

JADILMA COSME PIMENTEL

Caracterização das lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) e de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) através de sistemas potenciométricos e amperométricos

RECIFE/2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JADILMA COSME PIMENTEL

Caracterização das lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) e de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) através de sistemas potenciométricos e amperométricos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Co- orientadoras:

Profa. Dra. Sandra Rodrigues de Souza

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

RECIFE/2009

Pimentel, Jadilma Cosme

Caracterização das lectinas de folhas de Bauhinia monandra (BmoLL) e de sementes de Cratylia mollis (Cramoll) através de sistemas potenciométricos e amperométricos/ Jadilma Cosme Pimentel. – Recife: O Autor, 2009.

93 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Lectinas 2. Bauhinia monandra (BmoLL) 3. Cratylia mollis (Cramoll) 4. Biotecnologia I Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2009- 194

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho / Orientadora

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE



Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE



Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE



Profa. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró - RN



Prof. Dr. Roberto Araújo Sá

Universidade Federal de Pernambuco, Campus do Agreste, Caruaru-PE

“Obstáculos são aquelas coisas medonhas que você vê quando tira os olhos do seu objetivo.”

Henry Ford

A Deus pelas graças alcançadas. Aos meus pais e irmãos pelo amor, apoio e compreensão. A Maria Eduarda por iluminar minha vida.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho pelo incentivo e paciência dispensado a esta dissertação.

À Profa. Dra. Sandra Rodrigues de Souza, pela paciência, orientação e incentivo na produção deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela atenção e colaboração a mim dispensados.

À Profa. Dra. Janete Magali de Araújo por me acolher em seu laboratório, tornando possível a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho pela amizade e atenção.

A Adenilda Eugênia por sua atenção e simpatia.

À técnica do laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, Maria Barbosa Reis da Silva pela dedicação e ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos desta dissertação.

A todos do Laboratório de Glicoproteínas da UFPE, pelo acolhimento e ajuda a mim dispensados.

Aos meus amigos pelo carinho, amizade, compreensão e companhia dedicados a mim durante todo este ano.

Aos meus pais e meus avós, pelo apoio, carinho e compreensão sempre dispensados a mim.

Aos meus irmãos pelo convívio e amizade.

A Deus pelo Dom da Vida.

Lista de Figuras

Figura 01: Ligação da lectina com carboidrato	2
Figura 02: Rede de hemaglutinação	3
Figura 03: Reação de inibição da hemaglutinação	3
Figura 04: Esquema explicativo de uma cromatografia de afinidade	10
Figura 05: Aspectos das flores da <i>Bauhinia monandra</i>	11
Figura 06: Aspectos das folhas da <i>Bauhinia monandra</i>	12
Figura 07: Aspectos da <i>Cratylia mollis</i> .	14
Figura 08: Nanoporos de Nafion condutores de prótons	18
Figura 09: Eletrodo padrão de hidrogênio	19
Figura 10: Representação esquemática do princípio do biossensor	25

Sumário

Agradecimentos	V
Lista de Figuras	VI
Resumo	IX
Abstract	X
Introdução	1
1 - Lectinas	1
1.1.1 – Histórico	1
1.1.2 - Classificação	4
1.1.3 – Funções <i>in vivo</i>	5
1.1.4 – Aplicações	5
1.1.5 – Purificação	7
1.2 - <i>Bauhinia monandra</i>	11
1.3 - <i>Cratylia Mollis</i>	13
1.4- Microrganismos endofíticos	14
1.5- Nanoporos de Nafion aplicados em sistemas eletroquímicos	17
1.6- Abordagem eletroquímica	18
1.6.1 - Célula eletroquímica	18
1.6.2 - Eletrodo de Referência Padrão	19
1.6.3 - Eletrodo de Referência	20
1.6.4 - Eletrodo de Trabalho	20
1.6.5 – Sistemas eletroquímicos	21
1.6.6 - Potencial Eletroquímico	22
1.6.7 – Corrente amperométrica	23

1.6.8 - Biossensores	24
2 – Objetivo Geral	26
2.1 – Objetivos Específicos	26
Referências Bibliográficas	28
ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY: An electrochemical model to evaluate lectin-carbohydrate interactions.	55
ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BIOCHEMISTRY (MOSCOW): An electrochemical system to characterize lectin interaction with erythrocytes	70
ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY: A Novel Method to Evaluate Interaction Between <i>Bauhinia monandra</i> Leaf Lectin and Endophytic Bacterium	81
Conclusões	93

Resumo

A lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) foi avaliada através de sistemas potenciométricos e amperométricos visando elucidar o comportamento dessa proteína na presença de células procarióticas e eritrócitos de coelho em meios eletrolíticos apropriados, a lectina foi avaliada livre e imobilizada em nanoporos de Nafion e as respostas eletroquímicas foram obtidas por consequência da ligação desta proteína aos seus carboidratos específicos. Foram realizados testes na presença e na ausência de bactérias, endofíticos extraídos de folha da *B. monandra*, para analisar sua interação com os carboidratos de membrana destas células. BmoLL foi avaliada também interagindo com eritrócitos de coelho, na presença e ausência de galactose; a lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) foi avaliada livre na presença ou ausência de seu carboidrato específico. Os métodos eletroquímicos utilizados para verificar as mudanças de cargas nas superfícies de BmoLL demonstraram interações significativas dessa lectina aos carboidratos de membrana das células procarióticas empregadas neste sistema, bem como a forte ligação de BmoLL aos carboidratos de membrana de eritrócitos. Sistemas amperométricos e potenciométricos, utilizados para elucidar o comportamento da BmoLL na presença de células procarióticas e interagindo com carboidratos presentes na membrana de eritrócito de coelho, bem como Cramoll interagindo com diferentes concentrações de glicose apresentaram sensibilidade satisfatória para detectar trocas conformacionais na superfície dessas lectinas devido a sua bioadsorção com ligantes.

Palavras chaves: *Bauhinia monandra*, *Cratylia mollis*, Biossensores, eletroquímica, lectina, potencial eletroquímico, sistema potenciométrico, sistema amperométrico.

Abstract

Bauhinia monandra leaves lectin (BmoLL) were evaluated through electrochemical systems, using potentiometric and amperometric technique aiming elucidate this molecule behavior on prokaryotic cells and rabbit erythrocytes presence, on appropriate electrolytic medium, lectins was evaluated free and immobilized on Nafion nanopores and electrochemical responses were obtained due to proteins linking with specific carbohydrate. Were realized tests on bacteria presence and absence, endophytics extracted of *B. monandra* leaves, to analyze its interaction with membrane carbohydrate of this cells. BmoLL were also evaluated interacting with rabbit erythrocytes, on galactose presence and absence; *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll) were evaluated free on glucose presence and absence. The electrochemical methods utilized to evaluate charges superficial changes on BmoLL surface had demonstrated significant interactions of this lectin with prokaryotic cells, utilized on system, membrane carbohydrate, as well as, a high interaction of BmoLL with erythrocytes membrane carbohydrate. Amperometric and potentiometric systems, utilized to elucidate BmoLL behavior prokaryotic cells and interacting with rabbit erythrocytes membrane carbohydrate, as well as, Cramoll interacting with different glucose concentration, presented satisfactory sensibility to detect conformational changes on this lectins surface due its bioadsorption with ligands.

Keywords: *Bauhinia monandra*, *Cratylia mollis*, lectins, biosensors, electrochemical potentials, immobilized protein, Nafion, electrochemical potentiometric system, amperometric system.

Introdução

1 - Lectinas

1.1.1 Histórico

O primeiro estudo sobre lectinas foi feito por Stillmark em 1888. Ele utilizou um extrato bruto de sementes de *Ricinus communis* (mamona) que era capaz de produzir hemaglutinação em diferentes espécies de eritrócitos e denominou a proteína responsável por esse fenômeno de ricina (Gabor *et al.*, 2001). Posteriormente, na década seguinte, Hellin observou que o extrato tóxico de sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti) era, da mesma forma, capaz de produzir aglutinação de eritrócitos e denominou a proteína responsável de abrina (Kennedy *et al.*, 1995).

Inicialmente essas proteínas ou glicoproteínas foram denominadas aglutininas, hemaglutininas, fitohemaglutininas ou fitoaglutininas (Sharon & Lis, 1998) e somente em 1954 Boyd e Shapleigh propuseram o termo lectina para definir essas proteínas.

Durante o século XX, na década de 60, descobriu-se que as lectinas promovem estimulação mitogênica de linfócitos e inibição do crescimento de células tumorais, promovendo uma vasta utilização destas em estudos citoquímicos e histológicos (Moreira *et al.*, 1991; Sharon & Lis, 2001).

Análises de cristalografia de raios-X tornam possível elucidar estruturas de proteínas com seus grupamentos químicos e os tipos de ligação que são formadas (Tavares *et al.*, 1996). Em sua estrutura, as lectinas apresentam um ou mais sítios de ligação para as unidades glicídicas. Elas são glicoproteínas de origem não-imunológica, que podem ligar carboidratos (Figura 01) e aglutinar células (Singh *et al.*, 1999; Hajtó *et al.*, 2005, Iskratsch *et al.*, 2009).

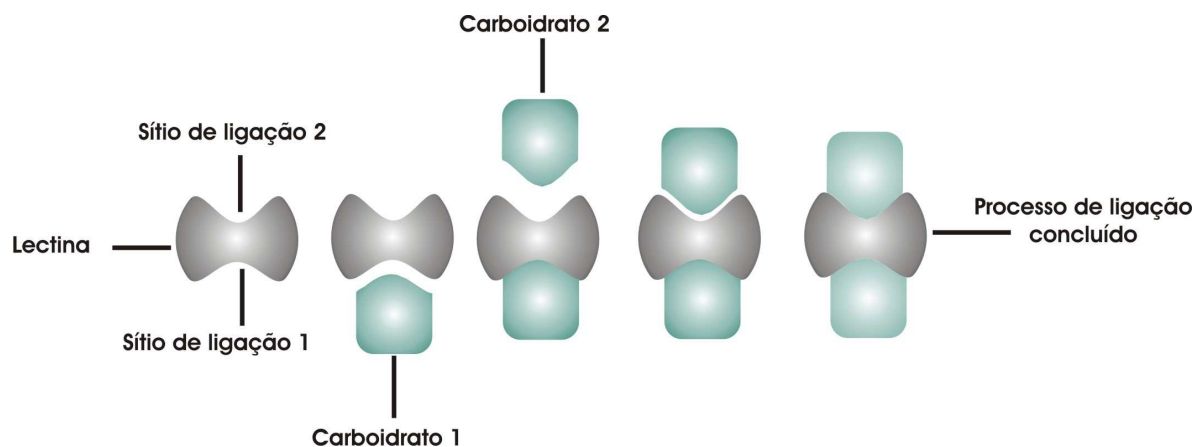


Figura 01: Ligação da lectina com carboidrato

Fonte: Jadilma Cosme Pimentel

Hodiernamente têm-se utilizado eritrócitos humanos ou de outros animais, como ratos e coelhos, tratados química ou enzimaticamente (Kabir, 1998; Nomura *et al.*, 1998; Coelho e Silva, 2000; Dinh *et al.*, 2009), bem como não tratados (Sampaio *et al.*, 1998), para identificar atividades de lectina (Sugawara *et al.*, 2000). A atividade hemaglutinante, Figura 02, decorre da interação da lectina, através de seus sítios de ligação, com padrões de carboidratos presentes na superfície da membrana celular.

A interação das lectinas com seus carboidratos específicos ocorre através de pontes de hidrogênio, coordenações metálicas, interações de van der Waals e hidrofóbicas (Schwarz *et al.*, 1993; Drickamer, 1998); a interação também pode ser mediada diretamente por moléculas de água (Yoshizumi *et al.*, 1999).

No entanto, carboidratos específicos podem ligar-se a lectina impedindo a aglutinação de células (Ratanapo *et al.*, 1998), Figura 03.

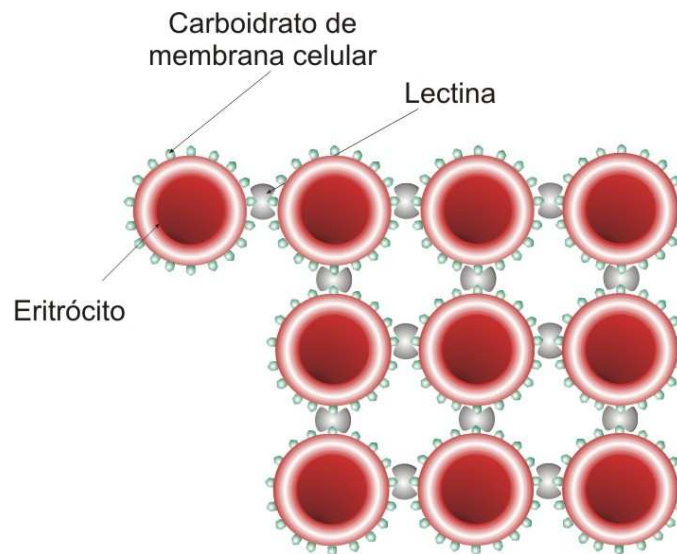


Figura 02: Rede de hemaglutinação.

Fonte: Jadilma Cosme Pimentel

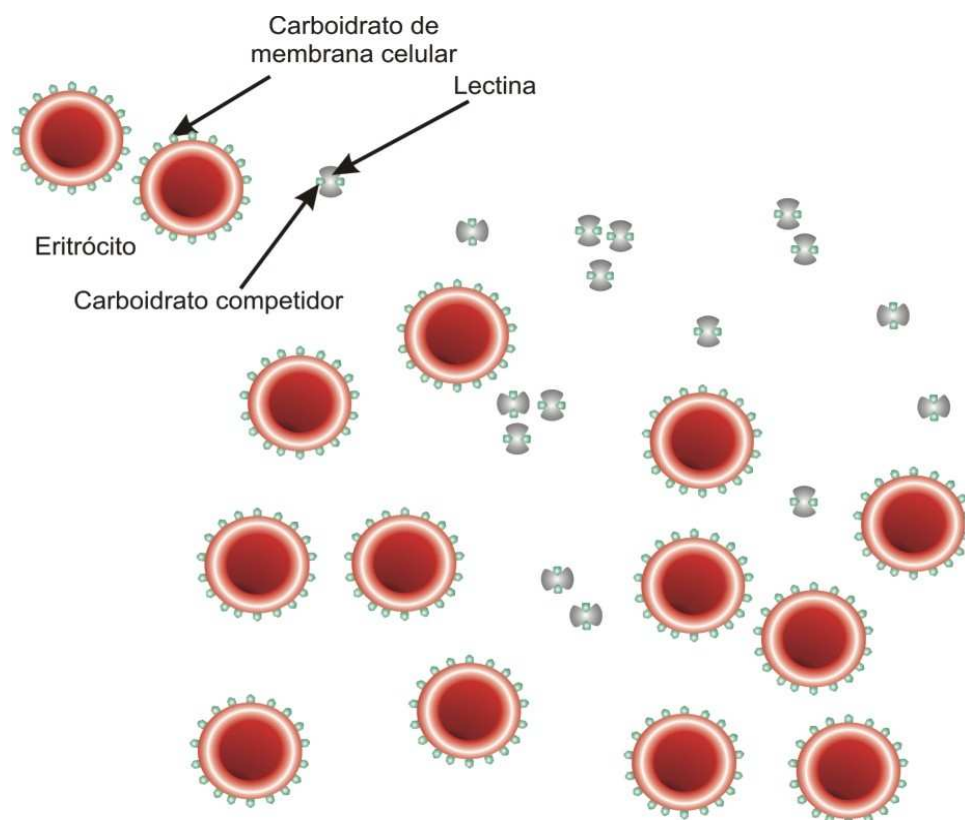


Figura 03: Reação de inibição da hemaglutinação.

Fonte: Jadilma Cosme Pimentel

A Concanavalina A (Con A) foi a primeira lectina obtida na forma cristalina em 1919 por James B. Summer, sendo esta extraída de sementes da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco). No final da década de 40, foi demonstrado por William C. Boyd e Rose M. Reguera que certas sementes continham aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos (Sharon & Lis, 1972). Recentemente, a Con A foi utilizada para a construção de um biossensor enzimático para glicose e lactato, apresentando resposta satisfatoriamente rápida e boa reprodutibilidade (Anzai *et al.*, 2000), como receptor para mensurar glicose *in vivo* (Pickup *et al.*, 2005), reconhecimento de bactérias (Hwang *et al.*, 2008), bem como na identificação de células normais e cancerígenas (Tan *et al.*, 2008).

1.1.2 Classificação

As lectinas representam um grupo de proteínas heterogêneas e diferenciam-se quanto à especificidade, estrutura molecular e atividade biológica (Elgavish *et al.*, 1997).

Sua classificação pode ser feita quanto à especificidade podendo pertencer ao grupo manose, grupo fucose, grupo galactose/N-acetilgalactosamina, grupo ácido siálico ou grupo glicanos complexos. Quanto à estrutura molecular a classificação abrange: as Merolectinas, que apresentam um único sítio ligante para carboidratos (Drickamer, 1998); Hololectinas, que apresentam apenas domínio de ligação para carboidrato, mas possuem dois ou mais sítios de ligação, este grupo compreende a maioria das lectinas de plantas; Quimerolectinas que possuem além do domínio ligante a carboidratos um outro domínio com uma atividade biológica que independe do domínio ligante para carboidrato (Peumans & Van Damme, 1995); e as Superlectinas que possuem dois domínios de ligação a carboidratos, que são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos (Peumans & Van Damme, 1998). Quanto

à relação evolucionária e estrutural podem pertencer a sete famílias, sendo que as mais numerosas são isoladas de leguminosas e ligadoras de quitina (Peumans *et al.*, 2000).

1.1.3 Funções *in vivo*

Nos seres vivos, as lectinas possuem as mais variadas funções. Acredita-se que em animais as lectinas participam do mecanismo de endocitose (Rudger *et al.*, 2000), transporte intracelular de glicoproteínas (Mecklenburg *et al.*, 2002), apoptose (Barbosa *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2008), defesa contra microorganismos, e na regulação da migração e adesão celular (Jankovic & Golubović, 2000), influência na homeostasia de leucócitos e na modulação de processos inflamatórios (Stowell *et al.*, 2008).

Em bactérias e parasitas elas participam do processo de ligação a células hospedeiras (Oka & Spiegel, 1997; Sharon, 1993). Foi observado também que em lectinas virais possivelmente estão envolvidas na ligação entre o vírus e a superfície celular de eritrócitos ou outras células (Singh *et al.*, 1999). Algumas lectinas expressadas por raízes de plantas agem como sinais moleculares para a associação de bactérias do gênero *Azospirillum*, atuando, portanto, como um fator determinante da especificidade da interação planta-bactéria (Antonyuk & Evseeva 2006).

1.1.4 Aplicações

As lectinas extraídas de plantas têm sido utilizadas como ferramenta analítica na pesquisa de glicoproteínas, e como uma proteína bioativa para induzir muitos processos celulares (Peumans & Van Damme, 1998). Algumas dessas glicoproteínas são mitogênicas e estimulam transformações dos linfócitos e apoptose (Barbosa *et al.*, 2001; Correia *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008); atividade larvívica (Sá,

et al., 2009^a); coagulante, assemelhando ao sulfato de alumínio utilizado no tratamento de água (Santos *et al.*, 2009); outras aglutinam preferencialmente células malignas (Janković & Golubović, 2000; Wang *et al.*, 2000) por isso têm-se investigado o seu envolvimento em metástase (Beltrão *et al.*, 1998), e em processos tais como adesão (Janković & Golubović, 2000), tipagem sangüínea (Matsui *et al.*, 2001), e sistemas de dosagem de glicose *in vivo* (Pickup *et al.*, 2005). Pesquisadores propõem que algumas lectinas estejam envolvidas no reconhecimento célula-célula. Na superfície de membrana da maioria das células, podem-se encontrar padrões de carboidratos, específicos para cada grupo celular, que podem ser reconhecidos por uma ou mais lectinas através de ligações seletivas, podendo ser esta seletividade quantificada através da determinação de potenciais eletroquímicos (Souza *et al.*, 2001). Devido a singularidade dos padrões de carboidratos expressados pelos grupos celulares as lectinas podem ser usadas para mostrar a diferença entre eles, auxiliando no diagnóstico (Muñoz-Crego *et al.*, 1999).

A lectina de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL) apresenta atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho e humanos dos tipos sanguíneos A, B, O e AB sendo fortemente inibida pela ovoalbumina; cMoL pode ser utilizada como coagulante no tratamento de água para consumo humano (Santos *et al.*, 2009).

Alguns estudos sobre lectinas de plantas têm investigado a expressão destas proteínas em bactérias (Luo *et al.*, 2005). Por causa da especificidade das lectinas para determinados carboidratos, estas podem ser utilizadas como ferramentas adicionais na identificação de bactérias (Hamada *et al.* 1997; Shen *et al.*, 2007; Serra & Gamela, *et al.*, 2008) e também para proteção de plantas contra a biodegradação (Sá, *et al.*, 2009^b).

Recentemente, através de um biossensor, foi obtida a identificação seletiva de subespécies de *Escherichia coli*, utilizando-se lectinas de *Artocarpus integrifolia*,

Arachis hypogaea, *Galanthus nivalis*, *Phytolacca americana*, *Lens culinaris*, *Helix pomatia*, *Persea americana*, *Triticum vulgare*, *Codium fragile*, *C. ensiformis* (Ertl *et al.*, 2003).

Lectinas de plantas apresentaram inibição de crescimento bacteriano em estudos *in vitro* (Pando *et al.*, 2004), no entanto, os mecanismos envolvidos neste fenômeno não foram esclarecidos.

Existe ainda, amplo interesse no estudo dessas biomoléculas com a finalidade de produzir medicamentos-inteligentes, que atuem em células específicas do organismo, evitando os efeitos colaterais que são tão comuns nos medicamentos tradicionais (Clark *et al.*, 2000). Mormente há empenho, na aplicação de lectinas, em busca de plantas transgênicas resistentes a pragas e microorganismos patógenos (Roopasshree, *et al.*, 2006). A interação entre lectinas de plantas e micro-organismos revela as perspectivas de usos antimicrobiais com finalidade terapêutica contra micróbios patógenos humanos ou para impedir a contaminação de cereais (Correia *et al.*, 2008). Verifica-se também o interesse econômico da aplicação de algumas lectinas na indústria e na agricultura (Silva *et al.*, 2009).

1.1.5 Purificação e caracterização

As lectinas podem ser obtidas e isoladas a partir de plantas, animais e microorganismos (Wang *et al.*, 2000). As sementes de leguminosas são as principais fontes de lectinas, chegando a constituir até 10% da proteína total. Apresentam-se, também, em diversos tecidos vegetais como raízes, vagens, bulbos, folhas, frutos e, inclusive, em cascas e entrecasca (Coelho & Silva, 2000; Ye & Ng, 2001). A detecção de lectinas, em extratos biológicos, pode ser realizada através de ensaios de

hemaglutinação, utilizando uma diluição em série da amostra antes da incubação com eritrócitos (Bladier *et al.*, 1989).

A caracterização das lectinas pode ser realizada através de diversos métodos tais como inibição por carboidratos e/ou glicoconjugados, atividade hemaglutinante em presença de íons, estabilidade da atividade lectínica em função de variações de pH, além de técnicas eletroforéticas e eletroquímicas para indicação da basicidade ou acidez da lectina, determinação de peso molecular e caracterização desta como glicoproteína (Coelho & Silva, 2000).

As lectinas de leguminosas apresentam-se estáveis em relação à sua estrutura conformacional quando submetidas a temperaturas de 50 à 55° C, sendo que, a maioria destas lectinas é irreversivelmente inativada em temperaturas acima dos 60-65° C (Rabijins *et al.*, 2001). No entanto foram observadas lectinas que mantém sua forma ativa em temperatura entre 75 e 85° C, como, por exemplo, a lectina de *Dolichos biflorus* (Roopasshree *et al.*, 2006).

Os testes de inibição da atividade hemaglutinante permitem a avaliação da especificidade de ligação a mono, di ou oligossacarídeos (Peumans & Van Damme, 1988).

A purificação de proteínas é obtida por meio de procedimentos de fracionamento, sendo de fundamental importância as propriedades físico-químicas da proteína de interesse que permitem a separação da mesma das demais substâncias, excluindo de forma seletiva os demais componentes da mistura, permitindo que somente a substância de interesse permaneça. O procedimento de purificação de lectinas de uma fonte biológica preconiza a preparação de extratos em diferentes tampões ou em solução salina. A purificação parcial dos extratos com atividade lectínica pode ser realizada por fracionamento salino e posterior diálise exaustiva (Kennedy *et al.*, 1995).

No procedimento da cromatografia a mistura de substâncias que será fracionada é dissolvida em um líquido (fase móvel), este, por sua vez, é passado através de uma coluna contendo uma matriz sólida e porosa (fase estacionária). Deslizando através da coluna, os solutos interagem com a fase estacionária e sua eluição é retardada; esse retardamento varia de acordo com as propriedades de cada soluto (Maitland & Maitland, 2002).

Métodos cromatográficos de afinidade, que são balizados na propriedade das proteínas se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos (Elder *et al.*, 1983), são os procedimentos mais utilizados para a purificação de lectinas. Nestes, um carboidrato que apresenta afinidade específica à proteína de interesse é ligado covalentemente a uma matriz inerte. Quando uma solução composta por substâncias distintas é eluída através desse material cromatográfico, a proteína que se deseja purificar liga-se ao carboidrato imobilizado, ao passo que as demais substâncias são lavadas através da coluna com uma solução tampão. A lectina pode ser coletada com elevado grau de pureza alterando-se as condições de eluição de forma a liberá-la da matriz (Cuatrecasas *et al.*, 1968), como demonstra a Figura 04. A preferência de utilização deste método em muitos protocolos de purificação de lectinas decorre da elevada conservação da atividade biológica dessas glicoproteínas, obtida após esse processo (Konozy *et al.*, 2003).

Existem ainda outras técnicas auxiliares como a cromatografia de troca iônica (Correia & Coelho, 1995), de filtração em gel (Hatakeyama *et al.*, 2002; Janković & Golubović, 2000), que, do mesmo modo que a cromatografia de afinidade, se caracterizam pela distribuição de moléculas que serão separadas por uma fase estacionária e outra móvel.

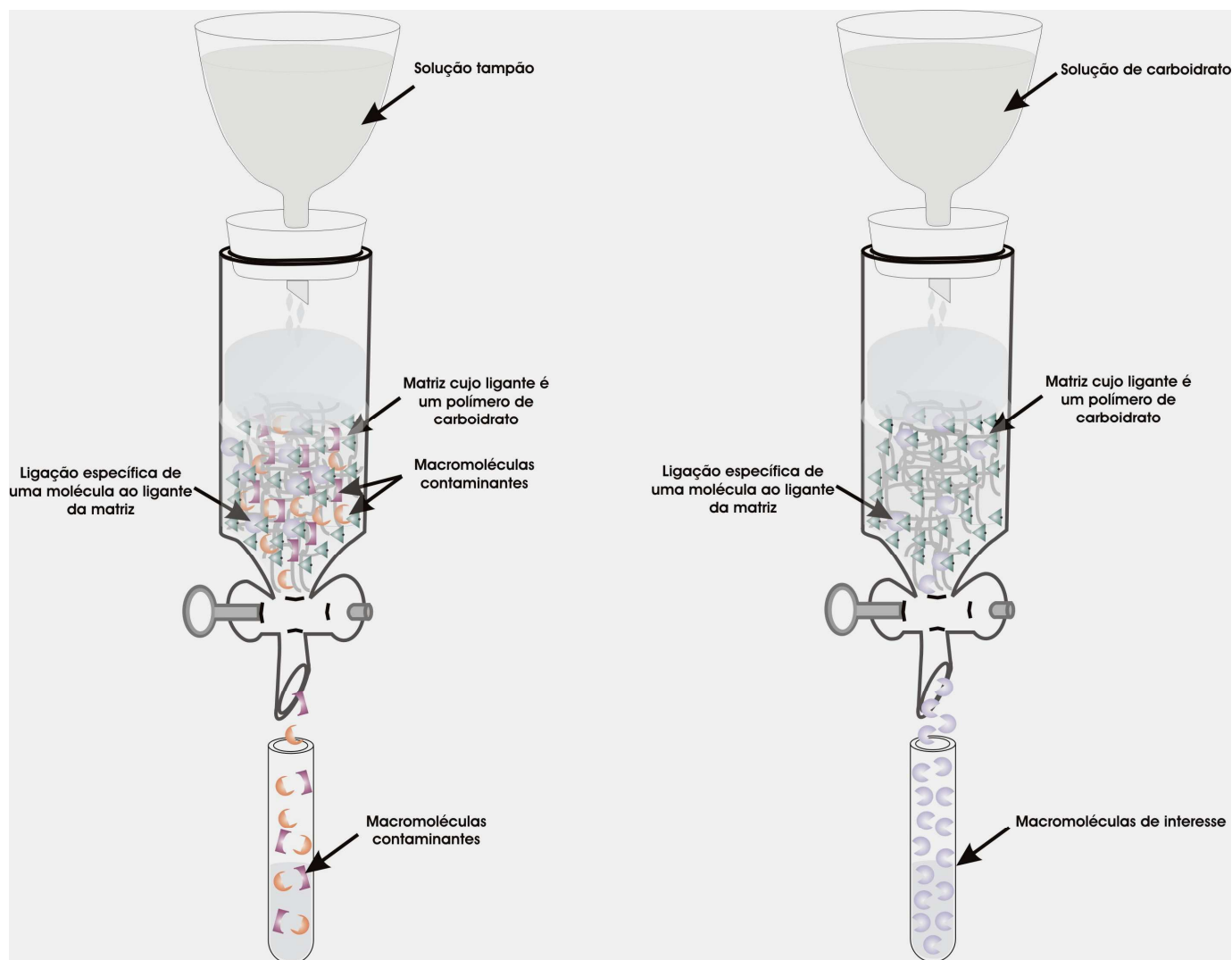


Figura 04: Representação esquemática de cromatografia de afinidade.

Fonte: Jadilma Cosme Pimentel

1.2 *Bauhinia monandra*

Identificado em 1753 por Carolus Linnaeus e compreendendo cerca de 300 espécies (Silva & Filho, 2002), *Bauhinia* é um gênero de árvores tropicais pertencentes à família das Leguminosae (Achenbach *et al*, 1988), contendo na flora brasileira 64 espécies. Em Pernambuco ocorrem espécies nativas como *B. acuruana* (Rodal *et al.*, 1998), *B. cheilantha* (Silva & Albuquerque, 2005), *B. forficata* (Silva *et al.*, 2003), *B. monandra* Kurz (Silva & Andrade, 2005), por exemplo. Este gênero (*Bauhinia*) tem sido amplamente estudado por possuir propriedades medicinais, sendo atribuídas a algumas espécies, propriedades antifúngicas, antibacterianas, antiinflamatórias, e em especial antidiabética (Silva & Filho, 2002).

B. monandra, Figura 05, é uma planta nativa da Ásia, embora ocorra também na Índia, Nigéria, e outras regiões da África e América do Sul. No Brasil é conhecida vulgarmente como pata-de-vaca, unha-de-vaca, casco-de-vaca, unha-de-boi, unha-de-anta e mororó (Bandami & Daulatabad, 1969).



Figura 05: Aspectos das flores de *Bauhinia monandra*.

Fonte: Maria Barbosa Reis da Silva

As folhas de *B. monandra*, Figura 06, apresentam uma concentração considerável de uma lectina específica à galactose (BmoLL). Uma quantidade superior a 2 mg da lectina pode ser extraída de 5 g de pó de folhas (Coelho & Silva, 2000).



Figura 06: Aspectos das folhas da *Bauhinia monandra*.

Fonte: Maria Barbosa Reis da Silva

Após a purificação, quando realizado o processo de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila, BmoLL demonstrou uma banda principal de 33 kDa, glicosilada, e uma outra banda de 26 kDa, não glicosilada. Foi obtida uma elevada atividade aglutinante de BmoLL em eritrócitos de coelhos tratados em glutaraldeído; eritrócitos humanos dos grupos B e AB tratados com glutaraldeído foram também aglutinados, no entanto, eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A e O não aglutinaram (Coelho & Silva, 2000).

O comportamento interfacial de BmoLL e sua habilidade de interagir com monocamadas de lipídios foi estudado por medidas de tensão de superfície (Rosilio *et al.*, 2004). Extratos etanólicos de folhas de *B. monandra* mostraram atividades

antioxidantes (Argôlo *et al.*, 2004). Além disso, BmoLL também apresentou ação inseticida (Macedo *et al.* 2007) .

1.3 *Cratylia mollis*

Cratylia constitui um gênero neotropical, recentemente originado de arbustos que são nativos da Amazônia, da parte central do Brasil e de áreas do Peru, Bolívia e nordeste da Argentina, caracterizando-se por sua ampla adaptação em zonas de secas prolongadas, devido ao seu sistema radicular bem desenvolvido, produzindo bons rendimentos de forragem que são utilizados para sistemas de produção animal (Argel & Lascano, 1998).

Este gênero (*Cratylia*) integra a família das Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Dioclenae, sendo um arbusto que pode alcançar de 1,5 a 3 metros de altura (Argel & Lascano, 1998; Queiroz & Coradin, 1995).

C. mollis, conhecida popularmente como feijão camaratuba ou camaratu, Figura 07, ocorre principalmente em áreas de Caatinga do Nordeste brasileiro e é utilizada como forrageira na Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco. Das sementes desta planta é extraída uma lectina, Cramoll, que apresenta formas moleculares (Cramoll 1, 2, 3 e 4) que reconhecem glicose e manose como principais carboidratos inibidores (Paiva & Coelho, 1992). Cramoll pode ser empregada como marcador para detecção de células normais e transformadas, benigna ou malignamente (Beltrão *et al.*, 1998).

A isoforma 1 da Cramoll (Cramoll 1) foi cristalizada (Tavares *et al.*, 1996) e completamente seqüenciada (de Souza *et al.*, 2003); ela apresenta atividades imunogênicas (Correia & Coelho, 1995) e anti-tumorais (Andrade *et al.*, 2004). Uma

preparação contendo as isoformas 1 e 4 de Cramoll (Cramoll 1,4), foi excelente ferramenta para o estudo de atividade mitogênica (Maciel *et al.*, 2004).



Figura 07: Aspectos da *Cratylia mollis*.

Fonte: Maria Tereza dos Santos Correia

As isoformas de Cramoll têm sido estudadas para avaliar seus diversos potenciais biotecnológicos, para análise estrutural e outras aplicações, como a busca de inibidores de agregação plaquetária, que é de relevante interesse para o uso biotecnológico (Rezende- Neto, 2003).

1.4 Microrganismos endofíticos

Endofíticos são microrganismos que, durante pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, vivem em tecidos vegetais, de modo sistêmico, sem causar danos ao hospedeiro (Saikkonen *et al.*, 1998). Esses organismos foram detectados em todas as espécies de plantas avaliadas recentemente (Azevedo *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005). Uma planta pode apresentar diferentes endofíticos, entre fungos e bactérias (Vandenkoornhuyse *et al.* 2002; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

A transmissão de microrganismos endofíticos pode ocorrer através de penetração ativa ou passiva via raízes (Sharma *et al.* 2005), estômatos e ainda através das sementes, por meio da reprodução por estaquias contaminadas. Atingindo os diversos tecidos da planta hospedeira, eles colonizam regiões específicas ou distribuem-se de forma sistêmica através dos vasos condutores e espaços intercelulares (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Os microrganismos endofíticos oferecem ao seu hospedeiro uma maior resistência ao estresse causado por fatores bióticos ou abióticos e, em troca recebem nutrientes e proteção (Azevedo *et al.*, 2002; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Conn *et al.*, 2008; Zang *et al.* 2009). Devido a essa alta interação mutualística, tem sido proposto que os endófitos co-evoluíram com suas plantas hospedeiras (Tan & Zou, 2001; Azevedo *et al.*, 2002; Bugni & Ireland, 2004). Entretanto, sob determinadas circunstâncias esse equilíbrio, entre o endofítico e o hospedeiro, pode ser quebrado em favor de um deles (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Inicialmente acreditava-se que os microrganismos endofíticos não causavam danos ou benefícios às plantas, sendo, por isso, considerados organismos imparciais, no entanto, através dos conhecimentos adquiridos, sabe-se atualmente que esses

microrganismos em muitos casos desempenham um papel importante na proteção de plantas contra predadores e patógenos (Azevedo *et al.*, 2000).

Algumas bactérias promovem o crescimento da planta hospedeira melhorando a produção da biomassa, através do aumento da fixação de nitrogênio (Oliveira *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005). Essa característica destas bactérias atrai a engenharia genética para a pesquisa desses microrganismos para a melhoria do rendimento de plantas (Oliveira *et al.*, 2004). Alguns endófitos têm sido relatados como agentes de controle biológico contra apodrecimento radicular (Almeida *et al.*, 2005). Há relatos, ainda, de que alguns microrganismos endofíticos aumentam a tolerância de certas plantas à seca (Azevedo, 1998).

Bactérias endofíticas têm sido estudadas como uma nova forma de controle biológico. A resistência conferida à planta por estes é, geralmente, proveniente da produção, por parte dos microrganismos, de compostos tóxicos aos patógenos ou herbívoros, ou ainda através da ativação do sistema de defesa da planta, também desencadeada pelo endófito (Azevedo *et al.*, 2002).

Hirsch, 1999 observou que em raízes de plantas as lectinas estão envolvidas no processo de simbiose com organismos endofíticos e sugere que essa característica de aglutinação ocorra também em sementes e folhas.

A reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria deve-se ao fato da habilidade dessas proteínas em reagir com carboidratos expostos na superfície da membrana celular tornando possível o emprego dessas biomoléculas como sonda-diagnóstico para a identificação de bactérias patogênicas (Muñoz-Crego *et al.*, 1999).

1.5 Nanoporos de Nafion aplicados em sistemas eletroquímicos

O Nafion pertence a uma classe de polímeros chamadas ionômeros perfluossufonados (Friequelmont-Loïzos *et al.* 1997). Este polímero apresenta cargas intrinsecamente negativas que aduz afinidade com cátions (Porterfield *et al.*, 2001); o polímero pode ser amplamente aplicado para estudos amperométricos de fluidos extracelulares (Sheppard *et al.*, 1998), que envolvem interações eletrostáticas intermoleculares exercendo um significativo efeito sobre suas propriedades físico químicas (Yoshizumi *et al.*, 1999). Previamente, experimentos utilizando análise de dispersão de raios-X têm revelado agrupamento metálico nesses polímeros. As regiões hidrofóbicas são compostas por polímeros de fluorcarbonatos e as regiões hidrofílicas pelos citados agrupamentos metálicos (Brookman *et al.*, 1986). Estas propriedades iônicas do Nafion foram estabelecidas adicionando os grupos do ácido sulfônico na matriz do polímero altamente condutor. Esses grupos podem funcionar como doadores extremamente fortes de prótons (Marinesco & Carew, 2002).

A superfície dos polímeros de Nafion contém poros em escala de dez a centenas de nanômetros caracterizando nano-estruturas. Estes nanoporos de Nafion, dotados com cargas negativas atribuídas aos grupos sulfônicos, são excelentes condutores de prótons (McGovern *et al.*, 2003), Figura 8; proteínas podem ser imobilizadas nesses filmes carregados apresentando alta eletroatividade para reconhecimentos de ligantes específicos (Huang *et al.*, 1998). Lectinas imobilizadas nestas superfícies são capazes de interagirem, devido a transferência de elétrons ocorrida no meio, com ligantes específicos; estas interações seletivas foram obtidas em sistema eletroquímico com cisteína imobilizada em Nafion para avaliações protéicas (Hon *et al.*, 2006).

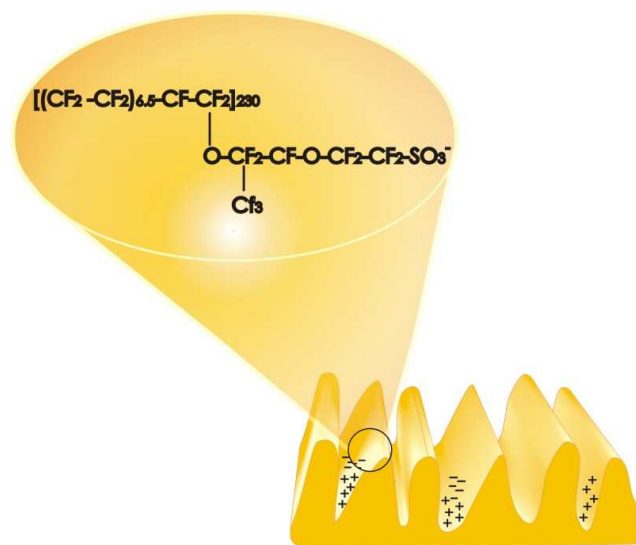


Figura 08: Nanoporos de Nafion condutores de prótons.

Fonte: Jadilma Cosme Pimentel

1.6 Abordagem eletroquímica

1.6.1 Célula eletroquímica

Uma célula eletroquímica constitui um dispositivo composto por um eletrodo de referência e um eletrodo de trabalho (Niaura *et al.*, 1996), que decompõem energia química em energia elétrica e vice-versa, por meio de uma reação de oxidação-redução. Acoplado a um multímetro, este sistema pode ser usado para a obtenção de medidas potenciométricas em sistemas inorgânicos, orgânicos e biológicos (Cohen *et al.*, 1999).

1.6.2 Eletrodo de Referência Padrão

O eletrodo de hidrogênio constitui eletrodo de referência padrão sendo composto por um fio de platina coberto com platina finamente dividida. O hidrogênio

gasoso é borbulhado em solução de ácido sulfúrico 1 M, sob pressão de 1 atm e temperatura de 25°C (Parthasarathy *et al.*, 1995), como mostra a Figura 09.

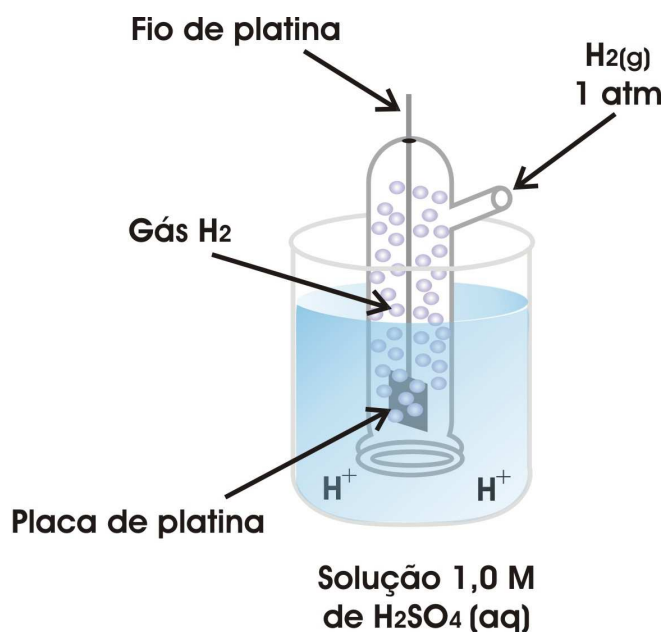


Figura 09: Eletrodo padrão de hidrogênio.

Fonte: Jadilma Cosme Pimentel

O potencial de um eletrodo revela a tendência de uma reação incidir na superfície deste, ou seja, apresenta a facilidade com que os átomos do eletrodo metálico perdem elétrons ou a facilidade com que os íons os recebem. O potencial do eletrodo padrão de uma espécie química é a diferença de potencial, expressa em volt, entre um elemento de uma solução 1 M de seus íons em relação ao eletrodo de hidrogênio, ao qual foi atribuído potencial igual a zero (Parthasarathy *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2003).

1.6.3 Eletrodo de Referência

O eletrodo de referência tem a finalidade de comparar a corrente que foi gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho, que de um modo geral, processam-se em potenciais em torno de 0 mV. Nesse potencial, a contribuição de espécies interferentes é

minimizada (Rosatto *et al.*, 2001). Para que um estudo eletroquímico seja bem sucedido é determinante a escolha do eletrodo de referência correto. Um eletrodo de referência necessita apresentar potencial que seja estável com o tempo e temperatura, não sendo alterado por pequenas perturbações do sistema, ou seja, pela passagem de uma pequena corrente elétrica, causada pela reação por interferentes (East *et al.*, 2000). Os eletrodos mais utilizados com este fim são os de calomelano saturado, Hg/HgCl (ECS) ou eletrodo de prata/cloreto de prata, Ag/AgCl (Niauara *et al.*, 1996).

O eletrodo de calomelano consiste de um aglomerado de mercúrio envolto por uma pasta de calomelano, Hg₂Cl (cloreto mercurioso), imerso em solução de KCl 3M (Milazzo & Bombara 1960).

O eletrodo de Ag/AgCl (prata/cloreto de prata) é constituído por um fio de platina revestido de prata, que é por sua vez, convertido, parcialmente, em AgCl, imergindo-o em solução de ácido clorídrico diluído e posteriormente imerso em uma solução saturada de KCl (East *et al.*, 2000).

1.6.4 Eletrodo de Trabalho

O eletrodo de trabalho tem a finalidade de gerar a corrente elétrica que será medida pelo eletrodo de referência. A construção desse eletrodo é realizada comumente a partir de metais (Guo & Dong, 2009), como platina (Souza *et al.*, 2001), ouro (Matsumoto *et al.*, 1998) ou prata (Niauara *et al.*, 1996) por suas excelentes propriedades elétricas e mecânicas. Outros materiais, baseados em carbono como, grafita, negro de carbono e fibra de carbono são igualmente usados para construir a fase condutiva (Rover-Júnior *et al.*, 2001). Esses materiais apresentam alta inércia química e fornecem uma carga na faixa de potenciais de trabalho anódico com baixa resistividade elétrica e uma alta proporção de sinal em relação ao ruído (Zhang *et al.*, 2000).

1.6.5 Sistemas eletroquímicos

Sistemas eletroquímicos podem ser aplicados para estudar processos envolvendo distribuição e transferência de cargas em sistemas inorgânicos, orgânicos e biológicos (Cohen *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 2008). São sistemas analíticos que incorporam materiais biologicamente ativos a um transdutor adequado com o propósito de medir a concentração ou atividade do produto de interesse (Liu *et al.*, 2008).

Esses dispositivos são utilizados para estudos da distribuição de cargas na superfície de uma lectina para o conhecimento da cinética de interação desta biomolécula com seu ligante específico de forma quantitativa, através da obtenção de potenciais eletroquímicos (Souza *et al.*, 2003), correntes amperométricas (Kobayashi & Anzai 2001) e para investigação da dupla camada elétrica interfacial de lectina em diferentes valores de pH (Andrade *et al.*, 2009).

A cinética de transferência de elétrons envolvendo o potencial redox de uma proteína imobilizada ou adsorvida depende de uma variedade de fatores, como a conformação da molécula imobilizada e as propriedades da interface da dupla camada elétrica (Niaura *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Sosnitza *et al.*, 1998; Bassi *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Niki *et al.*, 2002).

A caracterização de sistemas contendo materiais biológicos e envolvendo transferência de elétrons pode ser realizada por técnicas potenciométricas e amperométricas. Estes sistemas são de fundamental importância no estudo da superfície carregada de macromoléculas (Mímica *et al.* 2001), pode-se aplicar em sistemas analíticos (Marinesco *et al.* 2002), síntese de compostos (Deng *et al.* 2002) e estudos fundamentais de proteínas carregadas (Nadzhafova *et al.* 2004).

As reações de aglutinação de células vermelhas têm sido utilizadas para detectar atividade de lectinas. Todavia, sistemas convenientes e rápidos, tais como

eletroquímicos são necessários para elucidar a interação lectina-carboidrato (Hawa, 1993; Sugawara, 1998).

1.6.6 Potencial Eletroquímico

O potencial eletroquímico de uma molécula é a distribuição de cargas na superfície desta, quando submetida a um campo elétrico. Obtendo-se a medida do potencial eletroquímico é possível explorar a distribuição de cargas na superfície de proteínas, enzimas e lectinas (Yoshisumi *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2001; Guo & Dong, 2009).

Proteínas com sítios eletroativos como o grupamento heme (Nassar *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1996; Mimica *et al.*, 2001; Marken *et al.* 2002; Nadzhafova *et al.*, 2004) e lectinas (Souza *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2003;) interagindo com moléculas ou macromoléculas envolvem interações eletrostáticas.

O estudo de reações de transferência de elétrons em proteínas redox é atualmente uma das áreas mais ativas em bioeletroquímica. Sabe-se que os processos de transferência eletrônica são afetados pela carga da proteína e a distância entre os grupos prostéticos, mas pouco se conhece sobre o mecanismo de transferência de carga (Haruyama *et al.* 2005). “Promotores” de elétrons, tais como 4-mercaptopiridina (4-pyS) e 4,4'-ditiodipiridina (4-pySS), quando imobilizados como monocamadas sobre eletrodos (Au, por exemplo), mostram-se bastante efetivos no estudo de processos de transferência de elétrons em metaloproteínas (Yoshizumi *et al.*, 1999). O sucesso desses modificadores é atribuído ao fato de que ambos possuem um grupo funcional X capaz de se ligar à superfície metálica e um grupo funcional Y, fracamente básico ou aniônico, capaz de interagir com os grupamentos lisina (positivamente carregados em pH fisiológico) da metaloproteína (Souza *et al.*, 2001).

1.6.7 Corrente amperométrica

Medidas amperométricas são obtidas através da transdução de sinais, devido a trocas nas cargas superficiais de proteínas, resultantes da interação destas macromoléculas imobilizadas com ligantes específicos (Mimica *et al.*, 2001; Ignatov *et al.*, 2002, Tian *et al.*, 2002; Helmholtz *et al.*, 2003; Lowinsohn & Bertotti, 2006).

Respostas amperométricas obtidas da interação de proteínas com ligantes adsorvidos em filmes condutores podem ser alterados em relação a concentração da composição do meio (Nadzhafova *et al.*, 2004). O acréscimo na corrente amperométrica indica uma baixa repulsão eletrostática na superfície do eletrodo de trabalho (Cohen *et al.*, 1996). Sistemas eletroquímicos envolvendo polímero condutores e semi-condutores têm sido usados para o desenvolvimento de sensores químicos e também para estudos de estruturas de biomoléculas (Ito, 2001; Guo & Dong, 2009).

Eletrodos de platina e ouro têm sido utilizados para analisar interações amperométricas de biomateriais avaliando a transferência de elétrons entre o eletrodo de trabalho e a proteína para aplicação em indústrias alimentícias e biossensores (Wee *et al.*, 2005). Desde 1995 sua maior aplicação foi em medidas químicas na agricultura, bem como na indústria de alimentos (Zhang *et al.*, 2000) e medicamentos (Rogers & Gerlach, 1996).

Princípios baseados na interação carboidrato/ligante possibilitam a construção de sensores de glicose usando a Con A (Hawa, 1993). A caracterização de Con A interagindo com glicose foi realizada utilizando métodos amperométricos (Sugawara, 1998). Con A imobilizada em Sepharose através de íons metálicos carregados positivamente podem ser usados como ferramentas no campo de biossensores (Sosnitza *et al.*, 1998).

1.6.8 Biossensores

Sensores que utilizam material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecido animal e vegetal, células, organelas, e outros), imobilizado em uma membrana adequada e conectado a um transdutor, que monitoraram o aparecimento de reagentes ou produtos da reação do material biológico com o material de interesse, convertendo este sinal biológico em sinal elétrico, são hodiernamente classificados como biossensores (Filho-Fatinelo *et al.*, 1992; Riccardi *et al.*, 2002; Bruno *et al.*, 2006; Borisov & Wolfbeis, 2008). Estes têm aduzido maior progresso nos últimos anos, decorrente da necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para determinação de importantes compostos químicos e biológicos que se encontrem em concentrações muito baixas (Alfaya & Kubota, 2002; Meng *et al.*, 2009).

A caracterização de um sistema biológico com alto grau de precisão necessita o conhecimento deste, suas propriedades estruturais, bem como estabilidade na conformação das moléculas interagindo ou não com ligantes específicos (Bassi *et al.*, 1999). O fenômeno da interação em um sistema biológico pode ser descrito, na interface de biomoléculas, através de métodos eletroquímicos (Fricquelmont-Loïzos *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1999).

A imersão de um biossensor em solução de interesse ocasiona a difusão do substrato para o interior da membrana, onde se encontra o material biológico imobilizado que catalisa a reação, formando-se assim os produtos ou consumindo co-substratos eletroativos tais como H_2O_2 , CO_2 , NH_3 , O_2 , ácidos, entre outros (Filho-Fatinelo *et al.*, 1992). A energia desenvolvida por essa reação pode ser convertida, pelo biossensor, em um impulso, potencial ou corrente elétrica; uma mudança de cor (Riccardi *et al.*, 2002), chamada transdução óptica (Pinheiro & Raimundo, 2005), ou

mudança de massa, que conduz, por exemplo, uma mudança na frequência de vibração de um cristal piezoelétrico, entre outras (Riccardi *et al.*, 2002), Figura 10.

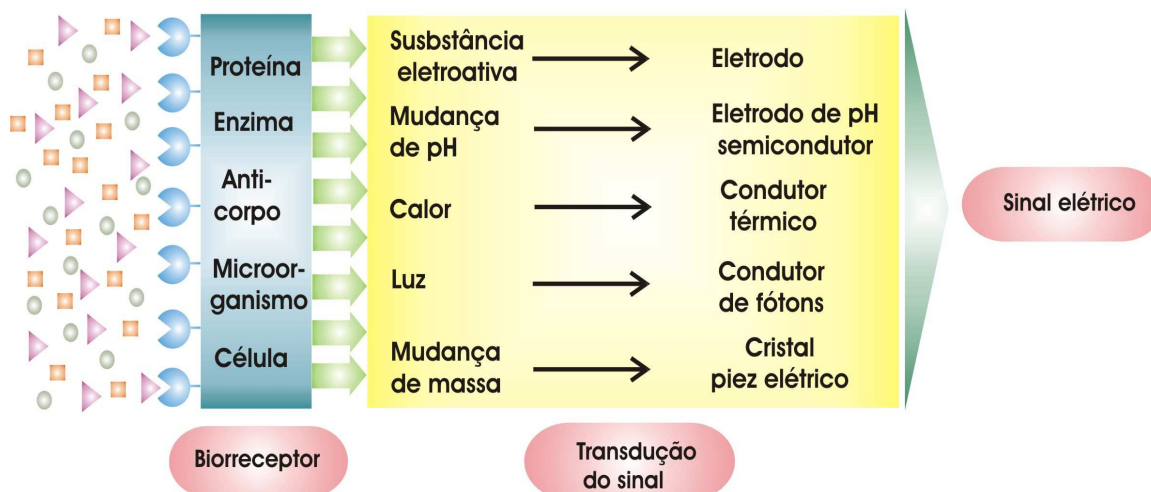


Figura 10: Representação esquemática do princípio do biossensor.

Fonte: Jadilma Cosme Pimentel

Um sensor biológico necessita apresentar parâmetros característicos como sensibilidade, estabilidade e tempo de resposta hábil. Hodiernamente biossensores têm sido usados no monitoramento contínuo de processos biológicos e sintéticos, e ajudam no entendimento desses processos. Aplicações típicas incluem monitoramento e controle ambiental, bem como medidas químicas na agricultura, alimento (Zhang *et al.*, 2000; Sozer & Kokini, 2009) e indústrias de droga (Rogers & Gerlach, 1996), além de monitoramento em tempo real *in vivo*, que substitui as técnicas analíticas intermitentes usadas em química industrial e clínica (Zhang *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2007).

O biossensor tem demonstrado a mesma precisão, quando comparado à metodologia aplicada atualmente para certos exames, como de urina e em alimentos, por exemplo, no entanto, tem demonstrado maior simplicidade e economia. Tem facilitado, na medicina (Basu *et al.* 2007; Du *et al.*, 2008), a identificação e quantificação de

metabólitos de forma específica, mesmo em quantidades muito pequenas de amostras, como nos líquidos corpóreos. Mormente, sendo a análise feita em tempo real o paciente pode ser atendido mais rapidamente (Alfaya & Kubota, 2002; Riccardi *et al.*, 2002; Wee, *et al.*, 2005; Nordin *et al.*, 2005). Biossensores são aplicados também em análises veterinárias, controle e análise de processos de fermentação, análises virais, bacterianas e farmacêuticas, controle industrial, aplicações militares (Rogers & Gerlach *et al.*, 1996) e para o controle e monitoramento da poluição (Rosatto *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2005).

Foi construído um sensor biológico balizado no método colorimétrico para a identificação rápida de subespécies de *Escherichia coli*, onde utilizaram nove lectinas de baixo custo; devido aos resultados obtidos experimentalmente; acredita-se que este sistema é uma grande promessa para a identificação microbiológica em amostras reais (Ertl *et al.*, 2003). Strianese et al. (2009) realizaram testes, utilizando um biossensor, para o monitoramento do crescimento bacteriano e sua susceptibilidade à antibióticos. Pickup *et al.* (2004) reportaram um sensor para monitorar glicose, baseado no método fluorescente, tendo efetuado testes *in vivo*.

2 Objetivo Geral

Caracterizar as lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) e de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) através de sistemas potenciométricos e amperométricos.

2.1 Objetivos Específicos

Analisar as propriedades eletroquímicas da lectina de folhas de *Bauhinia monandra* interagindo ou não com carboidratos específicos livres ou de membrana celular para relacionadas a trocas de cargas superficiais presentes na BmoLL.

Determinar os potenciais eletroquímicos gerados pela interação da lectina sementes de *Cratylia mollis*, Cramoll, em solução com carboidratos livres para explorar a distribuição de cargas sobre a superfície da lectina.

Avaliar a interação da lectina de folhas de *B. monandra*, imobilizada em nanoporos de Nafion, com endofíticos, da linhagem UFPEDA 598, isolados de folhas de *Bauhinia monandra*, através de métodos potenciométricos e amperométricos.

Analisar a inibição da interação dos endofíticos, da linhagem UFPEDA 598, isolados de folhas de *Bauhinia monandra* com BmoLL imobilizada em nanoporos de Nafion, com carboidratos específicos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; STÖCKER, M.; CONSTENLA, M. A. 1988. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, v.27, n. 6, p. 1571-1931.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. 2002. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel, na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. 2005. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 467-470.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. A. 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into lipossomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-445.

ANDRADE, C. A. S.; OLIVEIRA, M. D. L.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S., CORREIA, M. T. S.; MELO C. P. 2009. Comparison of the interfacial properties of *Eugenia uniflora* and *Triticum vulgaris* lectins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 7-12.

ANTONYUK, L.P. & EVSEEVA, N.V. 2006. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. **Microbiology**, v. 75, p. 470-475.

ANZAI, J.; KOBAYASHI, Y.; NAKAMURA, N.; HOSHI, T. 2000. Use of Con A and mannose-labeled enzymes for the preparation of enzyme films for biosensors. **Sensors and Actuators**. v. 65, p. 94-96.

ARGEL, P. J.; LASCANO, C. E. 1998. *Cratylia argentea* O. Kuntze: Una nueva leguminosa arbustiva para suelos ácidos en zonas húmedas tropicales. **Pasturas Tropicales**, v. 20, n. 1, p. 37-43.

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

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, Jr.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 40-65.

AZEVEDO, J. L; Jr MACCHERONI, W; de ARAÚJO, W. L; PEREIRA, J. O. 2002. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A; de BARROS, N. M; AZEVEDO, J. L. (Ed.) Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. **Caxias do Sul: EDUCS**, Cap. 8, p 233-268.

- AZEVEDO, J. L. 1998. Microorganismos endofiticos. In: I. S. MELO e J. L. AZEVEDO. **Ecologia Microbiana. EMBRAPA, Jaguariima**, São Paulo, p. 117-137.
- BADAMI, R. C.; DAULATABAD, C. D. 1969. Component acids of *Bauhinia* seed oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 20, p. 99-100.
- BARBOSA, T.; ARRUDA S.; CAVADA B.; GRANGEIRO T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETO M. 2001. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 96, p. 673-678.
- BASSI, A. S.; TANG, D.; BERGOUGNOU, M. .A. 1999. Mediated amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg^{+2} ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. **Analytical Biochemistry**, v. 268, n. 2, p. 223-228.
- BASU, A. K.; CHATTOPADHYAY, P.; ROYCHOUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. 2007. Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 2, p. 375-379.

BELTRÃO, E. I. C., CORREIA, M. T. S., FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. 1998. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 125-134.

BLADIER, D.; JOUBERT, R.; AVELLANA-ADALID, V. et al. 1989. Purification and characterization of a galactoside-binding lectin from human brain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 269, n. 2, p. 433-439.

BORISOV, S. M. E WOLFBEIS, O. S. 2008. Optical Biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 423-461.

BROOKMAN, P. J.; NICHOLSON, J. W. 1986. in: Developments in Ionic Polymers, vol. 2; eds. A. D. Wilson and H. J. Prosser, **Elsevier Applied Science Publishers: London**, p. 269-283.

BRUNO, L.; BARRA, G.; MANSUR, H.; ORÉFICE, R. L. 2004. Imobilização de proteínas do veneno do escorpião *Tytilus serrulatus* em blenda condutora de polianilina-Poli (metacrilato hidroxietila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n.3, p. 156-161.

BOYD, W. C. & SPHAPLEIGH, E. 1954. Diagnosis by subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (lectins). **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 235 –245.

BUGNI, T.S. and IRELAND, C.M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v.21, p.143-63.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. 2000. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 207-223.

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

CONN, V.M.; WALKER, A. R.; FRANCO, M. M. 2008. Actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 2, p. 208-218.

CORREIA M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. 1995. Purification of glucose/manose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-267.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P.M.G. 2008. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? **Recent Trends in Toxicology**, 47-59.

COHEN, Y.; LEVI, S.; RUBIN, S. W. 1996. Modified monolayer electrodes for electrochemical and piezoelectric analysis of substrate-receptor interactions: novel immunosensor electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 417, p. 65-75.

COHEN, O. J.; KING, B. C.; MAWKRIE, F. M.J. 1998. Spectroelectrochemical and electrochemical determination of ligand binding and electron transfer properties of myoglobin, cyanomyoglobin, and imidazolemyoglobin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 447, p. 53-62.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 636-643.

DENG, A.; CHENG, J.; HUANG, H. 2002. Application of polyaniline based ammonium sensor for the amperometric immunoassay of an urease conjugated Tal 1 protein. **Analytica Chimica Acta**, v. 461, p. 49-55.

DE SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; TRAPANI, S.; SANTOS, A. C. O.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J.; FAÇA, V. M.; CORREIA, M. T. S.; TAVARES, G. A.; OLIVA, G.; COELHO, L. C. B. B.; GREENE, L. J. 2003. Amino acid sequence tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, v. 13, n. 12, p. 961-972

DINH, H. L.; HORI, K.; QUANG, N. H. 2009. Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 89-97.

DRICKAMER, K. 1998. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, n. 263, p. 9557-9560.

DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. 2008 Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry** v. 614, p.149–156

EAST, G. A.; VALLE, M. A. 2000. Easy-to-Make Ag/agCl Reference Electrode. **Journal of Chemical Education**, v. 77, n. 1, p. 97-110.

ELDER, G. H.; TOVEY, J. A.; SHEPPARD, D. A. 1983. Protein Purification: Classical Approaches. **Biochemical Journal**, v. 215, p. 45-55.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. 1997. Lectin-Carbohydrates Interactions: Different Folds, Common Recognition Principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 462-467.

ERTL, P.; WAGNER, M.; CORTON, E.; MIKKELSEN, S. R. 2003. Rapid identification of viable *Escherichia coli* subspecies with an electrochemical screen-printed biosensor array. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 907-916.

FILHO-FATINELO, O.; CAPELATO M. 1992. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39.

FRICQUELMONT-LOÏZOS, M.; TAKENOUTI, H.; KANTÉ, W. J. 1997. Long-time and short-time investigation of electrode interface through electrochemical impedance measurements. Application to adsorption of human serum albumin onto glassy carbon rotating disc electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 428, p. 129-140.

GABOR, F., KLAUSEGGER, U., WIRTH, M. 2001. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35-47.

GUO, S.; DONG, S. 2009. Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 96-109.

HAMADA, S.; GILL K.; SLADE H. D. 1977. Binding of lectins to *Streptococcus mutans* cells and type-specific polysaccharides, and effect on adherence. **Infection and immunity**, 18,708-716.

HAJTÓ, T.; HOSTANSKA, K.; BERKI, T.; PÁLINKAS, L.; BOLDIZSÁR, F.; NÉMETH, P. 2005. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): overview of recent results from *In vitro* experiments and *In vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 59-67.

HARUYAMA, T.; SAKAI, T.; MATSUMOTO, K. 2005. Protein layer coating method on metal surface by electrochemical process through genetical introduced tag. **Biomaterials**, v. 26, p. 4944-4947.

HATAKEYAMA, T.; MATSUO, N.; AOYAGI, H.; SUGAWARA, H.; UCHIDA, T.; KURISU, G.; KUSUNOKI, M. 2002. Crystallization and preliminary crystallographic study of an invertebrate C-type lectin, CEL-I, from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. **Biological Crystallography**. v. 8, p. 143-144.

HAWA, G.; SCHALKHAMMER, T.; MANN-BUXBAUM, E.; PITTNER, F. 1993. Ligand interaction based electrochemical glucose sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 16, p. 423-428.

HELMHOLZ, H.; CARTELLIERI, S.; HE, L.; THIESEN, P.; NEIMEYER, B. 2003. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography A**, v. 1006, p. 127-135.

HIRSCH, A. M. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current opinion in plant biology**, v.2, p. 320-326.

HO, C. K.; ROBINSON, A.; MILLER, D. R.; DAVIS, M. J. 2005. Overview of sensors and needs for environmental monitoring. **Sensors**, v. 5, p. 4-37.

HONG, J.; GHOURCHIAN, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Direct electron transfer of redox proteins on a Nafion-cysteine modified gold electrode. 2006. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p.1572–1576.

HUANGA, L.; ADACHIA, T.; SHIMIZUA, Y.; GOTOA, Y.; TOYAMAB, J.; TANAKA, H.; AKASHI, R.; SAWAGUCHI, A.; IWATA, H.; HAGA, T. 2008. Characterization of lectin isolated from *Momordica charantia* seed as a B cell activator, **Immunology Letters**, v. 121, p. 148–156.

HWANG, G. M.; PANG, L.; MULLEN, E. H.; FAINMAN, Y. 2008. Plasmonic sensing of biological analytes through nanoholes. **Sensors Journal**, v. 8, n. 12, p. 2074-2079.

IGNATOV, S.; SHISHNIASHVILI, D.; GE, B.; SCHELLER, F. W.; LISDAT, F. 2002. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, p. 191- 1999.

ISKRATSCH, T.; BRAUN, A.; PASCHINGER, K.; WILSON, I. B. H. 2009. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 386, p. 133–146.

ITO, T. 2001. Ion-channel-mimetic sensor for trivalent cations based on self-assembled monolayers of thiol-derivatized 4-acyl-5-pyrazolones on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.495, p. 87-97.

JANKOVIĆ, M.; GOLUBOVIĆ, S. 2000. 200 kDa glycoprotein isolated from breast cancer tissue: a putative ligand for galectin-1. **Archive of Oncology**, v. 8, n. 2, p. 39-43.

KABIR, S. 1998. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193-211.

KENNEDY, J., PAIVA, P. M., CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTE, M.; COELHO, L. C. B. B. 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230.

KOBAYASHI, Y. AND ANZAI, J. Preparation and optimization of bienzyme multilayer films using lectin and glyco-enzymes for biosensor applications. 2001. **Journal of Electroanalytical Chemistry** v. 507, p. 250 -255.

KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. 2003. Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erytrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p.222-229.

LIU, Y.; GORE, A.; CHAKRABARTTY S.; ALOCILJA, E. C. 2008. Characterization of sub-systems of a molecular biowire-based biosensor device. **Microchimica Acta** v.163, p. 49–56

LOWINSOHN, D. E.; BERTOTTI, M. 2006. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, V. 29, N. 6, p. 1318-1325.

LUO, S.; ZHANGSUN, D.; TANG, K. 2005. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 184-191.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; 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 Physiology and Biochemistry - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, p. 486–498.

MACIEL, E. V. M.; ARAÚJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, n. 1, p. 57 – 60.

MAITLAND, P. D.; MAITLAND, D. 2002. Chromatography: Are we getting it right?. **Journal of Biological Education**, v. 37, n. 1, p. 6-8.

MARINESCO, S.; CAREW, T. J. 2002. Improved electrochemical detection of biogenic amines in *Aplysia* using base-hydrolyzed cellulose-coated carbon fiber microelectrodes. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 117, p. 87-97.

MARKEN, F., CHISTOPHER A. P., ASOGAN, D. 2002. Direct cytochrome and electrochemistry at boron-doped diamond electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, p. 62-66.

MATSUI, T.; HAMATO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. 2001. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50-57.

MATSUMOTO, T.; FURUSAWA, M.; FUJIWARA, H.; MATSUMOTO, Y.; ITO, N. 1998. A micro-planar amperometric glucose sensor unsusceptible to interference species. **Sensors and Actuators B**, v. 49, p. 68-72.

MCGOVERN, M. S.; GARNETT, E. C.; RICE, C.; MASEL, R. I.; WIECKOWSKI, A. 2003. Effects of Nafion as a binding agent for unsupported nanoparticle catalysts. **Journal of Power Sources**, v. 115, p. 35-39.

MECKLENBURG, M.; AVITEL, J.; WINQUIST, F.; GANG, J.; ORNSTEIN, K.; DEY, E.; BIN, X.; HEDBORG, E.; NORRBY, R.; AEWIN, H.; LUUNDSTRÖM, I.; DANIELSSON, B. 2002. Differentiation of human serum samples by surface plasmon resonance monitoring of the integral glycoprotein interaction with a lectin panel. **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 25-31.

MENG, L.; WU, P.; CHEN, G.; CAI, C.; SUN, Y.; YUAN, Z. 2009. Low potential detection of glutamate based on the electrocatalytic oxidation of NADH at thionine/single-walled carbon nanotubes composite modified electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 24, n. 6, p. 1751-1756.

MILAZZO, G.; BOMBARA, G. 1960. Reference electrodes and tensions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 265-284

MIMICA, D., ZAGAI, J. H., BEDIQUI, E. 2001. Electroreduction of nitrite by hemin, myoglobin and hemoglobin in surfactant films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 497, p.106-113.

MOREIRA, R. A.; AINOUI, I. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. 1991. Plant lectins: chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211 – 218.

MUÑOZ-CREGO, A.; ALVAREZ, O.; ALONSO, B.; ROGERS, D.J.; LLOVO J. 1999. Lectins as diagnostic probes in clinical bacteriology – an overview. **The Electronic Lectin Journal: “Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry”**, v. 13, n. 87.

NADZHAFOVA, O. Y.; ZAITSEV, V. N.; DROZDOVA, M. V.; VAZE, A.; RUSLING, J. F. 2004. Heme proteins sequestered in silica sol–gels using surfactants feature direct electron transfer and peroxidase activity. **Electrochemistry Communications**, v. 6, p. 205-209.

NASSAR, A. E. F.; WILLIS, W. S.; RUSLING, J. F. 1995. Electron Transfer from Electrodes to Myoglobin: Facilitated in Surfactant Films and Blocked by Adsorbed Biomacromolecules. **Analytical chemistry**, v. 67, p. 2386-2392.

NIAURA, G., GAIGALAS, A. K; VILKER, V. L. 1996. Non-resonant SERS study of the adsorption of cytochrome C on a silver electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.416, p. 167-178.

NIKI, K., SPRINKLE, J. R., MARGOLIASH, E. 2002. Intermolecular biological electron transfer: an electrochemical approach. **Bioelectrochemistry**, 55, 37-47.

NOMURA, K.; ASHIDA, H.; UEMURA, N.; KUSHIBE, S.; OZAKI, T.; YOSHIDA, M. 1998. Purification and caracterização of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenatai*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 667-673.

NORDIN, H.; JUNGNELIUS, M.; KARLSSON, R.; KARLSSON, O. P. 2005. Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology. **Analytical Biochemistry**, v. 340, p. 359-368.

OKA, Y.; SPIEGEL, Y. 1997. Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodea avanae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 51, p. 333-345.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; SILVA, E. E.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. 2004. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.295-299.

PAIVA, P. M. G. ; COELHO, L. C. B. B. 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean).. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, The Humana Press Inc., v. 36, n. 00, p. 113-118.

PANDO, L. A.; CARVALHO, D. D.; TOYAMA, M. H.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C.; PASCHOLATTI, S. F.; MARANGONI, S. 2004. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **The Protein Journal**, v. 23, n. 7, p. 437-444.

PARTHASARATHY, S.; RAMYA, K.; VENKATES, V. K.; 1995. Standard potential of hydrogen electrode. **Current Science**, v. 69, n. 10, p. 871-874.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. 1995. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. 1998. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in Biotechnology. **Biotechnology And Genetic Engineering reviews**, v. 15, p. 199-228.

PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; HAO, Q.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. M. 2000. Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 12, n. 64, p. 83-101.

PICKUP, J.; HUSSAIN, F.; EVANS, N. D.; ROLINSKI, O. J.; BIRCH, D. J. S. 2005. Fluorescence-based glucose sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 2555-2565.

PINHEIRO, S. C. L. E RAIMUNDO JR. I. M. 2005. Uso de membranas de nafion para a construção de sensores ópticos para medidas de pH.. **Química nova**, v. 28, N. 5, p. 932-936

PORTERFIELD, D. M.; LASKIN, J. D.; JUNG, S. K.; MALCHOW, R. P.; BILLACK, B.; SMITH, P. J. S.; HECK, D. E. 2001. Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 28, p. 1904-1912.

QUEIROZ, L. P.; CORADIN, L. 1995. Biogeografia de *Cratylia* e áreas prioritárias para coleta. Ed. **EMBRAPA, Memórias Taller sobre Cratylia**. p. 1-28.

RABIJINS, A.; VERBOVEN, C.; ROUGÉ, P.; BARRE, A.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; DE RANTER, C. J. 2001. Structure of a legume lectin from the bark of *Robinia pseudoacacia* and its complex with N-acetylgalactosamine. **Proteins**, v. 44, n.4, p. 470-478.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. 1998. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Science**, v. 139, p. 141-148.

REZENDE-NETO, J. M. 2003. Avaliação da atividade agregante e antiagregante plaquetária de formas moleculares das lectinas de sementes de *Cratylia mollis* MART. Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências Biológicas. Mestrado em Bioquímica

RICCARDI, C. S. ; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. 2002. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320.

RODAL, M. J. N.; ANDRADE, K. V. A.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S. 1998. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetal no município de Buíque, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 3, p. 517-526.

ROGERS, K. R.; GERLACH, C. L. 1996. Environmental biosensors: a status. **Report Environmental Science & Technology**, v.30, p. 486-491.

ROOPASHREE, S.; SINGH, S. A.; GOWDA, L. R.; RAO, A. G. 2006. Dual-function protein in plant defence: seed lectin from *Dolichos biflorus* (horse gram) exhibits lipoxygenase activity. **Biochemical Journal**, 395 (3), p. 629-639.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. 2001. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86.

ROSENBLUETH, M. and MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-837.

ROSILIO, V.; BOISSONNADE, M.; COELHO, L. C. B. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ANDRADE, C. A. S.; BASZKIN, A. 2004. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 250, p. 491-497.

ROVER-JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C. H.; DIAZ-MARINHO, T.; GABIOS, H. J. 2000. Medical chemistry based on the sugar code; fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 389-416.

SÁ, R. A.^a; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. 2009. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.149, p. 300-306.

_____ ^b; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W. 2009. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Journal Wood Science and Technology**, v. 43, p. 85 – 95.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. 1998. FUNGAL ENDOPHYTES: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p.319-343

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508.

SANTOS, M. M. C.; SOUSA, P. M. P.; GONÇALVES, M. L. S.; KRIPPAHL, L.; MOURA, J. J. G.; LOJOU, E.; BIANCO, P. 2003. Electrochemical studies on small electron transfer proteins using membrane electrodes. **Journal of Electrochemical Chemistry**, v. 541, p. 153-162.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. 1998. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. **Botanica Marina**, v. 41, p. 427-433.

SCHWARZ, F. P., SUROLIA, A., BHAT, R. G.; PURIT, K. D. 1993. Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, Pea (*Pisum sativum*) lectin, and lentil

(*lens culinaris*) lectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n.11, p. 7668-7677.

SERRA, B.; GAMELLA, M.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. 2008. Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 1853–1860.

SHARMA, P. K.; SARITA, S.; PRELL, J. 2005. Isolation and characterization of an endophytic bacterium related to *Rhizobium/Agrobacterium* from wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Current Science**, v. 89, p. 608-610.

SHARON, N., LIS, H. 1972. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959.

SHARON, N. 1993. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, 221-226.

SHARON, N., LIS, H. 1998. A century of lectin research. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491.

SHARON, N.; LIS, H. 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 491, p. 1-16.

SHEN, Z.; HUANG, M.; XIAO, C.; ZHANG, Y.; ZENG, X.; WANG, P. G. 2007. Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 2312-2319.

SHEPPARD, A. S.; CAMPBELL, A. S.; SMITH, J. R.; LLOYD, G. W.; RALPH, T. R.; WALSH, F. C. 1998. Electrochemical and microscopic characterisation of platinum-coated perfluorosulfonic acid (Nafion 117) materials. **The Analyst**, v. 123, p. 1923-1929.

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. 2005. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 17-26.

SILVA, A. J. R.; ANDRADE, L. H. C. 2005. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 45-60.

SILVA, G. M. C.; SILVA, H.; CAVALCANTI, M. L. F.; MARTINS, P. L. 2003. Autecologia *Bauhinia forficata* L. – Espécie ameaçada de extinção no ecossistema da Caatinga. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, n. 2, p. 52-66.

SILVA, M. D.C.; SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. 2009. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal

activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 334-340.

SILVA, M. L.; FILHO, V. C. 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454.

SING, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. 1999. Lectins: saucers, activities and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 145-178.

SOSNITZA P.; FAROOQUI M.; SALEEMUDDIN M.; ULBER, R.; SCHEPER T. 1998. Application of reversible immobilization techniques for biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 368, p.197-203.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. M.; 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**, v. 46, n.2, p. 191-193.

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**, v. 88, p. 255-258.

SOZER, N. & KOKINI, J. L. 2009. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89.

STOWELL, S. R.; QIAN, Y.; KARMAKAR, S.; KOYAMA, N. S.; DIAS-BARUFFI, M.; LEFFLER, H.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. 2008. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **Journal of Immunology**, V. 180, p. 3091-3105.

STRIANESE, M.; ZAUNER, G.; TEPPER, A. W. J. W.; BUBACCO, L.; BREUKINK E.; AARTSMA, T. J.; CANTERS, G. W.; TABARES, L. C. 2009. A protein-based oxygen biosensor for high-throughput monitoring of cell growth and cell viability. **Analytical Biochemistry**, v.385, p. 242–248.

SUGAWARA, K.; KURAMITSU, H.; HOSHI, S.; AKATSUKA, K.; TANAKA, S.; NAKAMURA, H. 1998. Electrochemical detection of lectin using a galactosamine labeled with daunomycin. **Talanta**, v. 47, p. 665-671.

SUGAWARA, K.; KURAMITSU, H.; HOSHI, S.; AKATSUKA, K.; TANAKA, S.; NAKAMURA, H. Electrochemical detection of lectin using a galactosamine labelled with daunomycin. **Talanta**, 2000, v. 47, p. 665-671.

SUMNER, J. B. 1919. The Globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 37, p. 137-142.

SUZUKI Y, INOUE T, YOSHIMARU T, RA C. 2008. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1783, n. 5, p. 924 – 934.

TAN, R.X. and ZOU, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p. 448-59.

TAN, L.; JIA, X.; JIANG, X.; ZHANG,Y.; TANG, H.; YAO, S.; XIE, Q. 2008. Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**, v. 383, p.130–136.

TAVARES, G. A.; CARACELLI, I.; BURGER, C. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVA, G. 1996. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectina from the seeds of *Cratylia mollis*. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, Great Britain, v. D52, p. 1046-1047.

TIAN F.; ZHU, G. 2002. Bionzymatic amperometric biosensor for glucose based on polypyrrole/ceramic carbon as electrode material. **Analytical Chimica Acta**, v.451, p. 251-58.

VANDENKOORNHUYSE, P.; BALDAUF, S. L.; LEYVAL, C.; STRACZEK, J.; YOUNG, P. W. 2002. Extensive Fungal Diversity in Plant Roots. **Science**, v.295, p. 2051-2052.

WANG, J. X.; LIU, J.; CEPRA, G. 1997 Thermal stabilization of enzymes immobilized within carbon paste electrodes. **Analytical Chemical**, v. 69, p. 3124 – 3127.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostretus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 3, p. 810– 816.

WEE, K. W.; KANG, G. Y.; PARK, J.; KANG, J. Y.; YOON, D. S.; PARK, J. H.; KIM, T. 2005. S. Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 1932–1938.

WEN, Y. L.; YANG, X.; HU, G.; CHEN, S.; JIA, N. 2008. Direct electrochemistry and biocatalytic activity of hemoglobin entrapped into gellan gum and room temperature ionic liquid composite system. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 744–748.

YE, X. Y. & NG, T. B. 2001. Peptides from Pinto Bean and Red Bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein exhibit antifungal, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase – inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 424-429.

YOSHIZUMI, A.; KANAYAMA, Y. M.; IDE, M.; KITANO, H. 1999. Selfassembled monolayer of sugar-carrying polymer chain: sugar balls from 2-methacryloyloxyethyl D-glucopyranoside. **Langmuir**, v. 15, p. 482-448.

ZHANG, S.; Wright, G.; Yang, Y. 2000. Materials and Techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, p. 273-282.

ZHANG, Y.; MU, J.; FENG, Y.; KANG, Y.; ZHANG, J.; GU, P.; WANG, Y.; MA, L.;

ZHU, Y. 2009. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy. **Marine Drugs**, v. 7, p. 97-112.

**ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF
THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY.**

**An Electrochemical Model to Evaluate Lectin-
Carbohydrate Interactions**

An Electrochemical Model to Evaluate Lectin-Carbohydrate Interactions

Jadilma C. Pimentel ^{b*}; Maria M. B. R. Silva^b; Maria T. S. Correia ^b; Sandra R. Souza^a; Luana C. B. B. Coelho^b

^aDepartamento de Ciências Biológicas da Faculdade Frassinetti do Recife-FAFIRE-PE; Avenida Conde da Boa Vista, 921, Boa Vista, Recife, 50060-002, Pernambuco, Brasil. *.E-mail: jadilma_cosme@ig.com.br

^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE. Avenida Moraes Rego, SN, Cidade Universitária, Recife, 50670-420, Pernambuco, Brasil.

A lectina de folha de *Bauhinia monandra* (BmoLL), específica à galactose, e a lectina da semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4), específica à glicose e manose, têm sido purificadas por meio de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade. Um sistema eletroquímico foi desenvolvido para avaliar os potenciais eletroquímicos de BmoLL e Cramoll 1,4 obtidos através de técnicas potenciostáticas usando diferentes soluções salinas como meios eletrolíticos para avaliar a distribuição de cargas entre o eletrodo de Ag/AgCl, eletrodo de referência, e um eletrodo de platina, eletrodo de trabalho. Os melhores potenciais para BmoLL (0,31 a 0,18 V vs Ag|AgCl) e Cramoll 1,4 (0,25 a 0,21 V vs Ag|AgCl) foram determinados. O modelo proposto é um potencial biossensor altamente sensível.

Palavras-chaves: Lectina de folha de *Bauhinia monandra*; ligação proteína-carboidrato; Lectina de semente de *Cratylia mollis*; modelo eletroquímico; sistema potenciométrico.

Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL), galactose specific, and *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll 1,4), glucose/mannose specific, have been purified through ammonium sulphate fractionation followed by affinity chromatography. An electrochemical system was developed to evaluate BmoLL and Cramoll 1,4 electrochemical potentials obtained through potentiostatic techniques using different salt solutions as carriers to evaluate charge distribution between Ag/AgCl electrode, reference electrode, and a platinum electrode, work electrode. The best electrochemical potentials for BmoLL (0.31 to 0.18 V vs Ag|AgCl) and Cramoll 1,4 (0.25 to 0.21 V vs Ag|AgCl) were determined. The proposed model is a highly sensitive potential biosensor.

Keywords: *Bauhinia monandra* leaf lectin; carbohydrate-binding protein; *Cratylia mollis* seed lectin; electrochemical model; potentiometric system.

Introduction

Electrochemical systems are analytical instruments used to determine electro-active species present in a sample solution under evaluation. These devices are widely used due to the increased necessity of simple, fast and economical analytical tests to obtain chemical and biological determinations in very low reagent concentrations.¹ A biosensor is characterized by sensitivity, stability and time of response; its typical applications include chemical measurements in medicine,² agriculture, food and drug industries.³ Sensor devices are also applied in veterinarian analysis, viral processes, bacterial and pharmaceutical fermentations, military applications⁴ as well as pollution control and monitoracy.^{3,5}

Lectins comprise a structurally very diverse class of proteins of a non-immune nature that are found in many types of organism ranging from viruses to humans. Transport proteins,

enzymes and toxins may qualify as lectins if they contain carbohydrate-binding sites, which could or not agglutinate cells or precipitate structures that contain sugar residues.⁶ They may be soluble or membrane-bound and are widely used as analytical and preparative agents in the study of glycoproteins.⁷

Bauhinia genus has been studied for its medicinal properties such as hypoglycemic trials. *Bauhinia monandra* leaves contain relatively high concentration of a galactose-specific lectin (BmoLL); more than 2 mg of lectin were obtained from 5 g of leaf powder.⁸ *B. monandra* leaf preparations containing BmoLL have already revealed hypoglycemic properties in rats; the interfacial behavior of BmoLL and its ability to interact with lipid monolayers have been studied by surface tension measurements.⁹ Also, ethanolic extracts from *B. monandra* leaves showed antioxidant activities;¹⁰ BmoLL insecticidal action has also been evaluated.¹¹ *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll, have different molecular forms, isolectins and isoform (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4), with different monosaccharide specificities.¹² Cramoll 1,4 have been used to detect normal and transformed cells, benignant or malignant.¹³ Cramoll isolectin 1 (Cramoll 1) was sequenced¹⁴ and crystallized;¹⁵ it revealed immunogenic¹⁶ and anti-tumoral activities.¹⁷ Cramoll 1 and Cramoll 1,4 also showed mitogenic activity.¹⁸

Many studies are being carried out to identify and characterize lectin carbohydrate interactions¹⁹ and electrochemical systems have been of great importance as a relatively easy and trustworthy methodology. In this work BmoLL and Cramoll 1,4 carbohydrate biospecific bindings were evaluated under different charged environments using an analytical sensor assembly. This new method could broadly unravel biological phenomena involving lectins and specific carbohydrates.

Materials and Methods

Purification of BmoLL and Cramoll 1,4 and electrochemical potential determinations

BmoLL and Cramoll were purified through extraction, ammonium sulphate fractionation (F0-60%) and affinity chromatographies in guar gel column⁸ and Sephadex G-75,¹⁶ respectively.

Electrochemical potentials were determined in 200 and 300 mmol.L⁻¹ phosphate buffers as well as 150 mmol.L⁻¹ NaCl, in absence and presence of specific carbohydrates to BmoLL (0.5 mg/ml; 200 to 1000 mmol.L⁻¹ galactose) and Cramoll 1,4 (1.0 mg/ml; 200 to 1000 mmol.L⁻¹ glucose), in the below mentioned electrochemical cell.

Reference electrode (Ag/AgCl) and confection of platinum work electrode

The electrochemical potential of Ag | AgCl electrode was evaluated in relation to a calomel saturated reference electrode.²⁰

The work electrode was made of a double platinized platinum sheet connected with a platinum wire; it showed a greater charge potential in relation to reference electrode (Figure 1). These electrodes were coupled to a high impedance multimeter to register electrochemical potentials (Figure 2).

Phosphate buffer preparations and calibrations were performed using solutions of monobasic and dibasic potassium phosphate prepared in 50 mmol.L⁻¹, 100 mmol.L⁻¹, 200 mmol.L⁻¹, 300 mmol.L⁻¹ and 400 mmol.L⁻¹ concentrations. The computer statistical analysis was processed by Microcal (TM) ORIGIN, version 6.0, Microcal Software.

Results and Discussion

An important issue in life sciences is to explore the structure-function relationship of protein molecules in an environment and the ligand effect on their structural and dynamic characteristics. Perturbations introduced by conformational structure changes in protein molecules can affect the analyzed molecule interfacial tension which may be of particular importance for the specific function.

The availability of pure BmoLL and Cramoll in milligram amounts, with pharmacological applications,^{9, 17, 21} as well as previous approaches to define electrochemical potential of free and immobilized Cramoll²² have raised interest to evaluate lectin carbohydrate interactions under distinct charged environments.

Protein adsorption on metal electrodes is of interest to develop potentiometric²³ and amperometric biosensors.²⁴ These methods reveal charge transfer processes occurring in the electrode/electrolyte interface, with fundamental importance to study macromolecular superficial charges²⁵ to apply in analytical systems²⁶ and studies of charged proteins.²⁷

Electrochemical systems have been widely used for specific evaluation of interactions between biomolecules and respective ligands.²⁸ An electrochemical system characterization of a redox protein is important to unravel the biological functions of macromolecules.²⁹ Potentiometric sensors have been applied to determine a variety of biological analytes using different types of Ag|AgCl reference electrode containing 3 M KCl as inner electrolyte or KCl-containing membrane.³⁰ The electrochemical system using platinum electrode *versus* Ag|AgCl (3M KCl) reference electrode was efficient to measure BmoLL and Cramoll specific carbohydrate interactions. Under all experimental conditions the formation of protein layer on electrode surface is an effective model used to study the electron transference at the electrode/solution interface.²⁴ An electrochemical potential is generated by protein charge accommodation in electrode surface submitted to an electric field. This measurement depend

upon adsorbed molecule conformation, adsorption forces, metallic surface composition and electrolyte solutions³¹ as well as applied electrochemical system properties.³²

Protein activity in general occurs at a pH range between 5 and 9; alterations beyond these limits can induce its denaturation or inactivation. The use of buffers confers to steady state a unique pH, in which proteins are in constant activity. In the present work (Figure 3) the electrochemical system was applied to evaluate BmoLL and Cramoll 1,4 interfaces with electrode/electrolyte interactions as analyzed through electrochemical potentials under different conditions. All buffer measurements were performed at pH 6.5, with active lectins; potentials in phosphate buffer stabilized after 50 min. Curves for 200 and 300 mmol.L⁻¹ phosphate buffer had a better charge accommodation in electrode surface, with stable electrochemical potentials. BmoLL and Cramoll 1,4 electrochemical potentials under 200 and 300 mmol.L⁻¹ phosphate buffer or 150 mmol.L⁻¹ NaCl, in carbohydrate absence, had also revealed higher values in relation to those obtained in the same electrolytic solutions with galactose or glucose (200, 400, 600, 800 and 1000 mmol.L⁻¹).

The principles based on charge distribution of double electric layer on Cramoll 1,4 interface system adsorbed on a platinum electrode surface or immobilized to active glass surface with aminopropyletoxysilane, APTES, made possible to construct the first electrochemical sensor to define analytical forms of lectin in saline solutions interacting with ligand.²³ In general, red cell agglutination interactions have been used to detect lectin activity; even so, a fast and convenient system is necessary to elucidate lectin and carbohydrate interactions.¹⁸ The presence of binding sites to carboxylated groups in cytochrome C was confirmed through electrochemical potential interactions regulated by electron transference between protein exposed to an electric field and different concentrations of ligands.^{19, 33}

Positive electrochemical potentials are important for studies of redox systems.³⁴ BmoLL and Cramoll 1,4 electrochemical potentials were positive and stabilized. Systems that can determine the charge distribution in protein surfaces such as lectins or enzymes³⁵ were carried out to define relative affinity of these molecules to cellular receptors in live organisms.

A redox system to glucose analysis with *Canavalia ensiformis* seed lectin, Concanavalin A (Con A) obtained better result at 0.16 V electrochemical potential, in phosphate buffer at pH 6.9, with 100 mmol.L⁻¹ glucose.³⁶

The present calibration interactions of known lectin concentrations (0.5 mg/ml, BmoLL, and 1.0 mg/ml, Cramoll) were measured with a carbohydrate range of 200 mmol.L⁻¹ to 1000 mmol.L⁻¹ and carbohydrate absence (control); the data showed a significant reduction curve when glucose and galactose increased in solutions.

The linear calibration curve obtained by a potentiometric response among 200 to 1000 mmol.L⁻¹ galactose revealed BmoLL correlation coefficient of 0.857 in 150 mmol.L⁻¹ NaCl and 0.853 in 300 mmol.L⁻¹ phosphate buffer; Cramoll presented a better result in 150 mmol.L⁻¹ NaCl, with a correlation coefficient of 0.965. These conditions express an important characteristic to make devices applied to analytical determinations (Figure 3). The high data correlation index showed BmoLL and Cramoll stability and ability to recognize carbohydrates in electrolytic environments. Sensors with high correlation coefficient revealed the highest sensitivity of these devices.³⁷

The electrochemical potential reduction *versus* carbohydrate concentration increase (Figure 3) indicates a charge reduction in electrode surface. The system sensitivity was dependent upon free carbohydrate binding sites; BmoLL structural conformation could reveal a lower superficial charge number inducing reduction of electrochemical potentials (150 mmol.L⁻¹ NaCl). A lower affinity was detected to Cramoll at 200 and 300 mmol.L⁻¹ phosphate buffers, at high glucose concentrations. Electrochemical potentials revealed charge distribution on molecular surface that can vary in relation to used electrolytic solution.³¹

Studies of biomolecule superficial charges in solutions and/or adsorbed on metallic surfaces, are essential prerequisites for interpretation of structural changes by interaction of macromolecules with its ligands, to define specificity.²⁸ Charge alteration capacity in electrode/electrolytic interface of a protein with specific ligand has been applied to develop analytical sensors.³⁷

Electrochemical potential stabilization time in the interface work electrode is singular to each biomolecule evaluated in the system. The results obtained in this work suggest that double platinized platinum sheet connected with a platinum wire, with the purpose to increase biomolecule adsorption area is skillful for electrochemical potential evaluations. A high stabilization degree of the double electric layer in protein/electrode interface in electrolytic solutions was obtained. The present work could open new horizons to the development of systems to characterize lectin interacting with cell surface carbohydrates.

Conclusion

A simple and economical quantitative model was developed to evaluate BmoLL and Cramoll 1,4 specific carbohydrate interactions under different charged environments. The system was sufficiently sensitive to detect lectin conformational changes through bioadsorption with ligands.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC).

References

1. Meng, L.; Wu, P.; Chen, G.; Cai, C.; Sun, Y.; Yuan, Z. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 175.
2. Nordin, H.; Jungnelius, M.; Karlsson, R.; Karlsson, O. P. *Anal. Biochem.* 2005, 340, 359.
3. Sozer, N. & Kokini, J. L. *Trends. Biotechnol.* 2009, 27, 82.
4. Rogers, K. R. & Gerlach, C. L. *Sci. Technol.* 1996, 30, 486A.
5. Vaseashta, A.; Vaclavikova, M.; Vaseashta, S.; Gallios, G.; Roy, P.; Pummakarnchana, O. *Sci. Technol. Adv. Mater* 2007, 8, 47.
6. Favacho, A. R. M.; Cintra, E. A.; Coelho, L. C. B. B.; Linhares, M. I. S. *Biologicals* 2007, 35, 189.
7. Sá, R. A.; Gomes, F. S.; Napoleão, T. H.; Santos, N. D. L.; Melo, C. M. L.; Gusmão, N. B.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G.; Navarro, D. M. A. F.; Bieber, L. W. *Wood Sci Technol*, **2009**, 43, 85.
8. Coelho, L. C. B. B.; Silva, M. B. R. *Phytochem. Anal.* 2000, 11, 295
9. Rosilio, V.; Boissonnade, M.; Coelho, L. C. B. B.; Santos-Magalhães, N. S.; Andrade, C. A. S.; Baszkin, A. *Colloids and Surfaces A* 2004, 250, 491.
10. Argôlo, A. C. C. M.; Sant'Ana, A. E. G.; Pletsch, M.; Coelho, L. C. B. B. *Bioresour. Technol.* 2004, 95, 229.
11. Macedo, M. L. R.; Freire, M. G. M.; Silva, M. B. R.; Coelho, L. C. B. B. *Comparative Biochem Physiol. Part A* 2007, 146, 486.
12. Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B. *Appl Biochem Biotech*, The Humana Press Inc. 1992, 36, 113.
13. Beltrão, E. I. C.; Correia, M. T. S.; Figueredo-Silva, J.; Coelho, L. C. B. B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998, 74, 125.

14. De Souza, G. A.; Oliveira, P. S. L.; Trapani, S.; Santos, A. C. O.; Rosa, J. C.; Laure, H. J.; Faça, V. M.; Correia, M. T. S.; Tavares, G. A.; Oliva, G.; Coelho, L. C. B. B.; Greene, L. J. *Glycobiology* 2003, 23, 961.
15. Tavares, G. A.; Caracelli, I.; Burger, C. R.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Oliva, G. *Acta Crystallogr. D* 1996, 52, 1046.
16. Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995, 55, 261.
17. Andrade, C. A. S.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Nascimento, S. C.; Santos-Magalhães, N. S. A. *Int. J. Pharm.* 2004, 278, 435.
18. Maciel, E. V. M.; Araújo-Filho, V. S.; Nakazawa, M.; Gomes, Y. M.; Coelho, L. C. B. B.; Correia, M. T. S. *Biologicals* 2004, 32, 57.
19. Sugavara, K.; Kuramitsu, H.; Hoshi, S.; Akatsuka, K.; Tanaka, S.; Nakamura, H. *Talanta* 2000, 47, 665.
20. East, G. A.; Valle, M. A. *J. Chem. Educ.* 2000, 77, 97.
21. Rodrigues, J. S.; Santos-Magalhães, N. S.; Coelho, L. C. B. B.; Couvreur, P.; Ponchel, G.; Gref, R. *J. Control. Release* 2003, 92, 103.
22. Souza, S. R.; Dutra, R. F.; Correia, M. T. S.; Pessoa, M. M. A.; Lima-Filho, J. L.; Coelho, L. C. B. B. *Bioresour. Technol.* 2003, 88, 255.
23. Souza, S. R.; Correia, M. T. S.; Pessoa, M. M. A.; Kennedy, J. F.; Lima-Filho, J. L.; Coelho, L. C. B. B. *Carbohydr. Polym.* 2001, 46, 191.
24. Monsalve, E.; Oviedo, P. J.; García-Pérez, M. A.; Tarín, J. J.; Cano, A.; Hermenegildo, C. *Cardiovasc Res* 2007, 73, 66.
25. Mimica, D.; Zagai, J. H.; Bedioui, E. *J. Electroanal. Chem.* 2001, 497, 106.
26. Liu, Y.; Gore, A.; Chakrabartty, S.; Alcolija, E. C. *Microchim Acta* 2008, 163, 49.

27. Nadzhafova, O. Y.; Zaitsev, V. N.; Drozdova, M. V.; Vazc, A.; Rusling, J. F. *Electrochemistry* 2004, 6, 205.
28. Wen, Y. L.; Yang, X.; Hu, G.; Chen, S.; Jia, N. *Electrochim. Acta*, 2008, 54, 744.
29. Marken, F.; Chistopher, A. P.; Asogan, D. *Electrochem. Commun.* 2002, 4, 62.
30. Simonis, A.; Dawgul, M.; LÜth, H.; SchÖning, M. J. *Electrochim. Acta* 2005, 51, 930.
31. Fricquelmont-Loïzos, M.; Takenouti, H.; Kanté, W. J. J. *Electroanal. Chem.* 1997, 428, 129.
32. Andrade, C. A. S.; Oliveira, M. D. L.; Santos-Magalhães, N. S., Correia, M. T. S.; Melo C. P. *Colloids Surfaces B.* 2009, 68, 7.
33. Niki, K.; Sprinkle, J. R.; Margoliash, E. *Bioelectrochemistry* 2002, 55, 37.
34. Matsumoto, T.; Furusawa, M.; Fujiwara, H.; Matsumoto, Y.; Ito, N. *Sens. Actuators B Chem.* 1998, 49, 68.
35. Cavada, B. S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T. B.; Barral-Neto, M. *Curr. Protein Pept. Sci* 2001, 2, 123.
36. Tian, F.; Zhu, G. *Anal. Chim. Acta* 2002, 451, 251.
37. Kobayash, Y.; Anzai, J. J. *Electroanal. Chem.* 2001, 507, 250.

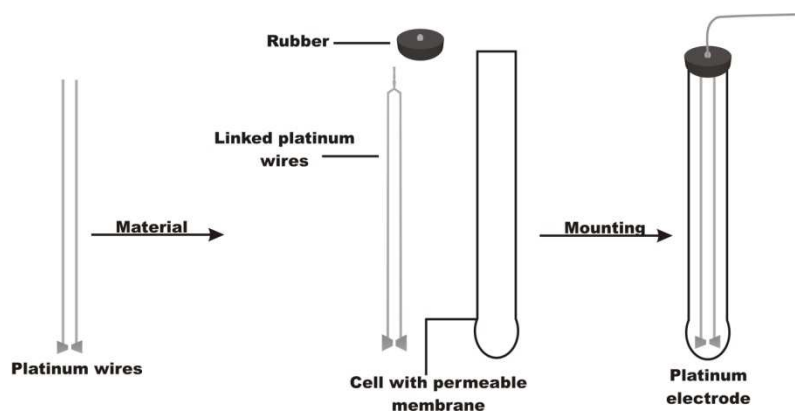


Figure 1: Confection of platinum electrode (work electrode).

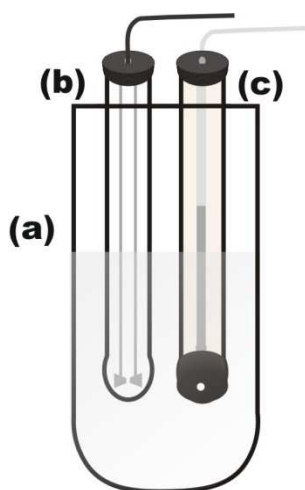


Figure 2: (a) Electrochemical cell. (b) Work electrode and (c) Ag | AgCl reference electrode immersed in solution.

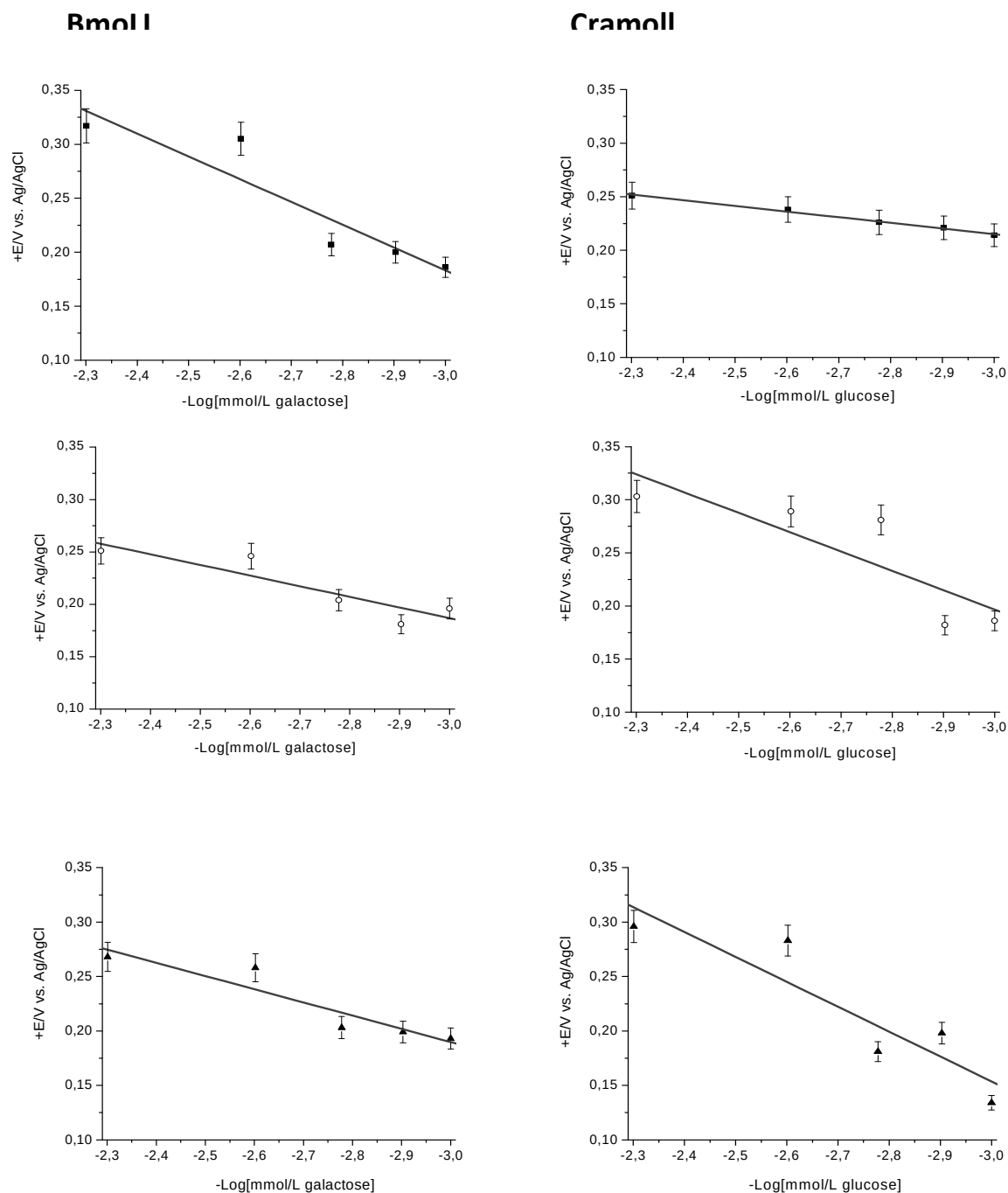


Figure 3: BmoLL and Cramoll 1,4 interactions under different salt solutions with distinct carbohydrate concentrations. (■) 150 mmol.L⁻¹ NaCl, (○) 200 mmol.L⁻¹ phosphate buffer and (▲) 300 mmol.L⁻¹ phosphate buffer. Simulation lines were based upon equation of linear regression (—). Data are given as means $\pm$ S.D. for three experiments each.

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO
BIOCHEMISTRY (MOSCOW)**

**An electrochemical system to characterize lectin
interaction with erythrocytes**

An electrochemical system to characterize lectin interaction with erythrocytes

Jadilma C. Pimentel¹, Gustavo M. Dias², Watha K. M. Siqueira², Sandra R. Souza², Luana C. B. B. Coelho¹

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Avenida Moraes Rego, sn, Cidade Universitária, Recife, 50670-420, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade Frassinetti do Recife/FAFIRE, Avenida Conde da Boa Vista, 921, Boa Vista, Recife, 50060-002, Brasil

Abstract

A galactose-specific *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) has been highly purified through ammonium sulphate fractionation and guar gel affinity chromatography. Qualitative assays have been used to evaluate lectin interaction with membrane carbohydrates. This work evaluated the interaction between BmoLL immobilized on nafion beads and rabbit erythrocyte carbohydrates in an electrolytic medium with and without galactose (100 mM and 200 mM) through a potentiometric method. A significant difference was observed in relation to BmoLL-nafion beads interacting with rabbit erythrocytes in galactose absence. This method revealed a great efficiency to evaluate BmoLL interactions with erythrocyte membrane carbohydrates and could be applied to erythrocyte surface studies.

Key words: *Bauhinia monandra* leaf lectin; erythrocytes; carbohydrate-binding protein; potentiometric system.

Introduction

Lectins are specific carbohydrate recognition proteins or glycoproteins which can agglutinate several cellular types (Singh et al., 1999; Dinh et al., 2009). These proteins with described larvicidal (Sá et al., 2009) and insecticidal activities (Silva et al., 2009) have been used as histopathological tools for cell recognition differentiation and functions (Matsui et al., 2000; Iskratsch et al., 2009). Cellular membrane oligosaccharide chains are widely related with lectin biological functions (Beltrão et al., 1998).

The versatile lectins possess two or more carbohydrate binding sites and this characteristic explains its ability to establish connection to erythrocytes and other cells (Matsui et al., 2000; Huanga et al., 2008).

According to Correia *et al.* (2008) the lectin presence can be detected in a sample through hemagglutination assay; protein binding sites interact with erythrocyte surface carbohydrates through reversible links among cells (Dinh et al., 2009).

The confirmation that the lectin is the agglutinating agent occurs with an inhibition assay using a solution containing specific carbohydrates or glycoproteins; lectin binding site occupation with free carbohydrate avoids lectin binding to erythrocyte surface, preventing cell agglutination and network hemagglutination (Ratanapo *et al.*, 1998; Correia et al., 2008; Dinh et al., 2009). These properties had also been reported to coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) with hemagglutinating activity to rabbit and A, B, O and AB human fresh erythrocytes; it was strongly inhibited by ovalbumin, beyond these applications this lectin can be used to water treatment for human consumption (Santos *et al.*, 2009).

Lectins bind to specific carbohydrates by hydrogen bridges, metallic coordination, van der Waals interactions and hydrophobic interactions (Drickamer, 1998). Some lectins have mitogenic activity (Maciel et al., 2004) and stimulate lymphocyte transformations and apoptosis (Barbosa et al., 2001); others identify preferential malignant cells (Beltrão et al., 1998; Tan et al., 2008) and can be used in sanguineous typology process (Matsui et al., 2001). Lectins have the most variable functions in living organisms (Huanga et al., 2008; Iskratsch et al., 2009), in endocytosis mechanism (Rudger et al., 2000), apoptosis (Correia et al., 2008). In bacteria and parasites they participate on linking process to cells hostesses (Oka & Spiegel., 1997).

Cell surface carbohydrates can interact with one or more lectins through selective binding; the specificity can be quantified through electrochemical potential determinations (Souza et al., 2001).

Nafion polymer surface contains pores in scale of ten to hundreds of nanometers characterizing nano-structures. These nafion nanopores endowed with negative loads attributed to sulfonic groups, are excellent proton conductors (McGovern et al., 2003); proteins can be immobilized in these loaded films with high electroactivity to recognize specific ligands (Huang et al., 1998).

A molecule electrochemical potential is surface charge distribution dependent when submitted to an electric field. With this measure it is possible to explore charge distribution on proteins, enzymes and lectin surfaces (Yoshisumi et al., 1999; Souza et al., 2001; Guo & Dong, 2009).

Bauhinia monandra leaves have a high concentration of a specific galactose lectin; more than 2 mg of BmoLL can be obtained from 5 g of leaf powder (Coelho & Silva, 2000). *B. monandra* leaf preparations containing BmoLL have already revealed hypoglycemic properties in rats; the interfacial behavior of BmoLL and its ability to interact with lipid monolayers have been studied by surface tension measurements (Rosilio et al., 2004). Also, ethanolic extracts from *B. monandra* leaves showed antioxidant activities (Argôlo et al., 2004); BmoLL insecticidal action has also been evaluated (Macedo et al., 2007).

The aim of this work was to evaluate the interaction preference of BmoLL immobilized on nafion beads to rabbit erythrocyte membrane carbohydrates or free galactose in an electrolytic medium.

Materials and Methods

BmoLL (0.5 mg/ml) was purified through a previously defined protocol using an ammonium sulphate fraction (0-60%) followed by affinity chromatography in guar gel column (Coelho & Silva 2000).

The electrochemical potential of Ag|AgCl electrode was evaluated in relation to a calomel saturated reference electrode (East & Valle, 2000).

The work electrode was made of a double platinized platinum sheet connected with a platinum wire; it showed a greater charge potential in relation to a reference electrode. These electrodes were coupled to a high impedance multimeter. Electrochemical potentials to lectin immobilized in nafion beads activate evaluation with erythrocytes were determined in 150 mM NaCl (Figure 1- A) using an electrochemical cell compound by an Ag/AgCl reference electrode and a platinum work electrode, both coupled to a high impedance multimeter to obtain electrochemical potentials (Figure 1- B).

BmoLL (0.5 mg/ml) electrochemical potentials were determined in 150 mM NaCl, pH 6.5, in absence and presence of galactose (100 mM and 200 mM). BmoLL electrochemical potential in galactose absence was considered a standard to lectin evaluation on saline solution containing carbohydrate or rabbit erythrocytes.

BmoLL electrochemical potentials were obtained on saline solution (150 mM NaCl), in carbohydrate and erythrocyte absence and presence using an electrochemical cell coupled to a high impedance multimeter.

The computer statistical analysis was processed by Microcal (TM) ORIGIN, version 6.0, Microcal Software.

Results and discussion

Nafion nanopore immobilized proteins are capable to interact with specific ligands due to electrostatic answers in this system (Hong et al., 2006; Wen et al., 2008). The characterization of cellular surface carbohydrates have used versatile proteins, lectins, that are important biological tools applied on potentiometric methods (Souza et al., 2001).

The electrochemical system sensitivity was quantitatively evaluated in lectin presence (BmoLL) on electrolytic medium interacting with rabbit erythrocyte membrane carbohydrates (Figure 1). The electrochemical potential variations in BmoLL nafion-bead absence (441,413 mV) and presence (356,796 mV) was observed on Figure 2-a. The interaction between BmoLL nafion-beads with galactose (Figure 2-b) reduced significantly the electrochemical potential with galactose (100 mM, 134,541 mV; 200 mM, 137,503 mV) revealing high affinity with BmoLL and free galactose on this used electrolytic medium. Similar data were obtained on electrochemical evaluations of Con A (Souza et al., 2001) and Cramoll interacting with glucose (Souza et al., 2001; Souza et al., 2003).

To evaluate protein-cell interaction on this applied system on erythrocytes presence (Figure 2-c), without BmoLL (372,904 mV) and on BmoLL presence (317,547 mV) it was demonstrated that its carbohydrate membranes increased affinity with BmoLL, in relation to free galactose (Figure 2-b); there were no significant electrochemical potential variations detected when galactose was added to medium with 100 mM (306.1092 mV) or 200 mM (288.4054 mV) concentrations, Figure 2-d.

Extracted plant lectins have been used as analytical tools on glycoprotein research, and like active protein to induce many cellular processes (Peumans & Van Damme, 1998; Huang et al., 2008, Tan et al., 2008). Researchers have considered that some lectins are involved on cell-cell recognition. On the majority of cell surfaces, standards of carbohydrates can be found, specific for each cellular group that can be recognized for one or more lectins through selective linkages; this selectivity can be quantified through electrochemical potential determinations (Souza et al., 2001). The singularity of carbohydrate

standards expressed by cell groups allow lectins to be used to show cell surface differences, assisting in diagnosis (Muñoz-Crego et al., 1999).

The red cell agglutination reactions have been used to detect lectin action. However, convenient and fast systems are necessary to elucidate lectin-carbohydrate interactions (Hawa, 1993; Sugawara, 1998; Dinh et al, 2009).

Electrochemical systems response involving biomaterials depends on a variety of factors, such as the immobilized molecule conformation and the double electric layer interface (Cohen *et al.*, 1996; Niaura *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Sosnitza *et al.*, 1998; Bassi *et al.*, 1999; Zhang et al., 2000; Niki et al., 2002; Wen et al., 2008; Guo & Dong, 2009).

On this work it was, therefore, proved that BmoLL selectivity to erythrocyte carbohydrate membranes are responsible for an electrochemical potential arrangement.

Conclusion

The electrochemical system developed can be applied to study processes involving distribution and charge transference between lectin and erythrocyte surface. BmoLL presents selectivity to rabbit erythrocyte carbohydrate membranes. This selectivity was quantitatively proved through electrochemical potential determination.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC).

Figure 1

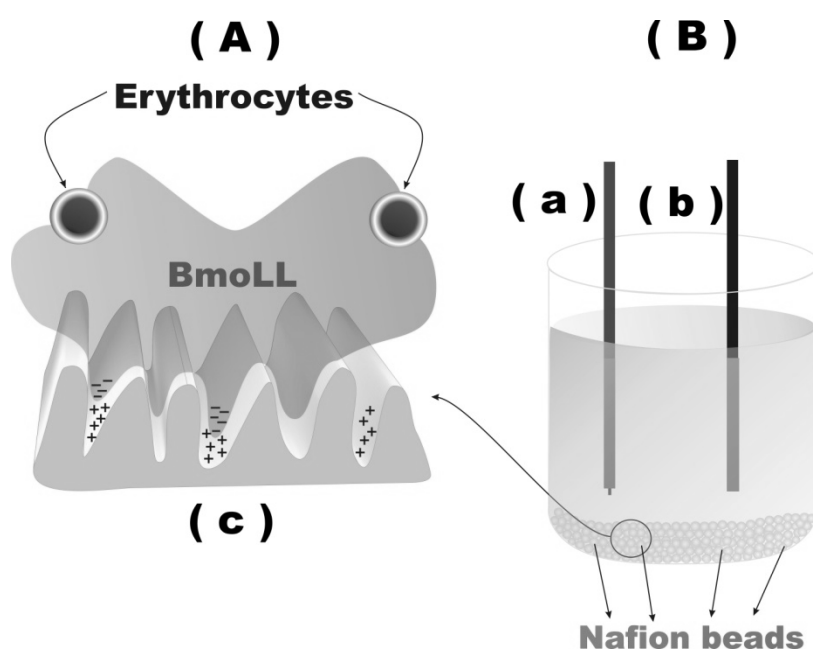


Figure 1. Schematic representation of BmoLL nafen-beads interacting with rabbit erythrocytes (A) and electrochemical system (B) containing platinum electrode (a), saturated calomel electrode (b) and electroactive/non-electroactive nanopores of nafen, a solid polymer electrolyte (c).

Figure 2

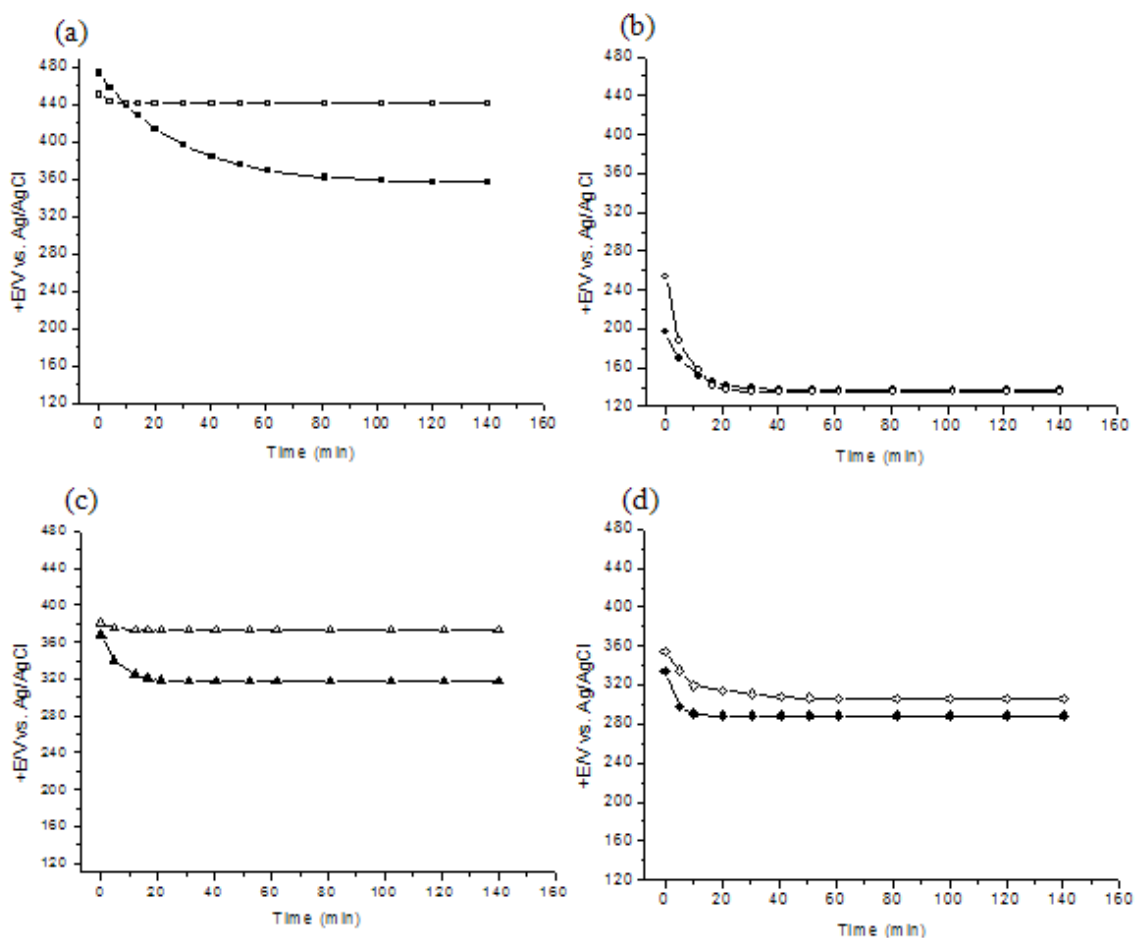


Figure 02: (a) Electrochemical potential obtained in 150 mM NaCl medium (□) and BmoLL presence in 0.15 mM NaCl medium (■); (b) BmoLL Electrochemical potential to 0.15 mM NaCl with 100 mM (○) and 200 mM (●) galactose; (c) Electrochemical potential to a suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes in 0.15 mM NaCl (△) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes in 0.15 mM NaCl interacting with BmoLL (▲); (d) Electrochemical potential suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes in 0.15 mM NaCl interacting with BmoLL and inhibition assayed with 100 mM galactose (◇) and electrochemical potential suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes in 0.15 mM NaCl interacting with BmoLL and inhibition assayed with 200 mM galactose (◆). Potentials were modeled using a Chi-square statistical distribution ($p < 0.05$).

References

- A.C.C.M. Argôlo, A. E.G. Sant'Ana, A. M. Pletsch, L. C. B. B. Coelho, Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresour. Technol.* 95 (2004) 229-233.
- T. Barbosa, S. Arruda, B. Cavada, T.B. Grangeiro, L.A.R. Freitas, M. Barral-Neto, *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96 (2001) 673-678.
- E.I.C. Beltrão, M.T.S. Correia, J. Figueredo-Silva, L.C.B.B. Coelho, Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74 (1998) 125-132.
- L.C.B.B. Coelho, M.B.R. Silva, Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochem. Anal.* 11 (2000) 295-300.
- O.J. Cohen, B.C. King, F. M. J. Mawkrice, Spectroelectrochemical and electrochemical determination of ligand binding and electron transfer properties of myoglobin, eyanomyoglobin, and imidazolemyoglobin. *J. Electroanal. Chem.* 447 (1999) 53-62.
- E.V.M. Maciel, V.S. Araújo-Filho, M. Nakazawa, Y.M. Gomes, L.C.B.B. Coelho, M.T.S. Correia, Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 32 (2004) 57 – 60.
- T. Matsui, J. Hamato, Y. Ozeki, K. Titani, Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. *Biochim. Biophys. Acta* 1525 (2001) 50-57.
- M. Mecklenburg, J. Avitel, F. Winquist, J. Gang, K. Ornstein, E. Dey, X. Bin, E. Hedborg, R. Norrby, H. Aewin, I. Luundström, B. Danielsson. Differentiation of human serum samples by Surface Plasmon Resonance monitoring of the integral glycoprotein interaction with a lectin panel. *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 25-31.
- Y. Oka, Y. Spiegel, Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodea avenae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51 (1997) 333-345.

- V. Rosilio, M. Boissonnade, L.C.B.B. Coelho, N.S. Santos-Magalhães, C.A.S. Andrade, A. Baszkin, Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 250 (2004) 491-497.
- R.S. Sinfh, A.K. Tiwary, J.F. Kennedy, Lectins: sources, activities, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19 (1999) 145-178.
- S.R. Souza, M.T.S. Correia, M.M.A. Pessoa, J.F. Kennedy, J.L. Lima-Filho, L.C.B.B. Coelho, A novel model to characterize the eletric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metalic surface. *Carbohydr. Polym.* 46 (2001) 191-193.
- S.R. Souza, R.F. Dutra, M.T.S. Correia, M.M.A. Pessoa, J.L. Lima-Filho, L.C.B.B. Coelho, Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresour. Technol.* 88 (2003) 255-58.
- A. Yoshizumi, Y. M. Kaqnayama, M. Ide, H. Kitano, Selfassembled monolayer of sugar-carrying polymer chain: sugar balls from 2-methacryloyloxyethyl D-glucopyranoside. *Langmuir* 15 (1999) 482-448.
- T. Iskratsch, A. Braun, K. Paschinger, I. B. H. Wilson, Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins *Anal. Biochem.* 386 (2009) 133–146.
- L. Huang, T. Adachia, Y. Shimizua, Y. Gotoa, J. Tovamab, H. Tanaka, R. Akashi, A. Sawaguchi, H. Iwata, T. Haga, Characterization of lectin isolated from *Momordica charantia* seed as a B cell activator. *Immunol. Lett.* 121 (2008) 148–156.
- L. Tan, X. Jia, X. Jiang, Y. Zang, H. Tang, S. Yao, Q. Xie, Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. *Anal. Biochem.* 383 (2008) 130–136.
- Y. Wen, X. Yahng, G. Hu, S. Chen, N. Jia, Direct electrochemistry and biocatalytic activity of hemoglobin entrapped into gellan gum and room temperature ionic liquid composite system. *Electrochim. Acta* 54 (2008) 744–748.
- H.L. Dinh, K. Hori, N.H. Quang, Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 89–97.

S. Guo & S. Dong, Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. Trends. Analyt. Chem. 28 (2009) 96-109.

A.F.S Santos, L.A. Luz, A.C.C. Argolo, J.A. Teixeira, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process. Biochem. 44 (2009) 504-508.

R. A. Sá, N. D. L. Santos, C. S. B. Silva, T. H. Napoleão, F. S. Gomes, B. S. Cavada, L. C. B. B. Coelho, D. M. A. F. Navarro, L. W. Bieber, P. M. G. Paiva, Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. 149 (2009) 300-306.

M.D.C. Silva, R.A. Sá, T.H. Napoleão, F. S. Gomes, N. D. L. Santos, A.C. Albuquerque, H.S. Xavier, P.M.G. Paiva, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). Int. Biodeterior. Biodegradatio.63 (2009) 334-340.

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY

**A Novel Method to Evaluate Interaction Between
Bauhinia monandra Leaf Lectin and Endophytic
Bacterium**

A Novel Method to Evaluate Interaction Between *Bauhinia monandra* Leaf Lectin and Endophytic Bacterium

J. C. Pimentel^{1*}; S. A. F. Ramos²; J. E. G. Souza³; M. B. R. Silva¹; J. M. Araújo²; S. R. Souza⁴; L. C. B. B. Coelho¹

¹ Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil, CEP: 50670-901, Fone/fax: 55 81 2126835; e-mail: jadilma_cosme@ig.com.br

² Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil, CEP: 50670-90,

³ Departamento de Química da Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526. Boa Vista - Recife, Pernambuco, Brasil, CEP 50050-900

⁴ Departamento de Educação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil, CEP: 52171-900

* To whom correspondence should be addressed.

Abstract — *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL - galactose specific) was immobilized on Nafion and evaluated through an electrochemical method using amperometric and potentiometric techniques, interacting with *B. monandra* endophytic bacterium in galactose presence and absence. The lectin was highly specific to endophytic membrane carbohydrates with a high stabilization degree of the double electric layer in protein/electrode interface in electrolytic solutions. BmoLL/endophytic interactions were related to the presence of modifying superficial charges, verified by amperometric current variation in relation to galactose absence or presence. Amperometric systems containing biological materials and involving electron transferences are of fundamental importance to study macromolecular superficial charges. The applied sensor can be use to evaluate BmoLL interactions at the carbohydrate binding sites.

Keywords: *Bauhinia monandra*, leaf lectin, endophytic bacterium, electrochemical, nafion, amperometric system.

{running title} Lectin-endophytic interaction

Endophytes are microorganisms that, during at least one phase of its life cycle, live in vegetal tissues, in systemic way, without causing host damage (Saikkonen, 1998). These microorganisms have been isolated from a large diversity of plants (Sharma et. al., 2005); a plant can have different endophytes, between fungus and bacterium (Vandenkoornhuyse et al. 2002; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Endophytic microorganism transmission can occur through active or passive penetration through roots, stomata and seeds (Sharma et. al. 2005). They reach diverse host plant tissues, colonize specific regions or distribute systemic forms through conducting vases and intercellular spaces (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). This transmission process through endophytic microorganisms offer to the host a high stress resistance caused by biotic or abiotic factors; in exchange they receive nutrients and protection (Conn et al., 2008; Zhang et al., 2009). The high mutual interaction promotes endophytic co-evolution with its plant hostesses (Tan & Zou, 2001; Bugni & Ireland, 2004). However, under determined circumstances, this endophyte-host equilibrium can be unbalanced in detriment of one of them (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

At the beginning of 1990 decade there was a great interest in lectin activity since these proteins are involved on cellular recognition mediation in many biological systems, such as bacteria, virus and protozoary adhesion in host cells, being this a prerequisite for infection, as well as leukocyte adhesion in vascular endothelial cells, a decisive factor of these cells to transit in living systems, and its performance in defense against pathogens (Sharon, 1993). Any plant lectins, produced by roots, act as molecular signals to sort bacteria *Azospirillum* association, been a determinant fact about plant-bacteria interaction specificity (Antonyuk & Evseeva 2006).

Selective reaction agglutination between lectin and bacterium occurs due to the protein ability to react with exposed carbohydrates in their surface making possible this biomolecules uses such as pathogenic bacterium identification (Muñoz-Crego et. al., 1999).

Bauhinia monandra leaves contain relatively high concentration of a galactose-specific lectin (BmoLL); more than 2 mg of the protein were obtained from 5 g of leaf powder. Ethanolic extracts from *B. monandra* leaves showed antioxidant activities (Argolo et al., 2004). The *Bauhinia* genus has been studied for its medicinal properties such as hypoglycemic trials (Coelho & Silva, 2000). *B. monandra* leaf preparations containing BmoLL have already revealed hypoglycemic properties in rats; the interfacial behavior of BmoLL and its ability to interact with lipid monolayers have been studied by surface tension measurements (Rosilio et al., 2004) and electrochemical measures (Andrade et al., 2009). BmoLL insecticidal action was also detected (Macedo et al., 2007).

Some plant lectin studies have been carried through the expression of these proteins in bacteria (Luo et al., 2005). Lectins also act as additional tools in bacterium identification due to its specificity to their ligand carbohydrates (Ertl et al., 2003).

Interaction phenomenon in a biological system can be described through electrochemical methods in the interface of biomolecules (Guo & Dong, 2009; Sozer & Kokini, 2009). Electrochemical analytical systems that incorporate biologically active materials on an appropriate transduction element have the purpose to measure the concentration or activity of interest product (Guo & Dong, 2009).

The objective of this work was to measure the specific interaction between BmoLL and *B. monandra* leaf endophytics through amperometric and potentiometric methods.

MATERIALS AND METHODS

The electrochemical system was composed by a platinum electrode (work electrode) and a calomel saturated electrode (reference electrode), responsible for the signal transduction (Figure 1).

Stabilization potential was obtained through potentiometric measurements performed on phosphate buffer. Evaluations were carried out in the presence and absence of galactose concentrations (100 mM and 200 mM) and *B. monandra* leaf endophytes (strain UFPEDA 598). The stabilized obtained potential was applied to amperometric technical evaluation of BmoLL and endophytic interaction.

The electrochemical potential was modelled using a Chi-square statistical distribution ($p < 0,05$) to determine stability points presented in the exponential equations; all the treatments were derived from six repetitions. The following equation [$Y = Y_0 + A \exp(-X/t)$] described the ligand-protein potential interaction, where Y is a potential interaction at time t , after immersion of the electrode on electrolytic medium and Y_0 is the measured potential at time zero.

The amperometric determination involved BmoLL immobilization in Nafion beads, BmoLL-Nafion beads (Figure 01). The amperometric evaluation was performed in 150 mM NaCl and 200 mM phosphate buffer, pH 6.5, as electrolytic media.

The electrochemical potential was performed connecting this electrodes to a high impedance multimeter. To evaluate the amperometric current the electrodes were coupled to a potentiostat PAR (Galvanostat, Model 73A), by Princeton Applied Research. To obtain this data a stable electrochemical potential of 110 mV was applied.

RESULTS AND DISCUSSION

There is a clear necessity of new methods to elucidate the deep interaction endophyte-host to evaluate the physiological mechanism of this symbiotic association.

The characterization of systems containing biological materials and involving electron transferences (tissues, microorganisms, enzymes, organelles, among others) can be performed through potentiometric or amperometric electrochemical methods. These systems are of fundamental importance to study macromolecular superficial charges [Ueta et al., 2008].

Stability values of ligand-protein potential interaction derived from the exponential equation $[Y = Y_0 + A \exp(-X/t)]$ in relation to its respective treatments (Figure 2). The best interaction results were revealed to BmoLL-nafion beads with endophytic bacterium on the phosphate buffer (306,6916 mV) and with 100 mM (303,8278 mV) and 200 mM (286,6590) galactose. This electrochemical potential reduction on specific carbohydrate free presence on the electrolytic medium occurred due to immobilized BmoLL preference to carbohydrates present on endophytic membrane. The potential of 306,6916 mV was closed to be applied on amperometric current obtainment generated by BmoLL-Nafion beads interaction with endophytics on galactose presence and absence (Figure 3). The ligand-protein potential interaction was stabilized at 15 min after immersion of the electrode on eletrolitic medium.

A similar reduction of electrochemical potential in time relation was reported on an experiment with *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll) interacting with different glucose concentrations (Souza et al. 2001). Superficial charges modifying in accordance with ligand interaction and electrolytic environment are verified on electrochemical systems potentiometrics (Souza et al. 2001; Andrade et al. 2009) and amperometrics (Nadzhafova et al. 2004; Du et al., 2008)

The results obtained through amperometric technique presented maximum current (55 nA) on endophytic absence and with 200 mM galactose; superior values were verified to BmoLL/endophytic interactions (117 nA) on galactose absence like maximum value and 76 nA on 200 mM galactose presence like minimum current, confirming BmoLL preference to carbohydrates present on endophytic membrane. BmoLL showed a satisfactory biological activity when interacting with *B. monandra* endophytic bacterium presenting a great specificity to its carbohydrate membrane. This preference is evident when BmoLL keeps its band at the same potential with galactose addition to the electrolytic medium (Figure 03).

Amperometric measurements are obtained through signal transduction due to exchange protein superficial charges, resultants of the macro-molecules immobilized interaction to specific ligand (Guo & Dong 2009).

Amperometric responses obtained depends on conformational proteic molecule changes generated by specific interaction with specific ligands, as well as of electrolic medium composition and electrostatic repulsion on interaction binding sites ligand-protein –metallic electrode (Nadzhafova et al. 2004). These systems are utilized like devices with good analytical performance (Du et al., 2008). Metallic electrodes have been used to analyze biomaterial amperometric interactions evaluating electron transference between the electrode and the protein to apply on food industry and biosensors (Wee et al., 2005; Sozer & Kokini, 2009; Basu *et al.* 2007; Du et al., 2008).

Conformational change determinations on biomolecule surfaces generated by specific ligand interactions were carried out to define relative affinity of macromolecules to cellular receptors in live organisms (Wen et al., 2008).

Antonyukl & Evseeva (2006) observed that plant root lectins are involved in the symbiosis process with endophytic organisms and are fundamental to determine plant-bacterium interaction genotypic specificity.

The electrochemical system containing BmoLL-Nafion beads revealed a specific protein interaction with endophytics. The high affinity between BmoLL and the endophytic bacterium in the used system will allow its use as an important tool to study endophyte-host relationship to facilitate research in economic and environmental impact fields.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC).

REFERENCES

- Argolo A. C. C., Sant' Ana, A. E. G., Pletsch, M., Coelho, L. C. B. B. (2004) *Bioresour. Technol.*, **95**, 229-233.
- Coelho, L. C. B. B., Silva, M. B. R. (2000) *Phytochem. Anal.* **11**, 295-300.
- Macedo, M. L. R., Freire, M. G. M., Silva, M. B. R., Coelho, L. C. B. B. (2007) *Comparative Biochem Physiol. Part A* **146**, 486–498.
- Rosilio, V., Boissonnade, M., Coelho, L. C. B. B., Santos-Magalhães, N. S., Andrade, C. A. C., Baszkin, A. (2004) *Coll. Surf. A* **250**, 491-497.
- Souza, S. R., Correia, M. T. S., Pessoa, M. M. A. P., Kennedy, J. F., Lima-Filho, J. L., Coelho, L. C. B. B. (2001) *Carbohydr. Polym.* **46**, 191-193.
- Ueta, R. R., and Diniz, F. B. (2008) *Coll. Surf. B Biointerfaces* **61**, 244–249.
- Bugni, T.S., and Ireland, C.M. (2004) *Nat. Prod. Rep.* **21**, 143-63.
- Tan, R.X., and Zou, W.X. (2001) *Nat. Prod. Rep.* **18**, 448-59.
- Zhang, Y., Mu, J., Feng, Y., Kang, Y., Zhang, J., Gu, P., Wang, Y., Ma, L., Zhu, Y. (2009) *Mar. Drugs* **7**, 97-112.
- Rosenblueth, M., and Martínez-Romero, E. (2006) *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 827-837.
- Conn, V. M., Walker, A. R., Franco, C. M. M. (2008) *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 208–218.
- Du, p., Zhou, b., Cai, c. (2008) *J. Electroanal. Chem.* **614**, 49–156.
- Wen, Y. L., Yang, X., Hu, G., Chen, S.; Jia, N. (2008) *Electrochim Acta.* **54**, 744–748.
- Saikkonen, K.; Faeth, S. H.; Helander, M.; Sullivan, T. J. (1998) *Annu Rev Ecol Syst.* **29**, 319-343.
- Sharma, P. K., Sarita, S., Prell, J. (2005) *Curr Sci.* **89**, 608-610.
- Vandenkoornhuyse, P., Baldauf, S. L., Leyval, C., Straczek, J., Young, P. W. (2002) *Science*, **295**, 2051-2052.
- Antonyuk, L.P. & Evseeva, N.V. (2006) *Microbiology*, **75**, 470-475.
- Sharon, N. 1993. TIBS.18, 221-226.**

Muñoz-Grego, A., Alvarez, O., Alonso, B., Rogers, D. J. Llovo J. (1999) *Electronic Lectin Journal* **13**, 87.

Andrade, C. A. S.; Oliveira, M. D. L.; Santos-Magalhães, N. S., Correia, M. T. S.; Melo C. P. (2009) *Colloids Surfaces B*, **68**, 7-12.

Luo, S., Zhangsun, D., Tang, K. (2005) *Appl Genet and Mol Biotechnol.* **69**, 184-191.

Ertl, P., Wagner, M., Corton, E., Mikkelsen, S. R. (2003) *Biosens Bioelectron.*, **18**, 907-916.

Guo, S.; Dong, S. (2009) *Trends Anal Chem* **28**, 96-109.

Sozer, N. & Kokini, J. L. (2009). *Trends Biotechnol*, **27**, 82-89.

Wee, K. W., Kang, G. Y., Park, J., Kang, J. Y., Yoon, D. S.; Park, J. H.; KIM, T. (2005) *Biosens Bioelectron*, **20**, 1932–1938.

Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychoudhuri, U., Chakraborty, R. (2007). *Bioelectrochem*, **70**, 375-379.

Souza, S. R, Correia, M. T. S, Pessoa, M. M. A. P, Kennedy, J. F, Lima-Filho, J. L, Coelho, L. C. B. B. (2001) *Carbohydr. Polym.* **46**, 191-193.

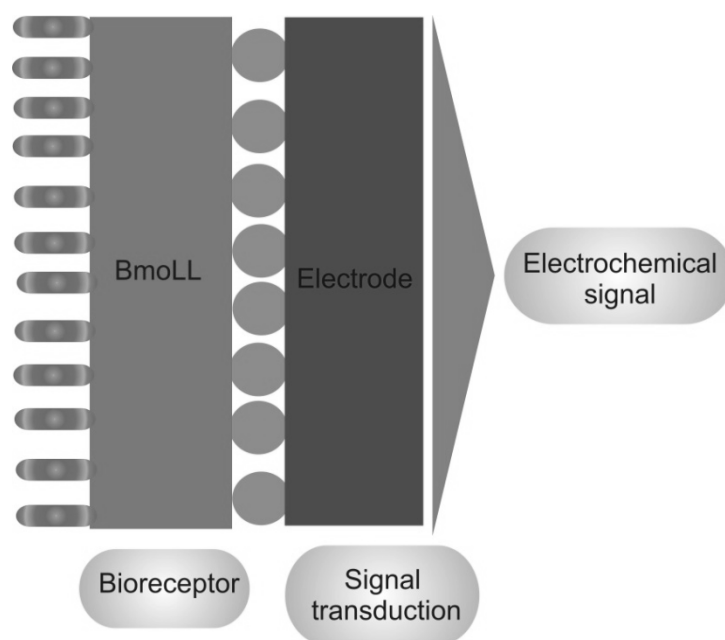


Figure 01: Schematic representation of the electrochemical system for amperometric measurements.

Endophytic bacterium (); Nafion-beads ().

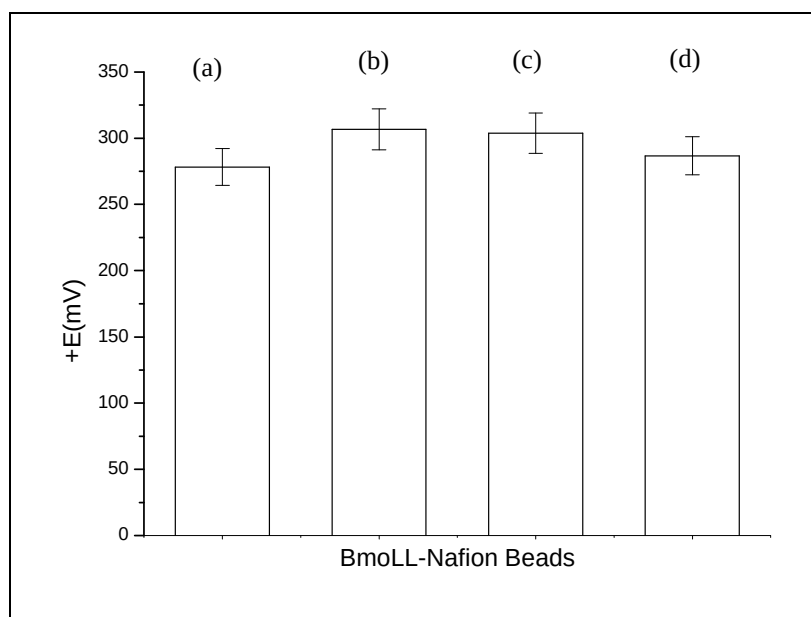


Figure 03: BmoLL electrochemical potential evaluation in electrolytic medium. BmoLL-Nafion beads (a); BmoLL-Nafion beads with endophytic bacterium (b); BmoLL-Nafion beads with endophytic bacterium and 100 mM galactose (c); BmoLL-Nafion beads with endophytic bacterium and 200 mM galactose (d); ($p < 0.05$).

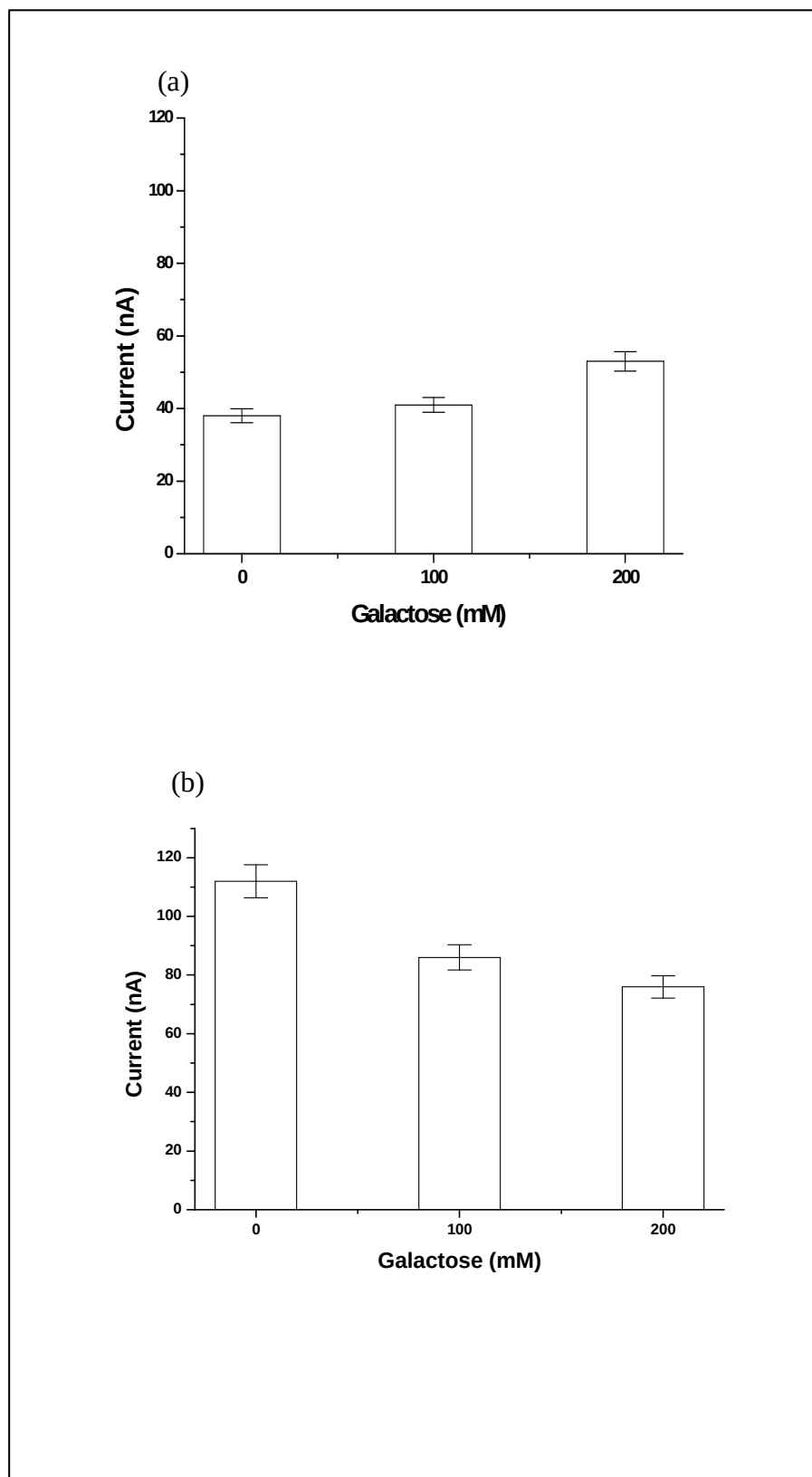


Figure 02: Amperometric current generated by BmoLL-Nafion beads in phosphate buffer interacting with specific carbohydrate (a) and bacterium (b). $p < 0.05$.

Conclusões

- Foi desenvolvido um método eletroquímico, quantitativo, para avaliar mudanças conformacionais das lectinas, BmoLL, imobilizada ou livre, interagindo com células e/ou galactose e Cramoll livre interagindo com glicose;
- Os sistemas eletroquímicos desenvolvidos podem ser aplicados para o estudo de processos envolvendo distribuição e transferência de cargas entre lectinas e carboidratos de superfície de membranas celulares;
- BmoLL apresentou alta seletividade aos carboidratos de membrana dos eritrócitos de coelho e dos endofíticos (UFPEDA 598) utilizados nos sistemas;
- O Sistema amperométrico aplicado detectou alta interação de BmoLL com os endofíticos extraídos de folhas de *B. monandra*;
- Os sistemas eletroquímicos utilizados contribuem para o estudo da associação de lectinas com carboidratos apresentados em superfícies celulares podendo elucidar a atuação destas proteínas em importantes processos celulares.