHO, 2017). Assim, há uma urgente necessidade de investimento em pesquisas que possam contribuir com novas alternativas moluscidas com ação eficaz, biossegura e elevada seletividade. Esse cenário encoraja nosso Grupo de Pesquisa por produtos naturais bioativos no controle populacional dos moluscos *B. glabrata*, agente infeccioso (cercárias de *S. mansoni*) e avaliação da ecotoxicidade ambiental com bioindicadores de referências (Albuquerque et al., 2014; Rocha-Filho et al., 2015; Araújo et al., 2019; Silva et al., 2019).

Neste contexto as plantas do gênero *Bauhinia* (Família das *Fabaceae*) são amplamente encontradas nos continentes onde é relatada endêmicidade para a esquistossomose, tais como na África, Ásia, bem como América Central e do Sul (Nworie; Okorie, 2018). No Brasil, a *Bauhinia monandra* é conhecida popularmente como "pata-de-vaca" e diversas aplicações biotecnológicas para as folhas e isolados da planta já foram reportadas (Cagliari et al., 2018; Oliveira et al., 2020). Por exemplo, uma lectina, proteína que se liga ao carboidrato galactose, por reconhecimento específico e reversível, foi purificada à homogeneidade das folhas de *B. monandra* (BmoLL, *B. monandra* Leaf Lectin) e apresentou atividade inseticida sobre *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Coelho; Silva, 2000; Macedo et al., 2007).

Além disso, outros resultados muito promissores foram observados com endofíticos isolados das folhas da *B. monandra*, sendo reportadas ações fungicida e bactericida (Ramos et al., 2016; Araujo-Melo et al., 2017). Em relação ao parâmetro de toxicidade utilizando o modelo bioindicador ambiental *Artemia salina* a BmoLL não afetou a sobrevivência de nauplios, nem mesmo em elevadas concentrações de 250-1.000 µg/mL (Araújo et al., 2019).

Apesar dos derivados de folhas de *B. monandra* apresentarem atividades biocidas promissoras no controle populacional de pragas ou micro-organismos indesejáveis, ainda não há estudos que reportem a toxicidade de preparações de folhas contendo a lectina BmoLL no controle populacional de caramujos de *B. glabrata*, agente infeccioso da esquistossomose mansônica e sobre *A. salina* (bioindicador de toxicidade ambiental). Assim, nosso objetivo é avaliar a toxicidade do extrato salino sobre embriões e caramujos adultos de *B. glabrata* e realizar ensaio de ecotoxicidade com *A. salina*.

3. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do extrato salino

Para a obtenção do extrato salino foi adicionado pó de folhas de *B. monandra* 10 % (p/v) (10 g) a 100 mL em uma solução salina de NaCl 0,15 M. A mistura foi mantida durante a noite a 4 ° C sob agitação suave usando um agitador magnético; o material foi filtrado através de gaze e centrifugado por 15 min a 12.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi liofilizado e estocado em freezer -20°C.

2.2 Teste de atividade hemaglutinante

Os eritrócitos foram obtidos de coelhos machos da raça Nova Zelândia conforme descrito por Bukantz (1946); as hemácias foram processadas com glutaraldeído (BING; WEYAND; STAVITSKY, 1967). A determinação da atividade hemaglutinante (AH) foi realizada em placas de 96 poços com fundo U definida com a diluição da amostra mais baixa que mostrou atividade hemaglutinante (CORREIA; COELHO, 1995). A atividade hemaglutinante específica (AHE) corresponde a AH dividida pela concentração de proteínas em miligramas.

2.3 Análise fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

2.3.1 Preparo das amostras

Foi pesado 10 mg do extrato de folhas de *B. monandra* e solubilizado em metanol para balão volumétrico de 5 mL. Em seguida, alíquotas foram transferidas para tubos *ependorfs*.

2.3.2 Cromatografia em Camada Delgada

Todos os padrões foram preparados na concentração de 0,5 mg/mL em metanol P.A. em tubos *ependorf*. As amostras e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 (Macherey-Nagel®, Alemanha). As placas foram

desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Tabela 1). A cuba foi saturada durante 15 min, em temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 0,5 cm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 0,5 cm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 10 cm. As amostras foram aplicadas a 0,5 cm da origem e com término 0,5 cm do final da placa. Após a eluição das placas, foram secas em temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível sendo em seguida digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Tabela 1 – Condições cromatográficas para identificação do perfil químico por Cromatografia em Camada Delgada.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador
Derivados Cinâmicos	(90:5:5)	Ácido cafeico	AlCl ₃
Flavonoides	(90:5:5)	Quercetina	AlCl ₃
Taninos hidrolisáveis	(90:5:5)	Ácido gálico	FeCl ₃
Taninos Condensados	(90:5:5)	Catequina	Vanilina Clorídrica + Δ
Cumarinas	(50:50:50)	Cumarina	KOH
Terpenos/Esteroides	(90:10)	β-sitosterol	Liebermann-Burchard + Δ
Saponinas	(16:10:2,5)	Escina	Liebermann-Burchard + Δ
Antracenicos	(20:30:15:0,5)	Senosídeo B	HNO ₃ + Δ + KOH
Açúcares	(100:11:11:26)	Glicose	Timol + H ₂ SO ₄ + Δ
Alcaloides	(70:20:10)	Piperina	Dragendorff

AlCl₃: Cloreto de alumínio a 5% em metanol; FeCl₃: Cloreto férrico; Δ: Aquecimento; KOH: hidróxido de potássio; HNO₃: Ácido nítrico; H₂SO₄: Ácido sulfúrico. 90:5:5 = Acetato de etila, ácido fórmico e água; 50:50:50 = Tolueno, éter etílico e ácido acético glacial (saturação); 90:10 = Tolueno, acetato de etila; 100:11:11:26 = Acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água; 16:10:2,5 = Clorofórmio, metanol e água; 20:30:15:0,5 = Acetato de etila, álcool n-butílico, água e ácido acético glacial; 70:20:10 = Tolueno, acetato de etila, dietilamina.

2.4 Avaliação da atividade do extrato salino de *Bauhinia monandra* sobre embriões e caramujos adultos da *Biomphalaria glabrata*

Embriões (n=100) nos estágios de blástula (0^a a 15^a h), foram expostos durante 24 h ao extrato salino de *B. monandra* em diversas concentrações em placas petri com volume final de 8,0 mL. O grupo controle negativo foi efetuado com água filtrada dechlorada e o grupo positivo com niclosamida na concentração de 1 mg/mL. Após a exposição os embriões foram lavados (água filtrada dechlorada) e transferidos para placas novas com água filtrada dechlorada, sendo monitorados durante 7 dias para serem avaliados quanto à sua viabilidade (normais) e inviabilidade (malformações e mortos) (Araújo et al., 2018b). Dois experimentos foram realizados independentes, em triplicata.

Caramujos adultos (n=10) com 10-14 mm de diâmetro de concha, foram expostos ao extrato de *B. monandra* em durante 24 h, em diversas concentrações, com volume final de 60 mL para cada solução. Após a exposição, os caramujos foram lavados e observados diariamente durante 7 dias, e a taxa de mortalidade foi registrada diariamente. O grupo controle negativo foi realizado nas mesmas condições apenas com água filtrada dechlorada. A niclosamida foi utilizada para o controle positivo, na concentração de 1 µg/mL (WHO, 1965). Dois experimentos foram realizados independentes, em triplicata.

2.5 Avaliação da ecotoxicidade ambiental utilizando a *Artemia salina* após exposição ao extrato salino da *Bauhinia monandra*

Ovos encistados de *A. salina* foram colocados em um béquer com 500 mL de água do mar (pH 8,0) e aeração constante em temperatura ambiente (25 ± 3 ° C) por 48 h. Após a eclosão, as larvas foram coletados e divididas em grupos experimentais (n = 10) com a ajuda de um estereomicroscópio (Wild M3B, Heerbrugg, Suíça) da seguinte forma: controles negativos (água do mar), positivo (1,0 µg/mL de niclosamida) e o extrato em diversas concentrações por 24 h a 25 ± 3 °C, de acordo com o procedimento descrito por Meyer et al. (1982).

Dois experimentos foram realizados em quadruplicado com um total de 80 amostras por tratamento, e avaliações de mortalidade e sobrevivência de larvas foram realizadas por observação de mobilidade com a ajuda de um estereomicroscópio.

2.6 Análise estatística

Os desvios padrão (DP) foram expressos como médias replicadas \pm DP e as diferenças significativas entre os grupos de tratamento foram analisadas pelo teste t de *Student* (significância $p < 0,05$) utilizando o *GraphPad Prism* versão 5.0 para *Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA). As concentrações letais (CL) necessárias para matar 10%, 50% e 90% dos embriões, larvas e moluscos foram calculadas pela análise *Probit* com um intervalo de confiança de 95% usando o *software StatPlus® 2009* (*Soft Analyst*, Vancouver, BC, Canadá).

3. Resultados e Discussão

3.1 Perfil fitoquímico e análise da atividade hemaglutinante

Após o processo de extração utilizando tampão citrato-fosfato contendo NaCl foi obtido o extrato salino das folhas de *B. monandra* apresentando rendimento de 0,45 mg/100 mL, equivalente a 0,45%. Na análise fitoquímica por CCD o extrato revelou a presença açúcares, saponinas, flavonóides e derivados cinâmicos (Tabela 1). No entanto, taninos hidrolisados e condensados, cumarinas, terpenos/esteróides, antracênicos e alcalóides não foram identificados. A análise química da preparação apresentou elevados teores de proteínas (21,2 mg/mL), atividade hemaglutinante (AH) de 2048 e atividade hemaglutinante específica (AHE) de 96,6. Dessa forma, a presença de AH no extrato confirma a presença da lectina BmoLL, o que corrobora com os resultados obtidos em outros estudos.

Tabela 2 – Perfil fitoquímico obtido da cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato das folhas de *B. monandra*.

Classe de metabólito	Extrato salino
Derivados cinâmico	+
Flavonóides	+
Taninos hidrolisáveis	-
Taninos condensados	-

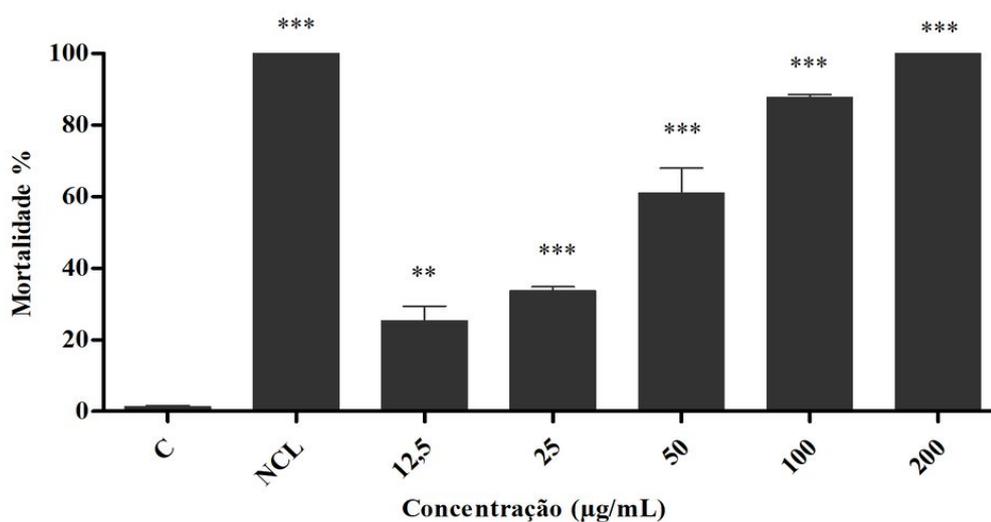
Cumarinas	-
Terpenos/Esteróides	-
Saponinas	+
Antracênicos	-
Açúcares	+
Alcalóides	-

Presença (+), ausência (-) ou banda com baixa intensidade do composto.

3.2 Avaliação da toxicidade do extrato sobre embriões e caramujos adultos de *B. glabrata*

O extrato de *B. monandra* apresentou toxicidade sobre os embriões de *B. glabrata*. O estágio de blástula apresentou 87,66% e 33,66% de inviabilidades nas concentrações de 100 e 25 µg/mL respectivamente (Figura 1). Além disso, na concentração de 200 µg/mL, todos os embriões apresentaram inviabilidade, demonstrando ser um moluscicida eficiente e promissor.

Figura 1 – Embriotoxicidade do extrato sobre embriões no estágio de blástula

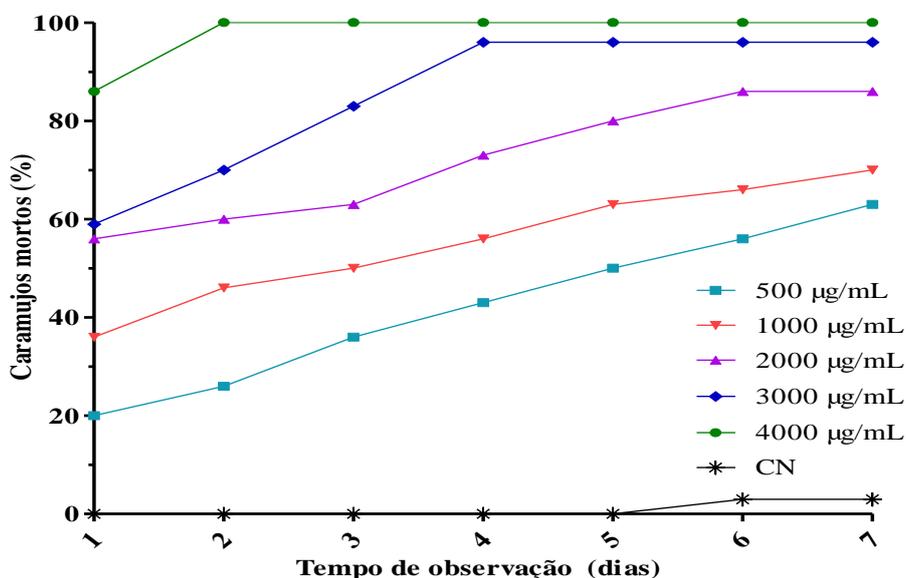


Resultados semelhantes foram observados com os testes de embriotoxicidade sobre *B. glabrata* com a amida piplartina de *Piper tuberculatum* (Rapado et al., 2013) que mostraram

eficácia para o estágio de blástula. Essa elevada suscetibilidade do extrato salino pode ser atribuída à forte proliferação celular observada. Ainda nessas fases, os organismos parecem estar mais sujeitos a sofrer efeitos teratogênicos e letais devido ao tratamento químico mesmo que sejam expostos em curtos períodos ou intervalos de tempo (exposição aguda) (Tallarico et al., 2014; Burić et al., 2015; Gombeau et al., 2017).

Já em caramujos adultos o extrato salino de *B. monandra* apresentou percentual de mortalidade de 16.6% na concentração de 4000 µg/mL quando avaliado no tempo de 24 h. Todavia, apresentou um nível gradativo de toxicidade ao longo dos 7 dias de exposição (48h) com indivíduos adultos de *B. glabrata*, alcançando taxas de mortalidade de 63% a 100% (500 - 4000 µg/mL) (Figura 2). Resultados similares foram encontrados em estudos de Amanda (2019) em que caramujos adultos expostos foram expostos à cloridrato de polihexametileno biguanida durante o período de 96 h para avaliar a mortalidade. Além disso, outros trabalhos como o de Xiao Shen (2018) e Lingpeng Dai (2011) avaliaram também a mortalidade de caramujos (*Pomacea canaliculata*) por um período superior a 24 h.

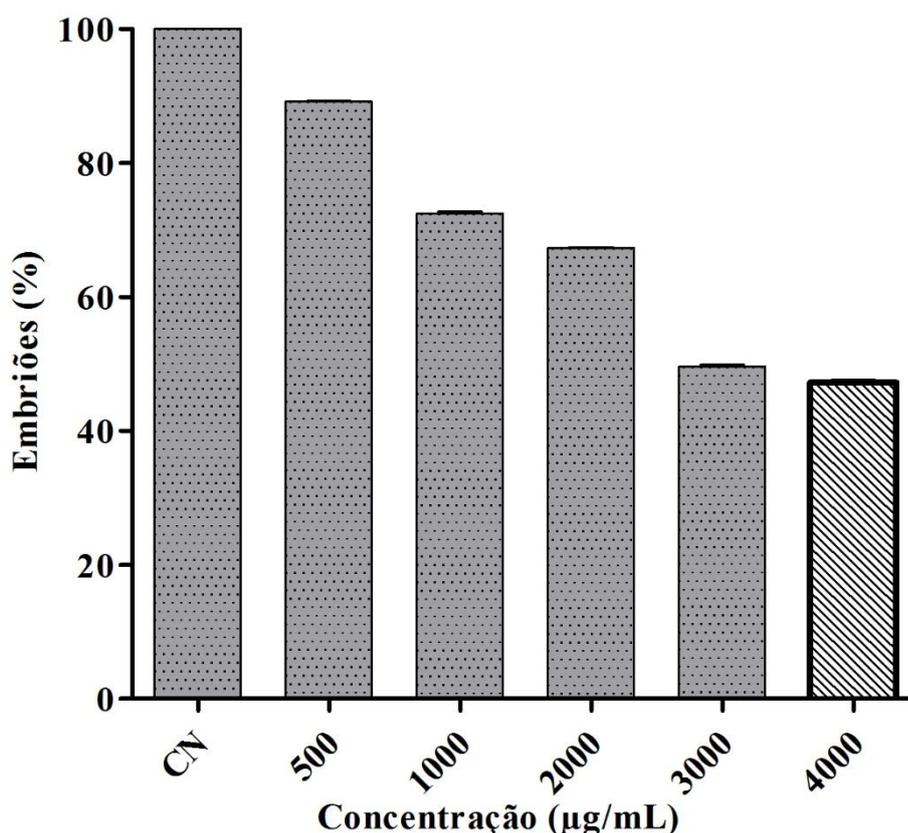
Figura 2 – Mortalidade dos caramujos adultos *B. glabrata* pelo extrato de *B. monandra*



3.3 Avaliação dos parâmetros de fertilidade e fecundidade

Quando avaliada a fertilidade dos caramujos adultos expostos, no grupo controle apresentaram 4.31% de embriões inviáveis. Enquanto nas concentrações de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 $\mu\text{g/ml}$, os embriões demonstraram 5.37, 5.88, 9.31, 10.47 e 11%, respectivamente para cada concentração. Quanto à fecundidade de *B. glabrata*, os resultados demonstraram uma diminuição do quantitativo de ovos após 7 dias de observação com redução de aproximadamente 11%, 28%, 33%, 50% e 53%, respectivamente para as concentrações de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3).

Figura 3 – Total de embriões de *B. glabrata* após 7 dias pós-exposição ao extrato salino.

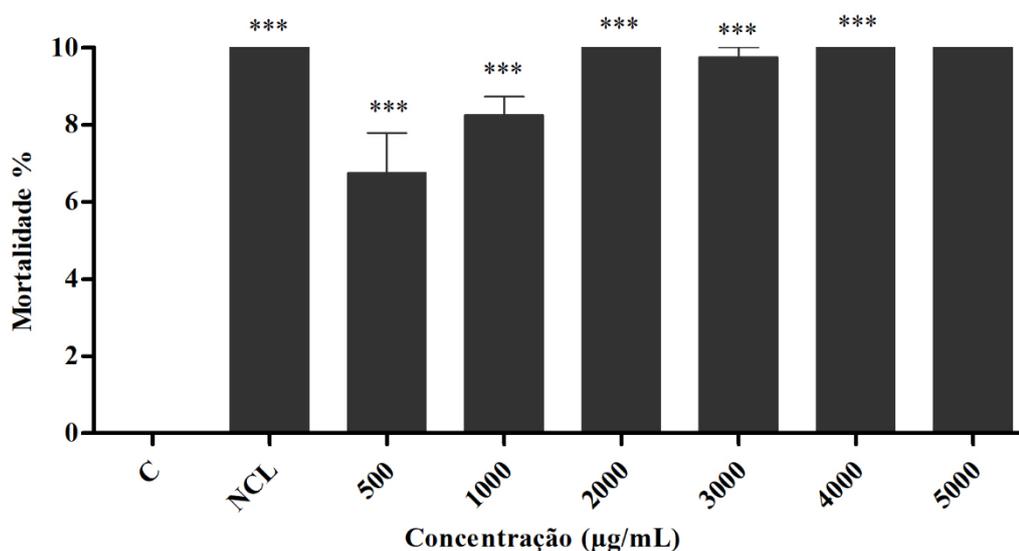


Nos estudos de Jaqueline et al. (2019 e Araújo et al. (2018) é relatada a diminuição na fecundidade e fertilidade de *B. glabrata* sobreviventes pós exposição à curcumina e ao ácido úsnico, dados esses que estão em consonância com nossos resultados.

3.4 Ecotoxicidade ambiental com *Artemia salina*

A avaliação do extrato de *B. monandra* sob a *A. salina* demonstrou elevados níveis de letalidade, até mesmo na menor concentração (Figura 4).

Figura 4 – Ecotoxicidade do extrato de *B. monandra* sobre *Artemia salina*



Resultados semelhantes foram também observados com o extrato de *Cratylia mollis* (Araújo, 2003), bem como o extrato de *Curcuma longa* (SILVA FILHO et al., 2009), em que foram observadas também toxicidade ambiental quando avaliadas sobre *A. salina*.

4. Conclusão

Os dados deste trabalho demonstraram efeitos tóxicos do extrato salino da *B. monandra* sobre embriões em estágio de blástula do molusco *B. glabrata*. O extrato também foi eficiente no combate aos caramujos adultos de forma gradativa tendo seu pico de efeito ao final de 4 dias. Porém quando avaliado sobre *A. salina*, o extrato demonstrou toxicidade. Portanto, o extrato salino de *B. monandra* poderá ser utilizado como alternativa no controle populacional do vetor, porém de forma pontual, em localidades com elevada endemicidade, devido ao seu impacto no

meio ambiente. Conseqüentemente, extrato salino é uma alternativa promissora no combate ao vetor da esquistossomose.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por auxílios e bolsas de Desenvolvimento Científico e (LCBBC), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

REFERÊNCIAS

1. ABNT. NBR 15499:2015 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. Rio de Janeiro, Brasil. 2015.
2. ALBUQUERQUE, L.P.; PONTUAL, E.V.; SANTANA, G.M.S.; SILVA, L.R.S.; AGUIAR, J.S.; COELHO, L.C.B.B.; RÊGO, M.J.B.M.; PITTA, M.G.R.; SILVA, T.G.; MELO, A.M.M.A.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**. v. 138, p. 23-27, 2014.
3. AMANDA et al. Molluscicidal activity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride on the early-life stages and adults of the *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Chemosphere**. V. 216, P. 365-371. 2019.
4. ARAÚJO, C.S.F.; ARAUJO, T.F.S.; SILVA, C.B.; CAMPOS, J.K. L.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEAO, T.H.; ALBUQUERQUE, P.B.S.; LIMA, V.L.M.; COELHO, L.C.B.B. Evaluation of toxicity on mice and artemicidal activity of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). Theory and Applications of Microbiology and Biotechnology. **ScienceDomain International**. v. 1, p. 44-52, 2019.
5. ARAUJO-MELO, R.O.; SOUZA, I.F.A.C.; OLIVEIRA, C.V.J.; ARAUJO, J.M.; SENA, K.X.F.R.; COELHO, L.C.B.B. Isolation and identification of endophyte microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves, mainly actinobacteria. **Biotechnology Journal International**. v. 17, p. 1-12, 2017.
6. ARAÚJO, H.D.A.; SILVA, L.R.S.; SIQUEIRA, W.N.; FONSECA, C.S.M.; SILVA, N.H.; MELO, A.M.M.A.; MARTINS, M.C.B.; LIMA, V.L.M. Toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**. v. 179, p. 39-43, 2018a.
7. ARAÚJO, H.D.A.; MELO, A.M.M.A.; SIQUEIRA, W.N.; MARTINS, M.C.B.; AIRES, A.L.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; SILVA, N.H.; LIMA, V.L.M. Potassium usnate toxicity against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Tropica**. v. 188, p. 132-137, 2018b.
8. BARBOSA, C.S.; SANTOS, R.S.; GOMES, E.S.; ARAÚJO, K.; ALBUQUERQUE, J.; MELO, F.; SEVILHA, M.A.; BRASILEIRO, D.; BARRETO, M.I.; LEAL-NETO, O.B.;

- BARBOSA, V.; CORREIA, W; GUIMARÃES, R.J.P.S. Epidemiologia da esquistossomose no Litoral de Pernambuco. **Revista de Patologia Tropical**. v. 43, n. 4, p. 436-445, 2014.
9. BARRETO, A. V. M. S.; MELO, N. D.; VENTURA, J. V. T.; SANTIAGO, R. T.; SILVA, M. B. A. Analysis of Schistosomiasis mansoni positivity in endemic health regions in the State of Pernambuco, Brazil, 2005-2010*. *Epidemiologia e Serviço em Saúde*. v. 24, n.1, p. 87-96, 2015.
 10. BING, D. H.; WEYLAND, J. G. M. AND STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 124(4):1166-1170, 1967.
 11. BRASIL. Plantas Mediciniais e Fitoterapia na Atenção Básica. Ministério da Saúde; 2012. Disponível em http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/miolo_CAP_31.pdf. Acessado em 05/07/2020.
 12. BUENO, Ariele Cardoso; PIOVEZAN, Marcel. Bioensaio toxicológico utilizando Artemia salina: fatores envolvidos em sua eficácia. Instituto Federal de Santa Catarina, 2015.
 13. BUKANTZ C.S.C., REIN L.C.C.R., KENT J.F. Studies in complement ® fixation. II. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. **J. Lab. Clin. Med.**, 31: 349-399, 1946.
 14. BURIĆ, P.; JAKŠIĆ, Ž.; ŠTAJNER, L.; SIKIRIĆ, M.D.; JURAŠIN, D.; CASCIO, C.; CALZOLAI, L.; LYONS, D.M. Effect of silver nanoparticles on Mediterranean Sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure. *Marine Environmental Research*. v. 111, p. 50–59, 2015.
 15. CAGLIARI, R.; KREMER, F.S.; PINTO, L.D.S. *Bauhinia* lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 119, p. 811-820, 2018.
 16. COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.
 17. COELHO, P.M.Z., CALDEIRA, R.L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 5, p. 1-6. 2016.
 18. COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**. v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
 19. CORREIA M.T.S., COELHO L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol** 55: 261-273, 1995.
 20. DAI L, WANG W, DONG X, HU R, NAN X. Molluscicidal activity of cardiac glycosides from *Nerium indicum* against *Pomacea canaliculata* and its implications for the mechanisms of toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011 Sep;32(2):226-32. doi: 10.1016/j.etap.2011.05.007. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21843803.
 21. DA SILVA FILHO, Carlos RM et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 919-923, 2009.
 22. DE ARAÚJO, FLÁVIA FABIANNY BARBOSA. Preparações Contendo Lectinas de Sementes de *Cratylia mollis*: Atividade sobre *Biomphalaria glabrata* e *Artemia salina*. 2003. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.
 23. GRAZEFFE, V.S.; TALLARICO, L.F.; PINHEIRO, A.S.; KAWANO, T.; SUZUKI, M.F.; OKAZAKI, K.; PEREIRA, C.A.; NAKANO, E. Establishment of the comet assay in the

- freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**. v. 654, n.1, p. 58-63, 2008.
24. JAQUELINE L Matos, et al. Atividades moluscicida e cercaricida da curcumina sobre cercárias de *Biomphalaria glabrata* e *Schistosoma mansoni*. **Society of Chemical Industry**. 2019
 25. KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. *Malacologia*. V. 34, 25–32. 1992.
 26. KOVÁCS, R.; CSENKI, Z.; BAKOS, K.; URBÁNYI, B.; HORVÁTH, Á.; GARAJVRHOVAC, V.; GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; NEGREIRA, N.; ALDA, M. L.; BARCELÓ, D.; HEATH, E.; KOSJEK, T.; ŽEGURA, B.; NOVAK, M.; ZAJC, I.; BAEBLER, Š.; ROTTER, A.; RAMŠAK, Ž.; FILIPIČ, M. Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5- fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. *Water Research*. v. 77, p. 201-212. 2015.
 27. LAMMER, E.; CARR, G.J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J.M.; BELANGER, S.E.; BRAUNBECK, Th. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v. 149, p. 196-209, 2009.
 28. LEUSCH, F. D. L.; KHAN, S. J.; LAINGAM, S.; PROCHAZKA, E.; FROSCIO, S.; TRINH, T.; CHAPMAN, H. F.; HUMPAGE, A. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Research*. v. 49, p. 300-315, 2014.
 29. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.
 30. MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 146, n.00, p. 486-498, 2007.
 31. MIYASATO, P.A.; KAWANO, T.; FREITAS, J.C.; BERLINCK, R.G.S.; NAKANO, E.; TALLARICO, L.F. Molluscicidal activity of some marine substances against the snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae). *Parasitology Research*. v. 110, p. 1873–1879. 2012.
 32. NWORIE, K.M.; OKORIE, N.A. Phytochemicals distribution and antioxidant potential of *Bauhinia monandra* (Linn.) leaves extract. **Research Journal of Medicinal Plants**. v. 12, n. 2, p. 78-83, 2018.
 33. OECD, 2013. Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. **Organization for Economic Cooperation and Development OECD**. Paris.
 34. OLIVEIRA, W.F.; SANTOS, N.R.M.; CABRERA, M.P.; FERREIRA, S.A.O.; RAPOSO, B.L.; NAPOLEAO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; CABRAL FILHO, P.E.; FONTES, A.; CORREIA, M.T.S. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cell. **Methods and Applications in Fluorescence**. v. 1, p. 1-13, 2020.

35. OLIVEIRA-FILHO, E.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 46, p. 342-350, 2000.
36. PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Programa de Enfrentamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco SANAR – 2011/2014/. **Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde** – Recife. 2ª Edição. 44 p. 2014.
37. RAMOS, S.A.F.; SILVA, L.C.N.; CORREIA, M.T.S.; ARAÚJO, J. M.; COELHO, L.C.B.B. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. **African Journal of Microbiology Research**. v. 10, p. 600-607, 2016.
38. ROCHA-FILHO, C.A.A.; ALBUQUERQUE, L.P.; SILVA, L.R.S.; SILVA, P.C.B.; COELHO, L.C.C.B.; NAVARRO, D.M.A.F.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; MELO, A.M.M.A.; NAPOLEÃO, T.H.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P.M.G. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**. v. 132, p. 188-192, 2015.
39. SCHOLTE, R.C.G.; CARVALHO, O.S.; MALONE, J.B.; Utzinger, J.; Vounatsou, P. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**. v. 6, n.3 p. 95-101, 2012.
40. SILVA, H.A.M.F.; SÁ, J.L.F.; SIQUEIRA, W.N.; LIMA, M.V.; MARTINS, M.C.B.; AIRES, A.L.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; FALCÃO, E.P.D.S.; BURIL, M.L.L.; PEREIRA, E.C.; MELO, A.M.M.A.; SILVA, N.H. Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Tropica**. v. 196, p. 172-179, 2019.
41. SIQUEIRA, W.N.; FRANÇA, E.J.; PEREIRA, D.R.; LIMA, M.V.; SILVA, H.A.M.F.; ARAÚJO, H.D.A.; SÁ, J.L.F.; MELO, A.M.M.A. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere**. v. 249, 2020.
42. SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, n.1, p. 184-191, 1988.
43. TALLARICO, L.F.; BORRELY, S.I.; HAMADA, N.; GRAZEFTE, V.S.; OHLWEILER, F.P.; OKAZAKI, K.; GRANATELLI, A.T.; PEREIRA, I.W.; PEREIRA, C.A.B.; NAKANO, E. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v. 110, p. 208–215, 2014.
44. VIEIRA, L. R.; GUSMAN, G. S.; VESTENA, S. Avaliação da atividade moluscicida de extratos vegetais sobre *Achatina fulica* Bowdich (Mollusca, Achatinidae). **Arquivo Instituto Biologia**. v. 83, p. 1-6, 2016.
45. WANG, W.; LI, M.; WANG, L.; CHEN, H.; LIU, Z.; JIA, Z.; QIU, L.; SONG, L. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 67, p. 221-228, 2017.
46. WHO. Schistosomiasis. Fact Sheet Detail. <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/schistosomiasis>. **World Health Organization**. Acesso no dia 09 de junho de 2020.

47. WHO. 2017. Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers. **World Health Organization**. Geneva: WHO/HTM/NTD/PCT/2017.02, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
48. WHO. World Health Organization. Molluscicide screening and evaluation. **World Health Organization**. v. 33, p. 567-581, 1965.
49. XIAO Shen et al. Molluscicidal activity of *Solidago canadensis* L. extracts on the snail *Pomacea canaliculata* Lam. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. V. 149, P. 104-112. 2018.

5 CONCLUSÕES

BmoLL purificada em gel de guar foi altamente imunogênica, induzindo o desenvolvimento de IgG anti-BmoLL no soro de coelho. O ensaio de rendimento de imobilização foi eficaz para detectar IgG anti-BmoLL imobilizado na superfície do eletrodo; a concentração de 0,11 mg/mL foi mais estável após as etapas de lavagem. O imunossensor eletroquímico baseado no IgG anti-BmoLL foi sensível a revelar as alterações ocorridas em diferentes concentrações de BmoLL após interagir com o IgG anti-BmoLL. O sistema foi específico para reconhecer BmoLL, não mostrando nenhuma interação significativa entre IgG anti-BmoLL e Con A.

A confecção de matriz na purificação de lectinas, que se ligam em especial a galactose, mostrou-se eficiente na purificação da BmoLL em quantidades de miligramas e de baixo custo e fácil aquisição. Sementes que tenham galactomananas, em especial as leguminosas, com quantidades elevadas de galactose em suas ramificações, podem ser usadas na fabricação de novas matrizes para cromatografia de afinidade. A BmoLL mostrou citotoxicidade frente às linhagens de células J774A.1 e S-180 nas concentrações de 17,5 µg /mL reduzindo a sua viabilidade celular no tempo de 24 h em aproximadamente 50%.

Os efeitos tóxicos do extrato salino da *B. monandra* sobre embriões em estágio de blástula do molusco *B. glabrata* foram bastante satisfatórios ao reduzir a viabilidade em 100% em uma concentração mínima de 200 µg/mL. O extrato também foi eficiente no combate aos caramujos adultos de forma gradativa tendo seu pico de efeito ao final de 4 dias, e reduzindo em 50% a fecundidade dos caramujos adultos. Porém quando avaliado sobre *A. salina*, o extrato mostrou-se tóxico. Portanto, o extrato salino de *B. monandra* poderá ser utilizado como alternativa no controle populacional do vetor em áreas com alta prevalência, sendo uma alternativa de baixo custo em regiões endêmicas.

REFERÊNCIAS

- ABID, S. A. et al. Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. **Life sciences**, v. 273, p. 1-6, 2021.
- ABREU, D. S. et al. SAM of Gliotoxin on Gold: A Natural Product Platform for Sugar Recognition based on the Immobilization of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr). **Electrochimica Acta**, v. 241, p. 116–123, 2017.
- AKERELE, O. Summary of WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p. 13-19, 1993.
- ALBUQUERQUE, L.P. et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**. v. 138, p. 23-27, 2014.
- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 30, p.1-10, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 276-278, 2007.
- ALVES, M. C. S. et al. Superação da dormência em sementes de *Bauhinia monandra* Kurz e *B. unguolata* L. - Caesalpinioideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 139-144, 2000
- ALVES, V.A.; BRETT, C.M.A. Characterisation of passive films formed on mild steels in bicarbonate solution by EIS. **Electrochimica Acta**, v. 47, p. 2081, 2002.
- AMOROZO, M.C.M. Pluralistic medical settings and medicinal plant use in rural communities, **Journal of Ethnobiology**. v. 24, p. 139-161, 2004.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Laverger, **Acta Botanica Brasilica** v. 16, p. 189-203, 2002.
- ANDJELKOVIĆ, U., GIACOMETTI, J., & JOSIĆ, D. Protein and peptide separations. **Liquid Chromatography**, p. 107–157, 2017.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 517–523, 2011.
- ANOSIKE, C.A.; OBIDOA, O.; EZEANYIKA, L.U.S. The antiinflammatory activity of garden egg (*Solanum aethiopicum*) on egg albumin-induced oedema and granuloma tissue formation in rats. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v. 5, p. 62-66, 2012.

ARAÚJO, H.D.A. et al. Toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**. v. 179, p. 39-43, 2019.

ARGOLO, A.C.C. et al. Extrato etanolado de *Bauhinia monandra* aumenta a secreção de insulina em ratos submetidos à desnutrição intrauterina. **International Journal of Biochemistry Research & Review**, v. 9, n. IV, p. 1-9, 2016.

ARGOLO, A.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004.

ASHFORD, D., ALLEN, A.K., NEUBERGER, A., The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. **Journal Biochemical.**, v. 201, p. 641-645. 1982.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; SILVA, F.M.; RESSEL, L.B. Plantas medicinais: O saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery – Escola de Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.

BADR, H. A. et al. Lectin approaches for glycoproteomics in FDA-approved cancer biomarkers. **Expert Review of Proteomics**, v. 11, p. 2, 27–236, 2014.

BENJAMINI E, SUNSHINE G, LESKOWITZ S. **Immunology: A Short Course**. 3rd ed. New York: Wiley-Liss, Inc. 1996.

BETTAZZI, F. Biosensors and Related Bioanalytical Tools. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 77, p. 1–33, 2017.

BORGES, F.I.; MENDONÇA, M.S. Morfo-anatomia da semente de *Bauhinia monandra* Kurz. (Leguminosae-caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 24- 32, 2009.

BUNN-MORENO M. M.; CAMPOS-NETO A. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **The Journal of Immunology**, v. 127, n. 2, p. 427-9, 1981.

BUTLE, A. B. et al. Immunostimulatory and anti-allergic potential of novel heterotrimeric lectin from seeds of *Zizyphus mauritiana* Lam, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, p.389-397, 2021.

CABRAL JMS, AIRES-BARROS MR, GAMA M. “**Engenharia Enzimática**”. Lidel-Edições Técnicas, Portugal, 2003.

CAGLIARI, R.; KREMER, F.S.; PINTO, L.D.S. *Bauhinia* lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 119, p. 811-820, 2018.

CAVADA, B. S. et al. A review of Viciae lectins studies: End of the book or a story in the writing? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 1104-1123, 2021.

CESEWSKI, E.; JOHNSON, B.N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 1, n. 159, 2020.

CHEN, M. et al. Molecular characterization and expression analysis of galectins in Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) in response to *Vibrio harveyi* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 347–354, 2019.

CHEN, P. K. et al. The lectin *Oryzata* induces phosphatase-mediated and carbohydrate-independent aggregation of insect cells, **Journal insect physiology**, v. 131, 2021.

CLARKE, W.; D’ORAZIO, P. **Electrochemistry**. Contemporary Practice in Clinical Chemistry, 2020.

CLEMENT, F.; PRAMOD, S. N.; VENKATESH, Y. P. Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (*Allium sativum*) with the major garlic lectins or agglutinins. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 316–324, 2010.

COELHO, L. C. B. B. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological / pharmacological and therapeutic application. **Journal of Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2017, p. 21-22, 2017.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.

COELHO, P.M.Z., CALDEIRA, R.L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 5, p. 1-6. 2016.

CORIOLOANO, M. C. et al. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 198-205, 2020.

CUMMINGS, R.D.; ETZLER, M.E. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. *In*: VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. Second edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

CURIE J., CURIE P. Development par pression de l'electricite polarise dans les cristaux hemiedries et fares inclines. **Comp. Rend.**, v. 91, p. 294–297, 1880.

DARCY, E. et al. Purification of Antibodies Using Affinity Chromatography. *In: WALLS D., LOUGHRAN, S. Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2017.*

DASSAA, A. et al. Electrochemical degradation of disperse blue 56 from aqueous solution using aluminum electrodes. **Materials Today: Proceedings**, v. 37, p. 3803-3807, 2020.

DELAHAUT. P. Immunisation – Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. **Methods**. v.1, n. 116, p. 4–11, 2017.

DOLAI S. E. M. TABIB-AZAR, "433 MHz Lithium Niobate Microbalance Whole Zika Virus Sensor With 370 Hz / ng Sensitivity," *em IEEE Sensors Journal*, vol. 20, n. 8, p. 4269-4274, 2020.

ELLIOTT, L. et al. HAGE, Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years, **Journal of Chromatography**, v. B, 2020.

EL-MARADNY, Y. A. Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 239-258, 2021.

ENGLER, A. Syllabus der pflanzenfamiliem. **Gebrüder Borntraeger**, v. 2, p. 49, 1964.

FALKOWSKI, P.; LUKASZEWSKI, Z.; GORODKIEWICZ, E. Potential of Surface Plasmon Resonance Biosensors in cancer detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2020.

FELGUEIRAS, H. P. et al. Competitive adsorption of plasma proteins using a quartz crystal microbalance. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 8, p. 13207–13217, 2016.

FERNANDES, A. J. et al. Immunoassay and amperometric biosensor approaches for the detection of deltamethrin in seawater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 23, p. 5923–5930, 2018.

Fornstedt, T. et al. **Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution**, **Anal. Sep. Sci.** v. 2, p. 1-22, 2015.

GABIUS, H. -J. AND GABIUS, S. Lectins and Glycobiology, 1st ed., **Springer-Verlag**, Berlin, Heidelberg, Germany, 1993.

GAJDOS, L. et al. Visualization of hydrogen atoms in a perdeuterated, lectin-fucose complex reveals key details of protein-carbohydrate interactions. **Structure**, v. 29, p. 1-11, 2021.

GAUTAM, A. K. et al. Legume lectins: Potential use as diagnostics and therapeutics against the Cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, 2019.

GIL, R.L et al. Potentiometric detection in liquid chromatographic systems: An overview. **Journal Chromatographic A**, v. 1602, p. 326-340, 2019.

HAGE, D.S. Affinity Chromatography: a review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 593-615, 1999.

HAMILTON, A.C. **Medicinal plants**, conservation and livelihoods. Biodiversity and Conservation, v. 13, p. 1477-1517, 2004.

HANLY, W. C.; ARTWOHL, J. E.; BENNETT, B. T. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry, **ILAR Journal**, v. 37, n. 3, p. 93-118, 1995.

HAYER, N.J. Desenvolvimento, purificação e caracterização de IgG anti-lectina de folha de Bauhinia monandra. **Tese (Doutorado - Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.**

HOMAR, J.C. Medicinas complementarias ou alternativas? Un dilema para el sistema público. **Atención Primaria**, v. 35, p. 389-391, 2005.

IHUOMA, O. et al. Evaluation of haemagglutination potentials of lectin isolated from ordeal tree (*Erythrophleum suaveolens*) stem bark, **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 4, p. 869–875, 2013.

ISERHARD, A.R.M. et al. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. Escola Anna Nery – **Escola de Enfermagem**, v. 13, n. 1, p. 116-22, 2009.

JARDIM, W. F. Measurement and interpretation of redox potential values (EH) in environmental matrices. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1233-1235, 2014.

JIANG, B. et al. Isolamento, Purificação e Caracterização de Duas Etapas de Lectina de Sementes de Feijão Zihua Snap (*Phaseolus vulgaris*). **Polímeros**, v. 11, n. 5, p. 785, 2019.

KADAKERI, S. et al. Protein synthesis and characterization. **Artificial Protein and Peptide Nanofibers**, p. 121–161, 2020.

KALADAS, P. M., GOLDBERG R., PORETZ, R.D., Rabbit anti-carbohydrate antibody elicited by the lymphocyte mitogenic glycoprotein from *Wistaria floribunda* seeds, **Molecular Immunology**, v. 20, n. 7, p. 727-735, 1983.

KAUSHIK, A. et al. Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. **Trends in Biotechnology**, 2018.

KEAY, R.W.J. Trees of Nigeria. Clarendon Press Oxford. **Nordic Journal of Botany**, v. 11, n. 3, p: 74-78, 1989.

KHURTSIDZE, E. et al. Galactose-binding lectin from mulberry (*Morus alba* L.) seeds with growth hormone-like activity. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 26–30, 2017.

KIM, K.; CHOI, G.; KIM, K. Determination of equilibrium state and Sn redox ratio in aluminoborosilicate glass melts by potentiometry and voltammetry. **Electrochemistry Communications**, v.109, 2019.

KORKISCH, J. **Modern methods for the separation of rarer metal ions**. Pergamon Press, 2013.

KUMAR, S. et al. Isolation and characterization of antifungal lectin from seeds of *Cassia auriculata* Linn, **International Journal of Biological Macromolecules**,3, 2017 53–60, 2017.

LACERDA, R. R. Isolamento, caracterização e atividade biológica da lectina de semente variedade Brasileira de feijão-lima (*Phaseolus lunatus* var. cascavel), 72f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LI, W. et al. Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interactions for the determination of glucose. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 11, p. 4203–4208, 2011.

LI, Y. Quantifying the efficiency of o-benzoquinones reaction with amino acids and related nucleophiles by cyclic voltammetry. **Food chemistry**, v. 317, 2020.

LIPMAN N. S., JACKSON L. R., TRUDEL L. J., Frances Weis-Garcia, Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources, **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p.258-268, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª ed. Nova Odessa, **Instituto Plantarum**, 2008.

LU, C.; CZANDERNA, A.; TOWNSHEND, A. Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances. *Journal Analytica Chimica Acta*, v. 199, p. 279, 1987

LUDWIG, A. K. H. Lectinology 4.0: Altering modular (ga) lectin display for functional analysis and biomedical applications. **General Subjects**. v. 1863, p. 935-940, 2019.

MACEDO, M.L.R. et al. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 146, n.00, p. 486-498, 2007.

MARTINS, E. R. et al. Plantasmedicinais, **Imprensa Universitária**, p. 220, Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 1995.

- MCCUNE, L.M.; JOHNS, T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. **Journal Ethnopharmacol**, v. 82, p. 197-205, 2002.
- MEHROTRA, P. et al. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p.153–159, 2016.
- MELO, C.M.L. et al. Healing activity induced by Cramoll1, four lectins in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 113-119, 2011.
- MIRANDA, H. Q. P. et al. Biosensores para diagnóstico de doenças causadas por vírus: uma revisão. **Hegemonia: Revista de Ciências Sociais**, [S. l.], n. 27, p. 22, 2019.
- MISHRA, A. et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, 2019.
- MO, H., WINTER, H. C. AND GOLDESTEIN, I. J. Purification and characterization of a Neu5Ac a 2–6-Gal b-1–4 Glc/GlcNac–specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623–10629, 2000.
- MOREIRA, R. A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v.47, n. 7, p. 1183-8, 1998.
- NIVETHA, R. et al. In silico analysis of carbohydrate-binding pockets in the lectin genes from various species of *Canavalia*, **Computational Biology and Chemistry**, v. 92, 107477, 2021.
- NWORIE, K. M.; OKORIE, N. A. Phytochemicals distribution and antioxidant potential of *Bauhinia monandra* (Linn.) leaves extract. **Research Journal of Medicinal Plants**. v. 12, n. 2, p. 78-83, 2018.
- OLIVEIRA W. F. et al. Titanium dioxide nanotubes functionalized with *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science Engineering C**, v. 90, p. 664-672, 2018.
- OLIVEIRA, W.F. et al. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobes for biological studies: application to red blood cell. **Methods and Applications in Fluorescence**. v. 1, p. 1-13, 2020.
- OLIVEIRA-FILHO, E.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 46, p. 342-350, 2000.
- OMAHÑA-SANZ, B. et al. An electrochemical method to rapidly assess the environmental risk of silver release from nanowire transparent conductive films. **NanoImpact**, v. 18, 2020.

PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PAIVA, P. M. G. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 982–989, 2011.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; PERNAMBUCO. **Secretaria Estadual de Saúde**. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Programa de Enfrentamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco SANAR – 2011/2014/. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde – Recife. 2ª Edição. 44 p.2014.

PIMENTEL, J. C. Caracterização das lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) e de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) através de sistemas potenciométricos e amperométricos. 106f. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

PUNDIR, C. S.; YADAV, N.; CHHILLAR, A. K. Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 211-225, 2019.

RATHNASAMY, S. K. et al. Air-assisted dispersive liquid phase microextraction coupled chromatography quantification for purification of therapeutic lectin from aloe vera – A potential COVID-19 immune booster, **Microchemical Journal**, v. 165, 2021.

RAWAT, A. Biosensor eletroquímico à base de nanopartículas de ouro altamente sensível para detecção de interações de anticorpos de antígeno. **Biociência Biotecnologia Research Communications**, v. 10, n. 1, p. 83-90, 2017.

RENGARAJ, S. et al. Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 50–58, 2018.

ROBARDS, KEVIN; RYAN, DANIELLE. **Princípios e prática dos métodos cromatográficos modernos**. Academic Press, 2021.

ROCHA-FILHO, C.A.A. et al. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**. v. 132, p. 188-192, 2015.

ROY, I.; SARDAR, M.; GUPTA, M.N. Exploiting unusual affinity of usual polysaccharides for nioseparation of enzymes on fluidized beds. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 27, p. 53-65, 2005.

SÁ, S. R et al. Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic *candida* species. **Talanta**, v. 220, 2020.

- SANTANA, G. M. S. et al. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56–60, 2012.
- SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, p 206-222, 1959.
- SCOPES, R. K. **Protein Purification, Principles and Practice**. 3rd ed. Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer-Verlag, Nova York, 1994.
- SESHAGIRIRAO, K., LEELAVATHI, C. AND SASIDHAR, V. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 370-372, 2005.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.
- SHIBATA H. et al. Immobilization of DNA on Quartz Crystal Microbalance Sensor Modified with Self-Assembled Monolayer of Thiol Derivative, **Journal of Oleo Science**, v. 69, n. 3, p. 271-276, 2020.
- SHU, J. et al. A new electrochemical method for simultaneous removal of Mn^{2+} and NH_4^{+} -N in wastewater with Cu plate as cathode. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, 2020.
- SILVA, H.A.M.F. et al. Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni cercariae*. **Acta Tropica**. v. 196, p. 172-179, 2019.
- SILVA, K.L; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, p. 449–454, 2002.
- SILVA, M. L. S. Lectin-based biosensors as analytical tools for clinical oncology. **Cancer Letters**, v. 436, p. 63–74, 2018.
- SILVA, M. C. C. et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds, **Process Biochem**. 47, p. 1049–1059, 2012.
- SILVA, P. M. S. et al. *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 171-177, 2016.
- SISENANDO, H.A.A.A.C. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 303-308, 2009.
- SORCI, M. et al. Purification of galacto-specific lectins by affinity membranes. **Desalination**, v. 199, p. 550-552, 2006.

SOUZA, S. R. et al. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate Polymers**, v.2, n.46, p. 191-193, 2001.

SOUZA, S. R. et al. Bauhinia Monandra Leaf Lectin (BmoLL) is Immunogenic: Electrochemical and Piezoelectric Biosensor Recognized Lectin/IgG Anti-BmoLL Interactions, **Recent Research Advances in Biology**, v. 9, p. 1-17, 2019.

SOUZA, S. R. et al. Charge transference detection through cyclic voltammograms in the interaction of *Cratylia mollis* seed lectin-carbohydrate inhibitor. **Biotechnology Journal International**. v.18, n. 3, p. 1-8, 2017.

SOUZA, S. R. et al. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 255–258, 2003.

STANTIČ, M. et al. Application of lectin immobilized on polyHIPE monoliths for bioprocess monitoring of glycosylated proteins, **Journal of Chromatography B**, v. 1174, 2021.

STEIN, D. R. Human polyclonal antibodies produced in transchromosomal cattle prevent lethal Zika virus infection and testicular atrophy in mice. **Antiviral Research**, v. 146, 164–173, 2017.

STOCK, N. K. et al. Development and characterization of polyclonal peptide antibodies for the detection of Yellow fever virus proteins. **The Journal of Virological Methods**, v. 222, p.110–116, 2015.

SUN, X. A novel oriented antibody immobilization based voltammetric immunosensor for allergenic activity detection of lectin in kidney bean by using AuNPs-PEI-MWCNTs modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 143, 2019.

TAKALOO, S.; ZAND, M. M. Wearable electrochemical flexible biosensors: With the focus on affinity biosensors, **Sensing and Bio-Sensing Research**. v. 32, p. 1-11, 2021.

TANG, Z et al. Contributing to liquid biopsy: Optical and electrochemical methods in cancer biomarker analysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 415, 2020.

TOMIYASU, J. Lectin histochemical studies on the olfactory gland and two types of glands in vomeronasal organ of the brown bear. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 6, p. 566–571, 2018.

VALE, N.B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368-80, 2002.

VAN DAMME, E.J.M.; Carbohydrate-protein Interactions: **Plant Lectins**. Comprehensive glycoscience—from chemistry to systems biology, p. 563–599, 2015.

VAN DAMME, E. J. M et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575–692, 1998.

VEIGA, J. B.; SIMÃO, NETO, M. Leucena na alimentação animal: recomendações básicas. **EMBRAPA Amazônia Oriental**, 1992, Belém, 4p.

VINCENT, J. V. B.; FRED, J. P. H. B. Health effects of wheat lectins: A review, **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 2, Pages 112-117, 2014.

VIEIRA, L. R.; GUSMAN, G. S.; VESTENA, S. Avaliação da atividade moluscicida de extratos vegetais sobre *Achatina fulica* Bowdich (Mollusca, Achatinidae). **Arquivo Instituto Biologia**. v. 83, p. 1-6, 2016.

WANG J. **Analytical electrochemistry**. Thirt edition. Wiley-VCH, A John Wiley & Sons, Publication, 2006.

WHO. **Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241511995>

WHO. **Schistosomiasis. Fact Sheet Detail**. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso no dia 09 de junho de 2020.

WHO. **The importance of Pharmacovigilance - Safety Monitoring of Medicinal Products**. Genev, 2002.

WILCHEK M., MIRON T., Thirty years of affinity chromatography, **Reactive and Functional Polymers**, v. 41, p. 263-268, 1999.

XIAOJIE, S. et al. Neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 spike protein. **Stem Cell Reports**, v. 50, p. 102-125, 2021.

ZHOU, Y. et al. A sensitive electrochemical method for indole based on the signal amplification strategy by gold/iron-oxide composite nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 1142, p. 56–64, 2021.

ZHU, X.; SHI, L. Electrochemistry. Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications, **Elsevier**, p. 209–236, 2019.

ANEXO A

Artigo de Pesquisa Publicado

Methods and Applications in Fluorescence

PAPER

Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells

To cite this article: Wesley F Oliveira *et al* 2020 *Methods Appl. Fluoresc.* **8** 035009

View the [article online](#) for updates and enhancements.



EDINBURGH
INSTRUMENTS

**EXPERTS IN MOLECULAR
SPECTROSCOPY**

Photoluminescence • Raman • UV-Vis • Transient Absorption



The advertisement features the Edinburgh Instruments logo on the left, which consists of a stylized circular pattern of dots. To the right of the logo, the text 'EDINBURGH INSTRUMENTS' is displayed. Below this, the main headline reads 'EXPERTS IN MOLECULAR SPECTROSCOPY' in a large, bold, red font. Underneath the headline, four scientific techniques are listed: 'Photoluminescence • Raman • UV-Vis • Transient Absorption'. On the right side of the advertisement, there is a photograph of a white and black Edinburgh Instruments microscope. The background of the advertisement is a gradient of red and white, with faint, stylized molecular or cellular structures visible.

Methods and Applications in Fluorescence



RECEIVED
27 February 2020

REVISED
15 May 2020

ACCEPTED FOR PUBLICATION
26 May 2020

PUBLISHED
12 June 2020

PAPER

Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells

Wesley F Oliveira^{1,2} , Natália R M Santos^{1,2} , Mariana P Cabrera² , Sílvia A O Ferreira¹ , Bruno L Raposo² , Thiago H Napoleão¹ , Patrícia M G Paiva¹ , Luana C B B Coelho¹ , Paulo E Cabral Filho² , Adriana Fontes^{2,3,4} and Maria T S Correia^{1,3,4}

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³ Adriana Fontes and Maria T S Correia jointly supervised this work.

⁴ Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: adriana.fontes@ufpe.br and mtscorreia@gmail.com

Keywords: nanoparticles, erythrocytes, glycobiology, fluorescence

Abstract

Carbohydrates perform important physiological functions in eukaryotic and prokaryotic cells. Indeed, alterations in glycan patterns may be associated with disorders. The analysis of these sugars can be reached using nanoprobe composed by lectins associated with fluorescent nanoparticles. This study reports the conjugation of a galactose-binding lectin (BmoLL) isolated from *Bauhinia monandra* leaves with quantum dots (QDs) by adsorption. QDs-BmoLL conjugates showed bright fluorescence and the hemagglutination assay revealed that the lectin preserved its carbohydrate-binding ability after the conjugation. To evaluate the efficiency/specificity of the bioconjugate, ABO human red blood cells (RBCs) were used as biological models and the labeling was analyzed by flow cytometry. Among ABO blood groups, higher labeling ($71.7 \pm 5.9\%$) was detected for B-type RBCs, whose antigens have galactose in their structure. The specificity of labeling was confirmed since A- and O-types RBCs incubated with QDs-BmoLL, as well as B-type cells incubated with previously galactose-inhibited conjugates, were labeled below 6%. In AB-type RBCs, which simultaneously have B and A (*N*-acetylgalactosamine) antigens on their membrane, the labeling was *ca.* $14.1 \pm 4.8\%$. Therefore, a successful conjugation was reached and QDs-BmoLL conjugates can be considered promising fluorescent nanoprobe for biological investigations.

1. Introduction

Sugars are considered the third alphabet of life, in which the other two are formed by nucleotides and amino acids [1]. These carbohydrates can be found in nature in the form of polysaccharides or glycoconjugates present on the surface of pro- and eukaryotic cells. The glycobiology studies the interaction of these molecules with others as well as their participation in biological processes [2]. Glycans perform different biological functions, from structural to modulatory roles, which involve nutrient storage and sequestration, cell differentiation, proliferation, and adhesion, among others [3].

In order to understand the numerous biological processes involving glycans, the study of these

molecules can be performed using proteins named lectins, which specifically recognize and bind to carbohydrates. Lectin binding to its target sugar can be revealed by using fluorescent semiconductor nanoparticles such as the quantum dots (QDs) [4]. In the biomedical field, QDs have numerous advantages over conventional organic fluorophores: for example, QDs have a narrow fluorescence emission tuned by their size, broad absorption spectra, high resistance to photobleaching, and an active surface for functionalization with biomolecules or even other nanoparticles [5].

Different lectins have been conjugated to QDs to render fluorescent nanoprobe that have been successfully applied in glycobiological investigations. Concanavalin A (Con A) and Cramoll lectins were

conjugated to QDs to study glucose/mannose profile in benign and malignant breast tissues [6, 7], and also in *Candida* cells [8, 9]. Conjugates based on *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA I) and QDs were prepared and applied for the investigation of H antigen in red blood cells (RBCs) [10]. Additionally, jacalin (a galactose-binding lectin) was effectively conjugated to QDs and recognized chronic myeloid leukemia K562 cells [11].

BmoLL is a galactose-specific lectin isolated from *Bauhinia monandra* leaf, a plant popularly known as pink bauhinia, orchid tree, and Napoleon's plume and called in Brazil as 'pata-de-vaca'. *B. monandra* has been used in folk medicine as an antidiabetic and antioxidant agent [12–14]. BmoLL is a heterodimer composed of a glycosylated polypeptide chain of 33 kDa and a non-glycosylated polypeptide of 26 kDa [12]. Insecticidal, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of BmoLL have been reported [15, 16] and this lectin was not toxic to mice when orally administered at a dose of 2000 mg kg⁻¹ [17]. BmoLL was also employed in a biosensor to differentiate dengue serotypes [18]. Additionally, the possibility of using BmoLL in drug delivery systems has encouraged researchers to incorporate this lectin into nanoparticles based on a core of polyester and a shell with polysaccharide [19] as well as on the surface of liposomes [20].

To join the advantages of the valuable properties of BmoLL and QDs in a single nanoplatform, the aim of this study was to conjugate this lectin with water-dispersed carboxyl coated cadmium telluride (CdTe) QDs by a simple and efficient strategy. Additionally, the specificity of the QDs-BmoLL conjugates was investigated by using the ABO blood group from human RBCs as a biological model. We believe that this novel fluorescent nanoprobe has the potential to be applied in a variety of glycobiology studies, in which the galactose carbohydrate is involved.

2. Experimental procedures

2.1. Purification of BmoLL

Leaves of *B. monandra* were collected at the campus of the Federal University of Pernambuco at Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil. Then, the leaves were washed, dried, and ground to obtain the flour. An extract was prepared by mixing the flour (in a proportion of 10%, w/v) with 10 mM citrate-phosphate buffer (CPB) at pH 6.5 containing 0.15 M NaCl, for 12 h at 4 °C using a magnetic stirrer. This extract was filtered, washed, and treated with ammonium sulfate at 60% saturation for 4 h at room temperature (RT, approximately 25 °C). After centrifugation (12,000 × g for 15 min), the precipitated fraction (F 0%–60%) was resuspended with CPB and dialyzed against distilled water (1 h) and CPB (3 h). BmoLL was purified through affinity chromatography by loading the dialyzed F 0%–60% sample onto the guar gel

column. The elution of BmoLL was performed with 30 mM galactose followed by dialysis against distilled water for 2 h and then against CPB for another 2 h [12].

2.2. Synthesis of MSA-CdTe QDs

The synthesis of water-dispersed cadmium telluride (CdTe) nanocrystals, stabilized, and functionalized with mercaptosuccinic acid (MSA), was performed according to previously reported procedure [21]. Initially, an aqueous solution containing cadmium chloride (CdCl₂—0.5 mmol) and MSA (0.6 mmol) at pH > 10 was prepared. In a second step, metallic tellurium (Te⁰—0.1 mmol) was reduced to Te²⁻ using sodium borohydride (NaBH₄—3 mmol) at pH > 10 using NaOH (2 M), under an inert N₂ atmosphere. Then, the reduced tellurium (Te²⁻) was added to the MSA/Cd²⁺ solution and the reaction remained for approximately 6:30 h under constant stirring and heating at 90 °C to obtain QDs emitting in the orange spectral region. The molar ratio used in the synthesis was 5:1:6 (Cd:Te:MSA).

2.3. Conjugation of QDs with BmoLL

QDs were conjugated to BmoLL by the adsorption strategy. Based on the methodology previously described by our group to conjugate Con A to MSA-CdTe QDs [6], we decided to evaluate the bioconjugation of BmoLL to these nanocrystals at pH 7.0 and 8.0. BmoLL bioconjugates at pH 7.0 formed precipitates after a certain time of conjugation, while those obtained at pH 8.0 remained stable. Therefore, this was selected as the ideal condition for our study. Firstly, an aliquot of the suspension of QDs (5.5 μM) had the pH adjusted to 8.0 using MSA (4.9% w/v). After that, QDs were mixed with BmoLL to reach a final lectin concentration of 280 μg ml⁻¹. QDs-BmoLL conjugates were kept under stirring for 2 h at RT. Then, QDs-BmoLL conjugates were stored at 4 °C during at least one week before using it. To remove residues from the synthesis of QDs, conjugates were washed using ultracentrifuge filters (10 kDa MWCO—GE Healthcare) in four centrifugation cycles (908 × g for 6 min) and resuspended in ultrapure water.

2.4. Characterization of QDs and conjugates

QDs and QDs-BmoLL conjugates were optically characterized by absorption and emission spectroscopies using UV–vis 1800 spectrophotometer (Shimadzu) and LS55 fluorometer (PerkinElmer), respectively. Emission spectra were acquired at 488 nm excitation wavelength. The size of the CdTe QDs was obtained by applying Dagepe's equation [22]. The concentration of QDs was determined using the molar extinction coefficient for CdTe QDs, proposed by Yu *et al* (2003) [23], and the Beer–Lambert law.

The bioactivity of QDs-BmoLL conjugates was confirmed by the hemagglutinating activity (HA) assay following the methodology performed by Correia and Coelho (1995) [24]. For this purpose, bare QDs, free lectin, and conjugates (QDs-BmoLL) were serially diluted in 96-well microplates and incubated with glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes suspension in NaCl (0.15 M) for 45 min, at RT. The HA was expressed in hemagglutinating units (HU), i.e., the inverse of the highest dilution capable of promoting hemagglutination.

2.5. Labeling of RBCs by QDs-BmoLL conjugates

To evaluate the labeling capability, efficiency, and specificity of QDs-BmoLL conjugates, RBCs of A-, B-, AB-, and O-types, collected from at least two different healthy donors for each blood type (Ethical Committees approvals: 3.167.603—HEMOPE and 3.061.165—UFPE), were used as biological models since B antigens present galactose in their structure. Moreover, A- and O-type RBCs do not have exposed galactose on their membrane, and AB-type RBCs have both galactose and *N*-acetylgalactosamine. The peripheral blood was collected in EDTA tubes and centrifuged at $1183 \times g$ for 5 min. Next, the pellet was further washed three times with NaCl (0.9% w/v) at $775 \times g$ for 2 min. Then, suspensions containing RBCs at 1% (v/v) in saline were prepared. RBCs were then incubated with QDs-BmoLL at a ratio of 1:1 (v/v) for 1 h under stirring at RT. Afterward, for removal of residual QDs-BmoLL, the suspensions were centrifuged at $775 \times g$ for 30 s, and the pellet was resuspended in 0.9% NaCl. To evaluate cell labeling, the analysis was performed in the flow cytometer Accuri™ C6 (BD Biosciences). A total of 20,000 events were acquired at 488 nm excitation and the fluorescence was detected with the bandpass (BP) filter FL2 585/40 nm. Results were indicated as average \pm standard deviation. In order to ensure the specificity of the bioconjugate in the labeling of the B-type group, an assay inhibiting the carbohydrate recognition domain of BmoLL in the nanosystem was performed. For this, conjugates were incubated for 30 min with a 0.2 M galactose solution before being added to the suspension of RBCs. All the experiments were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Optical properties

QDs presented a first absorption maximum at 581 nm, an average diameter of 3.3 nm, and a concentration of ca. 5.5 μ M. The conjugates showed a similar absorption profile as shown in figure 1(A).

QDs and QDs-BmoLL conjugates emission spectra showed a maximum emission peak at 617 and 612 nm, respectively as depicted in figure 1(B). The full width at half maximum (FWHM) was 51.5 nm for QDs and 54.7 nm for QDs-BmoLL. Additionally, after

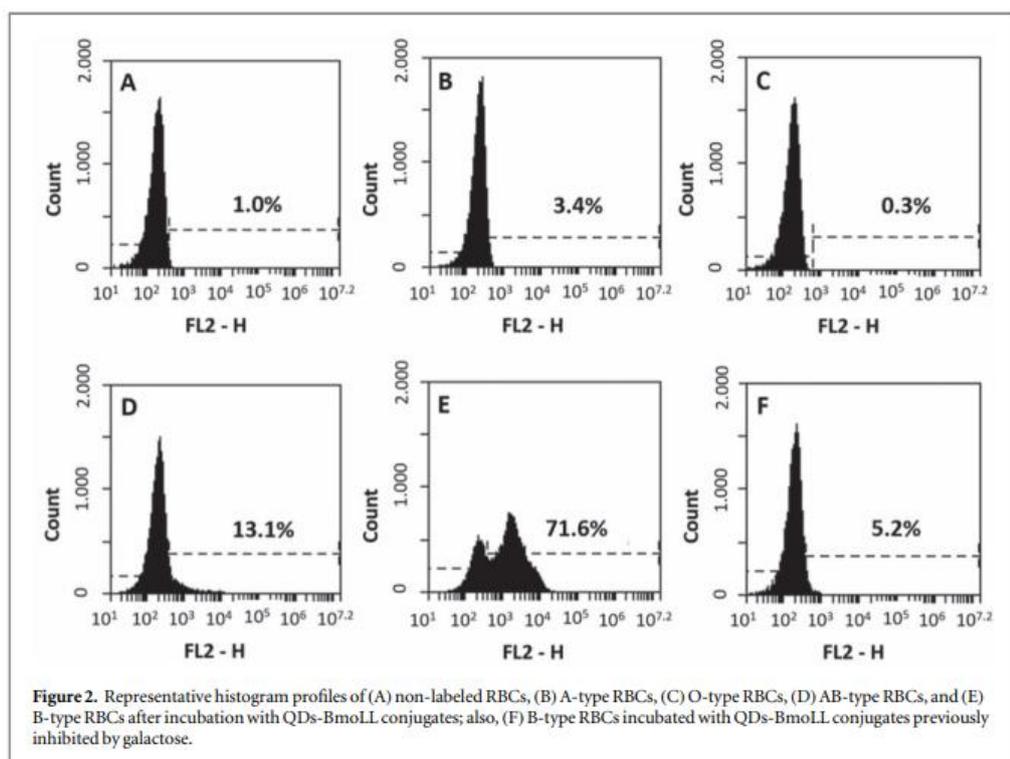
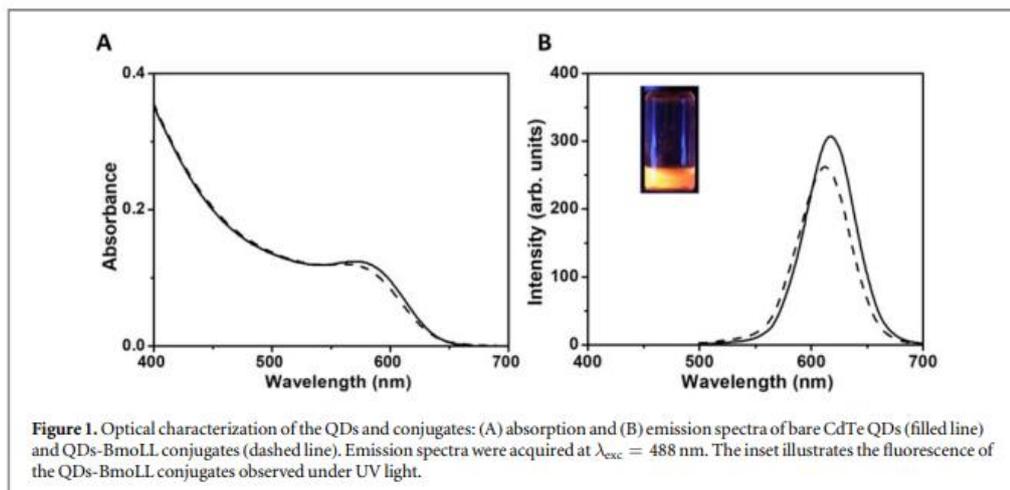
lectin conjugation, a small blue shift of 5 nm in the emission peak was observed, which can indicate modifications on the QDs surface that came from the conjugation process. This same behavior has been observed in other studies, in which this small blue shift was also reported: for example, after the conjugation of Cramoll lectin to CdTe QDs [7], or when anti-A or anti-B antibodies were conjugated to CdTe QDs [10]. A small reduction in the emission intensity was observed after conjugation (figure 1(B)) but QDs-BmoLL conjugates remained highly fluorescent, as also shown in the inset of figure 1(B).

3.2. Hemagglutinating activity

The biological properties of proteins may change after their bioconjugation to QDs. Thus, it is important to evaluate the lectin bioactivity after conjugation to guarantee a successful application of the conjugates. The BmoLL bioactivity after interaction with QDs was assessed by hemagglutination assay. Bare QDs did not exhibit HA, however, QDs-BmoLL bioconjugates had the same ability to agglutinate rabbit erythrocytes than the free lectin since both presented an HA of 1,024HU. This suggests that BmoLL preserved their carbohydrate recognition domains active after the binding to MSA-CdTe QDs. This same hemagglutinating performance was retained after conjugating QDs to other lectins, such as Con A [6] and Cramoll [25]. In addition, Coelho and Silva (2000) determined the carbohydrate binding specificity of BmoLL performing the inhibition assay of hemagglutination using different glycoproteins and sugars. Therefore, it was found that among the glycosides tested, the best inhibition was obtained by galactose and raffinose (a trisaccharide containing galactose, fructose, and glucose) [12].

3.3. Labeling of RBCs

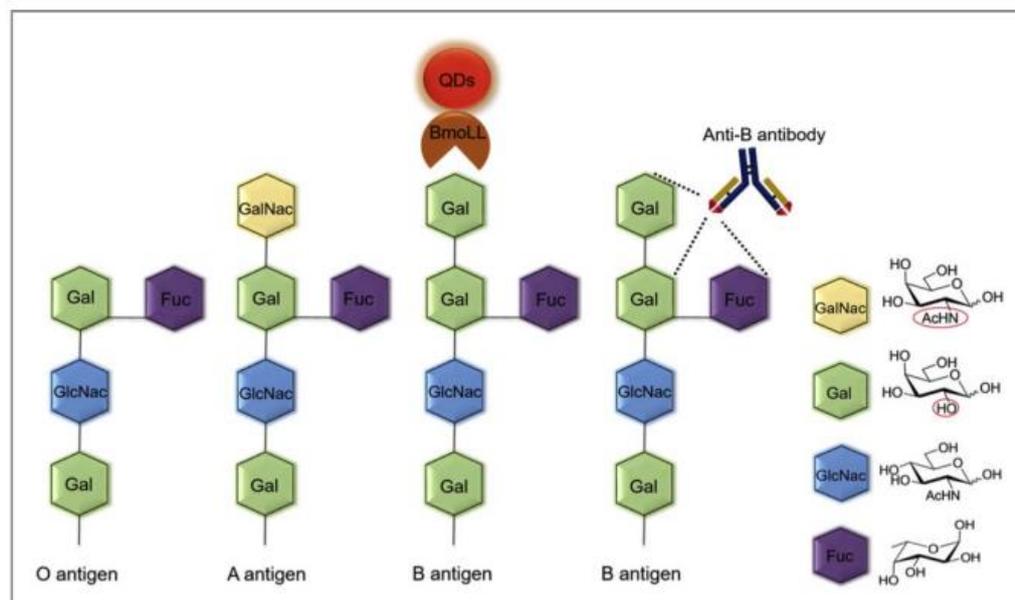
To investigate the efficiency and specificity of bioconjugates, the labeling of RBCs was performed. ABO blood groups are classified according to the types of sugar chains presented on RBC membranes [26]. These entire groups share an oligosaccharide in common called H antigen, which acts as a backbone carbohydrate chain that can receive the linkage of terminal monosaccharides depending on the inherited glycosyltransferase. A-type RBCs are produced by the addition of *N*-acetylgalactosamine (A antigen) in α -1,3 linkages to H antigen while in B-type RBCs there is the incorporation of galactose (B antigen) in α -1,3 linkage to H antigen. O-type RBCs do not have A and B glycosyltransferases and therefore do not have A and B antigens. On the other hand, AB cells have both antigens [27, 28]. Thus, we investigated the ability of QDs-BmoLL conjugates to bind especially to B-type RBCs, since these cells expose galactose on their surface.



Flow cytometry analysis results indicated a percentage of labeled cells of $3.1 \pm 0.5\%$ for A- and $0.30 \pm 0.04\%$ for O-type RBCs. These results can be visualized in figures 2(B) and (C), respectively. This inability of labeling was expected since these cells lack B antigen, which containing exposed galactose for BmoLL binding. A low percentage of labeling of $ca. 14.1 \pm 4.8\%$ was detected for AB-type RBCs (figure 2(D)), although they have both A and B antigens presented on the cell membrane. On the other hand, QDs-BmoLL conjugates labeled $71.7 \pm 5.9\%$ of B-type RBCs (figure 2(E)). Moreover, the bioconjugate presented colloidal stability and preserved its

labeling ability for at least 5 months after preparation ($ca. 70.8\%$ of B-type RBCs was labeled).

When the conjugates were previously incubated with galactose, the binding of the B-type RBCs declined to $5.8 \pm 1.0\%$, as shown in figure 2(F). These results demonstrated that BmoLL has been efficiently conjugated with QDs and the bioconjugates promoted specific and efficient labeling. Cagliari and colleagues (2018) reported, by hemagglutination assay, that *B. monandra* leaf lectin has specificity for human B-type cells over AB cells [29], corroborating our results. It is also interesting to mention that besides the maintenance of the fluorescent property of QDs, the



efficiency of the conjugate is also intrinsically related to the lectin. Coelho and Silva (2000) reported that BmoLL remained stable with activity at pHs from 4.5 to 9.0 and at temperatures below 50 °C [12]. Moreover, after incubating the erythrocytes with the QDs-BmoLL conjugate, the visual analysis did not show signs suggestive of hemolysis, presenting a supernatant translucent after centrifugation.

Our research group has previously reported a labeling >90% of both B- and AB-type RBCs by a conjugate consisted of anti-B monoclonal antibody and CdTe QDs [10]. We believe that the lower labeling obtained for AB-type RBCs with QDs-BmoLL conjugates may be due to differences in the molecular basis of the recognition of B antigen by the anti-B antibody and the lectin. Anti-B antibodies recognize B antigens by the epitope trisaccharide Gal-Fuc-Gal [30, 31], while the interaction of BmoLL occurs probably by the galactose terminal of this antigen, as schematized in figure 3 since this lectin has specificity by the galactose monosaccharide [12].

Other lectins had their specificity to galactose demonstrated by the ability to tightly agglutinate the B-type RBCs among the human erythrocytes tested, such as the lectin GS-I-B4 purified from *Griffonia simplicifolia* seeds [32] and that isolated from fruiting bodies of *Marasmius oreades* (MOA) [33]. Moreover, Sakakibara et al (1985) verified that the lectin extracted from eggs of sweetfish (*Plecoglossus altivelis*) had its hemagglutinating capacity specific to B-type RBCs, which was inhibited by monosaccharides with steric similarity at their C₂ and C₄ pyranose ring structure [34].

The lower labeling of AB-type RBCs can be associated with differences in the exposition of galactose and N-acetylgalactosamine residues on these cells. As

previously mentioned by Imberty and colleagues (1996) different kinds of forces are involved in the interaction of molecules such as antigen-antibodies recognitions, i. e., the same carbohydrate residue could display a steric hindrance to the recognition by one antibody but interact with a high degree with another [35]. As highlighted in red in figure 3, although these monosaccharides (galactose and N-acetylgalactosamine) have high structural similarity, they differ in the bonded group at C₂ [36].

It is noteworthy that, unlike BmoLL, some lectins have specificity not only to galactose but also to their homologous monosaccharides and can agglutinate all human RBCs types tested, such as the lectin isolated from mushroom *Psilocybe barrerae* [37], *Erythrina speciosa* seed lectin (SpecL) [38], *Artocarpus hypargyreu* lectin (AHL) [39] and the lectin purified from grub serum of rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) [40]. This specificity of QDs-BmoLL conjugates to label B-type RBCs happened since, except for the galactose, BmoLL recognizes no other monosaccharides [12]. Therefore, QDs-BmoLL labeling of B-type RBCs demonstrated the high specificity property of this lectin in comparison with other lectins capable of binding to this sugar that could also interact with other types of RBCs, which might not be so specific to some glycobiological studies.

4. Conclusions

BmoLL was efficiently conjugated with MSA-CdTe QDs at pH 8.0 and the lectin carbohydrate-binding ability was preserved after conjugation. QDs-BmoLL

conjugates were highly selective in labeling B-type RBCs once B antigen presents galactose in its structure. In addition, the inhibition assay showed a reduction in this labeling, corroborating the specificity of this new nanoprobe. Therefore, QDs-BmoLL conjugates can be considered an efficient fluorescent nanoplatform to study the expression of exposed galactose residues and their participation in the dynamics of various events, such as mechanisms of microbial pathogenicity, malignant differentiation of tumor cells in the process of tumorigenesis, and in hematological conditions.

Acknowledgments

The 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)' is recognized for fellowships (THN, PMGP, LCBBC, AF, and MTSC) and grants. This work was also supported by the 'Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)' and the 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)'. The National Institute of Photonics (INCT de Fotônica) is also acknowledged.

Conflict of interest

None declared.

ORCID iDs

Wesley F Oliveira  <https://orcid.org/0000-0002-6571-6216>
 Natália R M Santos  <https://orcid.org/0000-0001-9373-9899>
 Mariana P Cabrera  <https://orcid.org/0000-0001-9602-9403>
 Sílvio A O Ferreira  <https://orcid.org/0000-0002-4691-9544>
 Bruno L Raposo  <https://orcid.org/0000-0003-2107-9697>
 Thiago H Napoleão  <https://orcid.org/0000-0002-0065-2602>
 Patrícia M G Paiva  <https://orcid.org/0000-0003-3467-708X>
 Luana C B B Coelho  <https://orcid.org/0000-0002-1013-0023>
 Paulo E Cabral Filho  <https://orcid.org/0000-0002-1628-7769>
 Adriana Fontes  <https://orcid.org/0000-0003-4675-2163>
 Maria T S Correia  <https://orcid.org/0000-0003-4920-9975>

References

- [1] Roy R, Murphy P V and Gabius H 2016 Multivalent carbohydrate-lectin interactions: how synthetic chemistry enables insights into nanometric recognition *Molecules* **21** 629
- [2] Purcell S C and Godula K 2019 Synthetic glycoscapes: addressing the structural and functional complexity of the glycocalyx *Interface Focus* **9** 20180080
- [3] Varki A 2017 Biological roles of glycans *Glycobiology* **27** 3–49
- [4] Cunha C R A et al 2018 Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1862** 427–39
- [5] Pereira G et al 2019 (Bio)conjugation strategies applied to fluorescent semiconductor quantum dots *J. Braz. Chem. Soc.* **30** 2536–60
- [6] Andrade C G et al 2013 Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry *Int. J. Nanomedicine* **8** 4623–9
- [7] Carvalho M E T et al 2019 Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates *Int. J. Biol. Macromol.* **138** 302–8
- [8] Tenório D P L A et al 2015 CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida Albicans* *J. Photochem. Photobiol. B* **142** 237–43
- [9] Oliveira W F et al 2020 Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe *Microbiol. Res.* **230** 126330
- [10] Cabral Filho P E et al 2015 Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry *Int. J. Nanomedicine* **10** 4393–404
- [11] Behlol K, Ahmed A, Raja M R C and Mahapatra S K 2017 Interaction of cadmium sulfide quantum dots with jacalin for specific recognition of cancer cells *J. Lumin.* **182** 283–8
- [12] Coelho L C B B and Silva M B R 2000 Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra* *Phytochem. Anal.* **11** 295–300
- [13] Argolo A C C, Sant' Ana A E G, Pletsch M and Coelho L C B B 2004 Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia Monandra* *Bioresour. Technol.* **95** 229–33
- [14] Araújo-Melo R D O, Souza I F A C, Oliveira C V J, Araújo J M, Sena K X F R and Coelho L C B B 2017 Isolation and identification of endophyte microorganisms from *Bauhinia Monandra* leaves, mainly actinobacteria *Biotechnology Journal International* **17** 1–12
- [15] Macedo M L R, Freire M G M, Silva M B R and Coelho L C B B 2007 Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaflectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **146** (2007) 486–98
- [16] Campos J K L et al 2016 Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaflectin *Biochim Open* **2** 62–8
- [17] Araújo C S F et al 2019 Evaluation of Toxicity on Mice and Artemicidal Activity of *Bauhinia monandra* Leaf Lectin (BmoLL) ed A H A Elrefaei *Theory and Applications of Microbiology and Biotechnology* (London: Book Publisher International) vol 1, pp 43–52
- [18] Andrade C A S 2011 Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic-inorganic nanocomposite and *Bauhinia Monandra* lectin *J. Colloid Interface Sci.* **362** 517–23
- [19] Rodrigues J S, Santos-Magalhães N S, Coelho L C B B, Couvreur P, Ponchel G and Gref R 2003 Novel core (polyester)-shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins *J. Control. Release* **92** 103–12
- [20] Rosilio V, Boissonnade M-M, Coelho L C B B, Santos-Magalhães N S, Andrade A S and Baszkin A 2004 Interaction of *Bauhinia Monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **250** (2004) 491–7
- [21] Cabral Filho P E et al 2016 CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells *Biochim. Biophys. Acta* **1860** 28–35

- [22] Dagtepe P, Chikan V, Jasinski J and Leppert V J 2007 Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots *J. Phys. Chem. C* **111** 14977–83
- [23] Yu W W, Qu L, Guo W and Pen X 2003 Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals *Chem. Mater.* **15** 2854–60
- [24] Correia M T S and Coelho L C B B 1995 Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **55** 261–73
- [25] Cunha C R A et al 2018 Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **178** 85–91
- [26] Uno S et al 2018 Sensitive typing of reverse ABO blood groups with a waveguide-mode sensor *J. Biosci. Bioeng.* **126** 131–7
- [27] Makeneni S, Ji Y, Watson D C, Young N M and Woods R J 2014 Predicting the origins of anti-blood group antibody specificity: a case study of the ABO A- and B-antigens *Front. Immunol.* **5** 397
- [28] Choate J D 2018 ABO and Rh Blood Groups *Clinical Principles of Transfusion Medicine* ed R W Maitta 1st Edn (St. Louis, Missouri: Elsevier) pp 15–24
- [29] Cagliari R, Kremer F S and Pinto S 2018 *Bauhinia* lectins: Biochemical properties and biotechnological applications *Int. J. Biol. Macromol.* **119** 811–20
- [30] Korchagina E Y et al 2005 Design of the blood group AB glycotope *Glycoconj. J.* **22** 127–33
- [31] Alikhani A, Korchagina E Y, Chinarev A A, Bovin N V and Federspiel W J 2009 High molecular weight blood group A trisaccharide-polyacrylamide glycoconjugates as synthetic blood group A antigens for anti-A antibody removal devices *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **91** 845–54
- [32] Murphy L A and Goldstein I J 1977 Five α -D-Galactopyranosyl-binding *Bandeiraea Simplicifolia* seeds *J. Biol. Chem.* **252** 4739–42
- [33] Winter H C, Mostafapour K and Goldstein I J 2002 The mushroom *Marasmius Oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gal α 1,3Gal and Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity *J. Biol. Chem.* **277** 14996–5001
- [34] Sakakibara F, Kawauchi H and Takayanagi G 1985 Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (Ayu fish) eggs *Biochim. Biophys. Acta* **841** 103–11
- [35] Imberty A, Mollicone R, Mikros E, Carrupt P-A, Pérez S and Oriol R 1996 How do antibodies and lectins recognize histo-blood group antigens? A 3D-QSAR study by Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) *Bioorg. Med. Chem.* **4** 1979–88
- [36] Yazer M H, Olsson M L and Palcic M M 2006 The cis-AB blood group phenotype: fundamental lessons in glycobiology *Transfus. Med. Rev.* **20** 207–17
- [37] Hernandez E et al 1993 Purification and characterization of a galactose-specific lectin from *Psilocybe Barrerae* *Phytochemistry* **32** 1209–11
- [38] Konozy E H E, Bernardes E S, Rosa C, Faca V, Greene L J and Ward R J 2003 Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina Speciosa* Arch. *Biochem. Biophys.* **410** 222–9
- [39] Zeng Q, Lin F, Zeng L, Deng Y and Li L 2019 Purification and characterization of a novel immunomodulatory lectin from *Artocarpus hypargyreus* Hance *Int. Immunopharmacol.* **71** 285–94
- [40] Velayutham V, Shanmugavel S, Somu C and Sundaram J 2017 Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle *Oryctes Rhinoceros* *Process Biochemistry* **53** 232–44

ANEXO B

Pôster premiado no 20º Congressos da União Internacional da Biofísica Pura e Aplicada
IUPAB

IUPAB 20th IUPAB Congress

45th Annual SBBF Meeting

50th Annual SBBq Meeting

13th Annual SBBN Congress

2021

Certificate

We hereby certify that the abstract entitled

TOXICITY EVALUATION OF *Bauhinia monandra* EXTRACT CONTAINING PHYTOCHEMICALS AND LEAF LECTIN (BmoLL) ON EMBRYOS OF *Biomphalaria glabrata* (CB-013)

Aguilar, T.W.A.1, Ferreira, S.A.O.2, Freitas, K.H.1, Santos, L.S.1, Ferreira, M.R.A.3, Soares, L.A.L.3, Melo, A.M.M.A.4, Albuquerque, M.C.P.A.5, Araújo, H.D.A.1, Aires, A.L.5, Coelho, L.C.B.B.1.

1Depto de Bioquímica, Univ. Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil; 2Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, Recife, PE, Brazil; 3Depto de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, PE, Brazil; 4Depto de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, Recife, PE, Brazil; 5Depto de Medicina Tropical, UFPE, Recife, PE, Brazil.

received the **"POSTER AWARD"** for best poster presented during the 20th International Union For Pure and Applied Biophysics (IUPAB), 50th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 45th Congress of Brazilian Society of Biophysics (SBBf) and 13th Brazilian Society on Nuclear Biosciences Congress (SBBn), virtually, Brazil, on October, 4th to 8th, 2021.

Rosângela Itri
Rosângela Itri

Maurício da Silva Baptista
Maurício da Silva Baptista

Chairs of the IUPAB Congress

Diamond Sponsor

cytiva

Gold Sponsor

DAAD
SARTORIUS

SENAPSE

PETROBRAS

ADRIANA AMADA BRASIL

Silver Sponsor

ThermoFisher SCIENTIFIC

Organization

SBBq SBBf

Support

CNPq FAPESP
SBBN CAPES FAPERJ