

JADILMA COSME PIMENTEL

**Um sistema eletroquímico para monitoramento de
interações das lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* e de
sementes de *Cratylia mollis* com carboidratos em diferentes
meios eletrolíticos**

RECIFE/2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JADILMA COSME PIMENTEL

**Um sistema eletroquímico para monitoramento de interações das lectinas de
folhas de *Bauhinia monandra* e de sementes de *Cratylia mollis* com
carboidratos em diferentes meios eletrolíticos**

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

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues de Souza

RECIFE/2006

Pimentel, Jadilma Cosme

Um sistema eletroquímico para monitoramento de interações das lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* e de sementes de *Cratylia mollis* com cardoidratos em diferentes meios eletrolíticos / Jadilma Cosme Pimentel. – Recife : O Autor, 2006.

x, 56 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Mestrado em Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia, anexos e apêndice.

1. Lectinas (*Bauhinia monandra* e *Cratylia mollis*) – Biossensores. 2. Sistema potenciométrico. 3. Lectina e carboidratos - Interação. 4. Potencial eletroquímico. Título.



Profa. Dra. Luana Cassandra B.

Departamento de Bioquímica, Centro de C



Profa. Dra. Maria Tereza

Departamento de Bioquímica, Centro de C

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>. The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

„A vitória mais bela que se pode alcançar é vencer a si mesmo.

”

Santo Ignácio de Loyola

‘

,

A Deus pelas graças alcançadas. Aos meus pais pelo amor, apoio e compreensão.

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. Ms. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho pela amizade e atenção.

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 Anderson, Cíntia, Marília, Renata, Renato e Vivianne, pelo carinho, amizade, compreensão e companhia dedicados a mim durante todo este ano.

Aos meus amigos residentes em Lajedo, pelo apoio, carinho e amizade.

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 2 Figura 03: Reação de inibição da hemaglutinação 3 Figura 04: Esquema explicativo de uma cromatografia de afinidade 8 Figura 05: Aspectos de flores da *Bauhinia monandra* 9 Figura 06: Aspectos de folhas da *Bauhinia monandra* 10 Figura 07: Aspectos de *Cratylia mollis*. 12 Figura 08: Eletrodo padrão de hidrogênio 13 Figura 09: Representação esquemática do princípio do biossensor 17

Agradecimentos Lista de Figuras Resumo Abstract Introdução

1 -Lectinas

1.1

Histórico

1.2 -Classificação

1.3

. Funções *in vivo*

1.4

Aplicações

1.5

Purificação 2 -*Bauhinia monandra* 3 -*Cratylia Mollis* 4-Abordagem eletroquímica

4.1 -Célula eletroquímica

4.2 -Eletrodo de Referência Padrão

4.3 -Eletrodo de Referência

4.4 -Eletrodo de Trabalho

4.5 -Potencial Eletroquímico

Sumário

V VI IX X

1 1 1 4 4 5 6 8 11 12 12 13 14 14 15 4.6 -Potencial

Eletroquímico de proteínas 15

4.7 -Biossensores 16 5

-

. Objetivo Geral 19 6

Objetivos Específicos 19 Referências Bibliográficas 20 **Artigo: An electrochemical system for monitoring interactions of lectins from *Bauhinia monandra* leaves and *Cratylia mollis* seeds with 33 carbohydrates in charged environments**

Conclusões 43 Anexos 44

Resumo

A BmoLL, que é a lectina extraída de folha de *Bauhinia monandra*, é específica para galactose e tem sido purificada através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade. A Cramoll, lectina de *Cratylia mollis*, reconhece glicose/manose e apresenta propriedades similares a concanavalina A, Con A, lectina que é extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, e já é bastante caracterizada. Os potenciais eletroquímicos para BmoLL e Cramoll 1,4 foram obtidos através de técnicas potenciostáticas, utilizando diferentes soluções salinas como suporte para o controle da distribuição de cargas entre o eletrodo de Ag/AgCl, como eletrodo de referência, e o eletrodo de platina como eletrodo de trabalho, em um meio aerado. Os potenciais eletroquímicos positivos e específicos determinados para a BmoLL e Cramoll 1,4 indicaram uma alta sensibilidade dos eletrodos utilizados. Os resultados observados sugeriram que uma maior área de superfície do eletrodo aumenta a estabilização na interface da dupla camada elétrica. O sistema eletroquímico foi desenvolvido para avaliar as trocas de cargas nas superfícies de BmoLL e Cramoll 1,4 livres interagindo ou não com seus carboidratos específicos.

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

Abstract

BmoLL, that extracted lectin by *Bauhinia monandra* leaf lectin, is galactose specific and have been purified through ammonium sulphate fractionation followed by affinity chromatography. Cramoll, *Cratylia mollis* seeds lectin, recognizes glicose/manose and presents concanavalin A, similar properties, Con A, lectin one that it is extracted of *Canavalia ensiformes* seeds, and already sufficiently is characterized. BmoLL and Cramoll 1,4

electrochemical potentials were obtained through potentiostatics techniques using different salt solutions as carriers to evaluate distribution between Ag/AgCl electrode, reference electrode, and double platinized platinum foil connected with a platinum wire, work electrode. Lectin positive electrochemical potentials were determined and indicated electrode high sensitivities. The obtained results suggested that a high area electrode surface increases the stabilization in interface of the double electric layers. An electrochemical system was developed to evaluate charged loads in BmoLL and Cramoll 1,4 free surfaces, interacting or not with their specific carbohydrates.

Key words: *Bauhinia monandra*, *Cratylia mollis*, lectins, biosensors, electrochemical potentials, free surfaces, electrochemical potentiometric system.

Introdução 1 -Lectinas

1.1 Histórico

Em 1888 Stillmark fez o primeiro estudo sobre lectinas. Utilizando um extrato bruto de sementes de mamona (*Ricinus communis*) que era capaz de produzir hemaglutinação em diferentes espécies de eritrócitos e denominou de ricina a proteína responsável por esse fenômeno (Gabor *et al.*, 2001). Na década seguinte, Hellin descobriu que o extrato tóxico de sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti) também produzia aglutinação de eritrócitos, a proteína responsável foi chamada abrina (Kennedy *et al.*, 1995).

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

Em 1960, descobriu-se que as lectinas promovem estimulação mitogênica de linfócitos e inibição do crescimento de células tumorais, fazendo com que as mesmas fossem

muito utilizadas em estudos citoquímicos e histológicos (Moreira *et al.*, 1991; Sharon & Lis, 2001).

Através de cristalografia de raios-X é possível elucidar estruturas de proteínas com seus grupamentos químicos e os tipos de ligação que são formadas (Tavares *et al.*, 1996). As lectinas possuem 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), como mostra a Figura 02, porém, carboidratos

Um sistema eletroquímico... Pimentel, J. C. específicos podem ligar-se a lectina impedindo a aglutinação de células (Ratanapo *et al.*, 1998), Figura 03.

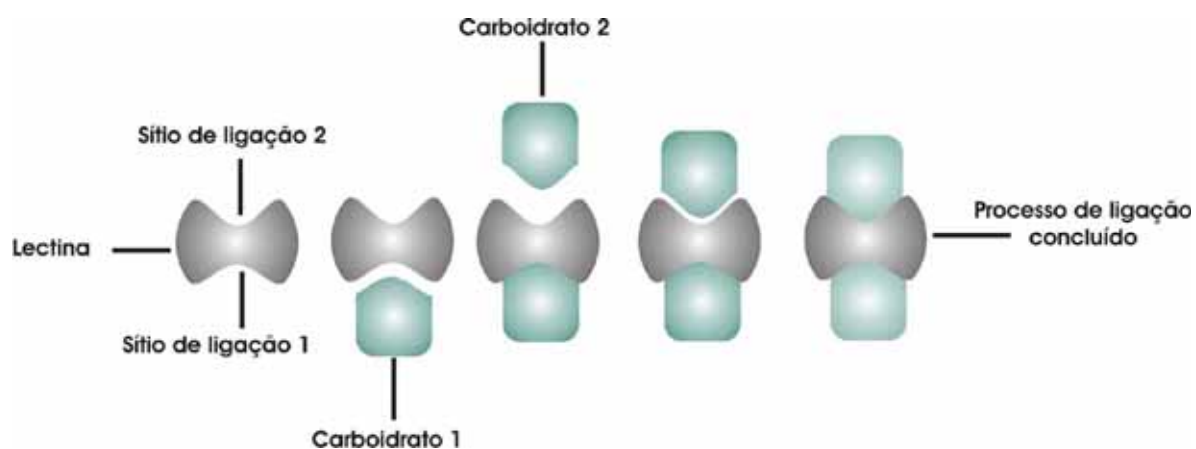


Figura 01: Ligação da lectina com carboidrato

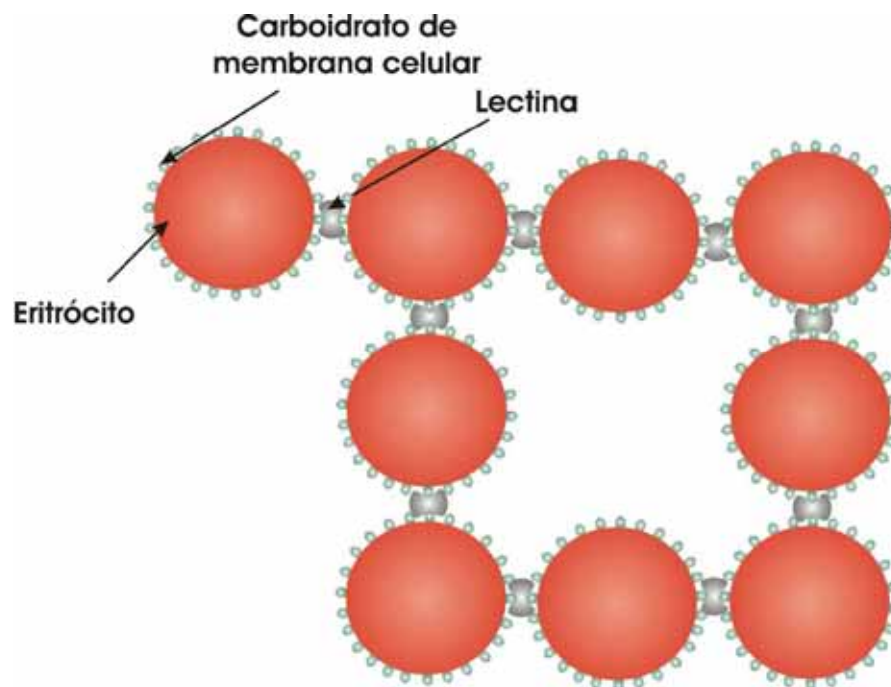


Figura. 02: Rede de hemaglutinação

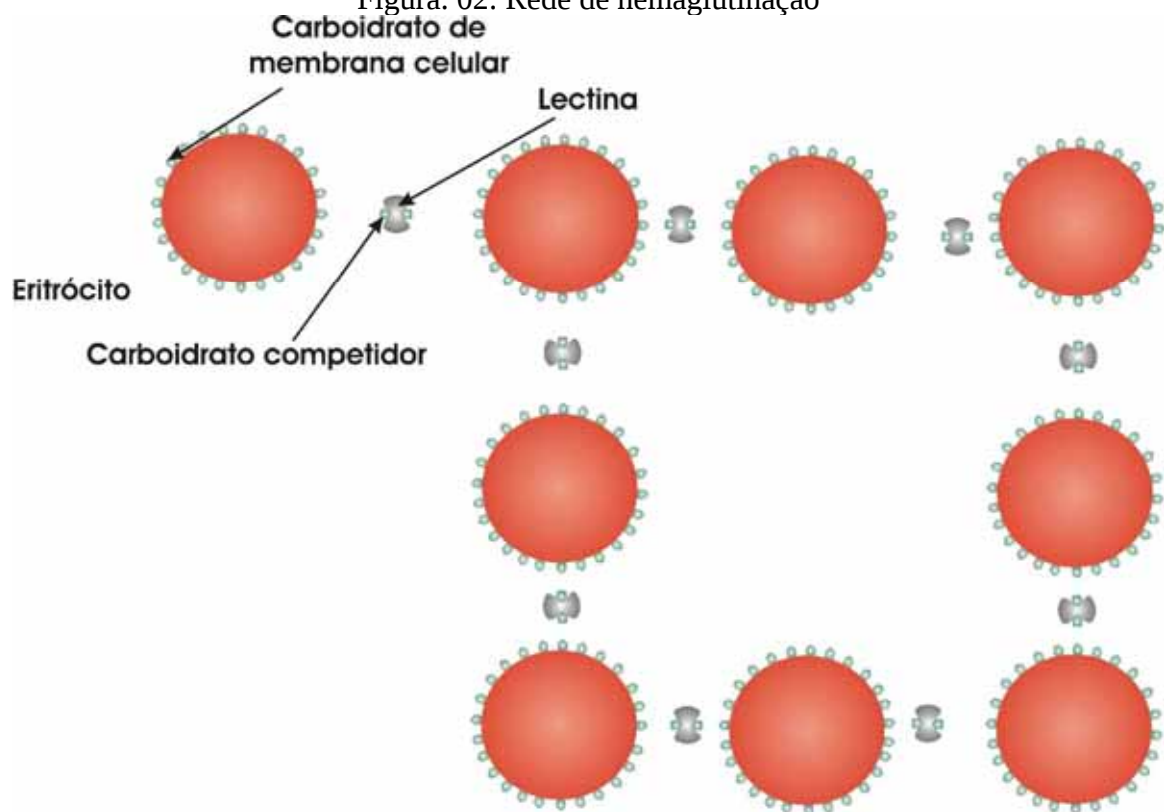


Figura. 03: Reação de inibição da hemaglutinação

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

A primeira lectina obtida na forma cristalina foi extraída do feijão de porco, *Canavalia ensiformis*, denominada Concanavalina A (Con A) em 1919 por James B. Summer. No final da década de 40, William C. Boyd e Rose M. Reguera reportaram que certas sementes continham aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos (Sharon & Lis, 1972). Em estudos recentes 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), bem como, foi utilizada como receptor para mensurar glicose *in vivo* (Pickup *et al.*, 2005).

1.2 Classificação

As lectinas constituem um grupo de proteínas heterogêneas, diferindo entre si quanto à especificidade, estrutura molecular e atividade biológica (Elgavish *et al.*, 1997).

Elas podem ser classificadas 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 envolve 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); e 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).

1.3 Funções *in vivo*

As lectinas possuem as mais variadas funções nos seres vivos. 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), defesa contra microorganismos, e na regulação da migração e adesão celular (Beltrão *et al.*, 1998; Jankovic & Golubović, 2000). As lectinas de vírus possivelmente estão envolvidas na ligação entre o vírus e a superfície celular de eritrócitos ou outras células (Singh *et al.*, 1999). Em bactérias e parasitas elas participam do processo de ligação a células hospedeiras (Oka & Spiegel, 1997).

1.4 Aplicações

As lectinas 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 lectinas são mitogênicas e estimulam transformações dos linfócitos e apoptose (Barbosa *et al.*, 2001); outras aglutinam preferencialmente células malignas (Jankovi

ć & Golubović, 2000; Wang *et al.*, 2000) de modo que tem sido investigado o seu envolvimento em metástase (Beltrão *et al.*, 1998), e em processos tais como adesão (Janković & Golubović, 2000), tipagem sanguínea (Matsui *et al.*, 2001), e para sistemas de

dosagem de glicose *in vivo* (Pickup *et al.*, 2005). Acredita-se que algumas lectinas estejam envolvidas no reconhecimento célula-célula. Na superfície da maioria das células, podemos encontrar padrões de carboidratos 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). Como um grupo de células não expressa padrões de carboidratos idênticos a outro tipo celular, as lectinas podem ser usadas para mostrar a diferença entre eles, auxiliando no diagnóstico (Muñoz-Crego *et al.*, 1999).

Recentemente foi observada a identificação seletiva de subespécies de *Escherichia coli*, através de um biossensor, utilizando-se lectinas de *Artocarpus integrifolia*, *Arachis hypogaea*, *Galanthus nivalis*, *Phytolacca americana*, *Lens culinaris*, *Helix pomatia*, *Persea americana*, *Triticum vulgare*, *Codium fragile*, *Canavalia ensiformis* (Ertl *et al.*, 2003).

Há ainda, grande interesse no estudo dessas biomoléculas a fim de produzir medicamentos-inteligentes, que atuam em células específicas do organismo, evitando os efeitos colaterais que são tão comuns nos medicamentos tradicionais (Clark *et al.*, 2000).

1.5 Purificação

As lectinas podem ser isoladas de plantas, animais e microrganismos (Wang *et al.*, 2000). As principais fontes de lectinas são sementes de leguminosas, chegando a constituir até 10% da proteína total. Podem, também, ser encontradas em diversos tecidos vegetais como raízes, vagens, bulbos, folhas, frutos e até mesmo cascas e entrecasca (Coelho & Silva, 2000; Ye & Ng, 2001). Em extratos biológicos as lectinas são detectadas principalmente através de ensaios de hemaglutinação, utilizando uma diluição em série da amostra antes da incubação com eritrócitos (Bladier *et al.*, 1989).

As lectinas podem ser caracterizadas 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 para

indicação da basicidade ou acidez da lectina, determinação de peso molecular e caracterização desta como glicoproteína (Coelho & Silva, 2000).

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

As proteínas são purificadas por procedimentos de fracionamento, onde as propriedades físico-químicas da proteína de interesse são usadas para separá-la das demais substâncias, eliminando seletivamente os demais componentes da mistura, de forma que somente a substância de interesse permaneça. Para a purificação de lectinas de uma fonte biológica é necessária inicialmente, 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 processo de cromatografia a mistura de substâncias a ser fracionada é dissolvida em um líquido (fase móvel), e ele é passado através de uma coluna contendo uma matriz sólida e porosa (fase estacionária). Fluindo através da coluna, os solutos interagem com a fase estacionária e sua eluição é retardada; esse retardamento depende das propriedades de cada soluto. (Maitland & Maitland, 2002).

O método da cromatografia de afinidade, que se baseia na propriedade das proteínas se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos (Elder *et al.*, 1983), é o mais utilizado para a purificação de lectinas. Nessa técnica um carboidrato que se liga de forma específica à proteína de interesse é ligado covalentemente a uma matriz inerte. Quando uma solução contendo substâncias distintas é passada através desse material cromatográfico, a proteína desejada liga-se ao carboidrato imobilizado, enquanto 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 ilustra a Figura 04. Esse método é utilizado em muitos protocolos de purificação de lectinas devido a alta conservação da atividade biológica (Konozy *et al.*, 2003).

Há ainda outras técnicas auxiliares como a cromatografia de troca iônica (Correia & Coelho, 1995), e gel filtração (Hatakeyama *et al.*, 2002; Jankovi

ć & Golubovi ć , 2000), que, como a cromatografia de afinidade, se caracterizam pela distribuição de moléculas que serão separadas por uma fase estacionária e outra móvel.

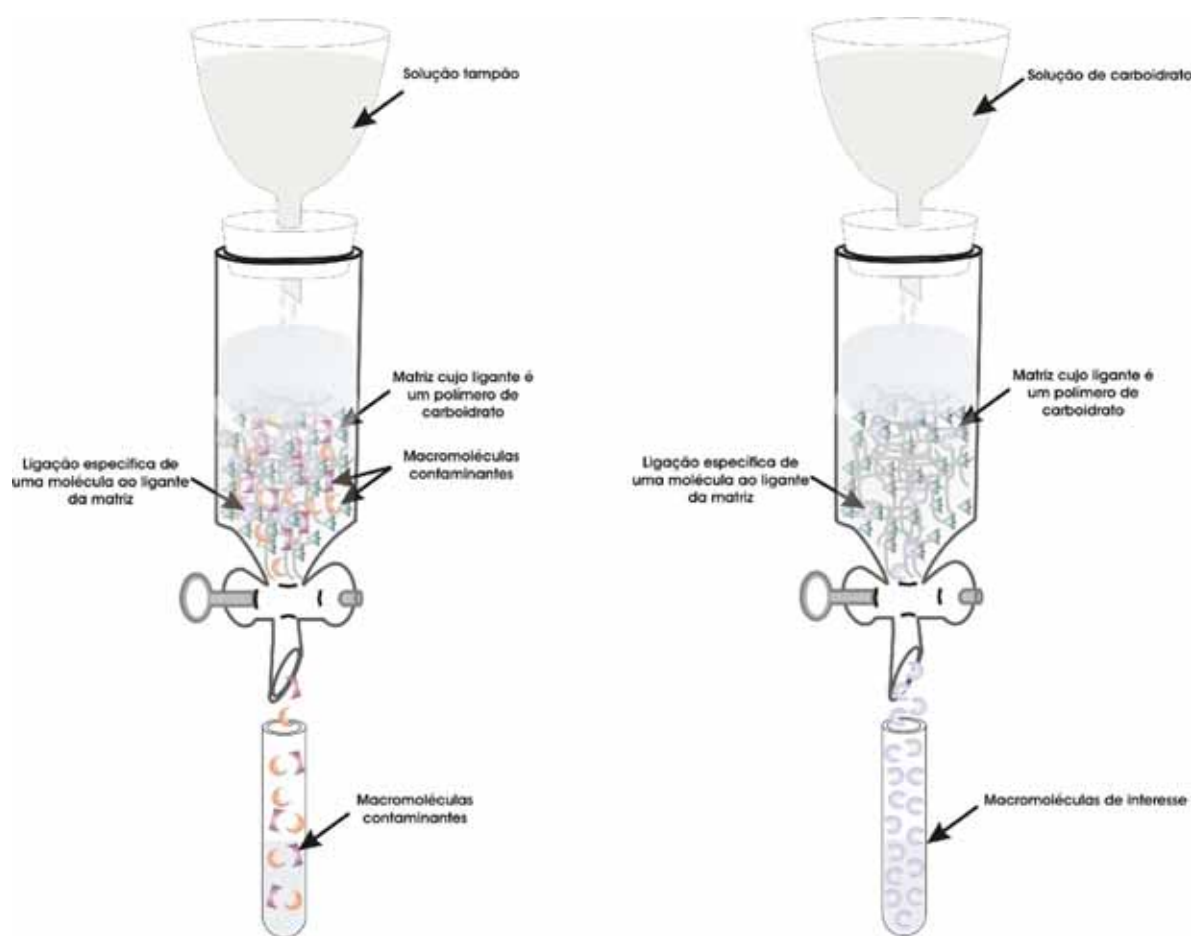


Figura 04: Representação esquemática de uma cromatografia de afinidade.

2 *Bauhinia monandra*

Bauhinia é um gênero de árvores tropicais pertencentes à família Leguminosae (Achenbach *et al*, 1988), que foi identificado em 1753 por Carolus Linnaeus e compreende cerca de 300 espécies (Silva & Filho, 2002), sendo que 64 podem ser encontradas no Brasil.

Ocorrem espécies nativas em Pernambuco como *B. acuruana* (Rodal *et al.*, 1998), *B. cheilantha* (Silva & Albuquerque, 2005), *B. forficata* (Silva *et al.*, 2003), *B. monandra* Kurz (Silva & Andrade, 2005), entre outras.

O gênero *Bauhinia* tem sido muito estudado por suas 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 de flores de *Bauhinia monandra*.

Folhas de *B. monandra*, Figura 06, contêm relativamente grande concentração de uma lectina específica à galactose (BmoLL). Mais de 2 mg da lectina podem ser obtidos de 5g de pó (Coelho & Silva, 2000).



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

Em eletroforese em gel de policrilamida contendo sulfato sódico, BmoLL demonstrou uma banda principal de 33 kDa, glicosilada, e uma outra banda de 26 kDa, não glicosilada. A elevada atividade aglutinante de BmoLL foi obtida em eritrócitos de coelhos tratados em glutaraldeído; eritrócitos humanos dos grupos B e AB tratados com glutaraldeído foram também aglutinados, enquanto que dos grupos sanguíneos A e O não aglutinaram (Coelho & Silva, 2000).

As preparações da folha de *B. monandra* que contêm BmoLL já têm revelado propriedades hipoglicemiantes em ratos (Pedrosa *et al.*, unpublished data). 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). Além disso, extratos etanólicos de folhas de *B. monandra* mostraram atividades antioxidantes (Argôlo *et al.*, 2004).

3 *Cratylia mollis*

Cratylia compõe um gênero neotropical, recém 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).

O gênero *Cratylia* pertence à 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).

Cratylia mollis, Figura 07, (feijão camaratuba ou camaratu) ocorre principalmente em áreas de Caatinga do Nordeste brasileiro sendo utilizada como forrageira na Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco. A lectina extraída de sementes dessa planta, Cramoll, apresenta formas moleculares 1 e 4 que reconhecem glicose e manose como principais carboidratos inibidores (Correia & Coelho, 1995). A lectina 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 de *Cratylia mollis*.

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 grande interesse para o uso biotecnológico (Rezende-Neto, 2003).

4 Abordagem eletroquímica

4.1 Célula eletroquímica

Célula eletroquímica é um dispositivo constituído de um eletrodo de referência e um eletrodo de trabalho (Niaura *et al.*, 1996), que transforma energia química em energia elétrica e vice-versa, através de uma reação de oxi-redução. Este dispositivo acoplado a um multímetro pode ser usado para a obtenção de medidas potenciométricas em sistemas inorgânicos, orgânicos e biológicos (Cohen *et al.*, 1999)

4.2 Eletrodo de Referência Padrão

O eletrodo de hidrogênio é constituído por um fio de platina coberto com platina finamente dividida. O hidrogênio gasoso é borbulhado numa solução de ácido sulfúrico 1M,

sob pressão de 1 atm. e temperatura de 25°C (Parthasarathy *et al.*, 1995) como mostra a Figura 08.

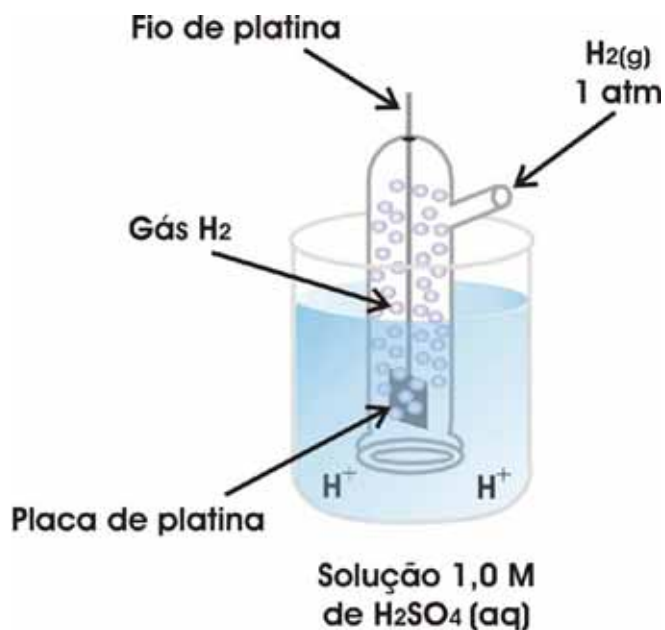


Figura 08: Eletrodo padrão de hidrogênio.

O potencial de um eletrodo mostra a tendência de uma reação ocorrer na superfície do eletrodo, ou seja, dá a medida da 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).

4.3 Eletrodo de Referência

O eletrodo de referência compara a corrente 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 ao redor de 0 mV. Nesse potencial, a contribuição de

espécies interferentes (facilmente oxidadas ou reduzidas) é minimizada (Rosatto *et al.*, 2001). Em estudos eletroquímicos é importante a escolha do eletrodo de referência correto. Um bom eletrodo de referência necessita ter um potencial que seja estável com o tempo e temperatura e que não seja alterado por pequenas perturbações do sistema, ou seja, pela passagem de uma pequena corrente elétrica, causada por interferentes (East *et al.*, 2000). Esse eletrodo pode ser 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 prata/cloreto de prata é composto 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).

4.4 Eletrodo de Trabalho

O eletrodo de trabalho gera a corrente elétrica que é medida pelo eletrodo de referência. Para a construção desse eletrodo são usados, comumente, metais como platina (Souza *et al.*, 2001), ouro (Matsumoto *et al.*, 1998) ou prata (Niauara *et al.*, 1996) devido às suas excelentes propriedades elétricas e mecânicas, além de outros materiais baseados em carbono. 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).

4.5 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).

4.6 Potencial Eletroquímico de proteínas

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).

4.7 Biossensores

Biossensor é um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecido animal e vegetal, células, organelas, e outros), imobilizado em uma membrana adequada, e conectado a um transdutor, o qual monitorará o aparecimento de algum reagente ou aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o material de interesse, convertendo este sinal biológico em sinal elétrico (Filho-Fatinelo *et al.*, 1992; Riccardi *et al.*, 2002). Biossensores têm apresentado maior desenvolvimento nos últimos anos, devido à crescente necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações muito baixas (Alfaya & Kubota, 2002).

Para uma caracterização de um sistema biológico com alto grau de precisão é necessário o conhecimento deste sistema em estudo, suas propriedades estruturais, bem como estabilidade na conformação das moléculas interagindo ou não com ligantes específicos (Bassi *et al.*, 1999).

Quando o biossensor é imerso em solução, o substrato difunde-se 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 gerada por essa reação pode ser convertida, pelo biossensor, em um impulso, potencial ou corrente elétrica; uma mudança de cor, chamada transdução óptica, ou mudança de massa, que conduz, por exemplo, uma mudança na frequência de vibração de um cristal piezo elétrico, entre outras (Riccardi *et al.*, 2002), Figura 09.



Figura 09: Representação esquemática do princípio do biossensor.

Os parâmetros que caracterizam um biossensor são sensibilidade, estabilidade e tempo de resposta. Recentemente biossensores têm sido usados para 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 e indústrias de droga, além de monitoramento em tempo real *in vivo*, que substitui as técnicas analíticas intermitentes usadas em química industrial e clínica (Zhang *et al.*, 2000).

Quando comparado à metodologia aplicada atualmente para certos exames, como de urina e em alimentos, por exemplo, o biossensor tem demonstrado a mesma precisão, mas com simplicidade e economia. Na medicina tem facilitado a identificação e quantificação de metabólitos de forma específica, mesmo em quantidades muito pequenas de amostras, como nos líquidos corpóreos. Além disso, já que a análise é 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).

Em 2003, Ertl *et al.*, construíram um biossensor utilizando o 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.

Pickup *et al.* (2004) reportaram um sensor para monitorar glicose, baseado no método fluorescente, tendo efetuado testes *in vivo*.

5 Objetivo Geral

Caracterização das lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* e de sementes de *Cratylia mollis* através de sistemas eletroquímicos visando explicar o comportamento dessas proteínas na presença de carboidratos.

6 Objetivos Específicos

Avaliar as propriedades eletroquímicas das lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* e de sementes de *Cratylia mollis* visando explorar:

→ Um sistema para avaliação da distribuição de cargas sobre a superfície das lectinas quando estas interagem ou não com carboidratos específicos.

→ Quantificar a interação lectina e ligante através de um sistema eletroquímico.

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.

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.

ANZAI, J.; KOBAYASHI, Y.; NAKAMURA, N.; HOSHI, T. 2000. **Use of Con A and mannose-labeled enymes 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.

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 Actuvation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 673-678.

BASSI, A. S.; TANG, D.; BERGOUGNOU, M. .A. 1999. **Mediated aperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6phosphate dehydrogenase, Mg^{+2} ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste.** Analytical Biochemistry, v. 268, n. 2, p. 223-228.

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 Biotecnology, 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.

—

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.

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.

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.

COHEN, O. J.; KING, B. C.; MAWKRIDE, F. M.J. 1999. **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.

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

DRICKAMER, K. 1998. **Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in**

animal lectins. Journal of Biological Chemistry, n. 263, p. 9557-9560.

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: Diferent Folds, Common Revognition 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.

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.

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.

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

JANKOVI

Ć, 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.

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 Polimers, v. 26, p. 219-230.

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 Dgalactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 410, p.222-229.

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.

MATSUI, T.; HAMATO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. 2001. **Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on noeglyvoproteins, 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.

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.

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

MOREIRA, A.; AINOUI, L.; OLIVEIRA, J. T.^a and CAVADA, B. S. 1991. **Plant Lectins: Chemical and Biological Aspects.** Memórias do Instituto Osvaldo Cruz, v. 86, p. 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.

NIAURA, G., GAIGALAS & 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.

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 avenae***. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 51, p. 333-345.

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

PEDROSA, L. F. C.; SILVA, M. B. R.; CECHINEL, M. Y. N.; CATANHO, M. T. J. A.; COELHO, L. C. B. B. (**unpublished data**).

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. 1995. **Lectins as plant defense proteins**. In: 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**. In: 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.

QUEIROZ, L. P.; CORADIN, L. 1995. **Biogeografia de Cratylia e Areas Prioritárias para Coleta. En: Potencial del Género Cratylia como Leguminosa Forrajera.** (eds.). EMBRAPA, CENARGEN, CPAC y CIAT, Memorias Taller sobre Cratylia. p. 1-28.

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.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. 2001. **Biossensores Amperométricos para Determinação de Compostos Fenólicos em Amostras de Interesse Ambiental.** Quimica Nova, v. 24, n. 1, p. 77-86.

ROSILIO, V.; BOISSONNADE, Marie-Martine; 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 Glutathione Associado a Métodos Eletroanalíticos na Avaliação do Estresse Oxidativo.** Quimica 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 Medical Chemistry, v. 7, p. 389-416.

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

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.

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

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.

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. 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.

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 eletric doublé layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface.** *Carboydrate Polymers*, n. 46, p. 191-193.

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 *Cratyllia mollis*.** *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, Great Britain, v. D52, p. 1046-1047.

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.

WANG, Hexiang; GAO, Jiquan; and T. B. Ng. 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.

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 Earch Transcriptase**

Inibitory Activities. Biochemical and Biophysical Research Communicatons, 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**

**An electrochemical system for monitoring interactions of lectins
from *Bauhinia monandra* leaves and *Cratylia mollis* seeds with
carbohydrates in charged environments**
**An electrochemical system for monitoring interactions of lectins
from *Bauhinia monandra* leaves and *Cratylia mollis* seeds with
carbohydrates in charged environments**

Jadilma C. Pimentel^{a,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;
^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE.

Abstract

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 double platinized platinum foil connected with a platinum wire, work electrode. The results showed that a high electrode surface area increased the stabilization in the interface of double electric layers. The best lectin positive electrochemical potentials to BmoLL (268 to 193) and Cramoll (252 to 214) were determined and indicated electrode high sensitivities. The present work defined the best electrolytic medium to evaluate BmoLL (300 mM sodium phosphate buffer) and Cramoll (150 mM NaCl) lectins versus carbohydrate interactions. BmoLL revealed a stronger reduction of electrochemical potentials at higher inhibition carbohydrate concentrations than Cramoll in NaCl 150 mM.

Key words: *Bauhinia monandra* lectin, *Cratylia mollis* lectin, electrochemical potentials, electrochemical potentiometric system.

1. 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]. The parameters that characterize a biosensor are sensitivity, stability and time of response. 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 applications [4] as well as pollution control and monitoracy [5].

Lectins, carbohydrate recognition proteins, have broad applications in different science areas such as, molecular biology, biophysical techniques, investigation of carbohydrates on cell surfaces, isolation and

characterization of glycoproteins, as well as cell-molecules and cell-cell interactions [6; 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 [9]. The interfacial behavior of BmoLL and its ability to interact with lipid monolayers have been studied by surface tension measurements [10]. Also, ethanolic extracts from *B. monandra* leaves showed antioxidant activities [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 for detecting normal and transformed cells, benignant or malignant [13]. Cramoll isolectin 1 (Cramoll 1) was sequenced [14] and crystallized [15]; it presented immunogenic, cytotoxic and anti-tumoral activities [16]. Cramoll 1 and Cramoll 1,4 also showed mitogenic activity [17].

*To whom correspondence should be addressed: Dr Luana C. B. B. Coelho. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Av. Moraes Rego, Sn, Cidade Universitária, Recife, 50670-420 Pernambuco, Brazil. E-mail: luanacassandra@terra.com.br

Many studies are being carried out to identify and characterize lectin carbohydrate interactions [18] and electrochemical systems have been of great importance as a relatively easy and trustworthy methodology. In this work BmoLL and Cramoll 1,4 carbohydrate bioespecific bindings were evaluated under different charged environments using an analytical sensor assembly. The method defined quantitatively distinct lectin/carbohydrate interactions.

2. Materials and Methods

2.1 Confection of Ag/AgCl reference and platinum work electrodes

The electrode used was confectioned from a Ag/AgCl disactivated pH electrode [19]. The silver wire covered with silver chloride was removed from pH electrode (Figure 1-a).

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

The work electrode was made of a double platinized platinum sheet connected with a platinum wire; it presented a greater charge potential in relation to reference electrode (Figure 1-b).

Phosphate buffer preparations and calibrations were performed using solutions of monobasic potassium phosphate and dibasic potassium phosphate prepared in 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM and 400 mM concentrations.

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

BmoLL was purified through ammonium sulphate fractionation (F0-60%) followed by affinity chromatography in guar gel column [8]; Cramoll was obtained by 150 mM NaCl (10% w/v) extraction followed by ammonium sulphate fractionation (F40 60%) and affinity chromatography in Sephadex G-75 [12].

Electrochemical potentials were determined in 200 and 300 mM phosphate buffers as well as 150 mM NaCl, in absence and presence of specific carbohydrates to BmoLL (0.5 mg/ml; 200 to 1000 mM galactose) and Cramoll 1,4 (1.0 mg/ml; 200 to 1000 mM glucose), in an electrochemical cell composed by Ag/AgCl reference electrode and double platinized platinum sheet connected with a platinum wire to increase the contact area, work electrode, both connected to a high impedance multimeter (Figure 2).

3. Results and Discussion

The availability of pure BmoLL and Cramoll in milligram amounts, with pharmacological applications [10; 16; 20], as well as previous approaches to define electrochemical potential of free and immobilized Cramoll [21] have raised interest to evaluate lectin carbohydrate interactions under distinct charged environments.

Electrochemical systems have been widely used for specific evaluation of interactions between biomolecules and respective ligands [22]. An electrochemical system characterization in a redox protein is important to unravel the biological functions of macromolecules [23]. The applied electrochemical system was efficient to measure BmoLL and Cramoll specific carbohydrate interactions.

Protein electrochemical potential is generated by charge accommodation in electrode surface submitted to an electric field. Measurements depend upon adsorbed molecule conformation, adsorption forces, metallic surface

composition and electrolyte solutions [24]. Charge stabilization time and electrochemical potential are related to analyzed molecule conformation and applied electrochemical system properties [25].

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 an unique pH, in which proteins are in constant activity. In the present work 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 (Figure 3). All buffer measurements were performed at pH 6.5, with active lectins; all potentials in phosphate buffer stabilized after 50 min. Curves for 200 and 300 mM 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 mM phosphate buffer or 150 mM 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 mM), figure 3.

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 interaction with ligand [26]. 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 [18; 27].

Positive electrochemical potentials are important for studies of redox systems [28]. 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 enzymes [29] were carried out to define relative affinity of these molecules to cellular receptors in alive organisms. A redox system to glucose analysis with *Canavalia ensiformis* seed lectin, Concanavalin A (Con A) obtained better result at 160 mV electrochemical potential, in phosphate buffer at pH 6.9, with 100 mM glucose [30].

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 mM to 1000 mM and carbohydrate absence (control); the data showed a significant curve reduction when glucose and galactose increased in solutions.

The linear calibration curve obtained by a potentiometric response among 200 to 1000 mM galactose revealed BmoLL correlation coefficient of 0.916 in 300 mM phosphate buffer; Cramoll presented a better result in 150 mM NaCl, with a correlation coefficient of 0.951 (Figure 3). The high correlation index for the data showed BmoLL and Cramoll stability and ability to recognize carbohydrates in electrolytic environments. Sensors with high correlation coefficient showed the highest sensitivity of these devices [31].

The electrochemical potential reduction *versus* carbohydrate concentration increase (Figure 3) indicate 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 the reduction of electrochemical potentials (150 mM NaCl). A lower affinity was detected to Cramoll at 200 and 300 mM phosphate buffers, at high glucose concentrations. Electrochemical potentials revealed charge distribution on molecular surface that can vary in relation to used electrolytical solution [24].

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, defining specificity [22]. Charge alteration capacity in electrode/electrolytic interface of a protein with specific ligand has been applied to develop analytical sensors [31].

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 method was developed to evaluate BmoLL and Cramoll specific carbohydrate interactions, under different charged environments; the system was sensible 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] WEE, K. W.; KANG, G. Y.; PARK, J.; KANG, J. Y.; YOON, D. S.; PARK, J. H.; KIM, T. S. Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. *Biosensors and Bioelectronics* 2005, v.20, p.1932-1938.
- [2] NORDIN, H.; JUNGNELIUS, M.; KARLSSON, R.; KARLSSON, O. P. Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology. *Analytical Biochemistry* 2005, v. 340, p. 359-368.
- [3] ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors & Bioelectronics* 2000, v. 15, p. 273-282.
- [4] ROGERS, K. R.; GERLACH, C. L. Environmental Biosensors: A Status Report. *Environmental Science & Technology* 1996, v. 30, p. 486A-491A.
- [5] HO, C. K.; ROBINSON, A.; MILLER, D. R.; DAVIS, M. J. Overview of sensors and needs for environmental monitoring. *Sensors* 2005, v. 5, p.4-37.
- [6] GOLDSTEIN, J. I. Lectin structure-activity: The story is never over. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, v. 50, p. 6583-6585.
- [7] SHARON, N.; LIS, H. History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules: a historical overview. *Glycobiology* 2004, v. 14, n.11, p. 53-62, 2004.
- [8] COELHO, L. C. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis* 2000, v. 11, p. 295-300.
- [9] PEDROSA, L. F. C.; SILVA, M. B. R.; CECINEL, M. Y. N.; CATANHO, M. T. J. A.; COELHO, L. C. B. B. (unpublished data).
- [10] ROSILIO, V.; BOISSONNADE, Marie-Martine; COELHO, L. C. B. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ANDRADE, C. A. S.; BASZKIN, A. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 2004, v. 250, p. 491-497.
- [11] ARGÔLO, A. C. C. M.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology* 2004, v. 95, n. 00, p. 229-233.
- [12] CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995, v. 55, p. 261-267.
- [13] BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1998, v. 74, p. 125-132.
- [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. Amino acid sequence tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology* 2003, v. 13, n. 12, p. 961-972.
- [15] TAVARES, G. A.; CARACELLI, I.; BURGER, C. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVA, G. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. *Acta Crystallography* 1996, D52, p. 1046-1047.
- [16] ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. A. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, v. 278, p. 435-445.
- [17] MACIEL, E. V. M.; ARAÚJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 2004, v. 32, p. 57-60.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] RODRIGUES, J. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; COUVREUR, P.; PONCHEL, G.; GREF, R. Novel core

(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *Journal of Controlled Release*, Amsterdam 2003, v. 92, p. 103-112.

[21] SOUZA, S. R.; DUTRA R. F.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. M. A.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresource Technology* 2003, v. 88, p. 255-58.

[22] COHEN, O. J.; KING, B. C.; MAWKRIIDE, F. M.J. Spectroelectrochemical and electrochemical determination of ligand binding and electric transfer properties of myoglobin, cyanomyoglobin, and imidazolemyoglobin. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, v. 447, p. 53-62.

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

[24] FRICQUELMONT-LOÏZOS, M.; TAKENOUTI, H.; KANTÉ, W. J. 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* 1997, n. 428, p. 129-140.

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

[26] SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. M. A.; KENNEDY, J. F.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B. 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* 2001, v. 46, p.191-193.

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

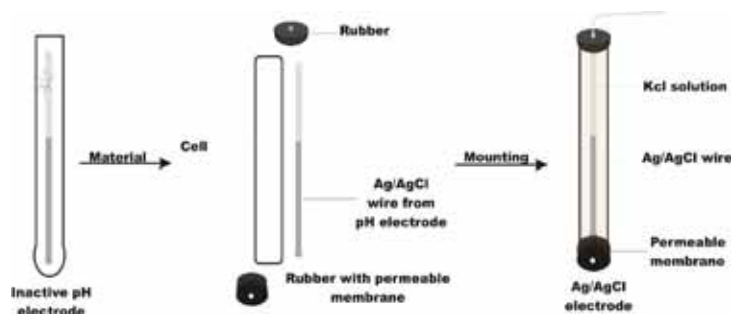
[28] MATSUMOTO, T.; FURUSAWA, M.; FUJIWARA, H.; MATSUMOSTO, Y.; ITO, N. A micro-planar amperometric glucose sensor unsusceptible to interference species. *Sensors and Actuators B* 49 1998, p. 68-72.

[29] CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETO, M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. *Current Protein and Peptide Science* 2001, v. 2, n. 2, p. 123-135.

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

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

(a)



(b)

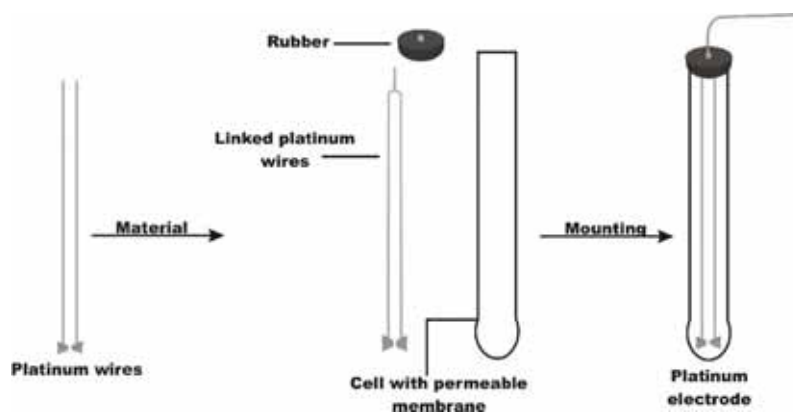


Figure 1: Confection of Ag/AgCl (a) and platinum (b) electrodes.

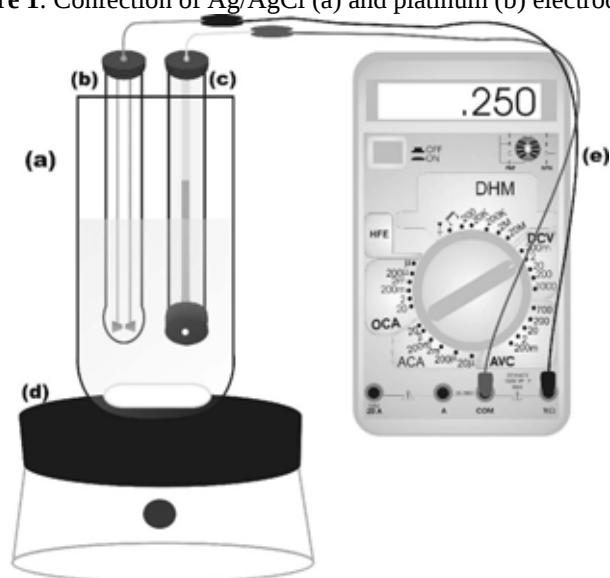


Figure 2: Electrochemical potential system. (a) Electrochemical cell; (b) work electrode; (c) reference electrode; (d) shaker and (e) multimeter.

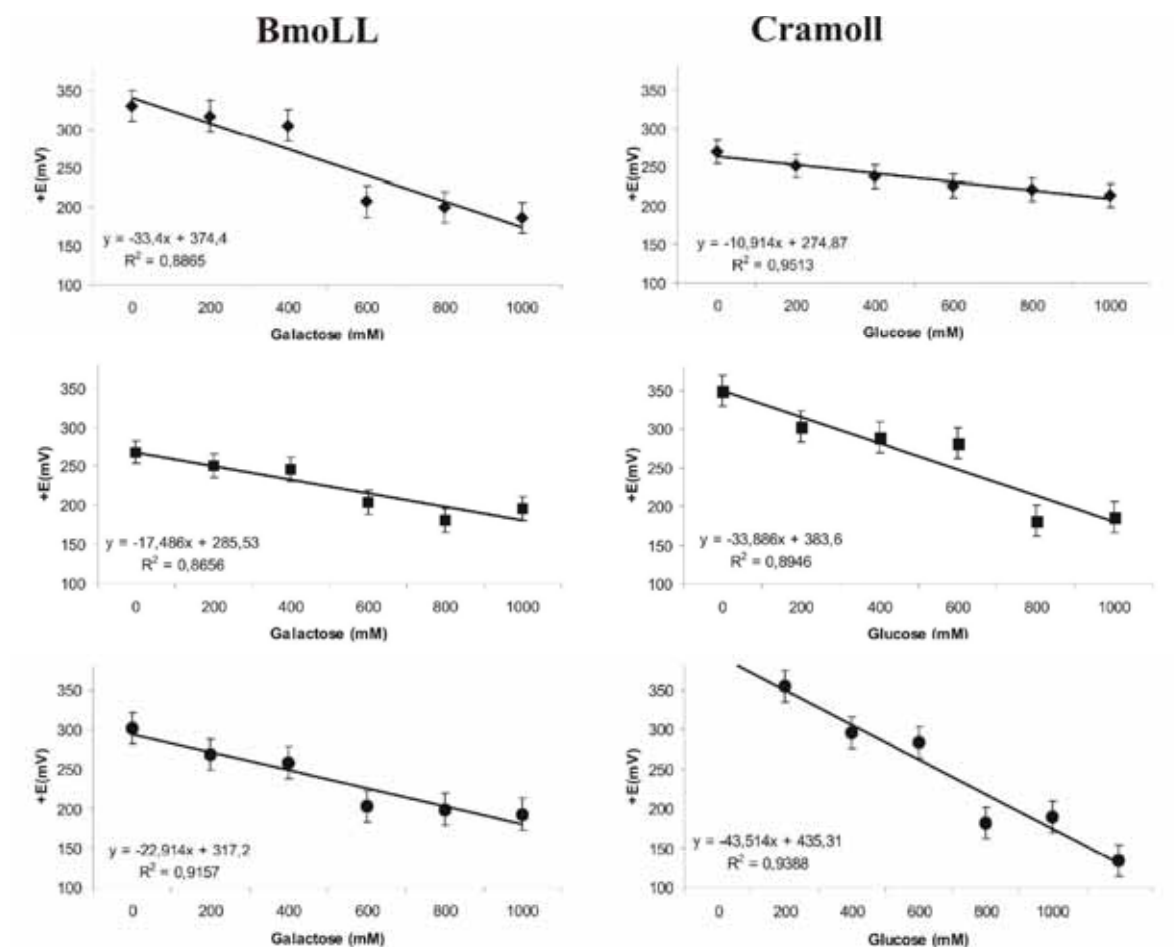


Figure 3: BmoLL and Cramoll 1,4 interactions under different salt solutions with distinct carbohydrate concentrations. (

◆) 150 mM NaCl, (

■) 200 mM phosphate buffer and (

●) 300 mM phosphate buffer. Simulation lines were based upon equation of linear regression (—). Data are given as means ± S.D. for three experiments each.

Conclusões

→ Os potenciais eletroquímicos positivos para a BmoLL e Cramoll 1,4 indicam a alta sensibilidade dos eletrodos, que são hábeis para dar informações sobre o comportamento resultante da interação destas proteínas com os seus ligantes específicos.

→ O sistema eletroquímico desenvolvido é sensível as mudanças conformacionais ocorridas na BmoLL e Cramoll 1,4 através da interação com ligantes.

→ O comportamento da dupla camada elétrica na interface eletrodo/lectina é um parâmetro básico para avaliação das cargas superficiais das lectinas BmoLL e Cramoll 1,4.

→ Foi desenvolvido um método quantitativo simples e economicamente viável para avaliação da interação da BmoLL e Cramoll 1,4 com seus ligantes específicos em diferentes soluções salinas.

→ Tampão fosfato 300 mM é o melhor meio eletrolítico para avaliação das cargas superficiais da BmoLL interagindo com galactose; Cramoll, interagindo com glicose, apresentou um melhor resultado em NaCl 150 mM.

→ Avaliações eletroquímicas de lectinas contribuem para o estudo da interação destas proteínas com os seus carboidratos específicos.

ANEXOS

Trabalhos apresentados em Congressos

Trabalho apresentado na XXXIII

Reunião Anual da

Sociedade Brasileira de Bioquímica

e Biologia

Molecular

Caxambu -MG, 2004.

**Evaluation of *Bauhinia monandra* leaf lectin interactions
with galactose through
electrochemical and optical measurements**

Souza, S.R.^{1,2} ; Pimentel, J.C.¹ ; Silva, M.B.R.³ ; Silva, K.C.F.² ; Coelho,
L.C.B.B.³

¹Faculdade Frassinetti do Recife-FAFIRE; ²Universidade Federal Rural
de Pernambuco-UFRPE;

³Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. E-
mail:souzz@bol.com.br

Lectins are proteins or glycoproteins with carbohydrate binding sites and widely distributed in unicellular or multicellular organisms. A galactose-specific *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) has been highly purified through ammonium sulphate fractionation and guar gel affinity chromatography. The aim of this work was to evaluate BmoLL interaction with galactose through electrochemical potentials and turbidity measurements. Potentials were measured through a system containing a pair of electrodes: a platinum wire as work electrode and a

reference (Ag/AgCl) electrode, both coupled to an impedance high multimeter. Change capacity at the interface of work electrode depends on carbohydrate lectin complex formation and was evaluated at different galactose concentrations in 0.15 M NaCl. Interactions between BmoLL and galactose were also measured using a nephelometric turbidity sensor. In conclusion BmoLL functioned as a signal amplifier in used electrochemical system; complexes BmoLL-carbohydrate blocked light pathway and were evaluated by used optical approach.

Supported by CNPq, PRONEX/FACEPE, MCT /CNPq/PADCT.



Evaluation of *Bauhinia monandra* leaf lectin interactions with galactose through electrochemical and optical measurements

Souza, S.R.^{1,2}; Pimentel, J.C.¹; Silva, M.B.R.¹; Silva, K.C.F.²; Coelho, L.C.B.B.³

¹Faculdade Francisco de Paula-FAFIRE, ²Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFPE, ³Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins with carbohydrate binding sites and widely distributed in unicellular or multicellular organisms. A galactose-specific *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) has been highly purified through ammonium sulphate fractionation and guar gel affinity chromatography. The aim of this work was to evaluate BmoLL interaction with galactose through electrochemical potentials and turbidity measurements.



Electrochemical system.

Results

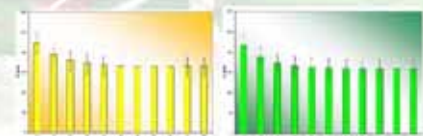


Figure 1. Electrochemical potentials with (b, 200 mM; C, 400 mM)

Materials and Methods

Potentials were measured through a system containing a pair of electrodes: a platinum wire as work electrode and a reference (Ag/AgCl) electrode, both coupled to an impedance high multimeter. Change capacity at the interface of work electrode depends on carbohydrate lectin complex formation and was evaluated at different

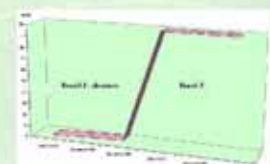


Figure 1. Turbidity evaluation.

Conclusion

Trabalho apresentado na VII^a
Reunião Regional da
Sociedade Brasileira de Bioquímica
e Biologia
Molecular e 2nd International
Symposium in
Biochemistry of Macromolecules
and Biotechnology
Recife -PE, 2004.



An electrochemical system for monitoring interactions of lectins from *Bauhinia monandra* leaves and *Cratylia mollis* seeds with carbohydrates in charged environments

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

^aDepartamento de Ciências Biológicas da Faculdade Frassinetti do Recife-FAFIRE-PE; ^bDepartamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE; ^cDepartamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE-PE.

* jadilma_Pimentel@hotmail.com.

[Av. Conde da Boa Vista, 1482. Apto. 311. Recife, PE. CEP: 50060-001](#)

Abstract

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 (Correia & Coelho, 1995; Coelho & Silva, 2000). BmoLL and Cramoll 1,4 electrochemical

potentials were obtained through potentiostatic techniques using different salt solutions as carriers to evaluate

distribution between Ag/AgCl electrode, reference electrode, and double platinized platinum foil connected

with a platinum wire, work electrode. Lectin positive

electroch
emical

potentials
were
determined
and

indicated electrode high sensitivities. The results suggested that a high electrode surface area increases the

stabilization in interface of double electric layers. An electrochemical system was developed to evaluate

charged loads in BmoLL and Cramoll 1,4 free surfaces, interacting or not with their specific carbohydrates.

Key words: *Bauhinia monandra*, *Cratylia mollis*, lectin, biosensor, electrochemical potential, free surface, electrochemical potentiometric system.

1. Introduction

An
ele
ctr
och
emi
cal
sys
te
m
is
an

Bauhinia monandra leaves contain analytical instrument used to determine the relatively high concentration of a galactose-various electro-active species present in the specific lectin; more than 2 mg of BmoLL were sample solution under evaluation. It works on the obtained from 5 g of leaf powder. *Bauhinia* genus principle of current or voltage measurements in an has been studied for its medicinal properties such electrochemical cell under the application of as hypoglycemic trials [Coelho & Silva, 2000]. *B.* voltage or current in a

predefined manner, *monandra* leaf preparations containing BmoLL respectively. have already revealed hypoglycemic properties in In this work BmoLL and Cramoll 1,4 rats. Also, ethanolic extracts from *B. monandra* carbohydrate interactions were evaluated under leaves showed antioxidant activities [Argolo *et al.*, 2004]. different electrochemical charged environments; reference (Ag/AgCl) and work (platinum) *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll, has electrodes were confectioned and used as an distinct molecular forms, isolectins and isoforms analytical sensor assembly. (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4), with different monosacharide inhibitions [Correia & Coelho, 1995]. Cramoll isolectin 1 (Cramoll 1) 2. **Experimental** was crystallized and completely sequenced [de Souza *et al.*, 2003]; it presented immunogenic, 2.1 **Ag/AgCl electrode confection and potential** cytotoxic and anti-tumoral activities. Cramoll 1,4 **determination** was an excellent tool in mitogenic activity studies The electrode used in this work was [Maciel *et al.*, 2004].

confectioned from the wire Ag/AgCl of a disactivated pH electrode [East & Valle 2000].



The silver wire covered with silver chloride was removed from a pH electrode (figure 1). The electrochemical potential of Ag/AgCl electrode was evaluated in relation to a calomel saturated reference electrode.

2.2 Work Electrode Construction

The work electrode was constituted by a double platinized platinum foil connected with a platinum wire, that adsorbs hydrogen in great amount; this electrode generates the electric charge that is measured by reference electrode (figure 2).

2.3 Phosphate buffer preparation

Solutions of monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) and dibasic potassium phosphate have been prepared (K_2HPO_4) in 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM and 400 mM concentrations. The solutions of dibasic potassium phosphate were calibrated to pH 6.5 using monobasic potassium phosphate solution of equal concentration.

2.5 BmoLL and Cramoll 1,4 electrochemical potentials

BmoLL and Cramoll 1,4 electrochemical potentials were determined in 200 and 300 mM phosphate buffers as well as NaCl 150 mM, in the absence and presence of specific carbohydrates, at 200 and 400 mM galactose and glucose for respective lectins. The electrochemical cell was composed by an Ag/AgCl reference electrode and a double platinized platinum foil connected with a platinum wire to increase the contact area, both connected to a high impedance multimeter.

3. Results and Discussion

Electrochemical systems have been widely used for specific evaluation of interactions between biomolecules and respective ligands [Cohen *et al.*, 1999]. Electrochemical system characterization in redox protein composite systems, such as cytochrome C is important, unravelling the biological function of these macromolecules [Marken *et al.*, 2002].

The electrochemical system application to evaluate BmoLL and Cramoll 1,4 interfaces with electrode/electrolyte interactions were analyzed through electrochemical potentials under different conditions. All potentials in phosphate buffer stabilized after 50 min. Curves for 200 and 300 mM phosphate buffer had a better charge accommodation in electrode surface; it occurred because of their stable electrochemical potentials.

Electrochemical potentials in phosphate buffer pH 6.5 were analyzed at 200 and 300 mM concentrations and NaCl 150 mM in the presence of galactose (BmoLL) and glucose (Cramoll 1,4), at 200 and 400 mM, respectively.

Principles based on charge distribution of double electric layer on Cramoll 1,4 interface system adsorbed on surface of a platinum electrode or immobilized to active glass surface with aminopropyletoxysilane, APTES [Souza *et al.*, 2001] made possible to construct the first electrochemical sensor to define analytical and quantitative forms of lectin interaction with ligand.

Electrochemical potential was regulated by electron transference between protein exposed to an electric field and different concentrations of ligands [Sugawara *et al.*, 2000].

Systems that can determine the charge distribution in protein surfaces such as lectins or enzymes [Cavada *et al.*, 2001] were carried out to define relative affinity of these molecules to cellular receptors in alive organisms.

BmoLL interactions varied in relation to electrolytic conditions. At 200 and 300 mM phosphate buffer and 150 mM NaCl, this property can be quantitatively detected through obtained electrochemical potentials in different solutions (figure 3-a). These

variations are related to the presence of modifying superficial charges in accordance with ligand interaction.

Cramoll 1,4 electrochemical potentials under different salt solutions showed a lower potential in relation to presence and increase of glucose concentration; the variations occurred with high significance in phosphate buffer, when compared with NaCl solution (figure 3-b).

Electrochemical potential stabilization time due to a charged film formation on work electrode is singular to each protein evaluated in the system. The results obtained in this work suggest that double platinized platinum foil connected with a platinum wire, with the purpose to increase biomolecule adsorption area in study is skillful for electrochemical potential evaluations. A high stabilization degree of the double electric layer in protein/electrode interface in electrolytic solutions was obtained.

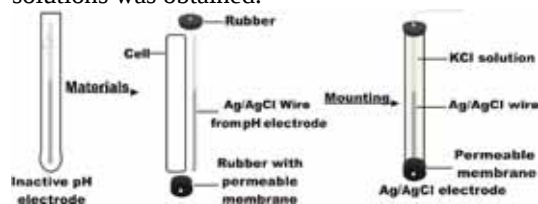
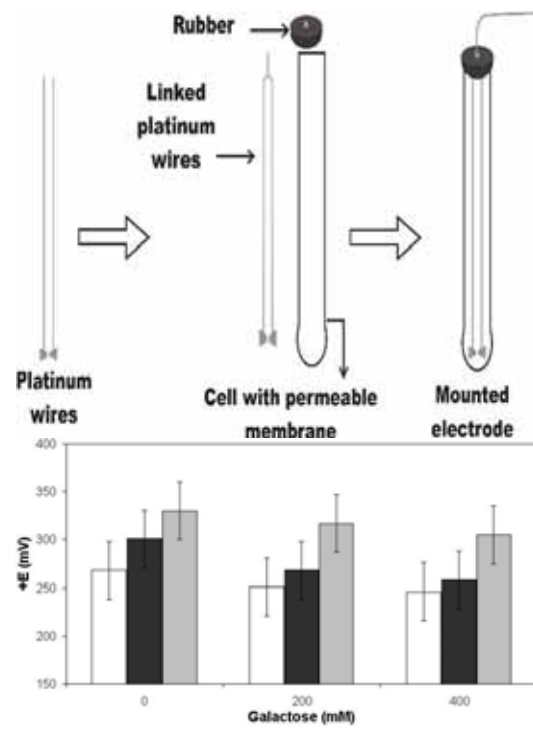
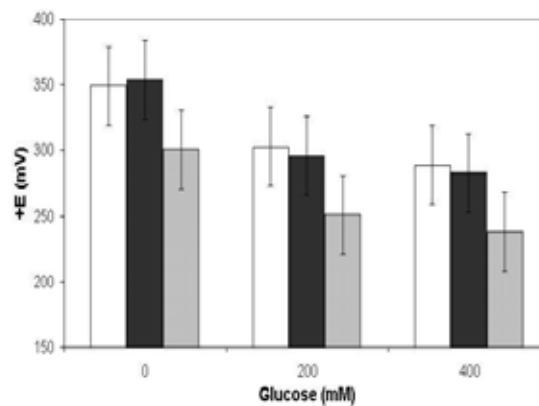


Figure 1: Ag/AgCl electrode confection.



(b)



Conclusion

A simple and economically viable quantitative method was developed to evaluate BmoLL (galactose) and Cramoll (glucose) specific interactions, under different charged environments; the system was sensible to detect lectin conformational changes through interaction with ligands.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

A. C. C. Argolo; A. E. G. Sant

, Ana, M. Pletsch, L. C. B. B. Coelho. Bioresource Technology. 2004, **95**, 229-233.
B. S. Cavada; T. Barbosa; S. Arruda; T. B. Grangeiro; M. Barral-

- Neto. **Current Protein and Peptide Science**, 2001, 2, 123-135.
- E. V. M. Maciel; V. S. Araújo-Filho; M. Nakazawa; Y. M. Gomes; L. C. B. B. Coelho; M. T. S. Correia. **Biologicals**, 2004, 32, 57-60.
- F. Marken; A. P. Chistopher; D. Asogan. **Electrochemistry Communications**, 2002, 4, 62-66.
- G. A. East; M. A. Valle. **Journal of Chemical Education**, 2000, 77, 97-110.
- G. A. de Souza; P. S. L. Oliveira; S. Trapani; A. C. O. Santos; J. C. Rosa; H. J. Laure; V. M. Faça; M. T. S. Correia; G. A. Tavares; G. Oliva; L. C. B. B. Coelho; L. J. Greene. **Glycobiology**, 2003, 13, 961-972.
- K. Sugawara; H. Kuramitsu; S. Hoshi; K. Akatsuka; S. Tanaka; H. Nakamura. **Talanta**, 2000, 47, 665-67.
- L. C. B. B. Coelho; M. B. R. Silva. *Phytochemical Analysis*. 2000, 11, 295-300.
- M. T. S. Correia; L. C. B. B. Coelho. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 1995, 55, 261-267.
- O. J. Cohen; B. C. King; F. M. J. Mawkrice. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 1999, 447, 53-62.
- S. R. Souza; M. T. S. Correia; M. M. A. Pessoa; J. F. Kennedy; J. L. Lima-Filho; L. C. B. B. Coelho. **Carbohydrate Polymers**, 2001, 46, 191-193.



An electrochemical system for monitoring interactions of lectins from *Bauhinia monandra* leaves and *Cratylia mollis* seeds with carbohydrates in charged environments

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

^aFaculdade Frassinetti do Recife-FAFIRE-PE; ^bUniversidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE; ^cUniversidade Federal Rural de Pernambuco

Introduction

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.

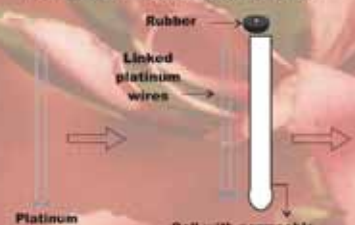
BmoLL and Cramoll 1,4 carbohydrate interactions were evaluated under different electrochemical charged environments; reference (Ag/AgCl) and work (platinum) electrodes were confectioned and used as an analytical sensor assembly.

Experimental

Ag/AgCl electrode confection



Work Electrode Construction



Results and Discussion

Electrochemical potential stable at the interface work electrode for each biomolecule evaluated in the system obtained in this work suggest that double foil connected with a platinum wire, will increase biomolecule adsorption area for electrochemical potential evaluations.

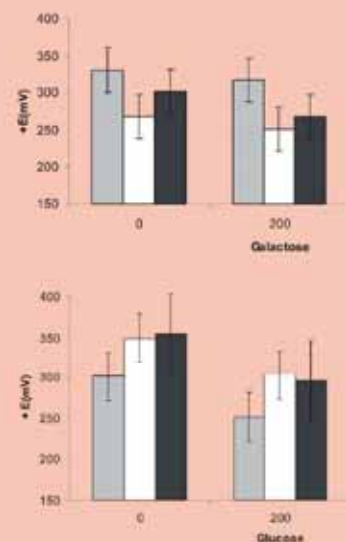


Figure 1: BmoLL (A) and Cramoll 1,4 (B) interactions in different carbohydrate and salt solutions. () 150 mM NaCl.

Trabalho apresentado na XXXIV
Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Bioquímica
e Biologia
Molecular
Águas de Lindóia -PE, 2004.

**Interaction of Bauhinia monandra leaf lectin with an
endophytic bacterium isolated
from leaves: detection by an electrochemical system**

Pimentel, J.C.^{1,2}, Ramos, S.A.F.²; Souza, J.E.G.³, Silva, M.B.R.²; Souza,
S.R.¹ and Coelho, L.C.B.B.²

¹Depto de Ciências Biológicas, Faculdade Frassinetti do Recife-FAFIRE-PE, Av. Condor,
500060-002, Boa Vista, Recife-PE, Brasil. ²Depto de Bioquímica, Centro de Ciências I,
Universidade Federal de Pernambuco. Rua Prof. Nelson Chaves S/N,
50670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil. ³Depto de
Química, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe,
526, 50050900 Boa Vista Recife-PE, Brasil. E-mail:
souzz@bol.com.br

Lectin-carbohydrate interactions constitute a signal to

answers such as mitogenic activity, tumoral cell recognition and diagnosis of specific bacteria. Potentiometric responses generated from biomolecules interacting with ligands are powerful tools for the knowledge of important biological processes; exchanges in heterogeneous protein surfaces are detected through system polarizability. In popular medicine, infusions of *Bauhinia monandra* leaves are used by carriers of diabetes as hypoglycemics. *B. monandra* leaf lectin (BmoLL), galactose-specific, has been highly purified through ammonium sulphate fractionation and guar gel affinity chromatography. The aim of this work was to evaluate the interaction of BmoLL and Canavalia ensiformis seed lectin, Concanavalin A, Con A, glucose-mannose specific, with an endophytic bacterium isolated from *B. monandra* leaves. The electrochemical cell used a platinum electrode (work electrode), a calomel saturated electrode (reference electrode), as well as BmoLL or Con A immobilized in nanopores of Nafion beads in saline medium, to obtain electrochemical parameters. BmoLL-Nafion beads revealed a high electrochemical potential of interaction with endophytic from *B. monandra* leaves (380 mV) in relation to Con A (260 mV). Potentials were reduced with increase (100-200 mM) of specific carbohydrates: galactose (280-260 mV) and glucose (150-110 mV). The results showed a specific binding endophytic/BmoLL. The electrochemical system containing BmoLL immobilized on Nafion beads is a model to characterize the broad bioselective phenomenon lectin-cell.

Supported by CNPq, PRONEX/FACEPE,
MCT/CNPq/PADCT.



Interaction of Bauhinia monandra leaf lectin with an endophytic bacterium isolated from leaves: detection by an electrochemical system

Pimentel, J. C.^{1,2}; Ramos, S. A. F.²; Souza, J. E. G.¹; Silva, M. B. R.²; Souza, S. R.¹; Coelho, L. C. B.³

¹Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade Pernambuco do Recife-UFPE-PE;

²Departamento de Bioprocessos da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE;

³Departamento de Química da Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

E-mail: souza@bcb.com.br

Introduction

Lectin-carbohydrate interactions constitute a signal to answers such as mitogenic activity, tumoral cell recognition and diagnosis of specific bacteria. Potentiometric responses generated from biomolecules interacting with ligands are powerful tools for the knowledge of important biological processes; exchanges in heterogeneous protein surfaces are detected through system polarizability. In popular medicine, infusions of *Bauhinia monandra* leaves are used by carriers of diabetes as hypoglycemics.

B. monandra leaf lectin (BmoLL), galactose-specific, has been highly purified through ammonium sulphate fractionation and guar gel affinity chromatography. The aim of this work was to evaluate the interaction of BmoLL and *Canavalia ensiformis* seed lectin, Con A, galactose-specific, with an endophytic bacterium isolated from *B. monandra* leaves (B27).

Experimental

The electrochemical cell used a platinum electrode (work electrode), a calomel saturated electrode (reference electrode), as well as BmoLL or Con A immobilized in nanopores of Nafion beads in saline medium, to obtain electrochemical parameters.

Results and Discussion

BmoLL-Nafion beads revealed the electrochemical potential of interaction of endophytic from *B. monandra* leaves (B27) in relation to Con A (260 mV). Potentials varied with increase (100-200 mM) of carbohydrates: galactose (280-260 mV) and glucose (150-110 mV). The results showed a specific interaction of endophytic/BmoLL.

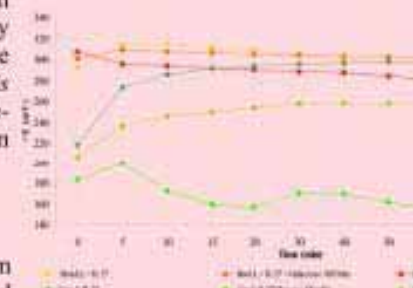


Figure 2. Electrochemical potentials of BmoLL and Con A interacting with endophytic bacterium.

APÊNDICE

ACS Paragon System

A Model of Excellence in Scientific Collaboration

[Home](#) [Privacy Policy](#)

[New to This Site?](#)

[Tools](#)

[Author Checklist](#)

[Rev](#)

Biotechnology Progress

[Submit New Manuscript](#)

[Thank You for Submitting a Manuscript](#)

Prof. Dr. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho,

Manuscript Number: bp0600381

Manuscript Title: An electrochemical system for monitoring interactions of lectins from Bauhinia monandra leaves and Cratylia mollis seeds with carbohydrates in charged environments

Below are the documents that you have submitted to the editorial office.

Submitted Files

Document	Uploaded Files	ACS-Generated PDFs
Manuscript Document	Paper submitted.doc (1384k)	PDF(408k)
	Word 2000 (Windows)	
Cover Letter	To the editor.doc (24k)	PDF(11k)
	Word 2000 (Windows)	

Sincerely,

Jerome Schultz

Editor in Chief, Biotechnology Progress