

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

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA LECTINA DE RAÍZES DE *Bauhinia*
monandra (BmoRoL)**

JAYRA DANTAS DE SOUZA

RECIFE - PE

2012

JAYRA DANTAS DE SOUZA

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA LECTINA DE RAÍZES DE *Bauhinia*
monandra (BmoRoL)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Co-Orientadores: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz

Recife - PE

2012

Souza, Jayra Dantas de

Aplicações biotecnológicas da lectina de raízes de *Bauhinia monandra* (BmoRoL) / Jayra Dantas de Souza. – Recife: O Autor, 2012.

131 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadores: Maria Tereza dos Santos Correia e Flamarion Borges Diniz

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e apêndices

1. Lectinas 2. *Bauhinia monandra* (BmoRoL) 3. Eletroquímica I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso II. Correia, Maria Tereza dos Santos III. Diniz, Flamarion Borges IV. Título

Jayra Dantas de Souza


**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA LECTINA DE RAÍZES DE
Bauhinia monandra (BmoRoL)**

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES




Profa. Dra. Luana Cassandra B. B. Coelho (Orientadora, Depto. de Bioquímica / UFPE)



Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz (Depto. De Química Fundamental / UFPE)



Profa. Dra. Patrícia Maria G. Paiva (Depto. de Bioquímica / UFPE)



Profa. Vera Lúcia de Menezes Lima (Depto. de Bioquímica / UFPE)



Profa. Dra. Michele Dalvina C. da Silva (Depto. de Ciências Animais / UFERSA)

SUPLENTES

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Depto. de Bioquímica / UFPE)

Prof. Dr. Roberto Araújo Sá (Centro Acadêmico do Agreste / UFPE)

“Concedei-nos Senhor, **Serenidade** necessária, para aceitarmos as coisas que não podemos modificar, **Coragem** para modificarmos aquelas que podemos e **Sabedoria** para distinguir umas das outras”

Reihold Niebuhr

A Deus pela força, saúde, oportunidade, persistência e fé para que eu pudesse finalizar esta importante etapa da minha vida,

À minha família e em memória ao meu pai Luiz Gonzaga de Souza.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A *Deus* que tem sempre me iluminado para continuar a caminhada.

A minha família, meus pais Ednice e Luiz Gonzaga, por todo amor e dedicação, aos meus irmãos Ludnice, Ludnise e Júnior por estarem sempre presentes em minha vida nos bons e nos difíceis momentos, pelas lutas incansáveis por melhoria e crescimento. Vocês são o que tenho de mais valioso na vida;

Á minha linda e adorada sobrinha Letícia, pela grande alegria que encontro em você.

A minha orientadora Profa. Dra. Luana Cassandra, pela orientação científica, confiança, oportunidade e apoio prestados nos momentos em que precisei de sua fé, força e conselhos sábios e sinceros;

Ao Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz (Departamento de Química Fundamental - DQF/UFPE) pelo incentivo, oportunidade, competência e ensinamentos seguros que contribuíram para a realização deste trabalho;

A Profa. Dra. Tereza Correia, pela co-orientação nesta minha fase de aprendizado.

A Daniel pelos esforços dedicados, compreensão, carinho e paciência nessa fase da minha vida, onde inúmeras vezes as dificuldades surgidas foram atenuadas pelo simples fato de contar e compartilhar com você;

A minha amiga Alessandra Mattos, pela força, conselhos, apoio e amizade. Os adjetivos escolhido são insuficiente para expressar minha gratidão e o esmero que tenho por sua amizade;

A Eduardo Falcao, pela amizade inestimável, contribuições e ajuda indispensável neste trabalho bem como os conselhos no decorrer desta trajetória e pelos muitos momentos de descontração que jamais serão esquecidos;

Aos amigos Maria Barbosa Reis da Silva e João Virgínio, pelo amor e amizade. A

todos que constituem o Laboratório de Glicoproteínas e amigos do Departamento de Bioquímica da UFPE pela contribuição no decorrer desta minha caminhada científica;

Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica Edson Mororó Moura e do Departamento de Química Fundamental – UFPE, Mônica Crespo, Euzébio, Rodrigo, Gilson Ferreira, Diego, Ana Claudia, Rogério e Talita com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado, descontração e amizade;

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas;

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS | xiii |
| | |
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT | xvi |
| | |
| CAPÍTULO I | |
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 20 |
| 3 OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 Objetivo Geral | 21 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 21 |
| | |
| CAPÍTULO II | |
| 1 BREVE HISTÓRICO SOBRE LECTINAS E SUA DISTRIBUIÇÃO NA NATUREZA | 23 |
| 1.1 Classificações das Lectinas | 25 |
| 1.2 Lectinas de Plantas Leguminosas | 26 |
| 1.3 O Gênero <i>Bauhinia</i> e a espécie <i>B. monandra</i> | 27 |
| 1.4 Identificação e Especificidade de Lectinas | 28 |
| 1.5 Purificação | 31 |
| 1.6 Caracterização Biológica de Lectinas | 33 |
| 1.7 Importância e Aplicações Biotecnológicas | 35 |
| 1.8 Ação Antifúngica | 38 |
| 1.9 Ação Inseticida | 39 |
| 1.9.1 os cupins | 40 |
| 2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR | 42 |
| 3 BIOSSENSORES | 45 |
| 3.1 Transdutores Eletroquímicos | 46 |

| | |
|--|----|
| 3.2 Técnicas Eletroquímicas | 47 |
| 3.2.1 voltametria cíclica | 48 |
| 3.2.2 espectroscopia de impedância eletroquímica | 50 |
| 4 CIRCUITO EQUIVALENTE | 57 |
| 5 SOFTWARE ZVIEW | 60 |
| 6 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA | 61 |
| REFERÊNCIAS | 62 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|-----------|
| Artigo 01: A new <i>Bauhinia monandra</i> galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities | 84 |
|--|-----------|

CAPÍTULO IV

| | |
|--|-----------|
| Artigo 02: A new galactose-specific lectin adsorbed on platinum electrodes followed by electrochemical impedance spectroscopy | 92 |
|--|-----------|

CAPÍTULO V

| | |
|---|------------|
| Artigo 03: Use of BmoRoL lectin adsorbed on graphite to evaluate blood serum contaminated with leishmaniasis | 113 |
|---|------------|

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

| | | |
|------------------|---|----|
| <i>Figura 1</i> | <i>Aspectos de flores e folhas de Bauhinia monandra</i> | 28 |
| <i>Figura 2</i> | <i>Esquema representativo aglutinação de eritrócitos por lectinas.</i> | 29 |
| <i>Figura 3</i> | <i>Esquema representativo da inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos.</i> | 30 |
| <i>Figura 4</i> | <i>Representação esquemática dos elementos constituintes de um biossensor.</i> | 45 |
| <i>Figura 5</i> | <i>Típico do sinal de excitação para voltametria cíclica, potencial vs tempo.</i> | 49 |
| <i>Figura 6</i> | <i>Típico voltamograma cíclico para um processo redox reversível.</i> | 49 |
| <i>Figura 7</i> | <i>Esquema da célula eletroquímica com três eletrodos. (I) (A) eletrodo de trabalho; (B) eletrodo auxiliar e (C) eletrodo de referência; (II) diagrama esquemático de um circuito Randles superimposto à interface eletrodo/eletrólito.</i> | 52 |
| <i>Figura 8</i> | <i>Representação de impedância (diagrama de Nyquist) referente ao circuito equivalente apresentado na figura (7 II), diagrama de Bode (b) correspondente ao diagram de Nyquist apresentado (a).</i> | 55 |
| <i>Figura 9</i> | <i>Circuito de Randles (no topo) e sua resposta no plano de impedância complexa.</i> | 57 |
| <i>Figura 10</i> | <i>Janela de exibição do programa ZView para obtenção dados investigados após determinação dos parâmetros de ajuste.</i> | 60 |
| <i>Figura 11</i> | <i>Representação esquemática do princípio de funcionamento de um AFM e os seus componentes fundamentais</i> | 61 |

Capítulo III

- Figure 1* Chromatography of F1 (20 mg of protein) on guar gel column. The washing step used 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.15 M NaCl; arrows represent the eluents added. Fractions (2 mL) were collected at 20 mL/h and evaluated for hemagglutinating activity (HA) and protein concentration. Absorbance at 280 nm (., 6) and log HA (-) are represented. 86
- Figure 2* Electrophoresis profiles of BmoRoL. (A) PAGE for basic proteins of standard cytochrome c (lane 1) and BmoRoL (lane 2) stained with 1% (w/v) Amido Black in 10% (v/v) acetic acid. (B) SDS-PAGE of molecular mass markers (lane 1) as well as BmoRoL in the absence (lane 2) and presence (lane 3) of b-mercapthoethanol stained with 0.02% (v/v) Coomassie Blue in 10% (v/v) acetic acid. (C) SDS-PAGE of BmoRoL stained with Schiff's reagent. 87
- Figure 3* Antifungal activity of BmoRoL on *Fusarium* species. Antifungal activity was indicated by a reduction of the fungal growth zone (diameter) in the plates in comparison to negative controls (100% of growth). Statistical analysis revealed that the results were significantly different ($p < 0.05$) in comparison with the negative control. 88
- Figure 4* Survival percentile of *Nasutitermes corniger* workers (A) and soldiers (B) in the presence of BmoRoL. Treatments were at 0.4 (●), 0.2 (○), 0.1 (■), 0.05 (□), and 0.025 (X) mg mL⁻¹. Citrate phosphate buffer was used as the control (-). Each point represents the mean of five repetitions. 88

Capítulo IV

- Figure 1* Nyquist diagram for a clean platinum disk electrode in $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 mM each) in 0.15 M NaCl: electrode clean (+), after exposure to solution citrate phosphate buffer during 10 min (○) and after exposure BmoRoL 0.05 mg/mL for 10 min (●). Solid lines in the figure represent the fitted lines. 104

| | | |
|----------|--|-----|
| Figure 2 | Equivalent circuit applied to fit impedance measurements in the presence of redox pair of $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. R_s , the ohmic resistance of the electrolyte solution; $CPE1$ associated with the double layer capacitance; $CPE2$, the Warburg impedance; $R1$ (R_{CT}), the electrode/solution resistance. | 105 |
| Figure 3 | Influence of changes in pH of the solution ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ in 1 mM NaCl 0.15M) on platinum electrode: before (\square) and after adsorption of the lectin BmoRoL (\blacksquare). | 106 |
| Figure 4 | Nyquist diagram for a clean platinum disk electrode in $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$: electrode clean (+), after exposure to solution galactose (o) and glucose (\bullet). (A) before and (B) after immobilization of BmoRoL (\star). | 107 |
| Figure 5 | Graphic relative charge transfer variation from glycoprotein impedance. Pt-glycoprotein (\blacksquare); Pt-BmoRoL (\boxtimes); Pt-BmoRoL-glycoprotein (\boxplus) | 108 |

Capítulo V

| | | |
|----------|---|-----|
| Figure 1 | AFM topographic image of the bare graphite electrode surface (A) and graphite electrode surface modified with BmoRoL (B) with Corss-section along the lines in (A) and (B). | 124 |
| Figure 2 | Nyquist plots for the stepwise modification process: bare graphite electrode (+), BmoRoL (\bullet), BmoRoL-BSA (o,) BmoRoL-BSA-US (\blacksquare), BmoRoL-BSA-CS(Δ). Solid lines represent fitted data represent experimental data. Supporting electrolyte 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 1:1 containing 0.15 M NaCl in PBS solution.. | 125 |
| Figure 3 | Equivalent circuit applied to fit the impedance measurements in the presence of redox pair of $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. R_s , the ohmic resistance of the electrolyte solution; $CPE1$ associated with the double layer capacitance; $CPE2$, the Warburg impedance; $R1$, the electrode/solution resistance. | 126 |
| Figure 4 | Three-dimensional plot for values of $R2$, Q and n given in Table 2. BmoRoL/BSA/US (\bullet) and BmoRoL/BSA/CS (\blacktriangle). | 127 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo III

| | | |
|----------------|--|----|
| <i>Table 1</i> | <i>Purification of Bauhinia Monandra root lectin (BmoRoL).</i> | 84 |
| <i>Table 2</i> | <i>Inhibitory assays of BmoRoL hemagglutinating activity with sugars and glycoproteins</i> | 87 |

Capítulo IV

| | | |
|----------------|---|-----|
| <i>Table 1</i> | <i>Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance result</i> | 109 |
| <i>Table 2</i> | <i>Relative charge transfer variation from impedance data</i> | 110 |

Capítulo V

| | | |
|----------------|---|-----|
| <i>Table 1</i> | <i>Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.</i> | 128 |
| <i>Table 2</i> | <i>Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.</i> | 129 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|--|
| Ag/AgCl | Prata/cloreto de prata |
| AH | Atividade hemaglutinante |
| Au | Ouro |
| BSA | Albumina do soro bovino |
| C | Capacitância |
| CPE 1 | “Constant phase element 1” – Elemento de fase constante correspondente a capacitância |
| CPE 2 | “Constant phase element 2” – Elemento de fase constante correspondente a impedância de Warburg |
| CS | Contaminated <i>Sera</i> – Soro contaminado com <i>Leishmania</i> |
| EIS | <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> – Espectroscopia de impedância eletroquímica |
| ELISA | “ <i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i> ” - ensaio imunoenzimático |
| E _{pa} | Potencial de pico anódico |
| E _{pc} | Potencial de pico catódico |
| E _{p/2} | Pico a meia altura |
| E _{1/2} | Potencial de meia-onda |
| I | Corrente |
| i _{pa} | Corrente de pico anódica |
| i _{pc} | Corrente de pico catódica |
| <i>Label-free</i> | Monitoramento livre de marcação |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| IRM | Intradermoreação de Montenegro |
| Pt | Platina |
| PBS | “ <i>Phosphate buffer solution</i> ” - solução tampão fosfato |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| R _{CT} | Resistência de transferência de elétrons |
| R _s | Resistência da solução |
| R _Ω | Resistência ôhmica oferecida pela solução no transporte dos íons entre o |

| | |
|-------------------|--|
| | eletrodo de trabalho e o de referência |
| US | Uncontaminated <i>Sera</i> – Soro não contaminado com <i>Leishmania</i> |
| VC | Voltametria Cíclica |
| V | Velocidade de varredura |
| $\Delta R_{CT}\%$ | Percentual relativo da interação da lectina e a glicoproteína |
| Z | Impedância |
| Z_{im} | Componente capacitiva ou imaginária na medida de impedância |
| Z_{re} | Componente resistivo ou real na medida de impedância |
| Z_w ou W | Impedância de Warburg que indica a resistência na transferência de massa |

RESUMO

Este trabalho descreve a purificação em quantidades miligramas de uma lectina de raízes secundárias de *Bauhinia monandra* (BmoRoL) e suas atividades antifúngica, termiticida e aplicação eletroquímica. A BmoRoL (6,2 mg) foi isolado por meio de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em gel de guar. A lectina nativa foi resolvida como uma única banda na eletroforese em gel de poli(acrilamida) para proteínas básicas. Sob condições de desnaturação e redução as que apareceu como um polipeptídeo único glicosilado de 26 kDa. A mais elevada atividade de aglutinação de BmoRoL foi encontrado com eritrócitos de coelho tratado com glutaraldeído. BmoRoL mostrou atividade antifúngica contra espécies fitopatogênicas de *Fusarium* e foi mais ativa em *Fusarium solani*. A lectina também mostrou atividade termiticida sobre os trabalhadores e soldados *Nasutitermes corniger* com LC₅₀ de 0,09 e 0,395 mg de 1 mL por 12 dias. BmoRoL foi imobilizada sobre a superfície de eletrodos de platina (Pt) e de grafite (C) e caracterizada por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), demonstrando que as reações do par redox da sonda eletroquímica para os eletrodos de Pt e C foram bloqueados devido a mudanças na impedância da interface eletrodo/solução. Os sistemas adsorvidos com BmoRoL foram em seguida utilizados para interação com carboidratos e glicoproteínas comerciais puras (ovoalbumina, fetuína, peroxidase e asialofetuína) bem como interação com glicoproteínas e/ou glicoconjugados em soros não contaminados e contaminados com *Leishmania* que evidenciaram o aumento da parte real da impedância (Z_{re}). Em conclusão, BmoRoL é uma nova lectina antifúngica e termiticida, que poderá ser aplicada na construção de biosensores uma vez que os sistemas eletroquímicos testados apresentaram uma resposta impedimétrica em eletrodos de Pt e C.

Palavras-chave: Lectinas, *B.monandra*, eletroquímica

ABSTRACT

This paper describes the purification of milligram quantities of a lectin from secondary roots of *Bauhinia monandra* (BmoRoL) and antifungal activities, termiticida and electrochemical application. The BmoRoL (6.2 mg) was isolated by ammonium sulfate fractionation and affinity chromatography on guar gel. The native lectin was determined as a single band on polyacrylamide gel electrophoresis for basic proteins. Under denaturing conditions and reducing those that appeared as a single polypeptide of 26 kDa glycosylated. The highest activity was found BmoRoL agglutination with rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde. BmoRoL showed antifungal activity against phytopathogenic *Fusarium* species and was more active in *Fusarium solani*. The lectin also showed activity termiticida on workers and soldiers *Nasutitermes corniger* with LC50 of 0.09 and 0.395 mg mL⁻¹ for 12 days. BmoRoL was immobilized on the surface of platinum electrodes (Pt) and graphite (C) and characterized by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), demonstrating that the redox reactions of the electrochemical probe for C and Pt electrodes were blocked by changes in the impedance of the interface electrode/solution. Systems with adsorbed BmoRoL were then used to interact with carbohydrates and glycoproteins commercial pure (ovalbumin, fetuin, asialofetuin and peroxidase) as well as interaction with glycoproteins and/or serum glycoconjugates in uncontaminated and contaminated with *Leishmania* showed that the increase of the real part impedance (Z_{re}). In conclusion, BmoRoL is a new antifungal and termiticide lectin, which may be applied in the construction of biosensors as electrochemical systems tested showed a response in impedimétrica Pt electrodes and C.

Key-words: Lectins, *B.monandra*, electrochemistry

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas de origem não imunológica que reconhecem, de forma reversível, carboidratos livres ou conjugados a superfícies celulares, através de seus sítios de ligação (Correia, Coelho & Paiva, 2008). Elas estão amplamente distribuídas na natureza. Nos vegetais, são especialmente purificadas de sementes (Paz *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009), mas também de outros tecidos como o cerne, frutos, folhas, rizomas e raízes (Sá *et al.*, 2008; Wu, Wang & Ng, 2011; Costa, *et al.*, 2010; Shao, *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010).

Devido à habilidade que as lectinas possuem de ligar a carboidratos ou glicoproteínas em solução ou na superfície de células, a presença de lectinas em uma amostra pode ser detectada através de ensaios de hemaglutinação. Estas interações com células, através de seus sítios de ligação, formam diversas ligações intercelulares reversíveis (Bianchet, *et al.*, 2010, Chen, *et al.*, 2010). Lectinas podem ser específicas para eritrócitos de diferente origem animal ou tipagem (Jung *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009) ou podem ser não específicas para grupos sanguíneos (Liu *et al.*, 2008).

As lectinas têm sido relacionadas a várias funções dentro dos vegetais. Presentes nos variados tecidos, elas parecem atuar como proteínas de reserva (Macedo *et al.*, 2011), de reconhecimento, de defesa contra fitopatógenos e predadores (Sá *et al.*, 2008; Kaur *et al.*, 2006; Dutta *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2003), de regulação e sinalização celular (Jiang *et al.*, 2006), bem como envolvidas no estabelecimento de simbiose entre organismos (Kvennefors *et al.*, 2008).

A diversidade de lectinas vegetais existentes, com especificidades variadas a glicoconjugados, em especial a oligossacarídeos que estão presentes na superfície celular de microorganismos, no trato intestinal de insetos e em células de mamíferos (Rojo *et al.*, 1997).

Estas propriedades aliadas à estabilidade, geralmente elevada, que essas proteínas apresentam em ensaios envolvendo mudanças de valores de pH, temperatura ou exposição a proteases (Peumans & Van Damme, 1995) conferem às lectinas um grande potencial biotecnológico.

Em diversos ramos da ciência, como a Biologia Celular e Molecular, Farmacologia, Bioquímica e Química as lectinas têm servido como ferramentas para investigações, como aglutinação de células (Zhang *et al.*, 2009), mitogenicidade (Dresch *et al.*, 2012), atividade antiviral e indutora de apoptose (Peng *et al.*, 2009), reconhecimento de glicosilados em superfície celular (Lakhtin, Lakhtin & Alyoshkin, 2011), reconhecimento de mudanças na composição de resíduos glicosilados de superfície de células transformadas (Rambaruth & Dwek, 2011), ação inibitória do crescimento de espécies fúngicas e bacterianas (Charungchittrak, *et al.*, 2011).

Neste trabalho buscou-se estudar as propriedades da lectina BmoRoL purificada das raízes secundárias de *Bauhinia monandra* e suas atividades biológicas, bem como a lectina poderá ser utilizada no desenvolvimento de biosensores eletroquímicos dentre tantas outras aplicações biotecnológicas.

2 JUSTIFICATIVA

Infusões de folhas do gênero *Bauhinia* são bastante utilizadas na medicina popular por apresentar efeito hipoglicemiante e diurético. Esse efeito hipoglicemiante foi relatado a partir de uma lectina das folhas de *B. Monandra* (BmoLL) (Rosilio, *et al.*, 2004).

Preparações de raízes secundárias de *B. monandra* mostraram valores elevados de comprovada atividade lectínica (Coelho & Silva, 2000), o qual despertou o interesse na sua purificação. O uso de raízes secundárias não prejudica o bom desenvolvimento da planta. As plantas do gênero *Bauhinia*, também denominada árvore orquídea, possuem ampla distribuição em cidades brasileiras como planta ornamental. A lectina purificada apresentou atividade antifúngica e contra cupins mostrando que pode ser utilizada em futuros processos biotecnológicos como, por exemplo, no controle de pragas agrícolas (Souza, *et al.*, 2011).

Dentre outras aplicações, a lectina BmoRoL, após algumas avaliações do potencial eletroquímico, mostrou que poderá ser utilizada em sistemas analíticos eletroquímicos que incorporam materiais biológicos, mais conhecidos com biosensores. Estes dispositivos, quando em contato com o elemento apropriado de transdução apresentam-se como uma ferramenta tanto de detecção, como obtenção de informações de atividade da biomolécula de interesse. A importância do trabalho encontra diretrizes quanto à utilização da lectina de raízes secundárias de *B. monandra* (BmoRoL) em futuros ensaios e aplicações biotecnológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Purificar, caracterizar e aplicar biotecnologicamente a lectina de raízes secundárias de *B. monandra*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Extrair e purificar a lectina de raízes secundárias de *B. monandra*;
- ✓ Avaliar a atividade hemaglutinante da lectina pura frente a eritrócitos de coelho e humanos tratados com glutaraldeído;
- ✓ Avaliar o efeito de íons, do pH e da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina pura;
- ✓ Inibir a atividade hemaglutinante da lectina usando diferentes carboidratos e glicoproteínas;
- ✓ Caracterizar a lectina pura através de eletroforese em géis de poliacrilamida;
- ✓ Avaliar a atividade antifúngica e termiticida da lectina (BmoRoL) frente espécies do gênero *Fusarium* e *N. corniger*; respectivamente;
- ✓ Avaliar as propriedades eletroquímicas da adsorção de BmoRoL em eletrodos sólidos e sua interação com carboidratos e glicoproteínas através impedância eletroquímica;
- ✓ Avaliar a interação de BmoRoL adsorvida frente a soros humanos não contaminados e contaminados com *Leishmania* através da impedância eletroquímica;
- ✓ Caracterizar a superfície do eletrodo ante e após adsorção de BmoRoL utilizando a técnica de AFM visando à criação de sua imagem.

CAPÍTULO II

1 BREVE HISTÓRICO SOBRE LECTINAS E SUA DISTRIBUIÇÃO NA NATUREZA

O primeiro relato sobre lectinas foi descrito em 1888 por Stillmark, a partir de uma preparação protéica parcialmente pura, obtida de *Ricinus communis* (mamona), a qual foi denominada ricina. Desde quando a ricina mostrou aglutinar as células vermelhas do sangue, o termo hemaglutinina vem sendo também utilizado (Vandenborre, Smagghe & Van Damme, 2011). A ricina, primeira lectina de origem vegetal a ser descoberta é uma proteína heterodimérica (dois monômeros não idênticos) com especificidade para Galactose e N-acetilgalactosamina (Lord, 1994).

O termo lectina, originado do latim “*lectus*” (significa selecionado, escolhido) foi introduzido por Boyd & Shapleigh no ano de 1954, para designar um grupo de proteínas que apresentam a característica de ligarem-se específica e seletivamente a resíduos de carboidratos de uma forma não covalente (Hong *et al.*, 2001, Sharon & Lis, 2004). São também conhecidas como aglutinina devido à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (Peumans & Van Damme, 1995; Kennedy *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 2001).

O interesse dos pesquisadores pelas lectinas intensificou-se consideravelmente na década de 80 e 90 do século XX, devido à propriedade aglutinante e ligante dessas biomoléculas. Desta forma, podem ser usadas como ferramentas valiosíssimas para a detecção, isolamento e caracterização parcial de glicocojugados (Silva *et al.*, 2011), bem como, possibilitar estudos de mudanças que ocorrem em superfícies celulares durante processos fisiológicos e patológicos, a partir do reconhecimento aos diferentes carboidratos expostos na superfície das membranas celulares; diferenciação de células cancerígenas e também como estratégia para desenvolvimento de drogas (Sharon & Lis, 2004; Petrossian, Banner & Oppenheimer, 2007).

Em 1980, segundo Goldstein e colaboradores, as lectinas foram definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que possuem pelo menos dois sítios moleculares de ligação através dos quais interagem com carboidratos, aglutinam células e precipitam polissacarídeos, sem alterar suas estruturas.

Peumans & Van Damme (1998) definiram lectinas como uma classe de proteínas ou glicoproteínas que contêm um ou mais sítios de ligação para carboidratos ou derivados sem apresentar função catalítica nem características estruturais imunológicas e que se ligam específica e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (Peumans & Van Damme, 1995; Ghosh & Maiti, 2007). Isso implica que, a mesma lectina pode interagir em receptores de diferentes glicoconjugados, idênticos ou estruturalmente similares, e a presença de no mínimo um domínio não catalítico, o qual se liga reversivelmente a um carboidrato específico é um pré-requisito para uma proteína ser considerada lectina. A interação de lectinas com hidratos de carbono específicos pode ser tão específicas quanto à interação entre antígeno e anticorpo ou substrato e enzima (Minko, 2004).

A especificidade das lectinas é determinada pela conformação dos sítios de ligação e pelos seus aminoácidos constituintes. Desta forma, a substituição de apenas um ou dois aminoácidos nos sítios de ligação a carboidratos, pode resultar em alterações significativas na especificidade da lectina (Kennedy *et al.*, 1995, Neumann, *et al.*, 2004).

Lectinas são encontradas de forma ubíqua na natureza, desde microorganismos como bactérias (Zinger-Yosovich, *et al.*, 2011), fungos (Hamshou, Van Damme & Smagghe, 2010), vírus (Huskens, *et al.* 2010); animais, como em protozoários (López-Vancell, 2010), insetos (Cheng, *et al.*, 2010), moluscos (Fujii, *et al.*, 2011), crustáceos (Zhang, *et al.*, 2011). Em plantas podem ser encontradas em diferentes famílias e diferentes tecidos da mesma, sendo as sementes a principal fonte, (Paz *et al.*; 2010). Outras partes das plantas têm sido utilizadas como fontes de lectinas: folhas (Salles, *et al.*, 2011), tubérculos (Kaur *et al.*, 2006),

entrecascas (Huang *et al.*,2002), flores (Liu *et al.*,2002), frutos (Wu, Wang & Ng., 2011), rizomas (Shao, *et al.*, 2011) e raízes (Yan *et al.*, 2010).

1.1 Classificações das Lectinas

Estudos estruturais, visando à caracterização da especificidade de interação das lectinas com os diferentes carboidratos são fundamentais para o entendimento das diferentes propriedades dessas proteínas. As lectinas, por representar um grupo heterogêneo de proteínas, diferem fortemente em relação à estrutura molecular, especificidade ao carboidrato, termodinâmica de ligação, atividade biológica e outras propriedades (Nilsson, 2007; Michiels, Van Damme & Smagghe, 2010).

Uma classificação para lectinas de plantas baseia-se no número de sítio de ligação a carboidratos e outros sítios de natureza não catalítica, dividindo-as em quatro tipos distintos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, (Peumans & Van Damme, 1998) e superlectinas (Peumans *et al.*,2001).

- Merolectinas: são proteínas formadas exclusivamente por um domínio de ligação para carboidrato e, por conta de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.
- Hololectinas: são proteínas formadas por domínio de ligação a carboidrato que contêm dois ou mais destes domínios idênticos ou muito semelhantes. Este grupo compreende as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, com capacidade de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.
- Quimerolectinas: compreende as proteínas que possuem um domínio de ligação para carboidrato e um domínio não relacionado que atua de forma independente.

- Superlectinas: compreende as proteínas com dois sítios de ligação a carboidratos, estruturalmente diferentes, reconhecendo carboidratos distintos.

Vários critérios são utilizados para a classificação de lectinas, por exemplo, elas podem ser agrupadas dentro de famílias distintas de proteínas homólogas que apresentam propriedades estruturais comuns, sendo a família das leguminosas a mais estudada e caracterizada (Liu, Bian & Bao, 2010; Cavada *et al.*, 1998). Exibem ampla variedade de especificidade de ligação a carboidratos (Van Damme, Lannoo, & Peumans, 2008).

1.2 Lectinas de Plantas Leguminosas

As plantas pertencentes a esta família representam um dos principais recursos como fonte de descobertas de novas proteínas, tais como as lectinas. As lectinas de leguminosas formam uma grande família de proteínas homólogas, porém mostram variações na especificidade ao carboidrato.

A Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas, também conhecida como *Leguminosae* (leguminosas), de ampla distribuição geográfica. Uma característica típica dessa família é apresentar o fruto do tipo legume, também conhecido como vagem. É subdividida em 3 subfamílias muito distintas: *Faboideae* (ou *Papilionoideae*), *Caesalpinioideae* (ou *Caesalpinaceae*) e *Mimosoideae* (ou *Mimosaceae*), (Cardoso, Mossanek & Acra 2007).

A variação no nome da família deve-se à coexistência de mais de um sistema de classificação. É a terceira maior família de *Angiospermae*, compreendendo 727 gêneros e 19.325 espécies (Lewis, *et al.*, 2005). As *Leguminosae* ocorrem em quase todas as regiões do mundo e quase todas as espécies da família apresentam simbiose de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* e semelhantes, que fixam o nitrogênio da atmosfera, uma característica ecológica de extrema importância. Também são de grande importância econômica pela

produção de alimentos como: feijão, ervilhas, soja, amendoim, lentilha entre outros (Lima, *et al.*, 2007).

Níveis mais elevados de atividade de lectina pode ser visto nas partes das plantas que são mais atraente para outros organismos e que são importantes para a sobrevivência das plantas (Ynalvez, Fuentes & Sanchez, 2011). Em estudo, uma lectina da banana demonstrou que têm a capacidade de estimular os linfócitos de origem animal e pode potencialmente exibir um efeito diferenciado dependendo dos açúcares presentes na superfície das células imunocompetentes no intestino de animais diferentes (Peumans, Zhang & Barre, 2000).

A lectina de banana pode ser seletivamente tóxica para as espécies que não contribuem para a disseminação de sementes de bananeira. Por outro lado, os frutos não irá ser tóxicos e são comestíveis a animais que são susceptíveis de difundir as sementes e, conseqüentemente, contribuir para a sobrevivência de que as espécies de plantas particulares no seu habitat natural (Peumans, Zhang & Barre, 2000).

1.3 O Gênero *Bauhinia* e a Espécie *B. monandra*

Encontrado em regiões tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental e oriental, *Bauhinia* é um gênero com vários representantes da família das Fabaceae (Caesalpinioideae). No total são mais de 200 espécies (Lewis, 2005), embora sejam de origem do continente Asiático, existem espécies nativas. As árvores deste gênero podem atingir até 10 m de altura, crescer em solos secos e pouco ricos em nutrientes; seu fruto é tipicamente um legume, chamado de vagem e também tem sido usada como forrageiras (Alves *et al.*, 200). Na medicina popular é utilizada para o tratamento de diabetes e como diurético, (Rosilio, *et al.*, 2004).

Este gênero encontra-se bem distribuído nas cidades brasileiras e contém numerosas espécies ornamentais; devido a suas flores vistosas são muito utilizadas no paisagismo e na arborização urbana. Uma característica peculiar do gênero *Bauhinia* é devido ao formato bifoliado de suas folhas que são conhecidas popularmente por “Pata-de-vaca”, “Unha-de-vaca” e “Orquídea dos pobres” (Borges & Mendonça, 2009). Em Pernambuco, podem ser encontradas espécies nativas como *B. chelantha* Stend, *B. forficata* Link, *B. heterandra* Benth, *B. membranacea* Benth, *B. monandra* Kurz, entre outras (Alves *et al.*, 2000).

A espécie *B. monandra* (Figura 1) é uma árvore de pequeno porte, distribuída pela zona tropical do mundo inteiro. O nome da espécie “monandra” refere-se ao fato de possuírem apenas um estame. A floração é espetacular e a árvore fica coberta de flores que se assemelham a orquídeas que posteriormente dão origem a vagens que amadurecem no outono.



Figura 1: Aspectos de flores e folhas de *Bauhinia monandra*. (Fonte: <http://www.reunion-shop.eu/Schmetterlings-Bauhinie-Bauhinia-Monandra-10-Samen> Acesso: 23/12/2011 as 14:40 hs)

São muitas as propriedades do gênero que vêm sendo pesquisadas. Como principais, podemos destacar a ação hipoglicemiante e o efeito diurético, muito difundido na medicina popular a partir das infusões de folhas na forma de chá (Rosilio, *et al*, 2004). O precursor das pesquisas sobre lectinas da espécie *B. monandra* foi o isolamento a partir das folhas de uma lectina galactose específica, denominada BmoLL (Coelho & Silva, 2000) favorecendo aplicações nos mais variados campos, desde avaliação hipoglicemiante a comportamentos interfacial de ligação a superfícies celulares de tecidos diferenciados, bem como aplicações com atividade inseticida (Macedo *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2005 parte II).

1.4 Identificação e Especificidade das Lectinas

Normalmente, a avaliação da presença de lectinas em materiais biológicos é realizada através de ensaios de aglutinação utilizando eritrócitos (Figura 2); a hemaglutinação pode ser testada com eritrócitos de animais e/ou humanos, onde estes podem ser não tratados ou tratados enzimaticamente (tripsina, papaína) ou quimicamente por glutaraldeído ou formaldeído, aumentando ou não a sensibilidade das células a lectinas. Este ensaio é realizado através de uma diluição sucessiva da lectina e posterior incubação com os eritrócitos (Coelho & Silva, 2000; Santos *et al.*, 2005).

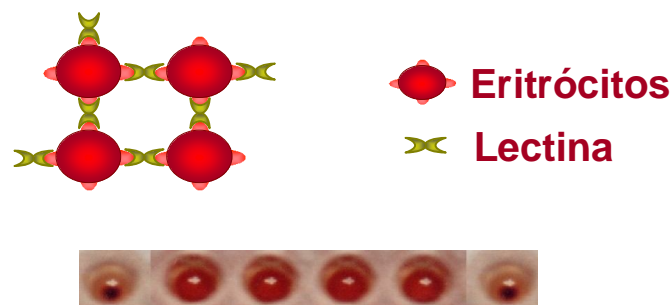


Figura 2: Esquema representativo da aglutinação de eritrócitos por lectinas. Fonte: (Fernandes, M.P.; Dissertação, UFPE, 2006).

No que se refere à especificidade de lectina, recente avanços tecnológicos na glicobiologia apresentam algumas idéias novas. Como por exemplo, a especificidade de lectina por ser examinada usando matrizes de glicanos, onde algumas lectinas mostraram propriedades de ligação mais complexas aos carboidratos (Van Damme *et al.*, 2007b). Desta forma, mesmo lectinas com estrutura muito semelhante, marcadamente diferem em sua especificidade de ligação. Um outro método utilizando glicoproteínas remodeladas também foi descrito (Iskratsch, *et al.*, 2009), bem como a introdução de microarrays, em que os painéis de lectinas são imobilizada em um único chip para análise dos glicanos (Gemeiner *et al.*, 2009).

A confirmação da presença de lectina em uma amostra é realizada através de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (AH) utilizando uma solução com carboidratos e/ou glicoproteínas (glicoconjugados). As lectinas ligam-se aos carboidratos ou glicoproteínas da solução teste em lugar de interagirem com os eritrócitos que, ao ficarem livres, precipitam (Figura 3).

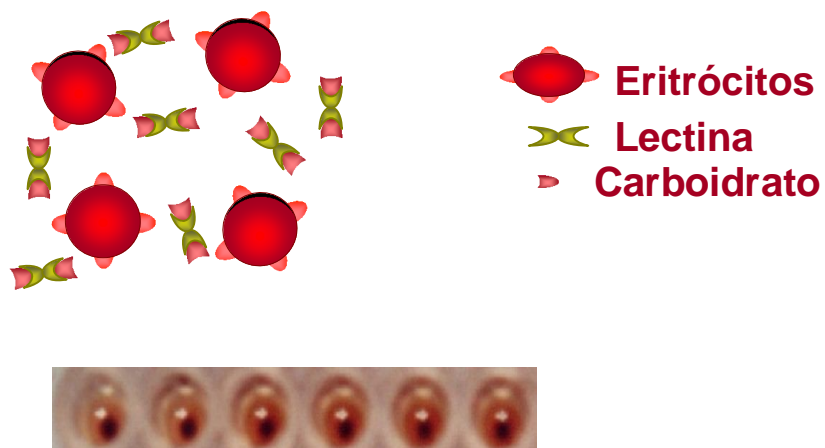


Figura 3: Esquema representativo da inibição da aglutinação de eritrócitos por lectinas em presença de carboidratos. Fonte: (Fernandes, M.P.; Dissertação, UFPE, 2006).

Segundo Michiels, Van Damme & Smaghe (2010), a preferência de lectinas a carboidratos geralmente é determinada por simples testes de inibição. Se a ligação de uma lectina a um receptor (por exemplo, em testes de aglutinação) é inibida por um monossacárido ou dissacárido, a lectina é dita específica em relação a este açúcar.

A especificidade de uma lectina pode ser definida através do ensaio de inibição da AH, utilizando para este fim diferentes monossacarídeos que em menor concentração, possuam maior capacidade de inibir sua atividade de hemaglutinação ou precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas (Gabor *et al.*,2001; Ng e Yu, 2001).

A disponibilidade destas proteínas e sua especificidade requintada a hidratos de carbono complexos ajudou a catapultar o campo de glicobiologia (Varki, 1999). Desta forma existem lectinas que apresentam especificidade para mais de um carboidrato, aglutinando células de diferentes tipos e espécies. Também existem lectinas que só aglutinam as células em que houver a presença de um determinado carboidrato (Gabor *et al.*,2001; Coutiño-Rodríguez *et al.*,2001).

Peumans & Van Damme (1998) observaram que lectinas de plantas exibem uma ampla especificidade para carboidrato, sendo que muitas apresentam maior afinidade para oligossacarídeos do que para açúcares simples ou têm especificidade direcionada contra glicanos (que não são próprios da planta); além disso, lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer o mesmo carboidrato.

1.5 Purificação

Geralmente a etapa inicial para purificação de lectinas consiste na extração de proteínas com solução salina ou tampão (Mladenov *et al.*,2002) e com temperatura e tempo de extração pré-definidos. A preparação obtida apresentando atividade hemaglutinante é dita

extrato bruto, o qual será avaliado quanto à concentração protéica e submetido à purificação parcial por fracionamento salino com sulfato de amônio (Paiva & Coelho, 1992).

O fracionamento salino é um processo posterior a etapa de extração que se baseia no princípio de que a solubilidade da maioria das proteínas é diminuída em elevadas concentrações de sais. O sulfato de amônio (Zhang *et al.*, 2010) é comumente utilizado devido à sua elevada solubilidade. Este processo, além de purificar parcialmente lectinas porque retira a sua camada de solvatação fazendo com que as mesmas precipitem, estabiliza a atividade hemaglutinante da proteína, mesmo após longos períodos de armazenamento (Kennedy *et al.*, 1995).

Outro processo muito usado na purificação de proteínas é a diálise, realizada em uma membrana (celulose) semipermeável, que separa as lectinas de moléculas pequenas, onde as proteínas ficam retidas, enquanto que, moléculas menores como carboidratos ou sais migram para a solução solvente de menor concentração no exterior da membrana (Thakur *et al.*, 2007).

Geralmente, a última etapa de purificação consiste no emprego de técnicas cromatográficas, com uma ampla variedade de métodos para purificar lectinas, como cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão molecular e cromatografia por afinidade específica de ligação a carboidratos, sendo este o principal método cromatográfico para purificar lectinas.

A cromatografia por bioafinidade (ou biosseletividade) separa as proteínas por suas especificidades de ligação a grupamentos químicos específicos existentes no suporte insolúvel (Sun *et al.*, 2007). Esses ligantes são covalentemente imobilizados á matriz promovendo uma fase estacionária seletiva. A amostra é aplicada à coluna; as moléculas sem afinidade passam sem ligar a matriz, enquanto as moléculas específicas são retidas e posteriormente são eluídas pela alteração de pH e/ou força iônica do meio, que tornam o complexo molécula-ligante

menos estável levando á dissociação do mesmo, ou ainda pelo emprego de substâncias com maior afinidade ao ligante. No caso de purificação de lectinas, o ligante a ser imobilizado é um carboidrato ou um glicoconjugado específico.

Lectinas específicas para N-acetilglicosamina, glicose e galactose têm sido isoladas à homogeneidade em colunas de quitina, Sephadex e gel de Guar, respectivamente. Desta forma a lectina desejada é obtida com alto grau de pureza (Stoyloff & Ivanov, 2010), alterando-se as condições de pH (Datta *et al.*,2001), força iônica (Chung *et al.*,2001) ou pela eluição com solução contendo um competidor (Lima *et al.*,1997).

Gel de guar é uma dessas matrizes e consiste em um polissacarideo com cadeias manose substituidas por residuos de galactose α 1-6; é uma matriz versatil para isolamentos de lectinas ligantes de D-galactopiranosil e N-acetil-galactosaminil (Coelho & Silva, 2000); outros exemplos de geis usados para cromatografia de afinidade são Affi-gel blue (Wong *et al.*, 2006) e Sepharose 4B (Chumkhunthod *et al.*, 2006). Lectinas com especificidade para galactose podem ser purificadas utilizando este suporte com a lectina das folhas de *B. monandra*, BmoLL (Coelho & Silva, 2000).

1.6 Caracterização Biológica de Lectinas

Os métodos de caracterização para lectinas são relacionados com a estrutura e a atividade biológica da molécula. Um dos principais é o ensaio de hemaglutinação, utilizado para detecção como também caracterização quanto à especificidade ao carboidrato.

O pH pode ter grande influência sobre a AH de lectinas, o que torna imprescindível a avaliação e o conhecimento sobre a faixa de pH onde a proteína se mantém estável e desempenhando sua função. Estabeler as condições do pH é importante, uma vez que o pH altera a carga líquida das proteínas, provocando repulsão eletrostática e rompimento de

algumas pontes de hidrogênios, bem como o comportamento da molécula em determinados meios e condições ideais onde esta possam apresentar atividade biológica.

A verificação da faixa de estabilidade ao pH pode ser feita submetendo-se a lectina a tampões em diferentes valores de pH. Resultados dependentes do pH revelam mudanças conformacionais e diferenças significantes no modo de interação dos sítios de ligações uma lectina (Jiménez, 2008). Em alguns casos diferenças significativas no pH pode não afetar a atividade de lectinas (Wittsuwannakul *et al.*, 1998) e em outros a lectina perde sua atividade em pequena variação de pH, como é o caso da lectina de *Erythrina speciosa* (Konozy *et al.*, 2003).

A temperatura pode causar alterações extremas na estrutura tridimensional de uma proteína, processo denominado desnaturação. Esse efeito do calor na estrutura pode ocorrer praticamente em todas as proteínas globulares, independente do tamanho ou da função biológica. Um estudo com uma lectina da planta *Q. fusiformis* revelou que a atividade da lectina é significativamente ligada ao nível de temperatura (Ynalvez, Fuentes & Sanchez, 2011).

Algumas lectinas permanecem estáveis até 55-65 °C e a partir de então, com a elevação da temperatura, a atividade hemaglutinante diminui até ser abolida, como no caso de uma lectina de feijão (Wong, Wong & Ng, 2006). Muitas lectinas contêm metais em suas estruturas e são chamadas de metaloproteínas, pois em alguns casos precisam de íons para exercer sua atividade (Sharon & Lis, 1990).

Quanto à atividade biológica, as lectinas são avaliadas através do ensaio de inibição e da atividade hemaglutinante, utilizando monossacarídeos ou carboidratos complexos e eritrócitos de diferentes espécies animais, testados para evidenciar a especificidade para carboidratos e para o tipo sanguíneo, respectivamente.

A eletroforese é uma técnica bastante utilizada para a caracterização estrutural de proteínas, assim como para o estabelecimento do grau de pureza. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (presença de sulfato sódico de dodecila- SDS) e redutoras (presença de β -mercaptoetanol) revelam o grau de pureza, a composição de subunidades (Pajic *et al.*, 2002) e através de coloração específica, a natureza glicoprotéica (Coelho & Silva, 2000). A eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas sob condições não desnaturantes é utilizada para analisar a pureza de estruturas moleculares nativas.

1.7 Importância e Aplicações Biotecnológicas

Lectinas são utilizadas como importantes ferramentas em processos biotecnológicos, bem como em pesquisas nas áreas das ciências biológicas, bioquímica, farmacológicas e médicas. As funções biológicas das lectinas ainda não são bem conhecidas. Elas têm sido aplicadas na determinação de tipos sanguíneos (Khang, Jean-Luc & Hoebekel, 1990; Mo *et al.*, 2000), apoptose (Li *et al.*, 2011), na detecção, purificação, caracterização e análise de glicoconjugados (Olajos, 2010; Cerrada, *et al.*, 2010) onde podem ser usadas para explorar superfícies celulares, ligando-se a porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolípídeos que se projeta na célula (Ghazarian, Idoni & Oppenheimer, 2011).

Nos animais, discute-se seu papel fisiológico nos processos de endocitose, transporte intracelular de carboidratos e glicoproteínas, nos processos de aderência e reconhecimento celular, na função estrutural e como receptores celulares para glicoproteínas (Rudiger *et al.*, 2000). Portanto, podem ser usadas no diagnóstico em processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (Liu, Bian & Bao, 2010), inclusive na análise de imunoglobulinas humanas (Daziel *et al.*, 1999; Fassina *et al.*, 2001).

Por causa do efeito danoso dos agentes quimioterápicos na terapia do câncer, tem sido dada uma atenção especial aos inibidores de crescimento de origem natural e, portanto tem aumentado consideravelmente o interesse de lectinas nos efeitos antitumoral (Abdukllaev & Demejia, 1997).

Uma abordagem testada recentemente usando lectina G Morniga para localização de tumores e potencialidade de entrega de compostos tóxicos, que se liga antígenos TF e Tn, foi descrita. A lectina foi conjugada com um agente de fotossensibilização, que, quando ativado pela luz pode causar a morte celular. A lectina ligada a células Tn positivas foi levada a cabo pela células, provocando uma elevada percentagem de citotoxicidade celular. Esta técnica pode ser uma estratégia alternativa para usar as lectinas para alvejar células tumorais para morte (Poiroux, G., *et al.* 2011).

As lectinas já são usadas na atividade antiproliferativa sobre células tumorais da leucemia (L1210 e M1) (Ngai e Ng, 2004), para distinguir o câncer de próstata e a hiperplasia benigna neste órgão (Basu *et al.*,2003), como marcadores de tecidos tumorais, em ensaios histoquímicos e imunohistoquímicos para detecção de resíduos glicosilados em superfícies teciduais de humanos e animais (Beltrão *et al.*,1998; Meyer *et al.*,2000; Barou *et al.*,2002; Pedini *et al.*,2002).

A propriedade de ligação a carboidratos das lectinas pode ser também utilizada em análise de mudanças que ocorrem sobre a superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos desde células normais a células transformadas à malignidade (Sharon & Lis, 2004). São também empregadas como moléculas bioadesivas no endereçamento de drogas (Rek, Krenn & Kungl, 2009).

Como ferramentas para a produção dos chamados medicamentos inteligentes, onde estes diferem dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, como o efeito provocado pela quimioterapia (Plattner, *et al.*, 2009,

Woodley, 2001), bem como o desenvolvimento de vacina (Toriniwa & Komiya, 2011; Lang, Schoenen & Desel, 2011)

Em humanos elas se ligam a eritrócitos e outras células pelo reconhecimento do N-acetil neuramínico presente na superfície celular e que é um pré-requisito para o início da infecção (Singh, Tiwry & Kennedy, 1999; Ghazarian, Itoni & Oppenheimer, 2011).

Algumas lectinas de plantas apresentam ação inseticida contra larvas de insetos, que causam danos à produção agrícola resultando em grandes perdas econômicas, o que possibilita o uso destas proteínas como bio-inseticidas (Yáskara *et al.*, 2005). A lectina de folhas de *Bauhinia monandra*, BmoLL, atuou como inseticida biológico contra larvas de *Anagasta kuehniell*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Macedo *et al.*, 2006), outras lectinas possuem efeito inibitório no crescimento de fungos (Freire *et al.*, 2002).

Lectinas vegetais podem ser adicionadas ao repertório de expansão de ligantes TLR (receptores Toll-like) utilizadas com agonistas desse receptores e assim fornecer sondas úteis e versáteis para caracterizar a natureza da expressão de superfície oligossacárida e função biológica de células (Unitt & Hornigold, 2011).

Lectinas parecem apresentar função de defesa antimicrobiana, especialmente em sistemas imunes de aves e mamíferos (Holmskov *et al.*, 1997). Em microorganismos, as lectinas fariam a ligação com células hospedeiras e atuariam como determinantes de reconhecimento em processo imunológico e fagocitose (Pochel & Irache, 1998). O papel das lectinas em fungos continua desconhecido (Kawagishi *et al.*, 2001), para bactérias e protozoários foi sugerido que as lectinas têm uma função importante facilitando sua adesão no epitélio intestinal.

Fisiologicamente, as lectinas participam na interação parasita/hospedeiro, no mecanismo de defesa da planta (Limpens & Bisseng, 2003) e como agentes mitogênicos (Maciel *et al.*, 2004). Algumas lectinas possuem a capacidade de se ligar especificamente a

hifas fúngicas e atuar impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo. Atuam ainda sobre a germinação de esporos fúngicos, provavelmente num estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (Sharon & Lis, 2001).

Nas plantas atuam no mecanismo de defesa inibindo o crescimento de bactérias fitopatogênicas, contra ataques de vírus, fungos e insetos, na relação planta/microorganismo (Cavada *et al.*,2000; Ratanapo *et al.*,2001; Limpens & Bisseng, 2003). Estimulação, proliferação e crescimento celular (Wititsuwannakul *et al.*,1998); na interação parasita/hospedeiro, simbiose e estoque de proteínas (Van Damme *et al.*,1997).

1.8 Ação Antifúngica

Os fungos são microrganismos ubíquos na natureza, encontrados no solo, água, vegetais, homem e detritos em geral. Muitos dão origem a doenças em plantas, contudo somente cerca de 100 dos milhares de espécies conhecidas de leveduras e fungos filamentosos provocam doenças em seres humanos ou em animais (Meyer *et al.*,2000).

O *Fusarium* é um importante componente da microflora em todo o mundo e apresenta grande variedade de espécies. O gênero *Fusarium* pode apresentar as formas patogênicas ou não-patogênicas, em solos naturais ou cultivados, onde podem permanecer por longo tempo sob a forma saprofítica, sobrevivendo no material orgânico do solo (Edel *et al.*,1997).

Algumas lectinas possuem a capacidade de se ligar especificamente a hifas fúngicas e atuar impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo. Atuam ainda sobre a germinação de esporos fúngicos, provavelmente

num estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (Lis e Sharon, 1981).

Atividade antifúngica foi observada em uma lectina isolada de sementes de *Castanea mollisma*, frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* (Wang & Ng, 2003); bem como a lectina de *S. jacobinensis* foi capaz de reduzir em 50% o crescimento de *F. moniliforme* e *F. oxysporum* (Vaz *et al.*, 2010). Outra lectina do cerne de *M. urundeuva* inibiu o crescimento de *F. oxysporum* e *F. decemcellulare* (Sá *et al.*, 2009).

1.9 Ação Inseticida

O controle de insetos, tem sido convencionalmente feito com inseticidas e organofosforados e piretróides, que podem ser tóxicos para outros seres vivos e apresentam grande risco de contaminação ambiental. Extratos de diversas partes das plantas, extrativos de madeiras e entrecascas, feromônios, análogos de hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina são tidos como potenciais componentes de produtos alternativos para combater espécies-praga de insetos, sem oferecer grande perigo ao meio ambiente (Sogabe *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004).

Os efeitos das lectinas sobre os insetos, como moléculas inseticidas são avaliados geralmente através de bioensaios onde há incorporação dessas proteínas na dieta dos insetos (Hamshou *et al.*, 2010). A ação inseticida de lectinas ainda é pouco conhecida, mas é provável que envolva sua ligação com às glicoproteínas das células epiteliais do intestino médio dos insetos; a ação inseticida, também pode estar relacionada às enzimas digestivas e proteínas assimiladoras, nas quais as lectinas podem interferir com suas funções, dessa forma, inibindo a digestão e absorção causando a privação nutricional (Leite *et al.*, 2005).

1.9.1 os cupins

Cupins são um grupo de insetos de grande importância na reciclagem de materiais celulósicos, no entanto, algumas espécies são capazes de causar danos à madeira, pinturas, monumentos, documentos históricos e edifícios (Koestler, 2000; Verma *et al.*, 2009). A capacidade de aproveitar a celulose como fonte energética se deve à presença de uma comunidade simbiótica de microorganismos encontrada no trato intestinal dos cupins (Fröhlich *et al.*, 2007). Essa microbiota é capaz de hidrolisar a celulose e a hemicelulose, fermentar e despolimerizar produtos a ácidos graxos de cadeia curta, que são absorvidos pelo hospedeiro, fixar nitrogênio, além de estar envolvida no metabolismo de hidrogênio (Warneck *et al.*, 2007)

Um grande número de espécies de cupins não são consideradas pragas e são de grande benefício para o ambiente como eficientes decompositores de matéria orgânica (Varma & Swran, 2007). Porém, 10% das espécies são consideradas pragas. No Brasil, as espécies causadoras dos maiores estragos são dos gêneros *Nasutitermes*, *Coptotermes* e *Cryptotermes* tanto em madeira estrutural de edificações como também em plantas vivas, tanto nos cultivos agrícolas quanto em florestas nativas.

O mecanismo de ação termiticida de lectinas de *M. urundeuva* foi estudado por Napoleão *et al.* (2011). A resistência à degradação por proteases foi também relacionada com a atividade inseticida da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (Paiva *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011). A atividade termiticida sobre *Nasutitermes corniger* tem sido relatada para lectina de *Cladonia verticillaris* (Silva *et al.*, 2009) e para os isolados de *Myracrodruon Urundeuva* (Sá *et al.*, 2008; Napoleão *et al.*, 2011) e *Crataeva tapia* (Araújo *et al.*, 2012).

Lectinas também são capazes de se ligar a enzimas digestivas glicosiladas ou glicoproteínas. A lectina galactose específica da folha *B. monandra* (BmoLL) induziu a

mortalidade das espécies *Callosobruchus maculatus* e coleópteros promovendo uma redução na atividade α -amilase no intestino do inseto (Macedo *et al.*, 2007).

2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada por diferentes espécies pertencente ao gênero *Leishmania*, que acomete pele, cartilagens e/ou mucosa (Lainson & Shaw, 1998). É considerada como um importante problema de saúde pública no mundo. E apresenta-se com uma diversidade epidemiológica por envolver vários agentes etiológicos, vetores e hospedeiros no ciclo de transmissão.

A LTA é considerada uma doença negligenciada, distribuída em 82 países, com incidência de cerca de 1,5 milhão de casos, dos quais 90% dos casos notificados ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, e, 90% da forma mucocutânea ocorrem na Bolívia, Peru e Brasil (WHO, 2011).

A LTA é uma doença que merece especial atenção devido às limitações terapêuticas existentes e à severidade representada pela forma mucosa da doença. No Brasil das sete espécies envolvidas com a LTA predomina a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, presente em todos os Estados federados (Brasil, 2007).

A incidência da LTA na região Nordeste é verificada principalmente nas áreas com resquícios de floresta de Mata Atlântica (Marzochi, 1992). Em Pernambuco, a LTA incide em todas as regiões do Estado, com predominância na Zona da Mata, com mais de 60% do total de casos notificados (Brandão-Filho *et al.*, 1999; Brandão-Filho, 2001).

O diagnóstico da LTA é feito através de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico clínico baseia-se nas características da lesão associadas à anamnese e aos dados epidemiológicos (Gontijo & Carvalho, 2003).

As técnicas clássicas de diagnóstico para LTA incluem o exame direto, intradermoreação de Montenegro, isolamento do parasito em meio de cultura e detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por métodos sorológicos e moleculares (Brito *et al.*, 2000). O

exame mais simples e de baixo custo é a pesquisa direta de formas amastigotas visualizadas ao microscópio óptico. A sensibilidade deste teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão, mas não discrimina espécies e a sensibilidade varia de 50 a 70% (Bensounssan *et al.*, 2006).

O cultivo e isolamento obtidos a partir de material de punção aspirativa e/ou biópsias de lesões são reconhecidos como os melhores métodos convencionais, que permite a confirmação e posterior identificação da espécie envolvida. Contudo, requer laboratório com infra estrutura e técnicos capacitados, além disso, o período é longo para a obtenção do resultado (Bensounssan *et al.*, 2006; Rodriguez–Gonzalez *et al.*, 2006).

Testes com base inumune como a Intradermorreação de Montenegro (IRM), avalia a resposta de hipersensibilidade celular tardia, é positivo durante a doença e após a cura e não diferencia doença atual de pregressa, nem distingue doença de infecção, porém é habitualmente negativo na forma difusa, na forma visceral e nos pacientes imunodeprimidos. A IRM é bastante utilizada nos inquéritos epidemiológicos de prevalência em áreas endêmicas (Kar, 1995).

Dentre os métodos sorológicos, a reação de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA , W. blot são mais utilizados. São técnicas sensíveis, mas apresentam reações cruzadas com outras doenças parasitárias, especialmente com a doença de Chagas e leishmaniose visceral (Brito *et al.*, 2000).

Com o advento da biologia molecular atualmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui o principal teste molecular devido à alta sensibilidade e especificidade, podendo detectar DNA do parasito em diversos tipos de amostras. Além disso, apresenta rapidez no diagnóstico e permite a genotipagem de *Leishmania* spp. (Rodrigues *et al.*, 2002).

Neste contexto, há necessidade de métodos mais sensíveis e acurados para o diagnóstico da LTA. Em áreas como a análises clínicas requerem o desenvolvimento de

ferramentas para a detecção seletiva de biomoléculas. Biossensores podem ser considerados como ferramentas complementares com método de análise, devido à sua simplicidade inerente, baixo custo relativo, resposta rápida, permitindo rápido monitoramento (Sassolas, Blum & Leca-Bouvier, 2011).

3 BIOSENSORES

De acordo com uma definição proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), biossensores constituem um tipo de sensor químico composto por um elemento biológico e um transdutor, capazes de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas (Strehlitz, Nikolaus & Stoltenburg, 2008; Rodriguez-Mozaz, Alda & Barceló, 2006; Theâvenot *et al.*, 1999).

O elemento biológico é fixado (ou imobilizado) na superfície sensora do transdutor, que converte o sinal da reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico passível de ser quantificado, conforme esquematizado na figura 4 (Sassolas, Blum & Leca-Bouvier, 2011; Pereira, Santos & Kubota, 2002). Este sinal pode ser resultante de alterações na concentração de prótons, liberação ou captação de gases, de íons específicos, calor, massa, absorvância, condutância ou transferência de elétrons (Alfaya & Kubota, 2002).

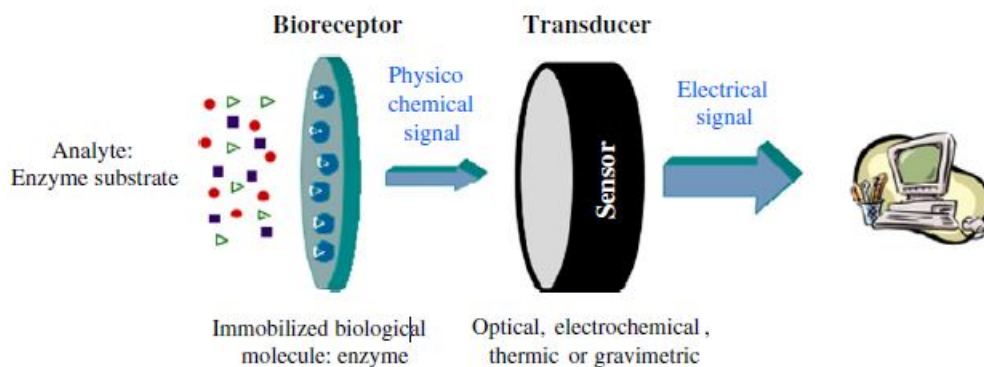


Figura 4: Representação esquemática dos elementos constituintes de um biossensor. (Fonte: Sassolas, Blum & Leca-Bouvier, 2011)

Os biossensores podem ser classificados em vários grupos de acordo com o elemento biológico e o tipo de transdutor empregado (Luong, Male & Glennon, 2008). Os principais materiais biológicos utilizados nestes dispositivos são proteínas, enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos. Além disso, microrganismos, células animais, células vegetais e cortes de tecidos também podem ser usados (Velasco-Garcia, 2009).

De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, os transdutores podem ser classificados em: eletromagnéticos, ópticos, calorimétricos e eletroquímicos. Os mais comumente usados são os eletroquímicos e de acordo com o parâmetro de medida realizada pode ser classificado em: amperométricos, condutimétricos, potenciométricos e impedimétricos (Mohanty & Kougiianos, 2006).

O transdutor a ser utilizado juntamente com o material biológico serve para detectar apenas um reagente ou produto específico, não respondendo a outras substâncias (espécies) presentes na amostra a ser analisada. A escolha de um determinado transdutor não depende apenas do tipo de elemento de reconhecimento, já que este determina quais variações das propriedades físico-químicas ocorreriam em função da interação, mas depende também de outros fatores como tempo de resposta, seletividade e sensibilidade (Riccardi, Costa & Yamanaka, 2002).

3.1 Transdutores Eletroquímicos

Os transdutores eletroquímicos são os mais usados em biossensores, principalmente por oferecerem vantagens como: simplicidade, rapidez na resposta, menor custo, alta sensibilidade e serem compatíveis com as tecnologias de micro fabricação (Jin *et al.*, 2006; Grieshaber *et al.*, 2008; Ronkainen, Halsall & Heineman, 2010).

Biossensores eletroquímicos têm como princípio básico a detecção de espécies eletroativas consumidas e/ou geradas durante o processo de interação do elemento biológico com seu substrato específico (Ronkainen, Halsall & Heineman, 2010). Esses sensores são projetados através do acoplamento de moléculas biológicas à superfície eletródica (por exemplo, eletrodos de platina, ouro, prata, à base de carbono, grafite ou condutores), que respondem ao aplicar impulsos elétricos, tais como corrente ou potencial (Sadik, Aluoch & Zhou, 2009).

Recentemente têm sido desenvolvidos vários tipos de sensores utilizando lectinas, seja para a identificação das mesmas ou com o intuito de investigar a interação lectina-carboidrato. Os métodos de investigação variam desde a adsorção direta das lectinas em superfícies metálicas ou através de superfícies modificadas (Andrade *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011a; Oliveira *et al.*, 2011b).

A Espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica do tipo *label-free* bastante utilizada para caracterizar e avaliar o desenvolvimento de biossensores. Outras técnicas como a voltametria cíclica e a microscopia de força atômica também se destinam para avaliar alterações do comportamento eletroquímico da interface eletrodo-solução pela presença das biomoléculas, bem como a observação de características morfológicas que elucidam pormenores de uma superfície modificada.

3.2 Técnicas Eletroquímicas

Muitos trabalhos descrevem o uso de técnicas eletroquímicas no monitoramento de reações biomoleculares. Os métodos eletroquímicos possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e algumas propriedades elétricas (Sadik, Aluoch & Zhou, 2009) como, corrente, potencial, condutividade, resistência e carga elétrica.

Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroquímicas são adequadas para quantificação de espécies de interesse nas diferentes áreas de estudo desde a pesquisa básica até a análise de rotina (Souza, Machado & Avaca, 2003). Neste trabalho, as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram empregadas para caracterização do biossensor, sendo bastante utilizadas por serem simples e sensíveis quando comparadas às técnicas ópticas ou piezoelétricas (Sadik, Aluoch & Zhou, 2009).

3.2.1 voltametria cíclica

É uma técnica eletroanalítica importante e amplamente empregada. No entanto, não permite a análise quantitativa do sistema investigado. Esta técnica possibilita fornecer informações rápida sobre a termodinâmica dos processos redox, da cinética de reações de transferências de elétrons e reações químicas acopladas aos processos adsorptivos (Bard & Faulkner, 2006).

A voltametria cíclica (VC) compreende um conjunto de técnicas que permitem investigar processos eletroquímicos através da observação de relações entre a corrente elétrica (I) e potencial (E) aplicado entre dois eletrodos imersos numa solução eletrolítica (Holler, Skoog & Crouch, 2009; Harris, 2001).

Na VC, uma varredura triangular de potencial com velocidade conhecida e constante é aplicada a um eletrodo de trabalho estacionário e com a solução mantida em repouso, onde, quando se alcança o potencial final desejado, a direção da varredura é invertida em direção ao potencial inicial, obtendo-se como resposta a tal perturbação, um gráfico de corrente vs. potencial (Skoog *et al.*, 2008; Wang, 2006).

A figura 5 representa o padrão típico da excitação do sinal para a técnica de voltametria cíclica de um sistema reversível. A faixa de variação do potencial aplicado deve ser aquela, onde a espécie em análise é eletroativa e o solvente é estável. Dependendo do analito pode-se fazer apenas um ciclo ou múltiplos ciclos.

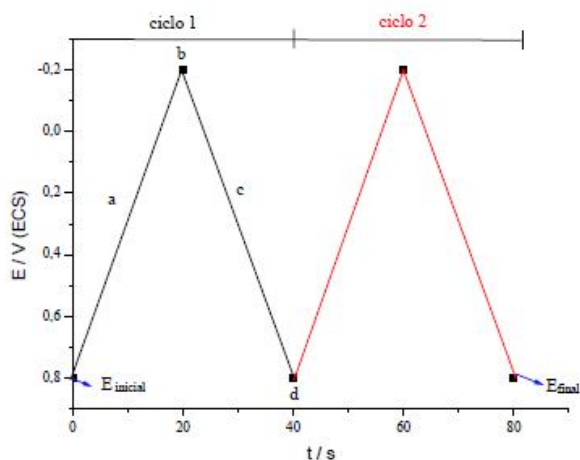


Figura 5: Típico do sinal de excitação para voltametria cíclica, potencial vs tempo, (Fonte: <http://qmc.ufsc.br/~metodos1>).

Um voltamograma cíclico, figura 6, é obtido pela medida de corrente sobre o eletrodo de trabalho durante a variação de potencial (gráfico de corrente em função do potencial). A corrente pode ser considerada o sinal responsável pelo sinal de excitação do potencial.

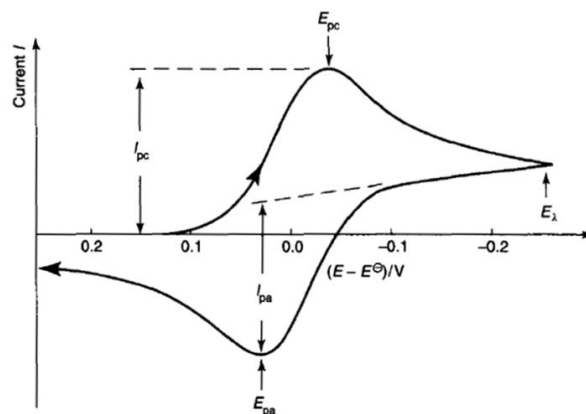


Figura 6: Típico voltamograma cíclico para um processo redox reversível, Fonte: (Skoog & Crouch, 2009).

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes em voltametria cíclica são os potenciais de pico (E_p) catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}); as correntes de pico catódica e anódica (I_{pc} e I_{pa}); os potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) e de pico a meia altura ($E_p/2$) (Holler, Skoog & Crouch, 2009).

Desta forma na investigação de reações eletródicas nos sistemas eletroquímicos reversíveis, os potenciais de pico, E_{pc} e E_{pa} , são independentes da velocidade de varredura v . $E^{0'}$ está posicionado entre E_{pc} e E_{pa} segundo a expressão:

$$E^{0'} = (E_{pa} + E_{pc}) / 2$$

A separação entre E_{pc} e E_{pa} é 59 mV/n (Bard & Faulkner, 2006).

Em mecanismos de sistemas mediadores a VC permite a sua caracterização a partir dos potenciais dos picos de intensidade registrados e das modificações provocadas por alterações da velocidade de varredura. Além disso, a técnica de VC pode ser utilizada para detalhar importantes informações do sistema, tais como potencial de oxidação e redução da espécie, número de elétrons transferidos, reversibilidade da reação, coeficiente de difusão, etc (Brett & Brett, 1993; Seong-Hun, Wone-Keun & Jae-Ho, 2010).

3.2.2 espectroscopia de impedância eletroquímica

Os estudos por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são por vezes extremamente complicados, devido ao grande número de variáveis, que podem interferir no sistema. Esta técnica pode ser usada para detectar a reação específica entre um receptor e seu ligante. EIE é amplamente utilizada para caracterizar as variações nas propriedades eletrônicas de materiais a granel, e para a investigação de processos superficiais e interfaciais em eletrodos (Barsoukov & Macdonald, 2005; MacDonald, 1991). É uma ferramenta amplamente empregada na caracterização de sistemas eletroquímicos e vem sendo bastante

empregada no monitoramento de reações por bioafinidade, como por exemplo, a ligação de lectinas com carboidratos.

A técnica consiste na aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. Nesta perturbação é aplicado um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é superimposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude (Shi *et al.*, 2008).

As amplitudes de excitação são geralmente muito pequenas empregando poucos milivolts. A magnitude das amplitudes de excitação causa somente perturbações mínimas no sistema em análise, de forma que, tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Na EIE surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema, uma vez que a perturbação pode ser feita usando diferentes valores de frequência. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidos a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado) (Damos, Mendes & Kubota, 2004).

Em linhas gerais, pode-se dizer que a impedância está para os sistemas de corrente alternada assim como a resistência está para os de corrente contínua. Enquanto nos sistemas de corrente contínua o impedimento do fluxo de elétrons é devido a um resistor, nos de corrente alternada este impedimento é feito também por capacitores e indutores, além dos resistores. E a oposição combinada de todos estes elementos (resistores, capacitores e indutores), dá-se o nome impedância.

Os termos resistência e impedância significam uma obstrução à passagem de corrente ou fluxo de elétrons. Ao lidar com corrente contínua, os resistores promovem este efeito, entretanto, no caso de corrente alternada, elementos de circuito, tais como capacitores e indutores podem também influenciar no fluxo de elétrons. Estes elementos podem afetar não somente a magnitude de uma corrente alternada em forma de onda, mas também suas

características dependentes do tempo ou suas fases (Kawakami, Kenji, 1996), uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema.

Desta forma, medidas da impedância e ângulo de fase permitem avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância, coeficientes de difusão de portadores de carga, entre outros (Damos, Mendes & Kubota, 2004).

Os sistemas eletroquímicos, geralmente são constituídos por um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar e um eletrodo de trabalho (figura 3). O eletrodo de referência, (normalmente de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), estabelece o potencial de trabalho. O eletrodo de trabalho funciona como elemento transdutor da reação bioquímica, enquanto o eletrodo auxiliar estabelece uma conexão com a solução eletrolítica (Grieshaber *et al.*, 2008).

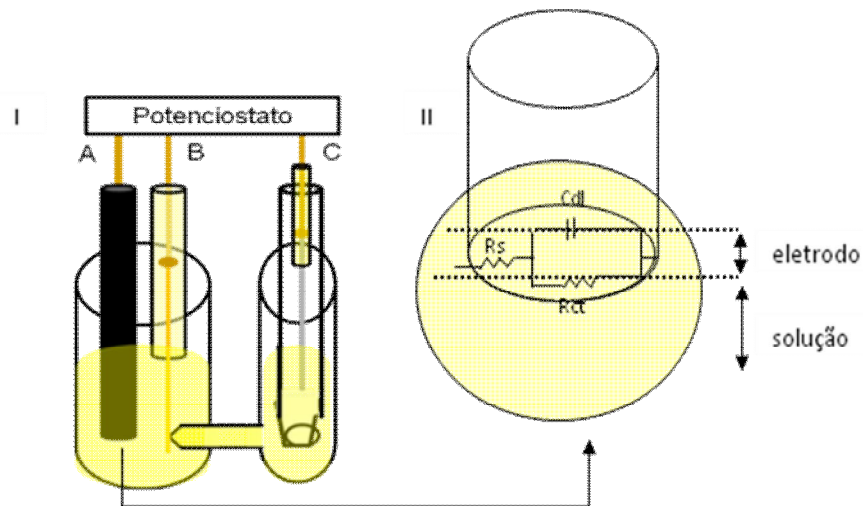


Figura 7: Esquema da célula eletroquímica com três eletrodos. (I) (A) eletrodo de trabalho; (B) eletrodo auxiliar e (C) eletrodo de referência; (II) diagrama esquemático de um circuito Randles superimposto à interface eletrodo/eletrólito (baseado em Damos, Mendes & Kubota, 2004)

A investigação do comportamento do sistema eletroquímico estar relacionada a circuitos elétricos que incluem resistores, capacitores e indutores (Huang, 2011). Desta forma, as medidas por impedância eletroquímica permitem ao pesquisador analisar e caracterizar o sistema em termos de um circuito equivalente através de modelo puramente elétrico (figura 7-II).

A representação da interface eletrodo/solução para o circuito acima (figura 7-II), onde R_s seria resistência da solução entre o eletrodo de trabalho e o de referência. R_{ct} seria a resistência de polarização na interface da dupla camada. C_{dl} seria a capacitância da dupla camada nesta interface, que representa todos os mecanismos de armazenamento de carga, relacionada à célula da medida preenchida com o material a ser analisado. O conhecimento de R_{ct} permite através de cálculo obter informação de reações eletroquímicas e as medidas de capacitância de fenômenos como por exemplo adsorção, desorção, processos de formação de filmes no eletrodo, entre outros. Segundo, Damos, Mendes & Kubota, (2004), uma vez que a corrente que passa na interface eletrodo/solução é conduzida pelos íons em solução, o efeito resistivo na solução sobre a migração dos íons é representado por uma resistência R_w .

Por outro lado, a introdução de elementos capacitivos em um circuito promove uma defasagem entre a corrente e o potencial. Desta forma, uma representação comum para a impedância em sistemas compostos por resistores e capacitores é através de um diagrama de fasores no qual a impedância apresenta uma componente real (resistiva) e imaginária (capacitiva). Para o circuito equivalente apresentado na (Figura 7 II) as componentes real (Z') e imaginária (Z'') da impedância do sistema são:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad \text{e} \quad Z'' = \frac{\omega C_d R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2}$$

onde, R_{Ω} - resistência da solução, R_{ct} - resistência à transferência de carga, ω - frequência angular e C_d - capacitância da dupla camada elétrica (Damos, Mendes & Kubota, 2004; Hsieh *et al.*, 2007).

Conforme pode ser observado nas expressões acima, em altas frequências a componente real da impedância tende a R_{Ω} , enquanto que nas regiões de baixa frequência tende a $R_{\Omega} + R_{ct}$. Ao avaliar este comportamento é possível inferir como obter informações sobre a resistência da solução na região de altas frequências e na região de baixas frequências sobre os processos de eletrodo (resistência à transferência de carga).

A partir equação acima pode ser construído um gráfico de Z'' em função de Z' revelando um comportamento circular com raio de $R_{ct}/2$ e centro em $Z'=R_{\Omega} + R_{ct}/2$ e $Z''=0$. Neste contexto, o componente imaginário da impedância (Z'') é plotado versus componente real da impedância (Z'), para cada frequência de excitação apresentado na figura 8A mostrando o perfil típico da impedância, conhecida como diagrama de Nyquist, (Figura 8A), (Alves & Brett, 2002; Dean, 2008).

Outra forma de análise são representações de $\log |Z|$ ($|Z|$ - módulo da impedância) e φ (ângulo de fase) v.s $\log \omega$ (ω - frequência), chamadas de curvas de Bode (Figura 8B), são de grande importância para a interpretação de dados provenientes da EIS, pois as informações obtidas a partir destes gráficos podem ser complementares às obtidas no diagrama de Nyquist.

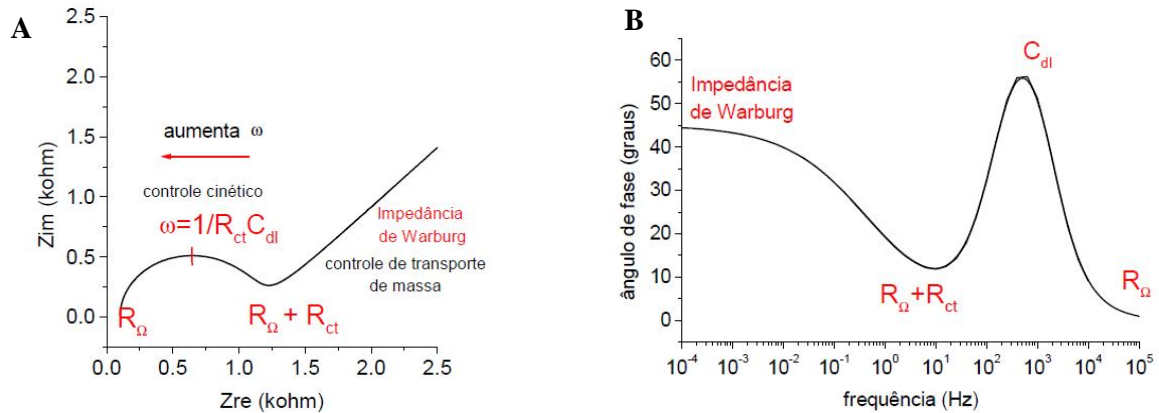


Figura 8: Representação de impedância (diagrama de Nyquist) referente ao circuito equivalente apresentado na figura 7 II, diagrama de Bode (B) correspondente ao diagrama de Nyquist apresentado em (A), (Fonte: Ueta, 2002).

Conforme pode ser observado na (Figura 8B), as alterações da impedância indicam os efeitos da resistência à transferência de carga no sistema. Por outro lado, à medida que, a frequência do sistema é aumentada observam-se alterações no ângulo de fase entre o potencial aplicado e a corrente resultante. Esta alteração no ângulo de fase possibilita a obtenção de informações sobre a componente capacitiva do sistema, uma vez que as componentes capacitivas introduzem um comportamento co-senoidal na corrente (Macdonald, 1991).

Desta forma, os efeitos da transferência de carga (R_{tc}), da dupla camada elétrica (C_d), bem como os efeitos da solução sobre a migração de íons (R_w), podem ser obtidos mediante a avaliação de diagramas de Nyquist e curvas de Bode. Adicionalmente, nos sistemas que apresentam efeitos significativos da impedância à transferência de massa (Z_w) a introdução de um elemento denominado "impedância Warburg" é feita com o propósito de simular as características do sistema experimental, tanto em processos que sofrem difusão linear, esférica

ou sob convecção forçada. Neste contexto, um grande conjunto de fatores pode influenciar a impedância do sistema, como processos faradaicos, adsorção de espécies eletroativas e não-eletroativas, reações no eletrodo envolvendo a formação de intermediários estáveis e heterogeneidade de superfícies, de forma a proporcionar à EIE um amplo campo de aplicação (Ates, 2011).

4 CIRCUITO EQUIVALENTE

No desenvolvimento de modelos baseado em métodos de EIE, o tratamento matemático envolvido na análise de impedância (o comportamento da resposta *ac* da célula eletroquímica) é convencionalmente descrita, por um circuito equivalente ou por equações cinéticas que levam às funções de impedância (Song, 2000).

De acordo com o que foi apresentado acima pode-se analisar reações de eletrodos utilizando circuitos elétricos equivalentes, os quais representam os processos relacionados às impedâncias Z_{im} e Z_{re} (Figura 8).

O circuito da Figura 9 é conhecido como circuito de Randles (Bruce, 1995) e é muito utilizado para interpretar os dados de EIE. O circuito de Randles engloba os processos descritos na Figura 7. Este modelo prevê que a corrente faradáica resultante das transferências eletrônicas na interface está sempre associada ao componente capacitivo.

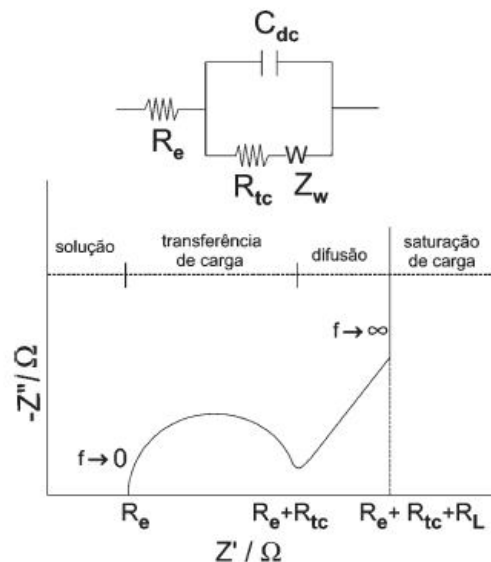


Figura 9: Circuito de Randles (no topo) e sua resposta no plano de impedância complexa (Fonte: Carvalho & Andrade, 1996).

Os componentes do circuito e as diferentes regiões de resposta em frequência representam o processo eletroquímico global. A região de alta frequência está associada com a resistência da solução eletrolítica, R_e . A região de frequências intermediárias está associada com a transferência de carga na interface, R_{tc} . O efeito de relaxação correspondente é apresentado no plano complexo ($jZ'' - Z'$) com um semicírculo, cuja constante de tempo é dada pelo produto $R_{tc}C_{dc}$ (Changjun & Shuhai, 2011; Harrington & Driessche, 2011)

Dois parâmetros são obtidos da análise do semicírculo: R_{tc} que é a medida do diâmetro e a frequência de relaxação característica, f_c , obtida no valor máximo do semicírculo. Em baixas frequências a impedância é caracterizada por processos de transporte de massa por difusão. Duas regiões podem ser identificadas no plano de impedância complexa: uma região linear com ângulo de fase $\pi/4$, correspondendo à difusão semi-infinita e representada pela impedância de Warburg, Z_w , e uma segunda região linear ainda em baixas frequências com um ângulo de fase de $\pi/2$, associada com uma resposta puramente capacitiva.

Considerando uma reação de eletrodo onde a etapa mais lenta está relacionada ao transporte iônico em direção a interface, é razoável considerar que a cinética da reação é limitada por difusão. Nestas condições o processo de difusão é progressivamente limitado pela acumulação de carga eletrônica na interface do eletrodo, resultando em uma capacitância C_L (Changjun, & Shuhai, 2011; Harrington, & Driessche, 2011)

O circuito de Randles descreve adequadamente os processos que ocorrem na região de altas frequências. Contudo, na região de baixa frequência, para eletrodos porosos, a análise é complexa e a interpretação física da C_L não pode ser descrita como uma capacitância pura, sendo representada por um elemento de fase constante (CPE) (Bruce, 1995).

Circuitos equivalentes contendo CPEs com impedância dada por $Z_{CPE} = 1 / (Qs^{\alpha_f})$ em que Q é o parâmetro de CPE, α_f o expoente CPE, $s = i\omega$ e ω frequência angular, são frequentemente encontrados na literatura e muitos circuitos equivalentes contendo pelo menos

dois CPEs têm sido propostos (Berthier, Diard & Michel, 2011). O significado físico de CPEs ainda é uma questão de controvérsia e CPEs são utilizados para descrever os diferentes fenômenos eletroquímicos, tais como de dupla camada de capacitância, adsorção, etc (Berthier, Diard, & Michel, 2011).

Uma vez escolhido o circuito elétrico que melhor descreve o processo, pode-se relacionar as propriedades físicas ou químicas com elementos do circuito e extrair valores numéricos de todos estes elementos, através de simulações dos dados experimentais, geralmente utilizando-se o método de mínimos quadrados não-linear, com o auxílio de um programa de computador adequado (Changjun, & Shuhai, 2011; Harrington, & Driessche, 2011).

5 SOFTWARE ZVIEW

ZView é um programa que permite analisar os resultados nos quais diversas variáveis das medidas de impedância, tais como capacitância, resistência, indutância, bem como outros componentes do circuito elétrico. O programa apresenta duas possibilidades para o estudo de circuitos elétricos: a simulação da resposta elétrica de um circuito e a modelagem dos resultados experimentais com o uso de circuito equivalente.

A figura 10A, apresenta a interface do programa, com a janela de circuito equivalente e os parâmetros (figura 10B) previamente estabelecidos pelo usuário. A partir do circuito equivalente o programa permite ajustar as curvas de resposta do circuito a curva obtida experimentalmente (modelagem dos dados ou fit).

O programa possui recursos nos quais os parâmetros podem variar livremente durante o ajuste ou serem fixados em determinado valor para melhor forma de obtenção dos dados. Na figura 10B, a janela do circuito equivalente permite obter informações de simulação e ajuste de curvas com o programa. A partir dele pode-se definir os parâmetros e obter os valores de desvio padrão do ajuste para cada parâmetro.

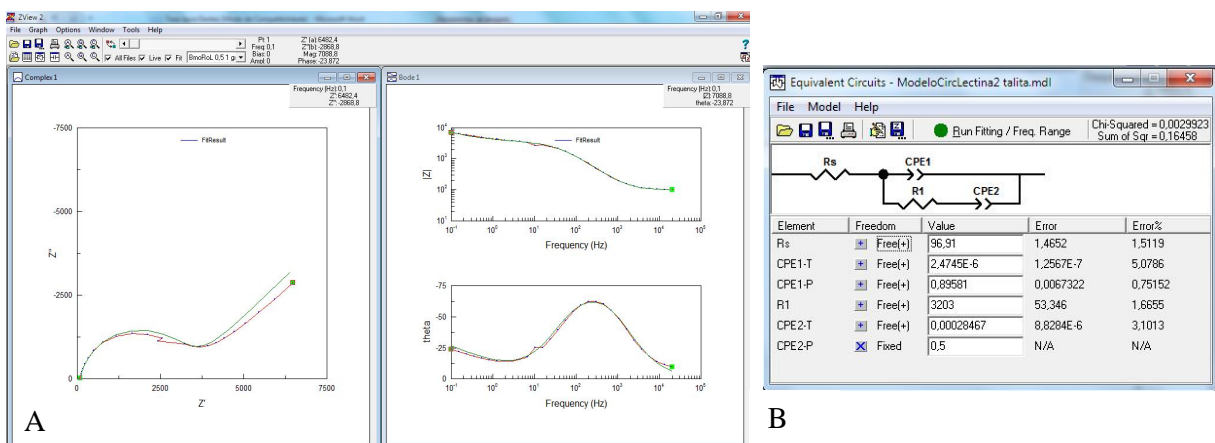


Figura 10: Interface do programa ZView (A) e janela de circuito equivalente (B) com os parâmetros de ajuste.

6 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA - AFM

A AFM é uma técnica de bastante útil para caracterização morfológica e estrutural de diferentes materiais. Este método tem com princípio básico a análise de medidas de deflexões obtidas através de varreduras da superfície de uma amostra com uma haste ou cantilever acoplado a uma ponteira na sua extremidade. O sistema opera sobre o controle de moduladores piezelétricos que permitem a movimentação vertical e horizontal da sonda de varredura com uma precisão nanométrica (Morita, Wiesendanger & Meyer, 2002; Gross *et al.*, 2009). A Figura 11 apresenta um esquema básico de funcionamento de um AFM.

As análises por AFM permitem a obtenção de imagens em duas e três dimensões das superfícies estudadas. Como vantagem adicional, não requer a preparação das amostras por recobrimento por materiais condutores, permitindo a análise de amostras biológicas sem perda das suas propriedades (Morita, Wiesendanger & Meyer, 2002; Pinto, 2010).

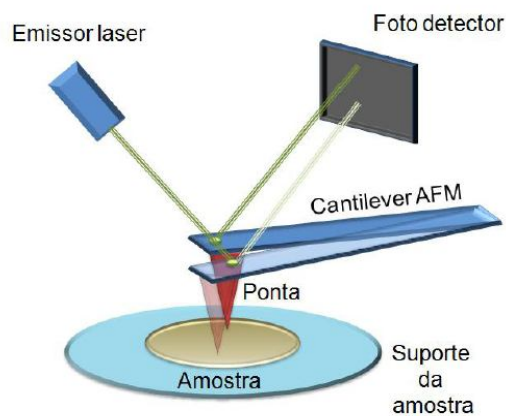


Figura 11: Representação esquemática do princípio de funcionamento de um AFM e os seus componentes fundamentais, (Fonte: Pinto, 2010).

REFERÊNCIAS

ABDUKLLAEV, F.I.; DEMEJIA, G. **Antitumor activity of natural substances lectins and saffron.** Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 47:195-202, 1997.

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

ALVES, V.A.; BRETT, C.M.A. **Characterisation of passive films formed on mild steels in bicarbonate solution by EIS.** Electrochimica Acta, 47, 2081, 2002

ANDRADE, C.A.S.; OLIVEIRA, M.D.L.; MELO, C.P.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; NOGUEIRA, M.L.; SINGH, P.R.; ZENG, X. **Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and Bauhinia monandra lectin.** Journal of Colloid and Interface Science, 362:517–523, 2011.

ARAÚJO, R.M.S.; FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CUNHA, M.G.C.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M.L.V.; PAIVA, P.M.G. **Crataeva tapia bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent.** Plant Science, 183:20–26, 2012.

ATES, M. **Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces.** Progress in Organic Coatings, 71:1–10, 2011.

BARD, A.J.; FAULKER, L.R. **Electrochemical Methods.** 2 ed., John Wiley & Sons, New York, 2006.

BAROU, O.; MEKRALDI, S.; VICO, L.; BOIVIN, G.; ALEXANDRE, C.; LAFAGEPROUST, M.H. **Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study.** Bone, 30:604-612, 2002.

BASU, P.S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S.K. **Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer.** Clinical Biochemistry, 36:373-376, 2003.

BAZIL, V.; ENTLICHER, G. **Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L).** The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 31:431-442, 1999.

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

BENSOUSSAN, E. **Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis.** Journal Clinical Microbiological, 44: 1435-1439, 2006.

BERTHIER, F., DIARD, J.P., MICHEL, R. **Distinguishability of equivalent circuits containing CPEs Part I.** Theoretical part, Journal of Electroanalytical Chemistry, 510: 1-11, 2001.

BIANCHET, M.A.; ODOM, E.W.; VASTA, G.R.; AMZEL, L.M. **Structure and Specificity of a Binary Tandem Domain F-Lectin from Striped Bass (*Morone saxatilis*).** *J. Mol. Biol.* 401:239–252, 2010.

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

BOYD, W.C.; SAHAPLEIGH, E. **Specific precipitating activity of plant agglutinins lectins).** Science, 119:419-423, 1954.

BRANDÃO-FILHO, S.P.*et al.* **Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 93:488-494, 1999.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 2. ed. atualizada – Brasília : Ed. Ministério da Saúde, 2007.

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**. New York: Ed. Oxford University Press, 1993. 464 p.

BRITO, M.E.F. *et al.* **Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by imunoblot analysis**. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7:318-321, 2000.

BRUCE, P. G. **Solid State Electrochemistry**. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

CARDOSO, F. S., MOSSANEK, E.A.O., ACRA, L.A. **Biologia floral de *Calliandra tweediei* BENTH. (FABACEAE BENTH.)** Estud. Biol. 29:283-289, 2007.

CAVADA, B.S.; MADEIRA, S.V.; CALVETE, J.J.; SOUZA, L.A.; BOMFIM, L.R.; DANTAS, A.R.; LOPES, M.C.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, B.T.; PINTO, V.P.; LEITE, K.B.; RAMOS, M.V. **Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from *Mimosaideae* (*Parkia discolor*)**. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 30:271-280, 2000.

CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F.; GRANGEIRO, T.B.; NUNES, E.P.; SALES, P.V.P.; RAMOS, R.L.; DE SOUZA, A.M.; CRISOSTOMO, C.V.; CALVETE, J.J. **Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vaitarea macrocarpa* Duke**. Phytochemistry, 49: 675-680, 1998.

CERRADA, M. L.; SÁNCHEZ-CHAVES, M.; RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. **Specific lectin interactions and temperature-induced reversible gels in novel water-soluble glycopolymers bearing maltotriionolactone pendant groups**, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 48:719–729, 2010.

CHANGJUN, X.; SHUHAI, Q. **Drawing impedance spectroscopy for Fuel Cell by EIS**. Environmental Sciences, 11:589-596, 2011.

CHARUNGCHITRAK, S.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. **Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen**. Food Chemistry 126:1025–1032, 2011.

CHEN, J.; LU, X.J.; YANG, H.Y.; SHI, Y.H. **An interaction between a C-type lectin receptor and leukocyte cell-derived chemotaxin 2 of ayu. *Plecoglossus altivelis***, Fish & Shellfish Immunology, 28:245–248, 2010.

CHENG, G.; COX, J.; WANG, P.; KRISHNAN, M.N.; DAI, J.; QIAN, F.; ANDERSON, J.F.; FIKRIG, E. **A C-Type Lectin Collaborates with a CD45 Phosphatase Homolog to Facilitate West Nile Virus Infection of Mosquitoes**. Cell, 142:714-725, 2010.

CHUNG, J.J.; RATNAPALA, L.A.; COOKE, I.M.; YANAGIHARA, A.A. **Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom**. Toxicon, 39:981-990, 2001.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R. **Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra***. Phytochemical Analysis, 11:1-6, 2000.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. **Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean)**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 55, 261-273, 1995.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. **Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic?** In: Siddique, Y.H. (Ed.), Recent Trends in Toxicology, 37:47- 59, 2008.

COSTA, R.M.P.B., VAZ, A.F.M., OLIVA, M.L.V., COELHO, L.C.B.B., CORREIA, M.T.S., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. **A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties**. Process Biochemistry, 45: 526–533, 2010.

COUTIÑO-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P.; GILES-RÍOS, H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: **Their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157:H7**. Archives of Medical Research, 32:251-257, 2001.

DAMOS, F.S.; MENDES, R.K; KUBOTA, L.T. **Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio) sensores.** Quím. Nova vol.27 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2004

DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, K.; SINGH, M. **A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases,** Plant Physiology and Biochemistry, 39:949-959, 2001.

DAZIEL, M.; McFARLANE, I.; AXFORD, J. S. **Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycansylation.** Glycoconjugate Journal, 16:801-807, 1999.

DEAN, D.A.; RAMANATHAN, T.; MACHADO, D.; SUNDARARAJAN, R. **Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues.** Journal of Electrostatics, 66:165–177, 2008.

DRESCH, R.R., LERNER, C.B., MOTHE, B., TRINDADE, V.M.T., HENRIQUES, A.T., VOZÁRI-HAMPE, M.M. **Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugate*.** Comparative Biochemistry and Physiology, 2012.

Dutta, I., Saha, P., Majumder P, Sakar, A. **Chakraborti D, Banerjee S, Das S. The efficacy of novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco.** Plant Biotechnol J 3:601–611, 2005b.

EDEL, V., STEINBERG, C., GAUTHERON, N., ALABOUVETTE, C. **Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations.** Phytopathology 87: 693–69, 1997.

FASSINA, G.; RUVO, M.; PALOMBO, G.; VERDOLIVA, A.; MARINO, M. **Novel ligands for affinity-chromatographic purification of antibodies.** Journal Biochemical and Biophysical Methods, 49:481-490, 2001.

Fernandes, M.P.; **Purificação, Caracterização e Aplicação Biotecnológica da(s) Lectina(s) Presentes(s) em *Bauhinia membranacea* Benth.** Dissertação de Mestrado, UFPE, 2006.

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; DESIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. **Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculente* seeds that interferes with fungal growth.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:61-68, 2002.

FUJII, Y.; KAWSAR, S.M.A.; MATSUMOTO, R.; YASUMITSU, H.; ISHIZAKI, N.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; TAEI, M.; OZEKI, Y. **A D-galactose-binding lectin purified from coronate moon turban, *Turbo (Lunella) coreensis*, with a unique amino acid sequence and the ability to recognize lacto-series glycosphingolipids.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 158:30–37, 2011.

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

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J.; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ, E.; KOGAN, G.; KOŽÁR, T. **Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics.** *Biotechnology Advances*, 27:1–15, 2009.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. **A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics.** *Acta Histochemica*, 113:236–247, 2011.

GHOSH, D.; MAITI, T.K. **Immunomodulatory and anti-tumor activities of native and heat denatured *Abrus agglutinin*.** *Immunobiology*, 212:589-599, 2007.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. **What should be called a lectin?** *Nature*, 255, 66-72, 1980.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. **Leishmaniose tegumentar americana.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36:71-80, 2003.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, I.; EIMHULT, E. **Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures**. Sensors, 8:1400-1458, 2008.

GROSS, L.; MOHN, F.; MOLL, N.; LILJEROTH, P.; MEYER, G. **The chemical structure of a molecule resolved by atomic force microscopy**. Science, 325:1110-1114, 2009.

HAMSHOU, M.; SMAGGHE, G.; SHAHIDI-NOGHABI, S.; GEYTER, E. D.; LANNOO, N.; VAN DAMME, E.J.M. **Insecticidal properties of Sclerotinia sclerotiorum agglutinin and its interaction with insect tissues and cells**. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40:883-890, 2010.

HAMSHOU, M., VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. **Entomotoxic effects of fungal lectin from *Rhizoctonia solani* towards *Spodoptera littoralis***. Fungal Biology, 114:34-40, 2010.

HARRINGTON, D.A.; DRIESSCHE, P.V.D. **Mechanism and equivalent circuits in electrochemical impedance spectroscopy**. Electrochimica Acta, 56:8005-8013, 2011.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2001. 862 p.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. São Paulo: Ed. Bookman, 2009. 1056 p.

HOLMSKOV, U.; *et al.* **Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule**. Journal of Biological Chemistry, 13743-13749, 1997.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M.V. **Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis**. Journal of Chromatography B, 752:207-216, 2001.

HSIEH, G.; FORD, S.J.; MASON, T.O.; PEDERSONB, L.R. **Experimental limitations in impedance spectroscopy: Part VI. Four-point measurements of solid materials systems.** Solid State Ionics, 100:297-311, 1997.

HUANG, R. H., *et al.* **Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfite motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv.** FFBS Letters, 521:87-90, 2002.

HUANG, V.M.; WU, S.L.; ORAZEM, M.E.; PÉBÈRE, N.; TRIBOLLET, B.; VIVIER, V. **Local electrochemical impedance spectroscopy: A review and some recent developments.** Electrochimica Acta 56:8048-8057, 2011.

HUSKENS, D.; FERIR, G.; VERMEIRE, K.; KEHR, J.C.; BALZARINI, J.; DITTMANN, E.; SCHOLS, D. **Microvirin, a Novel $\alpha(1,2)$ -Mannose-specific Lectin Isolated from *Microcystis aeruginosa*, Has Anti-HIV-1 Activity Comparable with That of Cyanovirin-N but a Much Higher Safety Profile.** Journal of Biological Chemistry, 285:24845-24854, 2010.

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

JIMÉNEZ, M.; ANDRÉ, S.; BARILLARI, C.; ROMERO, A.; ROGNAN, D.; GABIUS, H.J.; SOLÍS, D. **Domain versatility in plant AB-toxins: Evidence for a local, pH-dependent rearrangement in the 2c lectin site of the mistletoe lectin by applying ligand derivatives and modeling.** FEBS Letters, 582:2309-2312, 2008.

JIN, Y.; YAO X; LIU Q.; LI, J. **Haipirm DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator.** Biosensors and Bioelectronics, 22:1126-1130, 2006.

JIANG, J-F; Han, Y; Xing, L-J; Xu, Y-Y; Xu, Z-H; Chong, K. **Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*.** Toxicon, v. 47, p. 133-9, 2006.

JUNG, E.C.; KIM, K.D.; BAE, C.H.; KIM, J.C.; KIM, D.K.; KIM, H.H. **A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris***. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770:833–8, 2007.

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

KAR, K. **Serodiagnosis of leishmaniasis**. *Crit. Rev. Microbiol*, 21:123-152, 1995.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P.J.; SAXENA, A.K.; KHAN, R.H.; ASHRAF, M.T.; KAMBOJ, S.S.; SINGH, J. **A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer and anti-cancer effect on human cancer cell lines**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445:156–165, 2006.

KAWAGISHI, H., *et al.* **Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycocleptodonoides aitchisonii***. *Phytochemistry*, 56:53-58, 2001.

KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. **Lectins, versatile proteins of recognition: a review**, *Carbohydrate Polymers*, 26:219-30, 1995.

KHANG, N.Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. **A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata***, *Biochim. Biophys. Acta*, 1033:210, 1990.

KONOZY, E.H.; BERNARDES, E.S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L.J.; WARD, R.J. **Isolation, purification, and physicochemical characterizations of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa***. *Arch. Biochem. Biophys.* 410:222-230, 2003.

KVENNEFORS, E.C.E.; LEGGAT, W.; HOEGH-GULDBERG, O.; DEGNAN, B.M.; BARNES, A.C. **An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts**. *Developmental and Comparative Immunology*, 32:1582–1592, 2008.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. **The neotropical Leishmania species.** In Collier, Balows, Sussman (Eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases, 9nd Ed., Arnold, London, 5:241-266, 1998.

LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V. **Lectins of living organisms.** The overview. Anaerobe, 17:452- 455, 2011.

LANG, R., SCHOENEN, H., DESEL, C. **Targeting Syk-Card9-activating C-type lectin receptors by vaccine adjuvants: Findings, implications and open questions.** Immunobiology 216:1184-1191, 2011.

LEITE, Y.F.M.M.; SILVA, L.M.C.M.; AMORIM, R.C.N.; FREIRE, E.A.; JORGE, D.M.M.; GRANGEIRO, T.B; BENEVIDES, N.M.B. **Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).** Biochimica et Biophysica Acta, 1724:137-45, 2005.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia.** Kew Botanic Gardens, 369, 1987.

LEWIS, G.; SCHIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World.** The Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LI, W.W.; YU, J.Y.; XU, H.L.; BAO, J.K. **Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 414:282–286, 2011.

LIMA, L.C.P.; GARCIA, F.C.P.; SARTORI, A.L.B. **Leguminosae nas Florestas Estacionais do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: Ervas, Arbustos, Subarbustos, Lianas e Trepadeiras.** Rodriguésia, 58:331-358, 2007.

LIMA, V.L.M.; CORREIA, M.T.S.; CECHINEL, Y.M.N.; SAMPAIO, C.A.M.; OWEN, J.S.; COELHO, L.C.B.B. **Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase.** Carbohydrate Polymers, 33:27-32, 1997.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. **Signaling in symbiosis**. Current Opinion in Plant Biology, 6:343-350, 2003.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: MARCUS, A. **The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. Proteins and nucleic acids**. New York, Academic Press, 6:371-447, 1981.

LIU, B., BIAN, H.J., BAO, J.K. **Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic**. Cancer Letters, 2871-12, 2010.

LIU, C; ZHAO, X; XU, X-C; LI, L-R; LIU, Y-H; ZHONG, S-D; BAO, J-K. **Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea***. International Journal of Biological Macromolecules, 42:138-44, 2008.

LIU, W., *et al.* **Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel mannose-binding lectin from *Gastrodia elata* with antifungal properties**. Acta Crystallogr. D-Biological Crystallography, 58:1833-1835, 2002.

LÓPEZ-VANCELL, R., ESPINOSA, R.A., GONZÁLEZ-CANTO, A., AVENDAÑO, M. N., M.C. LEÓN, G., OLIVOS-GARCÍA, A., LÓPEZ-VANCELL, D., PÉREZ-TAMAYO, R. **Entamoeba histolytica: Expression and localization of Gal/GalNAc lectin in virulent and non-virulent variants from HM1:IMSS strain**. Experimental Parasitology, 125:244-250, 2010.

LORD, J.M.E.C. **Afinity chromatography for the purification of lectins (a review)**. Journal of Chromatography 215, 316-372, 1994.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. **Biosensor technology: technology push versus market pull**. Biotechnology Advances, 26:492-500, 2008

MACIEL, E. V. M. *et al.* **Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes**. Biologicals v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.

MACDONALD, D.D. **Review of Mechanistic Analysis by Electrochemical Impedance Spectroscopy.** *Electrochimica Acta*, 35:1509-1525, 1991.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; DA SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. **Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).** *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., KUBO, C.E.G., PARRA, J.R.P. **Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatilis*.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153:24–33, 2011.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. **Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans. *Sphenostyles stenocarpa* Harms.** *Phytochemistry*, 51:721-728, 1999.

MARZOCHI, M.C.A. **Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares.** *J. Bras. Med.*, 63:82-104, 1992.

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

MEYER, W.; BOLLHORN, M.; STEDE, M. **Aspects of general antimicrobial properties of skin secretion in the common seal *Phoca vitulina*.** *Diseases of Aquatic Organisms*, 41:77-79, 2000.

MICHIELS, K.; VAN DAMME E.J.M.; SMAGGHE, G. **Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins?** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 73:193–212, 2010

MINKO, T. **Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates.** Adv Drug Deliv Rev, 56:491–509, 2004.

MLADENOV, I.V.; HARALAMBIEVA, I.H.; IANKO, I.D.; MITOV, I.G. **Characterization of 20- kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1386:1-6, 2002.

MO, H.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I. J. **Purification and characterization of a neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glic/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Plyporus squamosus*.** Journal of Biological Chemistry, 275:10623-29, 2000.

MOHANTY, S.P.; KOUGIANOS, E.. **Biosensors: A tutorial review.** Potentials, IEEE, 25:35-40, 2006.

MORITA, S.; WIESENDANGER, R.; MEYER, E. **Noncontact atomic force microscopy.** Berlin: Springer, 2002. 439 p.

NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; SÁ, R.A.; ALBUQUERQUE, A.C.; COELHO, L.C.B.B. & PAIVA, P.M.G. **Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms.** International Biodeterioration & Biodegradation, 65:52-59, 2011.

NEUMANNA, D., LEHRB, C.M., LENHOFA, H.P., KOHLBACHER, O. **Computational modeling of the sugar–lectin interaction.** Advanced Drug Delivery Reviews, 56: 437– 457, 2004.

NG, T. B.; YU, Y. L. **Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling.** The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 33:269-277, 2001.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. **A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes and antiproliferative activity**

toward tumor cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 314: 988-993, 2004.

NILSSON, C.L. **Lectins: Analytical Technologies (Chapter 1 Lectins: Analytical Tools from Nature).** C.L. Nilsson (Editor) Elsevier B.V. 2007.

OLAJOS, M.; SZEKRÉNYES, Á.; HAJOS, P.; GJERDE, D.T.; GUTTMAN, A. **Boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC) Temperature dependence of glycoprotein isolation and enrichment.** Anal Bioanal Chem, 397:2401–2407, 2010.

OLIVEIRA, J.T. A., *et al.* **Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*.** Phytochemistry, 61:301-310, 2002.

OLIVEIRA, M.D.L.; NOGUEIRA, M.L.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.C.B.; ANDRADE, C.A.S. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sensors and Actuators B** 155:789–795, 2011a.

OLIVEIRA, M.D.L.; ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; SINGH, P.R.; ZENG, X. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, 362:194–201, 2011b.

PAIVA, P. M. G. & COELHO, L. C. B. B. **Purification and partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean).** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAIVA, P.M.G.; SANTANA, G.M.S.; SOUZA, I.F.A.C.; ALBUQUERQUE, L.P.; AGRANETO, A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; LUZ, L.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. **Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*.** International Biodeterioration & Biodegradation, 65: 982-989, 2011.

PAZ, NATHALIA VAREJÃO NOGUEIRA DA; MARCIUS DA SILVA ALMEIDA; NUCCIA N.T. DE CICCIO; GEÓRGIA C. ATELLA; COELHO, LUANA CASSANDRA

BREITENBACH BARROSO; CORREIA, M. T. S.; FOGUEL, D. **Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1).** Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics, 1804:1917-1924, 2010.

PEDINI, V.; SCOCCO, P.; GARGIULO, A. M.; CECCARELLI, P. & LORVIK, S. **Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry.** Journal of Fish Biology, 61:1363-1372, 2002.

PENG, H., LV, H., WANG, Y., LIU, Y., LI, C., MENG, L., CHEN, F., BAO, J. ***Clematis montana* lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities.** Peptides, 30:1805–1815, 2009.

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas.** Química Nova, 25:1012-1021, 2002.

PETROSSIAN, K., BANNER, L.R., OPPENHEIMER, S.B. **Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies.** Acta histochemica, 109:491-500, 2007.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. **Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2,** (Wu A. M. ed.), p. 27-54. Kluwer Academic, 2001.

PEUMANS, W.J., W. ZHANG, A. BARRE, C.H. Astoul and P.J. Balint-Kurti *et al.,.* **Fruit-specific lectins from banana and plantain.** Planta, 211: 546-554, 2000.

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

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

PINTO, E. M. **Novos materiais nanoestruturados para aplicações electroquímicas.** Tese. Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

PLATTNER, V.E, RATZINGER, G.E.E.T, GALLAUNER, S., GABOR, F., WIRTH, M. **Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin-mediated drug delivery.** Eur J Pharm Biopharm, 73:361–5, 2009.

POIROUX, G., PITIE, M., CULERRIER, R, SEGUI, B., VAN DAMME, E.J, PEUMANS, W.J. **Morniga G: A Plant Lectin as an Endocytic Ligand for Photosensitizer Molecule Targeting Toward Tumor-Associated T/Tn Antigens.** Photochemistry and Photobiology, 87:370–377, 2011.

RAMBARUTH, N.D.S.; DWEK, M.V. Cell surface glycan–lectin interactions in tumor metastasis. Acta Histochemica, 113: 591– 600, 2011.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W. & CHULAVATNATOL, M. **Interaction of a leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *Pseudomonas syringae pv mori*.** Plant Science, 160:739-744, 2001.

REK, A., KRENN, E., KUNGL, A.J. **Therapeutically targeting protein–glycan interactions.** Br J Pharmacol, 157:686–94, 2009.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. **Imunossensor Amperométrico.** Química Nova, 25:316-320, 2002.

RIEHL & GUARINO. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

RIPOL C, Favery B, Lecomte P, Van Damme E, Peumans W, Abad P, Jouanin L (2003). **Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes.** Plant Sci. 164: 517-523.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. **Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386:1025-1041, 2006.

ROJO, M.A.; YATO, M.; ISHII-MINAMI, N.; MINAMI, E.; KAKU, H.; CITORES, L.; GIRBE'S, T.; SHIBUYA, N. **Isolation, cDNA Cloning, Biological Properties, and Carbohydrate Binding Specificity of Sieboldin-b, a Type II Ribosome-Inactivating Protein from the Bark of Japanese Elderberry (*Sambucus sieboldiana*).** Archives of Biochemistry and Biophysics, 340:185–194, 1997.

RONKAINEN, N.J.; HALSALL, H.B.; HEINEMAN, W.R. **Electrochemical biosensors.** Chem. Soc. Rev., 39:1747-1763, 2010.

ROSILIO, V., BOISSONNADE, M.M., COELHO, L.C.B.B., MAGALHAES, N.S.S., ANDRADE, C.A.S., BASZKIN, A. **Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 250, 1–3, 2004.

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

SÁ ;ROBERTO A. ; FRANCIS S. GOMES ; THIAGO H. NAPOLEÃO; NATALY D. L. SANTOS ;CARLA M. L. MELO ; NORMA B. GUSMÃO; LUANA C. B. B. COELHO ; PATRÍCIA M. G. PAIVA ; LOTHAR W. BIEBER. **Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood Wood.** Sci Technol, 43:85-95, 2009.

SÁ R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L.; GOMES, F.S.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; COELHO, L.C.B.B., BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. **Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin.** International Biodeterioration & Biodegradation, 62:460–464, 2008.

SADIK, O.A.; ALUOCH, A.O.; ZHOU, A. **Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques.** Biosensors and Bioelectronics, 24: 2749-2765, 2009.

SALLES, H.O., VASCONCELOS, I.M., SANTOS, L.F.L., OLIVEIRA, H.D., COSTA, P.P.C., NASCIMENTO, N.R.F., SANTOS, C.F., SOUSA, D.F., JORGE, A.R.C., MENEZES, D.B., MONTEIRO, H.S.A., GONDIM, D.M.F. OLIVEIRA, J.T.A. **Towards a better understanding of *Ipomoea asarifolia* toxicity: Evidence of the involvement of a leaf lectin.** Toxicon, 58:502-508, 2011.

SANTOS, A.F.S.; ARGOLO, A.C.C.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. **Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds.** Water Research, 39:975-980, 2005.

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

SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. **Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors.** Biotechnology Advances, 2011.

SHAO, B., WANG, S, ZHOU, J, KE, L, RAO, P. **A novel lectin from fresh rhizome of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.** Process Biochemistry, 46: 1554–1559, 2011.

SHARON, N.; LIS, H. **The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: The molecular immunology of complex carbohydrates-2.** (Wu A. M. Ed.), 1-15. **Kluwer Academic**, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.** Glycobiology, 14:53–62, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. **Legum lectins – a large family of homologous proteins.** Federation American Societies Experimental Journal, 4:3198-3208, 1990.

SHI X.; YOU, F.; FU, F.; LIU, R.; YOU, Y.; DAI, M.; DONG, X. **Preliminary research on monitoring of cerebral ischemia using electrical impedance tomography technique.** Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc., 2008:1188-1191, 2008.

SILVA, M.C.C, SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. **Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae).** International Biodeterioration Biodegradation, 63:334-340, 2009.

SILVA, M.C.C.; SANTANA, L.A., SILVA-LUCCA, R.A.; LIMA, A.R.L.; FERREIRA, PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; OLIVA, M.L.V.; Correia, M.T.S. **Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities.** Process Biochem. 46:74-83, 2011.

SINGH, R. S.; TIWRY, A. K. & KENNEDY, J. F. **Lectins sources and applications.** Critical Reviews in Biotechnology, 19:145-178, 1999.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica.** Tradução de Marco Tadeu Grassi. 8. ed. São Paulo: Cengage, 2005, 1124p.

SONG, G. **Equivalent circuit model for AC electrochemical impedance spectroscopy of concrete.** Cement and Concrete Research, 30:1723-1730, 2000.

SOUZA, D. ; MACHADO, S.A.S. ; AVACA, L.A. **Voltametria De onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos.** Química Nova, 26:81-89, 2003.

SOGABE, A., KINJO, K., ABE, F., YAMAUCHI, T., YAGA, S., **Termiticidal substances from the wood and bark of *Wikstroema retusa* A. Gray.** Mokuzaï Gakkaishi 46, 47-53, 2000a.

STREHLITZ, B.; NIKOLAUS, N.; STOLTENBURG, R. **Protein Detection with Aptamer Biosensors.** Sensors, 8:4296-4307, 2008.

SUN, *et al.*, **Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei***. *Fish & Shellfish Immunology*, 23:292-299, 2007.

THEÂVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S.. **Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification**. *Pure Appl. Chem.*, 71:2333-2348, 1999.

TORINIWA, H.; KOMIYA, T. **Comparison of viral glycosylation using lectin blotting with Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines**. *Vaccine* 29: 1859–1862, 2011.

UNITT, J.; HORNIGOLD, D., **Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists**. *Biochemical Pharmacology*, 81:1324–1328, 2011.

UETA, R.R. **A espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo da interface platina/lectina**. Tese de Doutorado (Departamento de Química Fundamental), UFPE, Recife, 2002.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. & PEUMANS, W. **Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*)**. *Plant Molecular Biology*, 33:523-536, 1997.

VAN DAMME, E.J.M., LANNOO, N. & PEUMANS, W.J. **Plant lectins**. *Adv. Bot. Res.* 48, 107–209, 2008.

VAN DAMME, E.J., S. NAKAMURA-TSURUTA, J. HIRABAYASHI, P. ROUGE AND W.J. PEUMANS,. **The *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin represents a novel family of fungal lectins remotely related to the *Clostridium botulinum* non-toxin haemagglutinin HA33/A**. *Glycoconjugate J.*, 24: 143-156, 2007.

VARKI, A.: **Discovery and Classification of Animal Lectins, IN Essentials of Glycobiology.** Edited by Varki, A., Esko, J., Cummings, R., Freeze, H.H., Hart, G.W., and Marth, J. Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

VANDENBORRE, G., SMAGGHE, G., VAN DAMME, E.J.M. **Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects.** *Phytochemistry*, 72:1538–1550, 2011.

VAZ, A.F.M.; COSTA, R.M.P.B.; MELO, A.M.M.A.; OLIVA, M.L.V.; SANTANA, L.A.; SILVA-LUCCA, R.A.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. **Biocontrol of Fusarium species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from Sebastiania jacobinensis.** *Food Chemistry*, 119:1507–1513, 2010.

VELASCO-GARCIA, M.N. **Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20:27-33, 2009.

WANG, H. X & NG, T. B. **Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts.** *Protein Expression & Purification*, 32:44-51, 2003.

WANG, J. **Analytical electrochemistry.** 3rd ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2006, 250p.

WHO – **Report of the Leishmaniasis- Burden Disease.** World Health Organization, Disponível em/; <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em 24 de janeiro de 2011.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. **A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*).** *Phytochemistry*, 47:183-187, 1998.

WOODLEY, J. **Bioadhsion: New possibilities for drug administration?** *Clinical Pharmacokinetics*, 40:77-84, 2001.

WU, A.M., WU, J.H., SINGH, T., SINGHA, B., SUDAKEVITZ, D., GILBOA-GARBER, N. **Multivalent human blood group ABH and Lewis glycotopes are key recognition factors**

for a LFucNMan binding lectin from phytopathogenic *Ralstonia solanacearum*. Biochimica et Biophysica Acta, 1790:249–259, 2009.

WU, Y.; WANG, H.; NG, T.B. **Purification and characterization of a lectin with antiproliferative activity toward cancer cells from the dried fruit bodies of *Lactarius flavidulus*.** Carbohydrate Research, 346:2576–2581, 2011

YAMAMOTO, K.; KOMANI, Y. & OSAWA, T. **A chimeric lectin formed from *Bauhinia purpurea* lectin and *Lens culinaris* lectin recognizes a unique carbohydrate structure.** Journal of Biochemistry, 127:129-135, 2000.

YAN, Q., ZHU, L., KUMAR, N., JIANG, Z., HUANG, L. **Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity.** Food Chemistry, 122:589–595, 2010.

YÁSKARA, F. M. M. L.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B. & BENEVIDES, N. M. B. **Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).** Biochimica et Biophysica Acta, 1724:137-145, 2005.

YE, XY; NG, T.B. **A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 290:813-819, 2002.

YNALVEZ, R.A., FUENTES, L.M. & SANCHEZ, C.V. **Comparison and Temperature Study of Lectin Activities in Texas Live Oak (*Quercus fusiformis*) Crude Extracts.** Journal of plant Sciences, 6:124-134, 2011.

ZHANG, G., SUN, J., WANG, H., NG, T.B. **First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula mushroom*.** Phytomedicine, 17: 775–781, 2010.

ZHANG, H., CHEN, L., QIN, J., ZHAO, D., WU, P., QIN, C., YU, N., LI, E. **Molecular cloning, characterization and expression of a C-type lectin cDNA in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*.** Fish & Shellfish Immunology, 31:358-363, 2011.

ZHANG, H.; WANG, H.; WANG, L.; SONG, X.; ZHAO, J.; QIU, L.; LI, L.; CONG, M.; SONG, L. **A novel C-type lectin (Cflec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate-recognition domains.** Fish & Shellfish Immunology, 26:707–715, 2009.

ZINGER-YOSOVICH, K.D., SUDAKEVITZ, D., ILUZ, D., GILBOA-GARBER, N. **Analyses of diverse mammals' milk and lactoferrin glycans using five pathogenic bacterial lectins.** Food Chemistry, 124:1335–1342, 2011.

CAPÍTULO III

ARTIGO 01

International Biodeterioration & Biodegradation 65 (2011) 696–702



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities

Jayra D. Souza^a, Maria B.R. Silva^a, Adriana C.C. Argolo^a, Thiago H. Napoleão^a, Roberto A. Sá^b, Maria T.S. Correia^a, Patrícia M.G. Paiva^a, Michele D.C. Silva^c, Luana C.B.B. Coelho^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, 50670-420 Pernambuco, Brazil

^b Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Nova Caruaru, Caruaru, 55002-970 Pernambuco, Brazil

^c Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 59625-900 Rio Grande do Norte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2011
Received in revised form
27 February 2011
Accepted 28 February 2011
Available online 2 May 2011

Keywords:
Bauhinia monandra
Root lectin
Antifungal activity
Termiticidal activity

ABSTRACT

This work describes the purification in milligram quantities of a lectin from *Bauhinia monandra* secondary roots (BmoRoL) and its antifungal and termiticidal activities. The BmoRoL (6.2 mg) was isolated through ammonium sulfate fractionation and affinity chromatography on guar gel. Native lectin was resolved as a single band on polyacrylamide gel electrophoresis for basic proteins. Under denaturing and reducing conditions it appeared as a unique glycosylated polypeptide of 26 kDa. The highest agglutination activity of BmoRoL was found with glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes. BmoRoL showed antifungal activity against phytopathogenic species of *Fusarium* and was more active on *Fusarium solani*. The lectin also showed termiticidal activity on *Nasutitermes corniger* workers and soldiers with LC₅₀ of 0.09 and 0.395 mg ml⁻¹ for 12 days. In conclusion, BmoRoL is a new antifungal and termiticidal lectin that can be purified in milligram quantities and has potential biotechnological application for control of agricultural pests.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins with the ability to recognize and bind mono or oligosaccharides without inducing change in the carbohydrate bond (Sharon and Lis, 2001; Wu et al., 2006). They are found in animals (Alpuche et al., 2005; Yang et al., 2007), microorganisms (Bhowal et al., 2005; Khan et al., 2007), and plants. Plant lectins are isolated mainly from dry seeds but their occurrence in other vegetal tissues, such as leaves (Coelho and Silva, 2000), rhizomes (Kaur et al., 2005), tubers (Kaur et al., 2006), bark (Sá et al., 2009b), heartwood (Sá et al., 2008), and roots (Wong and Ng, 2006), has been reported.

Lectins interact with free carbohydrates or glycoconjugates through a particular site structure and non-covalent principles. The lectin structural diversity and high specificity of binding promote several applications such as purification of cells and glycoproteins (Sánchez and Cabezas, 1998) and monitoring of the expression of cell-surface carbohydrates (Fais et al., 2009). The isolation and characterization procedures for these proteins often involve screening for the ability to agglutinate cells and precipitate

glycoconjugates, followed by the isolation on affinity columns with specific ligands (Villanueva, 2002). Lectins, when immobilized in inert supports, act as affinity matrices to glycoconjugate isolation (Paiva et al., 2003; Silva et al., 2011).

Legume lectins are of interest due to their several physiological roles in plants, such as recognition, attachment, and colonization of nitrogen-fixing bacteria at epidermal cells in roots and transport of sugars, hormones, or glycoproteins (Van Rhijin et al., 1998; Wang and Ng, 2001; Irazoqui et al., 2005; Sreevidya et al., 2005). Plant lectins are also involved in defense against microorganisms and insects (Peumans and Van Damme, 1995) and have been studied as antifungal and insecticidal agents (Correia et al., 2008). Lectins have been successfully heterologously expressed for large-scale production and engineered into a variety of crops for use in integrated pest management strategies; the use of lectins for insect control may reduce the load of chemical insecticides (Lam and Ng, 2011).

Growth of fungi has been considered a major factor in the biodeterioration of several materials such as wood, stored grains, paintings, sculptures, leather, and oil (Sterflinger, 2010). *Fusarium* species can be found deteriorating wood (Apetorgbor et al., 2004) and concrete samples (Gu et al., 1998); they also cause several diseases in wheat (Wagacha and Muthomi, 2007), tomatoes (Agris, 2005), peanuts (Rojo et al., 2007), and other crops. An antifungal effect on *Fusarium* has been reported for lectins isolated

* Corresponding author. Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576.
E-mail address: lcbcoelho@gmail.com (L.C.B.B. Coelho).

from *Astragalus mongholicus* roots (Yan et al., 2005), *Myracrodruon urundeuva* heartwood (Sá et al., 2009a), and *Sebastiania jacobinensis* bark (Vaz et al., 2010).

Termites are a group of insects of great importance in the recycling of cellulosic materials; however, some species are able to cause damage to wood, paintings, monuments, historical documents, and buildings (Koestler, 2000; Verma et al., 2009). The biodeterioration promoted by termites has economical and environmental impacts. The replacement of deteriorated wood leads to an increase in the number of trees cut (Clausen and Yang, 2007), and the annual economic losses caused by termites reach U.S. \$290 million in China, \$800 million in Japan, and more than \$1 billion in the U.S. (Verma et al., 2009). *Nasutitermes* species (Termitidae family) can be found damaging roofs, linings, and structural spans of buildings, and the species *Nasutitermes corniger* is able to invade the urban environment, attacking wood in the structures of buildings (Edwards and Mill, 1986; Scheffrahn et al., 2002; Paes et al., 2007). Termiticidal activity on *N. corniger* has been reported for lectin from *Cladonia verticillaris* lichen (Silva et al., 2009) and for those isolated from *M. urundeuva* bark, heartwood, and leaf (Sá et al., 2008; Napoleão et al., 2011).

Bauhinia monandra Kurz ("pata-de-vaca", "orquidea del pobre", pulse or "Napoleon's plume") is an ornamental Fabaceae species whose leaves are used in popular medicine for the treatment of diabetes. A leaf lectin (BmoLL) specific to galactose has already been purified with high yield from *B. monandra* (Coelho and Silva, 2000). The aim of this work was to purify in milligram quantities a lectin from *B. monandra* secondary root (BmoRoL). Polypeptide molecular mass, carbohydrate-binding specificity, antifungal activity on *Fusarium*, and termiticidal activity on *N. corniger* are also reported.

2. Materials and methods

2.1. Extraction of *B. monandra* lectin (BmoRoL) from secondary roots

Secondary roots were harvested from the Germplasm Bank of Medicinal Plants at the Estação Experimental de Itapirema, Goiana City, or from the roads of Olinda and Recife cities, State of Pernambuco, Northeastern Brazil. A voucher specimen is archived under number 57,462 at the Herbarium "Dárdano de Andrade Lima" from the Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife. The secondary roots were well washed in tap water followed by distilled water, cut into small pieces, and left to dry at 28 °C for 2–3 days. A fine powder obtained in a multiprocessor was used to extract lectin.

Root powder extracts (10%, w/v) were obtained by overnight gentle shaking at 4 °C in 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.15 M NaCl. The root extract (E) was passed through gauze, centrifuged at 8000 g (15 min, 4 °C), and submitted to a 60% (w/v) ammonium sulfate fractionation by adding the solid salt. After 4 h at 28 °C, the precipitate was resuspended and dialyzed against distilled water followed by the citrate phosphate buffer (F1).

2.2. Protein content

Protein concentration was evaluated according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25–500 µg ml⁻¹) as standard or by measuring the absorbance at 280 nm.

2.3. Hemagglutinating activity (HA)

Glutaraldehyde-treated human (A, B, O and AB, types) or rabbit erythrocytes were obtained according to Bing et al. (1967). The HA

assays were performed according to Correia and Coelho (1995); HA was defined as the reciprocal (titer⁻¹) of the last sample dilution promoting full erythrocyte agglutination, and the specific HA (SHA) corresponded to the ratio between HA and the protein concentration (mg ml⁻¹).

2.4. BmoRoL purification

The BmoRoL was purified by chromatography on guar gel. The affinity matrix was obtained by cross-linking of refined guar gum (Sigma–Aldrich, USA) with epichlorohydrin in a mixture of water and 2-propanol (Gupta et al., 1979). A F1 sample (20 mg of protein) was loaded onto a guar gel column (7.5 × 1.5 cm), and the column was washed with citrate phosphate buffer until the absorbance at 280 nm (measured with a FEMTO spectrophotometer) was negligible. Then, the adsorbed lectin was eluted with 0.05 M D-galactose in citrate phosphate buffer. The fractions containing the lectin were pooled (BmoRoL) and dialyzed (4 h) against 0.01 M citrate phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M NaCl. The HA and protein content were measured, and the material was kept at –20 °C.

2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Polyacrylamide gel electrophoresis for native acidic and basic proteins was performed according to Davis (1964) and Reisfeld et al. (1962), respectively. PAGE under denaturing (SDS-PAGE) and reducing conditions was performed according to Laemmli (1970). Molecular mass standards (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden) were galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), alcohol dehydrogenase (37.6 kDa), carbonic anhydrase (28.5 kDa), myoglobin (18.4 kDa), and lysozyme (14 kDa). The gels were stained for protein with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (w/v) acetic acid. Glycoprotein staining was performed using the Schiff's reagent according to Pharmacia Fine Chemicals (1980).

2.6. Hemagglutinating activity inhibitory assays

The carbohydrate-binding specificity of BmoRoL was determined by inhibition assay using glycoproteins (asialofetuin, asocasein, avidin, casein, ferritin, fetuin, bovine fetal serum, peroxidase, ovalbumin, and thyroglobulin) and sugars D(+)-galactose, D(+)-raffinose, N-acetyl-D-galactosamine, L(+)-rhamnose, threosule, D(+)-cellobiose, and sucrose. The HA inhibitory assay was performed by incubation (45 min) of the lectin sample with carbohydrate (200 mM) or glycoprotein (0.5 mg ml⁻¹) solution before erythrocyte suspension addition.

2.7. Effects of ions, temperature, and pH on BmoRoL-induced hemagglutination

The BmoRoL activity was determined after incubation (30 min) with 0.02 M CaCl₂ or 0.04 M MgCl₂, after heating (30 min) at 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 °C or after incubation (30 min) with different buffers (0.01 M Tris–HCl buffer, pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, and 9.5; 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.5, 7.0 and 7.5; 0.01 M citrate phosphate buffer, pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, and 7.0). Determination of HA was done using rabbit erythrocyte suspension.

2.8. Antifungal activity

Fusarium decemcellulare (URM-3006), *Fusarium lateritium* (URM-2491), *Fusarium moniliforme* (URM-3226), *Fusarium oxysporum* (URM-2489), and *Fusarium solani* (URM-2490) were

Table 1
Purification of *Bauhinia monandra* root lectin (BmoRoL).

| Sample | HA (titer ⁻¹) | Protein (mg/mL) | Specific HA | Purification (times) |
|--------|---------------------------|-----------------|-------------|----------------------|
| E | 1024 | 1.96 | 523 | 1.0 |
| F1 | 4096 | 3.6 | 1141 | 2.18 |
| BmoRoL | 8192 | 0.47 | 17,430 | 33.3 |

Hemagglutinating activity (HA) was determined with rabbit erythrocytes. Specific HA corresponds to the ratio between HA (titer⁻¹) and protein concentration (mg/mL). Purification corresponds to the ratio between specific HA of the step and specific HA of the extract (E).

obtained from the Culture Collections of University Recife Mycologia (URM) from the Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

Antifungal activity was determined by a modified assay based on the method described by Cunico et al. (2004). Fungal mycelia were cultured on petri plates (10.0 × 1.5 cm) containing potato dextrose agar (PDA) medium; after 72 h at 28 °C, mycelium disks (0.625 cm in diameter) were cut from the center of each fungal culture. Next, BmoRoL (120 µg) was filtered using a 0.45-mm sterile syringe filter (Minisart®) and spread on solidified PDA in other Petri plates (10.0 × 1.5 cm); a fungal mycelium disk was placed in the center of each plate. A 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.15 M NaCl and 10 ppm Cercobin were used as negative and positive controls, respectively. Assays were carried out in triplicate. The plates were incubated at 28 °C for 72 h. Antifungal activity was indicated by a reduction of the fungal growth zone (diameter) in the plates in comparison to negative controls.

2.9. Termiticidal assay

The *N. corniger* was obtained from colonies maintained in the vegetation house at the Departamento de Agronomia of Universidade Federal Rural de Pernambuco and previously identified by Dr. Luiz Roberto Fontes (Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brazil).

Termiticidal activity was evaluated by a no-choice bioassay based on the method described by Kang et al. (1990). Each experimental unit consisted of a petri plate (9.0 × 1.5 cm) with the lower plate covered by filter paper. A filter paper disk (4 cm in diameter) impregnated with 200 µl of BmoRoL (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, or 0.025 mg ml⁻¹, corresponding to 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, or 0.4 mg of protein cm⁻², respectively) was put in each

plate. In the negative control, papers were impregnated with citrate phosphate buffer. Twenty active insects (16 workers and 4 soldiers) were carefully transferred to each plate; the assay was kept in darkness at 28 °C. Monitoring of assays was performed daily to detect the death of insects and to guarantee the humidity of the plates by adding a water drop to the paper covering the plate until all insects had died. Assays were measured in quintuplicate. The survival rates (as percentages) were obtained for each treatment and expressed as a mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using the computer package Statplus® 2006 (AnalystSoft, Canada) for determining the BmoRoL concentration required to kill 50% of the insects after 12 days (LC₅₀) by probit analysis with a reliability interval of 95%. Significant differences between each treatment and control were established performing Student's *t*-test (*p* < 0.05 or *p* < 0.01), assuming equal variances (homoscedastic) and considering the cumulative mortality during all assays using Origin™ 6.0 (Microcal, USA) software.

3. Results

3.1. BmoRoL purification and characterization

Secondary root extract from *B. monandra* showed HA with glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes and ammonium sulfate treatment yielded a partially purified lectin preparation (F1) with higher specific HA (Table 1). The F1 was submitted to affinity chromatography on guar gel and lectin activity adsorbed on column; the chromatographic profile revealed an active (specific HA of 17,430) protein peak (BmoRoL, 6.2 mg) eluted with 0.05 M galactose (Fig. 1). Table 1 summarizes the BmoRoL purification protocol. The yield of the chromatographic step was 71.4% in regard to the HA loaded on the column.

Polyacrylamide gel electrophoresis for native basic proteins of BmoRoL revealed a single polypeptide band (Fig. 2A, lane 2); no bands were detected in PAGE for acidic proteins. The SDS-PAGE of BmoRoL revealed a polypeptide band of 26 kDa in the absence (Fig. 2B, lane 2) or presence (Fig. 2B, lane 3) of β-mercaptoethanol, indicating that it does not contain disulfide bridges in its structure. BmoRoL is a glycoprotein, as revealed by glycoprotein staining with Schiff's reagent (Fig. 2C).

BmoRoL promoted agglutination of all tested erythrocytes, except human O-type cells. BmoRoL HA with rabbit erythrocytes (8,192⁻¹) was higher than HA with human A (1,024⁻¹), B (512⁻¹),

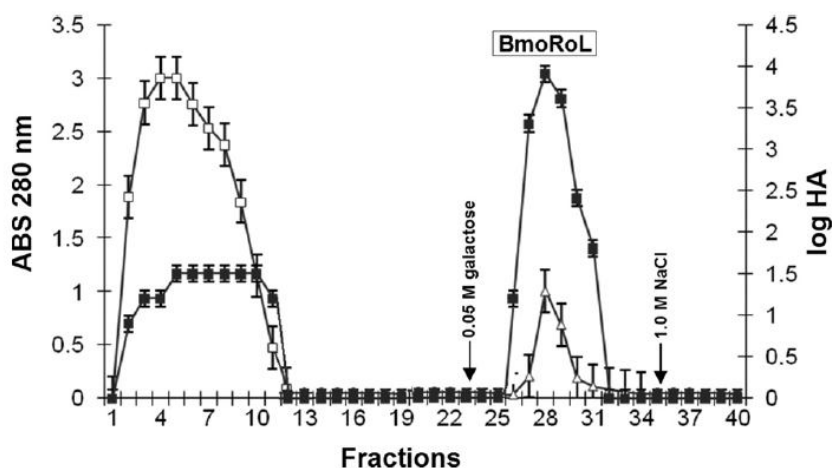


Fig. 1. Chromatography of F1 (20 mg of protein) on guar gel column. The washing step used 0.01 M citrate phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.15 M NaCl; arrows represent the eluents added. Fractions (2 mL) were collected at 20 mL/h and evaluated for hemagglutinating activity (HA) and protein concentration. Absorbance at 280 nm (□, △) and log HA (■) are represented.

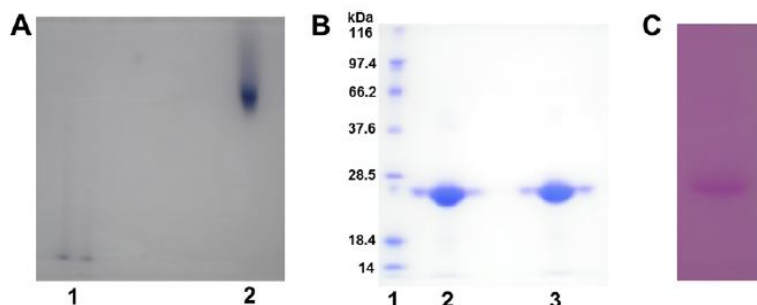


Fig. 2. Electrophoresis profiles of BmoRoL. (A) PAGE for basic proteins of standard cytochrome c (lane 1) and BmoRoL (lane 2) stained with 1% (w/v) Amido Black in 10% (v/v) acetic acid. (B) SDS-PAGE of molecular mass markers (lane 1) as well as BmoRoL in the absence (lane 2) and presence (lane 3) of β -mercapthoethanol stained with 0.02% (v/v) Coomassie Blue in 10% (v/v) acetic acid. (C) SDS-PAGE of BmoRoL stained with Schiff's reagent.

and AB (512⁻¹) types. Rabbit erythrocytes were used in all the subsequent HA assays described below.

BmoRoL HA (titer of 8,192⁻¹) was totally inhibited by D(+)-galactose and D(+)-raffinose and reduced in the presence of threolose, sucrose, and L(+)-rhamnose (Table 2). Glycoproteins were also able to inhibit BmoRoL HA (Table 2), azocasein being the best inhibitor.

Incubation of BmoRoL with divalent cations Ca⁺² or Mg⁺² did not affect the lectin activity. BmoRoL activity was stable heating up to 60 °C but lost its activity above this temperature. The effect of pH on BmoRoL HA showed that the lectin was more active in pH 6.5; BmoRoL was also active in pH 7.0 and 7.5.

3.2. Antifungal activity

The antifungal activity of BmoRoL was shown by the significant reduction in growth of *F. solani* ($p = 0.00008$) and *F. oxysporum* ($p = 0.0118$) that was detected in comparison with the negative control (Fig. 3). The highest growth inhibition (30%) was detected for *F. solani*; although the growth of *F. moniliforme*, *F. lateritium*, and *F. decemcellulare* in the presence of BmoRoL was lower than in negative control, lectin effect was not statistically significant ($p > 0.05$).

3.3. Termiticidal activity

The BmoRoL was able to induce the death of *N. corniger* workers (Fig. 4A) and soldiers (Fig. 4B). The effects of lectin at 0.4, 0.2, and 0.1 mg ml⁻¹ (corresponding to 6.4, 3.2, and 1.6 mg of protein cm⁻²) on workers were statistically significant ($p < 0.05$) in relation to the control. The effects of all lectin concentrations on soldiers were statistically different ($p < 0.01$) in relation to the control. The LC₅₀ determined were 0.09 mg ml⁻¹ (standard error: 0.019) for workers and 0.395 mg ml⁻¹ (standard error: 0.014) for soldiers.

4. Discussion

Fungi and termites are responsible for the decay of several materials with economic, medical, and historical importance. The search for new compounds to control these deteriorative agents is increasing and plant lectins have been pointed out as natural and biodegradable antifungal and insecticidal agents.

A galactose-specific lectin (BmoLL) was isolated from a *B. monandra* hypoglycemic leaf preparation; HA inhibited by D-galactose has already been detected in preparations of *B. monandra* petioles, stem branches, stems, buds, and flowers, as well as secondary roots (Coelho and Silva, 2000). The high specific HA (7282) reported by

Coelho and Silva (2000) for secondary root preparations stimulated the isolation of the lectin present in this tissue. In addition, the hypothesis that lectins present in root hairs – the sites of rhizobial entry for many legumes – display a recognition role (Hirsch, 1999) stimulated the isolation and characterization of *B. monandra* secondary root lectin (BmoRoL).

BmoRoL was isolated using guar gel column and chromatography supports prepared from guar gum – a long chain polysaccharide constituted by galactose and mannose – have been efficiently used as an affinity matrix to purify galactose-binding lectins (Coelho and Silva, 2000; Yan et al., 2005; Santos et al., 2009). Galactose-specific lectin from *Dolichos lablab* seeds was purified by an affinity chromatography column using Sepharose–galactose gel (Latha et al., 2005).

Similar to BmoRoL, the galactose-binding lectin purified from roots of *A. mongholicus* is a glycoprotein (Yan et al., 2005). Between several functions, the presence of glycosylation in proteins has been related with thermal stability and resistance to proteolysis (Drickamer and Taylor, 2006; Raju and Scallan, 2006); the presence of carbohydrate in BmoRoL structure may be involved in its thermal stability. Other glycosylated lectins that showed thermal stability are the *Arundo donax* rhizome lectin, which lost its activity at 85 °C (Kaur et al., 2005) and the *M. urundeuva* leaf lectin, which is stable to heating at 100 °C (Napoleão et al., 2011).

Table 2
Inhibitory assays of BmoRoL hemagglutinating activity with sugars and glycoproteins.

| Inhibitor | Specific HA |
|--------------------------|-------------|
| Sugar | |
| D(+)-cellobiose | NI |
| D(+)-galactose | 0 |
| D(+)-raffinose | 0 |
| L(+)-rhamnose | 4357 |
| N-acetyl-D-galactosamine | NI |
| Stachyose | 8714 |
| Sucrose | 4357 |
| Threolose | 2178 |
| Glycoprotein | |
| Asialofetuin | 2178 |
| Azocasein | 1089 |
| Bovine serum albumin | 8714 |
| Fetuin | 8714 |
| Ovalbumin | 2178 |
| Peroxidase | 8714 |
| Thyroglobulin | 4357 |

Specific HA corresponds to the ratio between HA (titer⁻¹) and protein concentration (mg/mL). Specific HA of BmoRoL: 17,430. NI: not inhibited.

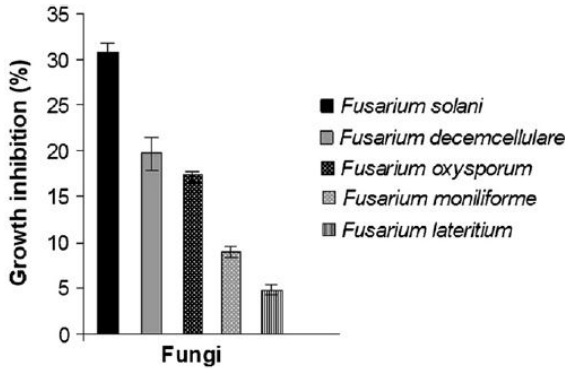


Fig. 3. Antifungal activity of BmoRoL on *Fusarium* species. Antifungal activity was indicated by a reduction of the fungal growth zone (diameter) in the plates in comparison to negative controls (100% of growth). Statistical analysis revealed that the results were significantly different ($p < 0.05$) in comparison with the negative control.

BmoRoL agglutinated differentially the tested erythrocyte types, suggesting that lectin recognizes the carbohydrate specificity comprising the surface of erythrocyte membranes. The high affinity of BmoRoL for galactose indicates that the lectin could be included

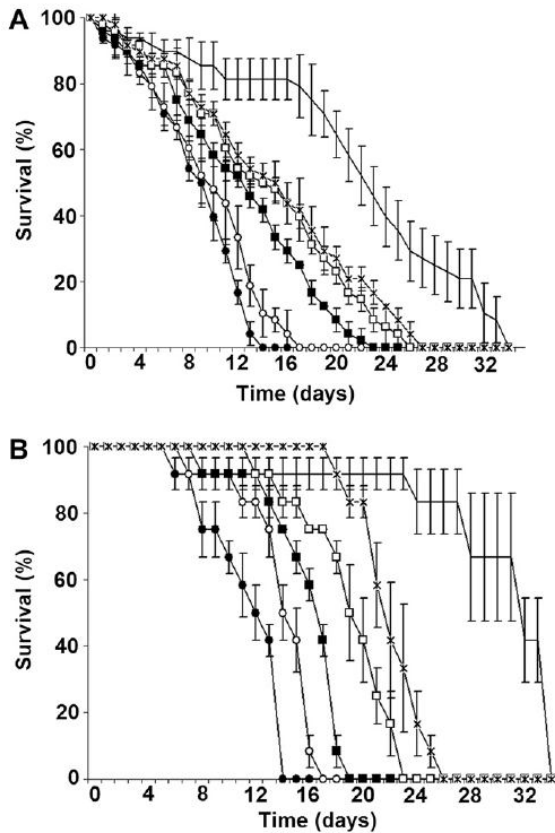


Fig. 4. Survival percentile of *Nasutitermes corniger* workers (A) and soldiers (B) in the presence of BmoRoL. Treatments were at 0.4 (●), 0.2 (○), 0.1 (■), 0.05 (□), and 0.025 (×) mg ml^{-1} . Citrate phosphate buffer was used as the control (-). Each point represents the mean of five repetitions.

in the group of galactose-specific lectins. BmoRoL HA was not stimulated in the presence of divalent cations; this behavior has been observed for other lectins such as those from *A. donax* rhizomes and *A. mongholicus* root, which did not require metal ions for their HA (Kaur et al., 2005; Yan et al., 2005). BmoRoL showed stability at pH levels from 6.5 to 7.5, similarly to *Salvia bogotensis* seed lectin, which showed a maximum pH stability at pH 7.0 and lost its activity at pH below 2.0 and above 12.5 (Vega and Pérez, 2006).

BmoRoL (120 μg) was less effective than other antifungal lectins that inhibit the growth of *Fusarium* species. The lectin from *M. urundeuva* heartwood inhibited the growth of *F. oxysporum* and *F. decemcellulare* in more than 50% of the samples, at an amount of 50 μg (Sá et al., 2009a). The lectin from *S. jacobinensis* was able to reduce by 50% the growth of *F. moniliforme* and *F. oxysporum* at 123 and 303 μg , respectively (Vaz et al., 2010). Lectins can bind to the hyphal cell wall (Lis and Sharon, 1981) and interfere in spore germination (Trindade et al., 2006); antifungal activity has been reported mainly for chitin-binding lectins, which are able to bind chitin present in the fungal cell wall (Selitrennikoff, 2001). Galactose-binding lectins have been poorly studied as antifungal agents; the galactose-binding lectin from *A. mongholicus* root lectin was active against *F. oxysporum* (Yan et al., 2005).

BmoRoL was more active on termites than was *C. verticillaris* lichen lectin, which showed a LC_{50} of 0.199 mg ml^{-1} for workers and 0.5 mg ml^{-1} for soldiers (Silva et al., 2009). On the other hand, BmoRoL was less effective on *N. corniger* than lectins from *M. urundeuva*, since it showed a slower effect as determined by the LC_{50} values after 12 days of the experiment while for *M. urundeuva* bark (LC_{50} of 0.974 and 0.787 mg ml^{-1} for workers and soldiers, respectively), heartwood (LC_{50} of 0.248 and 0.199 mg ml^{-1} for workers and soldiers, respectively), and leaf (LC_{50} of 0.374 and 0.432 mg ml^{-1} for workers and soldiers, respectively) lectins the values corresponded to 4 days (Sá et al., 2008; Napoleão et al., 2011).

The mechanism of termiticidal action of *M. urundeuva* lectins was studied by Napoleão et al. (2011); the authors suggested that the chitin-binding property and bactericidal effect on symbionts found in the termite gut, as well as resistance to proteolysis in the insect gut are related to the insecticidal activity. Resistance to degradation by proteases was also related to the insecticidal activity of the coagulant *Moringa oleifera* seed lectin on the lepidopteran *Anagasta kuehniella* (Oliveira et al., 2011).

Insecticidal lectins may also bind to glycoconjugates on the surface of gut epithelial cells, disrupting the structural organization along the digestive tract; larvae of *Aedes aegypti* killed after contact with the water-soluble lectin from *M. oleifera* seeds showed an absence of gut underlying epithelium and hypertrophy of segments (Coelho et al., 2009). Lectins are also able to bind the sugar moiety of glycosylated digestive enzymes or assimilatory proteins; the galactose-binding lectin from *B. monandra* leaf (BmoLL) induced the mortality of the coleopteran *Callosobruchus maculatus* and promoted a reduction in the α -amylase activity in the insect gut (Macedo et al., 2007).

Lectins are biodegradable, and they have been suggested as natural compounds for fungi and insect control that are safer than the synthetic agrochemicals currently applied. The toxicity of lectins has been studied with the aim of ensuring their safety vis-à-vis the environment and human health. The antifungal lectin from *S. jacobinensis* did not have a deleterious effect on *Artemia salina* nauplies and *Biomphalaria glabrata* embryos, which indicates the low ecotoxicity of lectin (Vaz et al., 2010). The water-soluble lectin from *M. oleifera* seeds, insecticidal on *A. aegypti*, was not genotoxic in cell-free plasmid DNA as well as the *Salmonella typhimurium* (Kado and Ames) assays (Rolim et al., 2011). Further studies are

needed to evaluate the toxicity of BmoRoL on non-target organisms, as well as to develop strategies for its production at the lowest cost possible in order to be economically viable.

The present work revealed that besides the leaf lectin from *B. monandra*, a secondary root lectin, BmoRoL, was also galactose-specific and highly purified in milligram quantities by guar gel affinity chromatography; the new antifungal and termiticidal lectins possess biotechnological potential for application in control of agricultural pests.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowships (MTSC, PMGP, and LCBBC); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a post-doctoral fellowship (RAS); and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for research grants.

References

- Agrios, G.N., 2005. Plant pathology, fifth ed. Elsevier Academic Press, New York, pp. 343–346.
- Alpuche, J., Pereyra, A., Agundis, C., Rosas, C., Pascual, C., Slomianny, M.C., Vázquez, L., Zenteno, E., 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta* 1724, 86–93.
- Apetorgbor, M.M., Darkwa, N.A., Frimpong, O., Agyeman, V.K., 2004. Biodeteriorating agents associated with three tropical timber species. *Forest Ecology and Management* 195, 311–323.
- Bhowal, J., Guha, A.K., Chatterjee, B.P., 2005. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Carbohydrate Research* 340, 1973–1982.
- Bing, D.H., Weyand, J.G., Stavinsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124, 1166–1170.
- Clausen, C.A., Yang, V., 2007. Protecting wood from mould, decay, and termites with multi-components biocide systems. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59, 20–24.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, M.B.R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis* 11, 1–6.
- Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 77, 934–938.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (amaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55, 261–273.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2008. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? In: Siddique, Y.H. (Ed.), *Recent trends in toxicology*, vol. 37 Transworld Research Network, Kerala, pp. 47–59.
- Cunico, M.M., Carvalho, J.L.S., Silva, V.C., Montrucchio, D.P., Kerber, V.A., Grigoletti Júnior, A., Auer, C.G., Miguel, M.D., Miguel, O.G., 2004. Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) sobre três fitopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico* 71, 141–143.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121, 404–427.
- Drickamer, K., Taylor, M.E., 2006. *Introduction to glycobiology*, second ed. Oxford University Press, USA.
- Edwards, R., Mill, A.E., 1986. *Termites in buildings: their biology and control*. Rentokil, London.
- Fais, M., Karamanska, R., Russell, D.A., Field, R.A., 2009. Lectin and carbohydrate microarrays: New high-throughput methods for glycoprotein, carbohydrate-binding protein and carbohydrate-active enzyme analysis. *Journal of Cereal Science* 50, 306–311.
- Gu, J.-D., Ford, T.E., Berke, N.S., Mitchell, R., 1998. Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41, 101–109.
- Gupta, K.C., Sahni, M.K., Rathore, B.S., Narang, C.K., Mathur, N.K., 1979. Gel-filtration medium derived from guar gum. *Journal of Chromatography A* 169, 183–190.
- Hirsch, A.M., 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 320–326.
- Iraozqui, F.J., Vozari-Hampe, M.M., Lardone, R.D., Villarreal, M.A., Sendra, V.G., Montich, G.G., Trindade, V.M., Clausen, H., Neres, G.A., 2005. Fine carbohydrate recognition of *Euphorbia milii* lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 14–21.
- Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). *Mokuzai Gakkaishi* 36, 78–84.
- Kaur, A., Singh, J., Kamboj, S.S., Sexana, A.K., Pandita, R.M., Shamnugavel, M., 2005. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry* 66, 1933–1940.
- Kaur, M., Singh, K., Rup, P.J., Saxena, A.K., Khan, R.H., Ashraf, M.T., Kamboj, S.S., Singh, J., 2006. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445, 156–165.
- Khan, F., Ahmad, A., Khan, M.I., 2007. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 457, 243–251.
- Koestler, R.J., 2000. When bad things happen to good art. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46, 259–260.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lam, S.K., Ng, T.B., 2011. Lectins: Production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 45–55.
- Latha, V.L., Rao, R.N., Nadimpalli, S.K., 2005. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). *Protein Expression and Purification* 45, 296–306.
- Lis, H., Sharon, N., 1981. Lectins in higher plants. In: Marcus, A. (Ed.), *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*, vol. 6. Academic Press, New York, pp. 371–447.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- 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 Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 146, 486–498.
- Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Lima, T.A., Santos, N.D.L., Sá, R.A., Albuquerque, A.C., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 52–59.
- Oliveira, C.F.R., Luz, L.A., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2011. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bio-insecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry* 46, 498–504.
- Paes, J.B., Melo, R.R., Lima, C.R., Oliveira, E., 2007. Resistência natural de sete madeiras ao cupim subterrâneo (*Nasutitermes corniger* Motsch.), em ensaio de preferência alimentar. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 2, 57–62.
- Paiva, P.M.G., Souza, A.F., Oliva, M.L.V., Kennedy, J.F., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B., Sampaio, C.A.M., 2003. Isolation of trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology* 88, 75–79.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347–352.
- Pharmacia Fine Chemicals, 1980. Polyacrylamide electrophoresis, laboratory techniques. Pharmacia, Uppsala.
- Raju, T.S., Scallon, B.J., 2006. Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 797–803.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E., 1962. Disk electrophoresis of basic protein and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195, 281–283.
- Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Chulze, S.N., Torres, A.M., 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection* 26, 549–555.
- Rolim, L.A.D.M.M., Macêdo, M.F.S., Sisenando, H.A., Napoleão, T.H., Felzenszwalb, I., Aiub, C.A.F., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R.B., Paiva, P.M.G., 2011. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. *Journal of Food Science* 76, 153–158.
- Sá, R.A., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Gomes, F.S., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2008. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62, 460–464.
- 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., Bieber, L.W., 2009a. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science and Technology* 43, 85–95.
- Sá, R.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., 2009b. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology* 149, 300–306.
- 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* 44, 504–508.
- Sánchez, M.M., Cabezas, J.A., 1998. Use of two lectins for characterization of glycoconjugates from human, porcine and bovine sera. *Biochemical Education* 26, 309–312.

- Scheffrahn, R.H., Cabrera, B.J., Kern Jr., W.J., Su, N.Y., 2002. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: First record of a non-endemic establishment by a higher termite. *Florida Entomologist* 85, 273–275.
- Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2883–2894.
- Sharon, N., Lis, H., 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 491, 1–16.
- 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 and Biodegradation* 63, 334–340.
- Silva, M.C.C., Santana, L.A., Silva-Lucca, R.A., Lima, A.L.R., Ferreira, J.G., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Oliva, M.L.V., Zingali, R.B., Correia, M.T.S., 2011. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with *in vitro* platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry* 46, 74–80.
- Sterflinger, K., 2010. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* 24, 47–55.
- Sreevidya, V.S., Hernandez-Oane, R.J., So, R.B., Sullia, S.B., Stacey, G., Ladh, J.K., Reddy, P.M., 2005. Expression of the legume symbiotic lectin genes psl and gs52 promotes rhizobial colonization of roots in rice. *Plant Science* 169, 726–736.
- Trindade, M.B., Lopes, J.L.S., Soares-Costa, A., Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., Oliva, M.L.V., Beltramini, L.M., 2006. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764, 146–152.
- Van Rhijin, P., Goldberg, R.B., Hirsch, A.M., 1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *The Plant Cell* 10, 1233–1249.
- Vaz, A.F.M., Costa, R.M.P.B., Melo, A.M.M.A., Oliva, M.L.V., Santana, L.A., Silva-Lucca, R.A., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., 2010. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. *Food Chemistry* 119, 1507–1513.
- Vega, N., Pérez, G., 2006. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry* 67, 347–355.
- Verma, M., Sharma, S., Prasad, R., 2009. Biological alternatives for termite control: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 959–972.
- Villanueva, M.A., 2002. Elimination of artefacts on native Western blots arising from endogenous lectin activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 50, 141–149.
- Wang, H.X., Ng, T.B., 2001. A novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots with sequence similarity to Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. *Life Sciences* 69, 327–333.
- Wagacha, J.M., Muthomi, J.W., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* 26, 877–885.
- Wong, J.H., Ng, T.B., 2006. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38, 234–243.
- Wu, J.H., Singh, T., Herp, A., Wu, A.M., 2006. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin). *Biochimie* 88, 201–217.
- Yan, Q., Jiang, Z., Yang, S., Deng, W., Han, L., 2005. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 442, 72–81.
- Yang, T.L., Fang, L., Shaojing, L., Xun, X., 2007. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 88–97.

CAPÍTULO IV

ARTIGO 02: a ser submetido ao periódico *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

A new galactose-specific lectin adsorbed on platinum electrodes followed by electrochemical impedance spectroscopy

A new galactose-specific lectin adsorbed on platinum electrodes followed by electrochemical impedance spectroscopy

Jayra D. Souza ^{a,b}, Maria T.S. Correia ^a, Flamarion B. Diniz ^{b,*}, Luana C.B.B. Coelho ^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

^bDepartamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Laboratório de Eletroquímica Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

* Corresponding author:

E-mail address: fbd@ufpe.br (F.B. Diniz), luanacassandra@terra.com.br.

ABSTRACT

Adsorption of a galactose specific lectin from the roots of *Bauhinia monandra* (BmoRoL) on platinum electrode was investigated using electrochemical impedance spectroscopy. The system iron / potassium ferricyanide was used to investigate the interface of the electrode. EIS data were analyzed by simple equivalent circuit. The carbohydrate front interactions showed a better response after immobilization of the lectin. Changes in pH of the electrolytic probe presented impedimétrica response different to the electrode before and after immobilization of the lectin. The interaction BmoRoL-glycoproteins showed that the lectin has a impedimétrica response greater in the presence of asialofetuína.

Keywords: lectin, glycoproteins

1. Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins with the ability to recognize and to bind mono- or oligosaccharides without inducing changes in the carbohydrate bond [1, 2]. BmoRoL is a lectin isolated from *Bauhinia monandra* secondary roots. It is a galactose-specific lectin, and its antifungal and termiticidal activities have been reported [3].

Lectins have increasingly attracted scientific interest in recent years. They have been used to purify glycoproteins [4], to monitor the expression of cell-surface carbohydrates [5] and have been applied in biological recognition, such as cell-to-cell and ligand-receptor interaction, blood group typing, immune response, and transport of biological macromolecules [6]. Lectinas de leguminosas despertam bastante interesse devido a seus vários papéis fisiológicos nas plantas como reconhecimento celular, ligação e colonização com bactérias fixadoras de nitrogênio em células da epiderme das raízes e transporte de açúcares, hormônios e glicoproteínas [7, 8].

Electrochemical techniques are a powerful tool to characterize biomolecules due to their high sensitivity to structural changes that take place upon interaction of the biomolecule with different ligands. Due to their selectivity, sensitivity, and simplicity of use, electrochemical sensors can also be used to measure the electrical resistance of biological tissues (in which case it can work as an immunosensor) [9], to detect cell morphology changes [10], to study cell adhesion [11, 12] and changes of the cell physiological state, and to test the efficiency of drugs [13]. Hence, the development of simple and highly sensitive detection methods for carbohydrate–protein interactions is an extremely important analytical challenge.

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is an efficient, rapid and sensitive electrochemical technique that can be used to investigate changes of interfacial properties at electrode surfaces. It is suitable for the characterization of biocatalytic transformations, and especially for the label-free transduction of biosensing events on electrodes [14, 15]. The method involves the application of a small perturbation of the potential or current. The perturbation is a single sine wave with different frequencies. From the applied perturbation and the measured response, the magnitudes of the impedance and phase shifts are determined [16].

The interfacial properties of lectins have been studied by EIS to determine carbohydrate composition and glycosylation percentage of glycoconjugates through lectin microarrays [17]. As another example, a biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and relying on sugar–lectin biospecific interactions has been proposed for the determination of glucose [18]. Electrochemical potentials of lectins can

also be used in quantitative and qualitative determinations of glycoconjugates, which have allowed detecting a glycoprotein associated to human mammary tumors [19]. In this work, the potential of a lectin (BmoRoL) adsorbed Pt electrode is investigated for sensor applications. Impedimetric (EIS) measurements were carried out with the electrode for evaluating the interaction of the lectin with carbohydrates and glycoproteins of biological interest.

2. Experimental

2.1. Materials

BmoRoL was purified according to a reported procedure [3]. Ultrapure water from the Nanopure system Milli-Q (Billerica, MA, USA) was used in all experiments. All other chemicals were used as received. The glycoproteins (asialofetuin, fetuin, peroxidase and ovalbumin) and sugars (galactose and sucrose) were obtained from Sigma chemical (St Louis, MO, USA). $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$, NaCl, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, and citric acid were purchased from Vetec.

2.2. Apparatus

The electrochemical measurements were performed on an EG&G PAR 263A potentiostat interfaced with a PerkinElmer 5210 (USA) lock-in analyzer controlled by a computer. A two-compartment electrochemical cell with Luggin capillary was used in all electrochemical measurements. The platinum disc (model MF-2013, diameter of 1.6 mm) used as a work electrode was purchased from Bio Analytical Systems (West Lafayette, IN, USA). A gold wire was used as counter electrode and the reference electrode was Ag/AgCl (sat. KCl). The measurements were performed in a solution of $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1mM each) in 0.15M NaCl.

2.3. Preparation of the electrode surface

The Pt working electrode was polished on felt disc containing an alumina suspension (0.3 μ m, Fortel, Brazil) for 3 min, after which it was sonicated in Milli-Q water for 7 min and rinsed. It was then immersed in conc. nitric acid for about 3 min (F. Maia, Brazil), and rinsed with water. Cyclic voltammetry scans were

performed with sweep potential between -0.1 and 0.45 V with a scan rate of 50 mV/s. The impedance experiments were carried out in the frequency range of 100 mHz to 20 kHz. The amplitude of the applied sine wave potential was 5 mV, while the direct current (dc) potential was limited at the open circuit potential measured just after CV. Electrode potentials are reported throughout with respect to the Ag/AgCl electrode (sat. KCl). All electrochemical measurements were performed on a solution of $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 mM each) in 0.15 M NaCl.

2.4. Lectin immobilization and study of lectin–sugar and lectin-glycoprotein interactions

Suspensions of BmoRoL in a citrate-phosphate 0.01 M buffer solution in 0.15 M NaCl (pH 6.5) were prepared according to a reported procedure [3]. The lectin concentration was 0.05 mg/mL. Lectin adsorption was carried out by direct contact between the electrode and ~1mL of the suspension for 10 min. The electrode was then rinsed with water and characterized by EIS.

For the interaction studies by EIS, the lectin-modified electrode was rinsed with water and immersed in the citrate-phosphate buffer containing the carbohydrate (galactose or glucose) or the glycoprotein (asialofetuin, fetuin, peroxidase and ovalbumin) concentration 0.05 mg/mL for 10 min at room temperature (ca. 26 °C). The electrode was then rinsed with water and placed in the electrochemical cell for EIS.

3. Results and discussion

3.1. Electrochemical impedance spectroscopy for the Pt clear and BmoRoL modified electrode

Fig. 1 shows the Nyquist diagrams obtained for the clear platinum electrode disc, after contact with the buffer for 10 min followed by a rinse with water. The impedance measurements show a very small semicircle on the high frequency side, and a linear behavior typical of a diffusion process (Warburg) on the low frequency side. The semicircle corresponds to the electron transfer resistance at the electrode-solution interface. After the cleaning procedure the electrode has a resistance (R_{CT}) of 259.8 Ω . Performing a cyclic voltammetry on the clean Pt electrode yielded a curve with the anode and cathode peaks at 260 and 200 mV, respectively. The shape of the curve and peak separation are typical of a reversible process, being a good indicator of the cleanliness of the Pt [20].

In a blank test, the exposure of clean electrode for 10 min to the buffer solution (the medium in which the protein is stable) produced identical results to the electrode not exposed to buffer, as expected. However, after adsorption of the lectin, it was found that BmoRoL underwent a significant increase in the semicircle diameter (R_{CT}) of 646.2 Ω , indicating a blocking of the electrode surface of more than 50%.

[insert figure 1]

All curves were characterized by a semicircular region (in the high frequency end of the spectrum) and a linear region (in the low frequency end of the spectrum). This behavior is well known [21,22] and can be easily modeled by a modified Randles equivalent circuit (**Fig. 2**). The circuit includes the following four elements: R_s is attributed to resistance caused by the solution, the resistance R_1 is assigned to the surface of the electrode / solution CPE1 is an imperfect capacitor for the behavior of the double layer of the solution and is related to CPE2 Warburg diffusion. The components, R_s and CPE2, represent bulk properties of the electrolyte solution and diffusion of the applied redox probe, respectively. Thus, they are not affected by chemical transformations occurring at the electrode interface. The other two components of the circuit, CPE1 and R_1 depend on the dielectric and insulating features at the electrode/electrolyte interface. Whereas the charge transfer resistance is directly related to the kinetics of the redox reaction, the constant phase element has been related to the heterogeneous nature of the electrode/solution interface (its dispersion, caused, for instance, by the surface roughness) [23]. The quality of the adjustment is shown in **Fig. 2**, indicating excellent agreement between experimental and calculated data.

[insert figure 2]

3.2 Effect of pH on the impedance response of adsorbed BmoRoL.

It has been previously shown [3] that the pH affects the hemagglutinating activity of BmoRoL. Studies utilizing different buffers showed that the lectin is active at pH values of 6.0, 7.0, and 7.0. It has been suggested that pH variations may not significantly affect the lectin activity [24], but another work has suggested otherwise [25].

The behavior of the electrode-solution interface was investigated before and after adsorption of the lectin as a function of the electrolyte solution pH, as shown in Fig. 3. In these systems impedimetric measurements were carried out before and after immobilization of BmoRoL, varying only the electrolyte pH 3.0 to 9.0.

It has been shown that the charged state of a lectin depends heavily on the pH, on presence of complexing counterions, and on the conformational reorganization feasibility when protein–solid surface interactions occur [26]. As a consequence, it is very difficult to understand and model the adsorption of these proteins on surfaces. The adsorption process of globular proteins on solid surfaces can induce conformational changes, which affect their biological function. In addition, the structural stability of the native protein has direct influence on the adsorption/desorption kinetic. The initial stages of an adsorption process take place in the milisecond – second time scale and can produce modifications in the protein conformation or solvation, while changes in orientation or lateral distribution in the adsorbed state can be kinetically slower, in the order of seconds to minutes [17, 27].

The impedimetric resistance of the electrode- solution interface before lectin adsorption varied between 200 and 350 Ω . After adsorption, at pH 6 (the optimal pH for the lectin's biological activity), there was an increase in blocking of the electrode of more than 70% compared to the clean electrode. At more acidic pH values there was a further increase in this resistive behavior (619.2, 703.5 and 855.2 Ω for pH 5, 4, and 3, respectively). At pH 9 a similar resistive increase was also observed (655.4 Ω). These increases in the blocking of electron transfer in the double layer suggest the occurrence of lectin denaturation.

[insert figure 3]

3.3 Interaction of BmoRoL front of carbohydrates (glucose or galactose)

Figure 4 present the Nyquist plots for clean Pt and after contact with the carbohydrates galactose or fructose. After BmoRoL adsorption, the semicircle undergoes an increase in its diameter. This diameter is related to the interfacial electron-transfer resistance (RCT). Since the impedimetric resistance (around 250 Ω) nearly did not change for the clean electrode, and for the glucose and galactose experiments, it is believed that no interaction between the electrode surface and the carbohydrate took place.

The overall interaction of the lectin with the different carbohydrates is a result of their different properties, such as molecular structure, biological activity, and carbohydrate specificity and inhibition. Amperometric biosensor for glucose based on a Pt electrode, has been proposed [28, 29].

[insert figure 4]

Values of the electrical parameters extracted from the impedance state on platinum disk electrode, Pt after sugars, results using this equivalent circuit are given in **Tables 1**.

[insert table 1]

3.4 Interaction of BmoRoL and glycoproteins

Lectins interact with carbohydrate-free or glycoconjugates, which have enabled its application in determining blood types [30, 31], detection and separation of glycoconjugates, which can be used to explore cell surfaces by binding to the carbohydrate portion of glycoproteins or glycolipids that protrude into the cell [32]. The results presented in **Fig. 5** show that BmoRoL was able to recognize glycoproteins, as can be seen in the increase in charge transfer, R2. Hence, the performance of the modified electrode for detection of glycoproteins was evaluated through the relative variation of this parameter. This variation can be calculated according to the following **Eq.1**:

$$\Delta R (\%) = \frac{R2 (\text{after}) - R2 (\text{before})}{R2 (\text{before})} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

where R2 (before) and R2 (after) are, respectively, the values of the charge transfer resistance of the electrode/solution interface after and before (Pt-clean e Pt-glycoprotein), (BmoRoL e Pt-BmoRoL), our (BmoRoL e Pt-BmoRoL-glycoprotein) exposure. The results are given in **Table 2**.

According to Souza *et al.*, 2011 [3], BmoRoL had its biological activity inhibited in the presence of glycoproteins.

The characterization by impedance spectroscopy in the presence of BmoRoL presented little response to the fetuin and peroxidase glycoproteins with a blockage in the transfer of electrons from 693 to 970 Ω (ΔR (%) 47.4 and 32.8) respectively. This behavior may be due to the lack of biological specificity of the lectin to these glycoproteins. However, there was an adsorption of these glycoproteins on the electrode surface bare with a greater response to the peroxidase.

Similar results were obtained for the ovalbumin glycoprotein with a block of 51% to the electrode immobilized with BmoRoL, while their adsorption on the electrode clean it is around 10% lower than the electrode modified with the lectin. Showing that there was more interaction after exposure the BmoRoL

However, for asialofetúina glycoprotein the resistance after incubation with BmoRoL increased to 1713.333 Ω corresponding to ΔR 130.6%. But, when performing the direct adsorption in electrode, the adsorption was even greater than when previously incubated with BmoRoL. These results show that this glycoprotein can used as recognition and differentiation tool of biomolecules, since it adsorbs very well on Pt electrodes.

The impedance measures are consistent with the biological testing, for which the lectin has or not significant interaction with the glycoproteins.

[insert figure 5]

[insert table 2]

4. Conclusions

This article presented results on the effect boqueio of the electrode Pt after adsorption of the BmoRoL lectin. The carbohydrate front interaction affected the response to blocking electron transfer after immobilization of the lectin, as well as glycoproteins, where the greatest response impedimétrica occurred in the presence of asialofetúina glycoprotein. Changes in the pH of the electrolytic probe, presented different impedimétricas response to the electrode before and after immobilization of the lectin.

Acknowledgments

The authors are grateful for financial support the scholarship during this work for Souza, J.D. The fundamental chemistry department and INAMI-INCT.

References

- [1] N. Sharon and H. Lis (Eds.), *Lectins*, Second Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003.
- [2] J.H. Wu, T. Singh, A. Herp and A.M. Wu, Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin), *Biochim.* 88 (2006) 201.
- [3] J.D. Souza, M.B.R. Silva, A.C.C. Argolo, T.H. Napoleão, R.A. Sá, M.T.S. Correia, P.M.G. Paiva, M.D.C. Silva and L.C.B.B. Coelho, A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65 (2011) 696.
- [4] M.C.C. Silva, L.A. Santana, R.A. Silva-Lucca, A.L.R. Lima, J.G. Ferreira, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, M.L.V. Oliva, R.B. Zingali and M.T.S. Correia, Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities, *Process Biochem.* 46 (2011) 74.
- [5] M. Fais, R. Karamanska, D.A. Russell and R.A. Field, Lectin and carbohydrate microarrays: New high-throughput methods for glycoprotein, carbohydratebinding protein and carbohydrate-active enzyme analysis, *J. Cereal Sci.* 50 (2009) 306.
- [6] N. Sharon and H. Lis, History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, *Glycobiol.* 14 (2004) 53.
- [7] F.J. Irazoqui, M.M. Vozari-Hampe, R.D. Lardone, M.A. Villarreal, V.G. Sendra, G.G. Montich, V.M. Trindade, H. Clausen and G.A. Nores, Fine carbohydrate recognition of *Euphorbia milii* lectin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 14.
- [8] V.S. Sreevidya, R.J. Hernandez-Oane, R.B. So, S.B. Sullia, G. Stacey, J.K. Ladh and P.M. Reddy, Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs52* promotes rhizobial colonization of roots in rice, *Plant Sci.* 169 (2005) 726.
- [9] I. Navrátilová and P. Skládal, The immunosensors for measurement of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid based on electrochemical impedance spectroscopy, *Bioelectrochem.* 62 (2004) 11.

- [10] S. Arndt, J. Seebach, K. Psathaki, H-J. Galla and J. Wegener, Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 583.
- [11] A. Bouafsoun, S. Helali, S. Mebarekd, C. Zeillerd, A.F. Prigent, A. Othmane, A. Kerkeni, N. Jaffrézic-Renault and L. Ponsonnet, Electrical probing of endothelial cell behavior on a fibronectin/polystyrene/thiol/gold electrode by Faradaic electrochemical impedance spectroscopy (EIS), *Bioelectrochem.* 70 (2007) 401.
- [12] A. Bouafsoun, S. Helali, A. Othmane, A. Kerkeni, A.F. Prigent, N. Jaffrézic-Renault, F. Bessueille, D. Léonard and L. Ponsonnet, Evaluation of endothelial cell adhesion onto different protein/gold electrodes by EIS, *Macromol. Biosci.* 7 (2007) 599.
- [13] A.M. Otto, M. Brischwein, E. Motrescu and B. Wolf, Analysis of drug action on tumor cell metabolism using electronic sensor chips, *Arch. Pharm.* 337 (2004) 682.
- [14] M. Gamella, S. Campuzano, C. Parrado, A.J. Reviejo and J.M. Pingarron, Microorganisms recognition and quantification by lectin adsorptive affinity impedance, *Talanta* 78 (2009) 1303.
- [15] X. Jiang, L. Tan, B. Zhang, Y. Zhang, H. Tang, Q. Xie and S. Yao, Detection of adherent cells using electrochemical impedance spectroscopy based on molecular recognition of integrin $\beta 1$, *Sens. Actuators B: Chem.* 149 (2010) 87.
- [16] M. Ates, Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces, *Prog. Org. Coat.* 71 (2011) 1.
- [17] S. Noinville, M. Revault (Eds.), Conformations of Proteins Adsorbed at Liquid–Solid Interfaces, Principles and Practice. Proteins at Solid–Liquid Interfaces, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006.
- [18] W. Li, R.Yuan, Y. Chai, H. Zhong and Y. Wang, Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interactions for the determination of glucose, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 4203.
- [19] M. Jie, C.Y. Ming, D. Jing, L.S. Cheng, L. Huai, F. Jun and C.Y. Xiang, An electrochemical impedance immunoanalytical method for detecting immunological interaction of human mammary tumor associated glycoprotein and its monoclonal antibody, *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 425.
- [20] F.B. Diniz and R.R. Ueta, Platinum oxidation and its effect on concanavalin A adsorption, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 4281.
- [21] Y. Houa, S. Helali, A. Zhang, N. Jaffrezie-Renault, C. Martlet, J. Minic, T. Gorjankina, M.A. Persuy, E. Pajot-Augy, R. Salesse, F. Bessueille, J. Samitier, A. Errachid, V. Akimov, L. Reggiani, C. Penneta and E. Alfinito, Immobilization of rhodopsin on a self-assembled multilayer and its specific detection by electrochemical impedance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1393.

- [22] F. Patolsky, M. Zayats, B. Katz and I. Willner, Precipitation of an insoluble product on enzyme monolayer electrodes for biosensor applications: characterization by Faradaic impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, and microgravimetric quartz crystal microbalance analyses, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3171.
- [23] H. Hillebrandt, G. Wiegand, M. Tanaka and E. Sackmann, High electric resistance polymer/lipid composite films on indium-tin-oxide electrodes, *Langmuir* 15 (1999) 8451.
- [24] R. Wittsuwannakul, D. Wittsuwannakul, and C. Sakulborirug, A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Phytochem.* 47 (1998)183.
- [25] E.H.E. Konozy, E.S. Bernardes, C. Rosa, V. Faca, L.J. Greene and R.J. Ward, Isolation, purification, and physicochemical characterizatio of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*, *Arch. Biochem. Biophys.* 410 (2003) 222.
- [26] F.Y. Oliva, O.R. Cámara and L.B. Avelle, Adsorption of human serum albumin on electrochemical titaniumdioxide electrodes: Protein–oxide surface interaction effects studied by electrochemical techniques, *J. Electroanal. Chem.* 633 (2009) 19.
- [27] W. Norde, A. Baszkin and W. Norde (Eds.), *Proteins at Solid Surfaces. Physical Chemistry of biological Interfaces*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [28] L. Xu, Y. Zhu, L. Tang, X. Yang, and C . Li, Biosensor based on self-assembling glucose oxidase and dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles on carbon nanotubes for glucose detection. *Electroanal* (2007) 19:717-22.
- [29] L. Xu, Y. Zhu, L. Tang, X. Yang, and C . Li, Dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles/polyaniline nanofibers for glucose detection. *J Appl Polym Sci* (2008) 109:1802.7.
- [30] N.Q. Khang, G. Jean-Luc and J. Hoebeke, A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*, *Biochim. Biophys. Acta* 1033(1990) 210.
- [31] H. Mo, H.C. Winter and I.J. Goldstein, Purification and characterization of a Neu5Aca2-6Galb1-4Glc/GlcNac-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus saquamosus*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10623.
- [32] M. Sarkar, G.C. Majumder and T. Chatterjee, Goat sperm membrane: lectin-binding sites of sperm surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens, *Biochim. Biophys. Acta* 1070 (1991) 198.

Figures

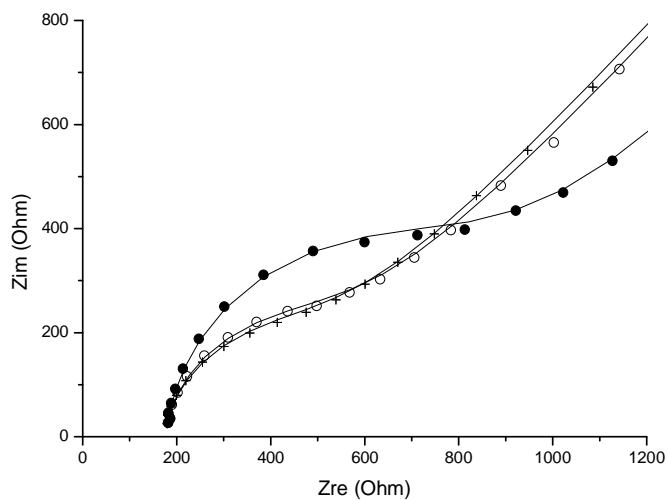


Fig. 1. Nyquist diagram for a clean platinum disk electrode in $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1 mM each) in 0.15 M NaCl: electrode clean (+), after exposure to solution citrate phosphate buffer during 10 min (o) and after exposure BmoRoL 0.05 mg/mL for 10 min (●). Solid lines in the figure represent the fitted lines.

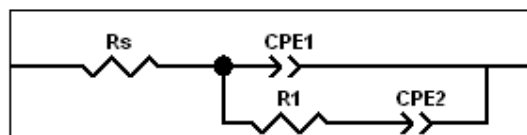


Fig. 2. Equivalent circuit applied to fit impedance measurements in the presence of redox pair of $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. R_s , the ohmic resistance of the electrolyte solution; CPE1 associated with the double layer capacitance; CPE2, the Warburg impedance; R_1 , the electrode/solution resistance.

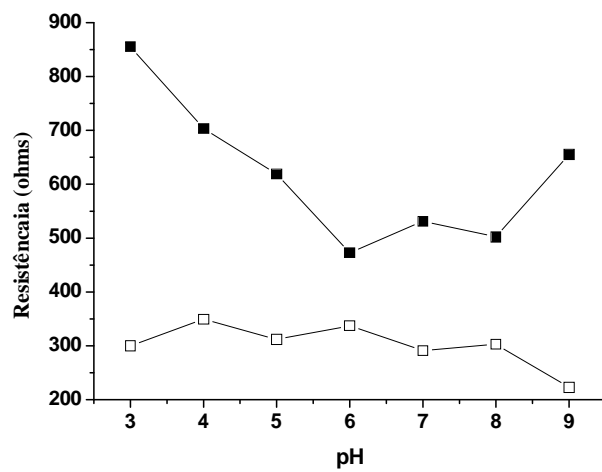


Fig. 3. Influence of changes in pH of the solution ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ in 1 mM NaCl 0.15M) on platinum electrode: before (□) and after adsorption of the lectin BmoRoL (■).

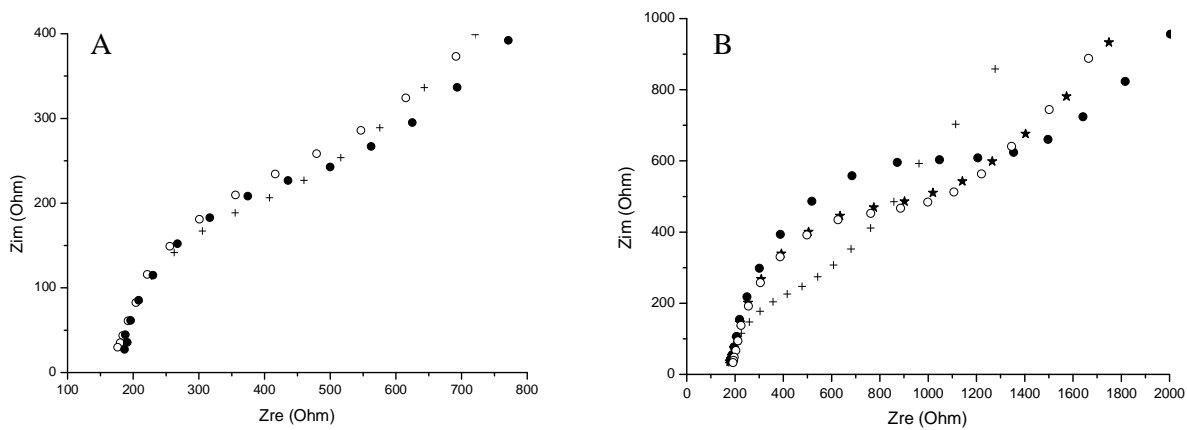


Fig. 4. Nyquist diagram for a clean platinum disk electrode in $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$: electrode clean (+), after exposure to solution galactose (o) and glucose (●). (A) before and (B) after immobilization of BmoRoL (★).

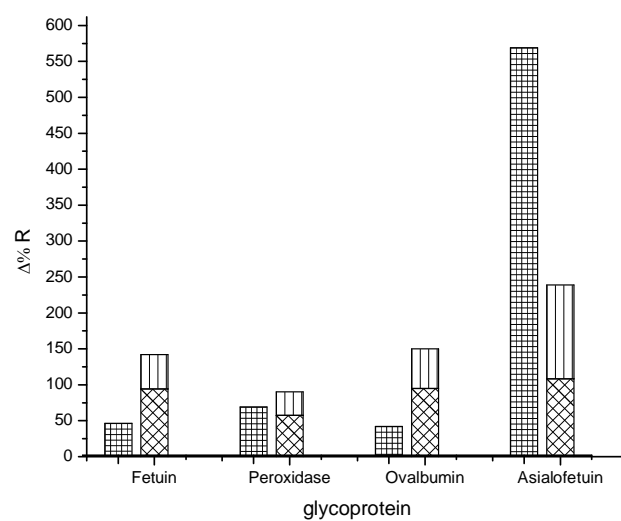


Fig 5. Graphic relative charge transfer variation from glycoprotein impedance. Pt-glycoprotein (■); Pt-BmoRoL (▨); Pt-BmoRoL-glycoprotein (▩)

Table 1. allows the same comparison for after sugars electrode surfaces

| | $R2 (\Omega)$ | $Q (F)$ | n |
|---------------------|---------------|---------|---------|
| Pt, clean | 320.4 | 1.46 | 0.82846 |
| Pt-Glucose | 348.3 | 1.30 | 0.88863 |
| Pt-Galactose | 322.5 | 1.59 | 0.8631 |
| Pt-BmoRL | 912.2 | 1.40 | 0.86897 |
| Pt-BmoRoL-Glucose | 810.5 | 1.06 | 0.90802 |
| Pt-BmoRoL-Galactose | 1174 | 1.12 | 0.89022 |

Table 2 relative charge transfer variation from glycoprotein impedance dados

| <i>Glycoprotein</i> | $\Delta R(\%)$ Pt-glycoprotein | $\Delta R(\%)$ Pt-BmoRoL | $\Delta R(\%)$ Pt-BmoRoL- glycoprotein |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--|
| Peroxidase | 67.3 | 57.4 | 32.8 |
| Fetuin | 44.5 | 94.2 | 47.4 |
| Ovalbumin | 40.2 | 94.9 | 55.1 |
| Asialofetuin | 566.9 | 108.2 | 130.6 |

CAPÍTULO V

ARTIGO 03: a ser submetido ao periódico *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

Use of BmoRoL lectin adsorbed on graphite to evaluate blood serum contaminated with leishmania

Use of BmoRoL lectin adsorbed on graphite to evaluate blood serum contaminated with leishmania

Jayra D. Souza ^{a,b}, Maria T.S. Correia ^a, Maria E. F. Moura, Flamarion B. Diniz ^{b,*}, Luana C.B.B. Coelho^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

^bDepartamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Laboratório de Eletroquímica Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

* Corresponding author:

E-mail address:

luanacassandra@terra.com.br (L.C.B.B. Coelho)

fbd@ufpe.br (F.B. Diniz).

Abstract

Immobilization of the lectin BmoRoL on a graphite electrode has been investigated by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM). AFM was used to characterize the surface of the electrode before and after BmoRoL adsorption. The system was used to probe serum samples for Leishmaniasis. EIS showed a clear increase in the electron transfer resistance when the sensor was exposed to contaminated sera when compared to uncontaminated sera. The results were analyzed using an equivalent circuit model and the values for charge transfer resistance and capacitance were obtained. Changes in the sensor resistance were used to distinguish its response to the different sera. Hence, the lectin immobilization on the electrode surface, combined with EIS, was shown to be a valuable tool for developing a biosensor to diagnose Leishmaniasis.

Keywords: *Leishmaniasis; lectin BmoRoL; electrochemical impedance spectroscopy; atomic force microscopy*

1. Introduction

American Cutaneous Leishmaniasis (ATL) is an infectious disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus, belonging to Trypanosomatidae family, which affects the skin and mucous membranes. Transmission takes place through the bite of mosquitoes belonging to the Phlebotominae subfamily, the actual species depending on the geographical location [1].

Leishmaniasis caused by dermatropic species are endemic in 82 countries, with an incidence of approximately 1.5 million cases per year. The ATL also known as mucocutaneous leishmaniasis, Bauru ulcer, etc., is widely distributed in the Americas, extending from the southern United States to northern Argentina. About 90% of cutaneous leishmaniasis cases are concentrated in Brazil and six other developing countries [2]. Hence, it constitutes a dermatologic disorder that deserves greater attention because of its severity and the risk of deformities that can produce in man [3]. The disease has received increasing attention due to expanding international travel and population overgrowth in several endemic areas.

The diagnosis of ATL covers epidemiological, clinical and laboratory aspects (parasitological and immunological diagnosis). A combination of some of these elements is often necessary to reach the final diagnosis [4]. All the currently available tests, however, show severe limitations [5]. Culture tests tend to be unreliable, and to take up to 3 weeks. Molecular techniques (such as PCR and genome detection) are still expensive and not widely available, while serological tests (ELISA, IFA, and others) are very limited in scope. Histology tests, such as punch biopsy or aspirate test, are the most common, but involve invasive procedures and time-consuming specimen preparation. The Montenegro skin test is also very common, but does not detect acute infection and may give false positives [5]. Hence, new techniques that are reliable, fast and easy to use must be developed in order to speed up diagnosis and facilitate fighting the disease.

Biosensors are small devices used to transduce biological signals; they have been used in several applications, such as diagnostic tools, biological interaction monitoring, etc.. Lectins have been extensively exploited as a basis for biosensor design. Lectins serve as key carbohydrate recognition molecules, which bind reversibly to specific sugars [6]. Moreover, lectins play key roles in a variety of important biological processes such as cell-surface recognition, cell-cell communications, cancer and host-pathogen infection, etc [7, 8]. A detailed analysis of protein-carbohydrate interaction is necessary to provide important information regarding biological function and for the development of disease diagnostic tools [9]. The specificity of lectins to carbohydrate moieties should enable the development of specific sensors for sugars.

Electrochemical biosensors have been widely used for monitoring biomolecular interactions since it offers a certain advantages of cost-effectiveness and portability (possible point-of-care) [10]. These monitoring biomolecular reactions are mainly based on the detection of current or potential changes resulting from interactions occurring at the transducer/ biomolecule interface [11]. The biosensors are designed by coupling the biorecognition elements (e.g., antibodies, DNA, receptors) to solid electrode surfaces (e.g., Pt, Au, Ag, graphite or carbon-based conductors) or electrode arrays, which respond to applied electrical impulses such as potential or current [12-13].

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is often used to probe biomolecular interactions [14]. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is an efficient and rapid electrochemical technique suitable for characterization of biocatalytic transformations on electrode surfaces, and especially for the label-free transduction of biosensing events on electrodes [15]. The successful coupling of electrochemistry with naturally existing sophisticated biomolecules promises to generate novel, real time molecular recognition technologies that are sensitive and selective.

Atomic force microscopy (AFM) can be used to facilitate the study of lectin-carbohydrate interaction, because it has been developed as a powerful technique for studying the structural details of biological systems with high spatial resolution and also been is used alongside biosensors for probing various substances [9, 16]. In This work, technique of EIS and AFM were used to investigate the immobilization of BmoRoL on electrodes of graphite, the experimental approaches for evaluation of a biosensor response for serum glycoproteins from patients infected by Leishmania using electrochemical techniques.

2. Experimental

2.1. Materials and Reagents

The lectin from *Bauhinia monandra* secondary roots (BmoRoL) was obtained from the Laboratory of Glycoproteins (UFPE) [17]. Bovine serum albumin (BSA, 99%) was purchased from Sigma chemical (St. Louis, MO, USA). Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), Potassium ferrocyanide ($K_4Fe(CN)_6$), sulfuric acid (H_2SO_4) and sodium chloride (NaCl) were purchased from VETEC (Brazil). Chemical reagents were all of analytical grade and water used in the preparation of all solutions was obtained from Milli-Q plus (Billerica, USA).

Samples sera from three patients each, infected by Cutaneous leishmania, and negative for sera were obtained from Laboratório Aggeu Magalhaes PE.

2.2. Apparatus

The electrochemical measurements were performed on an EG&G PAR 263A potentiostat interfaced with a PerkinElmer 5210 (USA) lock in analyzer controlled by a computer. A two-compartment electrochemical cell with Luggin capillary containing three electrodes was used. An Ag/AgCl electrode, a gold wire, and a graphite electrode were used as reference, auxiliary and working electrodes, respectively. The graphite electrode (3 mm diameter) was acquired from Bio Analytical Systems (West Lafayette, IN, USA).

2.3. Lectin BmoRoL immobilization

Prior to use, the graphite electrode surface was manually polished with alumina slurries (0.3 μm) for 3min and washed ultrasonically in Milli-Q water for 7 min. Subsequently, the electrode was placed in concentrated H_2SO_4 for 5 min and washed extensively with Milli-Q water. Then, graphite electrode surface was incubated with an aliquot (500 μL) of BmoRoL (0.5 mg mL^{-1}) in citrate phosphate buffer (0.01M in 0.15M NaCl, pH 6.5) prepared according to a reported procedure [17] for 10 min. Subsequently, the electrode was exhaustively rinsed with Mili-Q water to remove unbound lectin. The electrode was then rinsed with water and placed in the electrochemical cell for EIS measurement.

2.3. Serum-lectin immobilization

The BmoRoL modified electrode surface was blocked with an aliquot (500 μL) of 0,05% BSA solution for 10 min to avoid non-specific binding. Subsequently, the electrode was exhaustively rinsed with Mili-Q water to remove unbound BSA and exposed to serum from patients contaminated by Cutaneous leishmaniasis and non-contaminated sera, diluted in 10 mM pH 7.4 PBS solution (1:100 dilution) for 10 min at room temperature 26 $^{\circ}\text{C}$).

2.4. Electrochemical Measurements

The measurements were performed in the presence of a 10.0 mL of a solution of 0.01 M $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) in 0.15 M NaCl, used as a redox marker.

The impedance measurements were recorded between 20 kHz and 100 mHz, at sinusoidal voltage perturbation of 5 mV amplitude. The experiments were carried out under open circuit potential conditions. The measurements of cyclic voltammetry were performed in a potential between -0.2 and $+0.6$ V *versus* Ag/AgCl electrode at 50 mV s^{-1} .

2.2. AFM measurements

Atomic force microscopy (AFM) topographic images were performed under ambient conditions using a commercial 5500 scanning probe microscope (Agilent Technologies, USA) in AC mode. Cantilevers with a golden silicon probe (NSG10, NT-MDT, $F_0 = 140 \text{ KHz}$, Force constant = 3.1 N/m) were used for the noncontact mode AFM in air at room temperature (approximately 25° C). Scan areas varying from $0.1 \mu\text{m} \times 0.1 \mu\text{m}$, the scan speed for imaging was about 1–2 lines/s with a resolution of 512×512 data points were obtained. The AFM Picoview software was used to analyze the recorded scans.

3. Results and discussion

3.1. AFM characterization

AFM has produced valuable images that add to our understanding of the structure and functions of the system and biomolecules. In contrast to data obtained from electron microscopy, the three-dimensional analysis with AFM permits a spatial insight on the geometry of surface-adsorbed molecules [18]. In a report [19], the structure of Mannan-binding lectin was visualized on a spermine-coated mica surface with a near-atomic level resolution.

In the Fig. 1B were observed clusters of BmoRoL which are clearly seen on the surface and are isolated from each other. Cross-section of analysis revealed that the average height of BmoRoL was about 2 nm, which is

consistent with the typical size lectin BmoLL [20], purified and characterized from leaves of species leguminous plant (*B. monandra*).

{ Insert figure 1 }

3.2 Characterization BmoRoL immobilized on the graphite electrode and recognition of glycoproteins by EIS

The resulting BmoRoL-modified graphite electrode was obtained and further used as the sensing basis for electrochemical impedance and binding of serum glycoproteins with BmRoL. All Nyquist plots presented here are in good agreement with the literature [20], in which the charge transfer is diffusion-limited by the transported of ferri-/ferrocyanide species to the electrode surface. Data in the low frequency side form a straight line with a 45° slope.

The bare graphite electrode showed the process of electron transfer of $\sim 15 \Omega$ and a diffusion-limiting step. Formation of a layer of adsorbed lectin caused an increase in the electron transfer resistance to 2985 Ω ; this variation corresponds to a blocking of more than 200 times (**Fig. 2**). This increase is quite significant since the electrode surface was not chemically modified. Other works have approached this by modifying the electrode surface in order to achieve a better impedimetric response [10, 20, 21]. The result for the graphite electrode immobilized with BmoRoL was subsequently used as a basis for the electrochemical detection of glycoproteins in contaminated sera with Leishmania by EIS. It was shown that the formation of the layer of adsorbed lectin caused an increase in the electron transfer resistance. This response was even greater when there was exposure to BSA and the sera (**Fig. 2**). Hence, there was a further increase in the electrode surface blocking. The magnitude of this resistance increase may be related to the lectin-serum interaction.

{ Insert Figure 2 }

It can be seen that the semicircle diameter is greater when the system interacts with glycoproteins of the sera contaminated with Leishmania in comparison with the uncontaminated sera. For these results, the interface charge transfer resistance increases with the addition of contaminated sera, as indicated by the R1 value of 10907 Ω . On the other hand, a lower value (8194 Ω) was observed for uncontaminated sera. The solid lines in **Fig. 2** represent the model fit of the experimental data utilizing an equivalent circuit.

Table 1 lists the equivalent circuit parameters used for tracing the curves for each system with BmoRoL interaction between and contaminated sera and uncontaminated sera.

{Insert Table 1};

A Randles modified equivalent circuit, **Fig. 3**, was found to provide an adequate adjustment to the data, hence yielding more detailed information about the impedimetric behavior of the systems featuring the lectin. The fitted curves indicate the excellent agreement between the circuit model and the experimental results.

The Randles modified equivalent circuit (**Fig. 3**) was then used to determine each experiment's parameter: the electrolyte resistance (R_s), the Warburg impedance resulting from ion diffusion (CPE2), electron transfer resistance (R_1), and the constant phase element (CPE1) related to the electrode roughness (instead of the double layer capacitance). The values of Q and n (the reactance and the dispersion of the constant phase element) were extracted from CPE1.

{Insert Figure 3}

The results revealed a blockage of the graphite electrode surface in differentiating the samples tested for sera contaminated and uncontaminated. Table 2 shows the equivalent circuit parameters of the fitting curves of the interaction between BmoRoL and glycoproteins present in sera infected by Leishmania.

{Insert Table 2}

Another way to analyze these data is comparing the three variables (R_2 , Q , and n). In this respect, a 3-D graph was assembled as shown in **Fig. 4**. The results are arranged in a way that allows grouping the sera within the graph. The NCS groups (samples A and B) are located in the region of low R_2 and Q , and high n , corresponding to a lesser blockage effect on the electrode surface with low capacity dispersion. The SC results, on the other hand, are distributed in different regions. One group (sample E) near the US group but with different Q values. Another group (samples C and D) is in an intermediate region, with similar n values but distinct R_2 and Q , and the last group (sample F) is in the bottom region of the graph, with higher R_2 and Q and lower n . These features indicate greater blockage effects and less capacitive dispersion on the electrode surface. This

heterogeneous distribution may be associated to four different types of serum tested in this work, in which the underlined groups belong to two different patients and the three points that are not underlined belong to other two patients whose data do not correlate well in the graph.

{ Insert Figure 4 }

These results indicate that EIS is suitable to follow the changes in the electron transfer resistance resulting from immobilizing BmoRoL on the graphite electrode surface without chemical modifications. The impedimetric response for both Leishmania contaminated and non contaminated sera might be used in future research as a biosensor for tests that are faster and simpler than the ones currently available.

4. Conclusions

In the present work, we have introduced a novel approach for the fabrication of a biosensor based on the modification of an electrode surface with BmoRoL. Electrochemical impedance technique was used to investigate the interaction between BmoRoL and sera from patients contaminated by Leishmania. The electrochemical response of a redox probe system ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) was effective as a signal for the presence of agglutination reactions on the electrode. Variations in relative charge transfer resistance and a graphical analysis of the impedance data, through RCT, Q and n, allowed separation of the contaminated sera and non-contaminated sera. This kind of electrode and data analysis have a potential application as a biosensor for the recognition of different patterns of glycoproteins in blood serum for Leishmaniasis disease that currently has no analysis fast so that the sooner treatment begins.

Acknowledgments

Souza J.D. thanks to FACEPE foundations for the scholarship during this work.

Reference

- [1] W.H. Markle and K. Makhoul, *Am. Farm. Physician*. 69 (2004) 1455.
- [2] WHO, 2007. Report of the Consultative Meeting on Cutaneous Leishmaniasis. Geneva.
- [3] Brasil, 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 3rd ed. Ministério da Saúde, Brasília (DF).
- [4] P.E. Manson-Bahr, In: W. Peters and R. Kilich-Kendrick (Eds.), *Diagnosis. The Leishmaniasis*. London, 1987.
- [5] P. Konidas and M. Durkin-Konidas, *J. Am. Acad. Derm.* 63 (2010) 309.
- [6] N. Bhat and H.D. Ward, In: M. Caron, A.-P. Sve (Eds.), *Lectins and Pathology*, Routledge: UK, 2000.
- [7] N.E. Zachara and G.W. Hart, *Chem. Rev.* 102 (2002) 431.
- [8] G.E. Ritchie, B.E. Moffatt, R.B. Sim, B.P. Morgan, R.A. Dwek and P.M. Rudd, *Chem. Rev.* 102 (2002) 305.
- [9] Y. Li, H. Qiao, C. Xing, J. Zhang, L.-X. Wang, H. Wang, B. Zhang and J. Tang, *J. Struct. Biol.* 176 (2011) 46.
- [10] I.-H. Min, L. Choi, K.-S. Ahn, B.K. Kim, B.Y. Lee, K.S. Kim, H.N. Choi and W.-Y. Lee, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1326.
- [11] O.A. Sadik, A.O. Aluoch and A. Zhou, *Biosens. Bioelectronics* 24 (2009) 2749.
- [12] D. Andreescu, S. Andreescu and O.A. Sadik (Eds.), *New Materials for Biosensors, Biochips and Molecular Bioelectronics* in “*Comprehensive Analytical Chemistry*”, Edited by L. Gorton, Elsevier, 2005.
- [13] S. Andreescu, J. Karasinski and O.A. Sadik (Eds.), *Multiarray Biosensors for Toxicity Monitoring and Bacterial Pathogens*, CRC Press, USA, 2005.
- [14] E. Katz and I. Willner, *Electroanal.* 15 (2003) 913.

- [15] R. Maalouf, C. Fournier-Wirth, J. Coste, H. Chebib, Y. Saikali, O. Vittori, A. Errachid, J.-P. Cloarec, C. Martelet and N. Jaffrezic-Renault, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4879.
- [16] T.V. Ratto, K.C. Langry, R.E. Rudd, R.L. Balhorn, M.J. Allen and M. W. McElfresh, *Biophys. J.* 86 (2004) 2430.
- [17] J.D. Souza, M.B.R. Silva, A.C.C. Argolo, T.H. Napoleão, R.A. Sá, M.T.S. Correia, P.M.G. Paiva, M.D.C. Silva and L.C.B.B. Coelho, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65 (2011) 696.
- [18] T. Vorup-Jensen and T. Boesen, *Ad. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1008.
- [19] H. Jensenius, D.C. Klein, M. van Hecke, T.H. Oosterkamp, T. Schmidt and J.C. Jensenius, *J. Mol. Biol.* 391 (2009) 246.
- [20] C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, C.P. Melo, L.C.B.B. Coelho, M.T.S. Correia, M.L. Nogueira, P.R. Singh and X. Zeng, *J. Coll. Interface Sci.* 362 (2011) 517.
- [21] R.R. Ueta and F.B. Diniz, *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 61 (2008) 244.

Figures

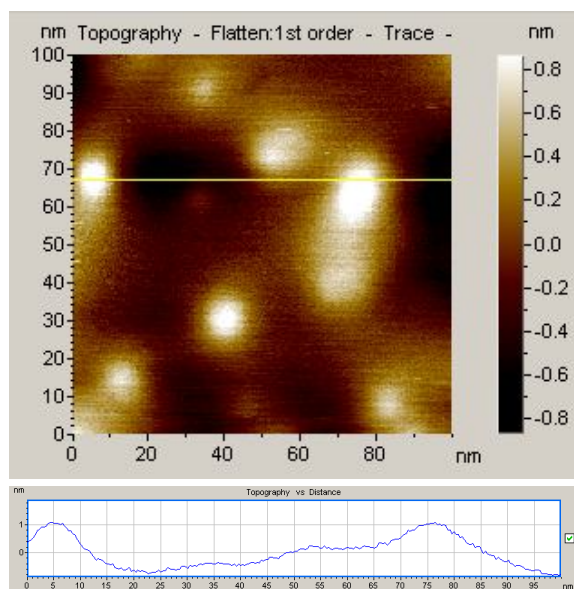


Fig.1. AFM topographic image of the graphite electrode surface modified with BmoRoL, with Corss-section along the lines.

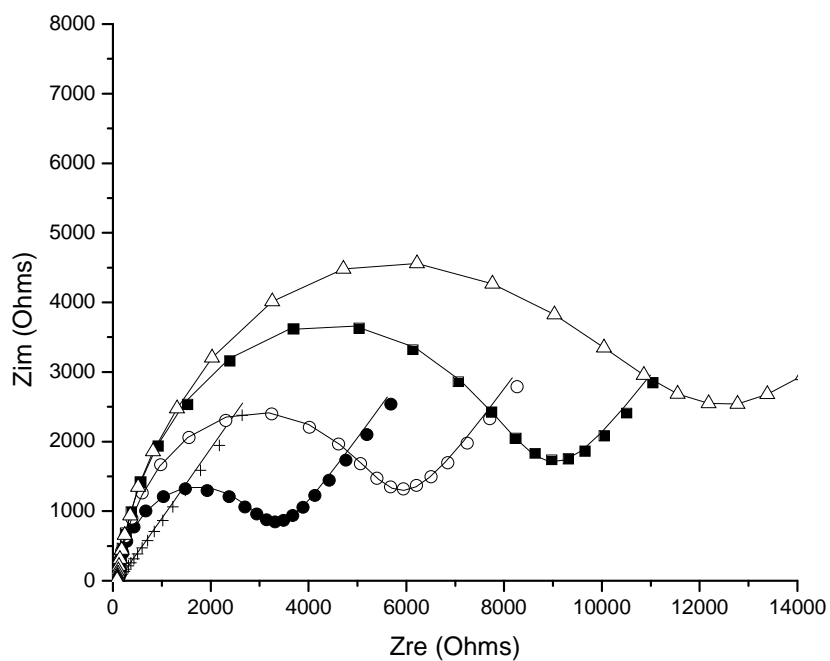


Fig. 2. Nyquist plots for the stepwise modification process: bare graphite electrode (+), BmoRoL (●), BmoRoL-BSA (○), BmoRoL-BSA-US (■), BmoRoL-BSA-CS (Δ). Solid lines represent fitted data represent experimental data. Supporting electrolyte 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 1:1 containing 0.15 M NaCl in PBS solution.

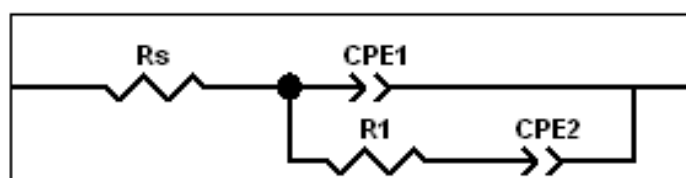


Fig. 3. Equivalent circuit applied to fit the impedance measurements in the presence of redox pair of $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. R_s , the ohmic resistance of the electrolyte solution; $CPE1$ associated with the double layer capacitance; $CPE2$, the Warburg impedance; $R1$, the electrode/solution resistance.

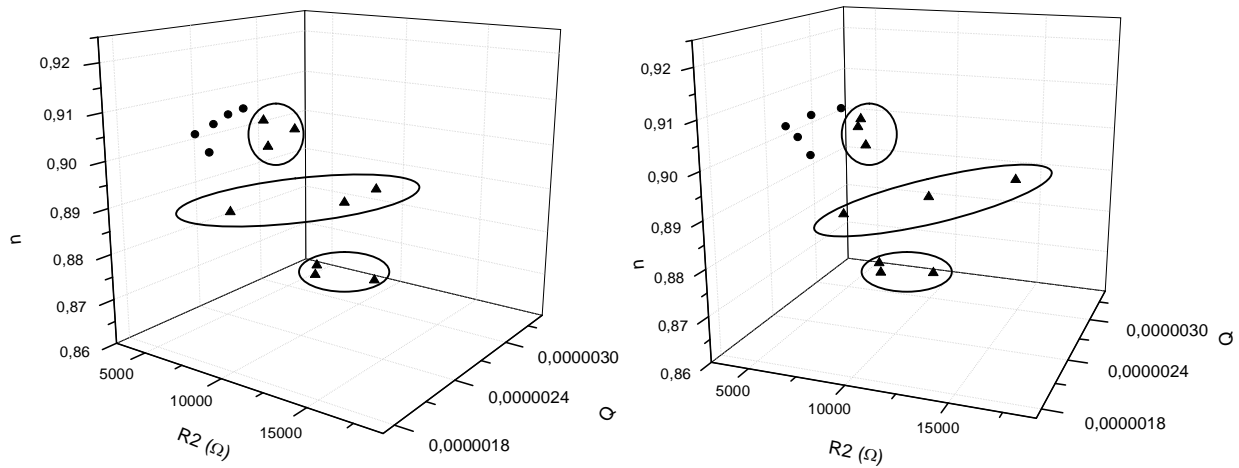


Fig. 4. Three-dimensional plot for values of $R2$, Q and n given in Table 2. BmoRoL/BSA/Unontaminated sera (●) and BmoRoL/BSA/Contaminated sera (▲).

Table 1. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance result.

| | <i>R2</i> (Ω) | <i>Q</i> (<i>F</i>) | <i>n</i> |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------|----------|
| Graphite clean | 15.49 | 8.22E-07 | 1.066 |
| Graphite-BmoRoL | 2958 | 2.56E-06 | 0.90771 |
| Graphite-BmoRoL-BSA | 5314 | 2.30E-06 | 0.91197 |
| Graphite-BmoRoL-BSA-Uncont. sera | 8194 | 2.17E-06 | 0.91055 |
| Graphite-BmoRoL-BSA-Cont. sera | 10907 | 2.69E-06 | 0.88825 |

Table 2. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

| | <i>sample</i> | <i>R2</i> (Ω) | <i>Q</i> (<i>F</i>) | <i>n</i> | |
|----------------------------|---------------|------------------------|-----------------------|----------|---------|
| BmoRoL/Uncontaminated sera | A | 8194 | 2.17E-06 | 0.91055 | |
| | | 7300 | 2.00E-06 | 0.90218 | |
| | B | 6979 | 1.93E-06 | 0.90619 | |
| | | 3866 | 2.47E-06 | 0.90325 | |
| | | 5861 | 2.34E-06 | 0.90718 | |
| BmoRoL/ Contaminated sera | C | 17304 | 1.90E-06 | 0.90211 | |
| | | 10907 | 2.69E-06 | 0.88825 | |
| | D | 9333 | 1.89E-06 | 0.89216 | |
| | | E | 5983 | 2,94E-06 | 0.90023 |
| | | | 9116 | 2,24E-06 | 0.90278 |
| | F | 8916 | 2,24E-06 | 0.90816 | |
| | | 9170 | 3,32E-06 | 0.86156 | |
| | | 7096 | 2,98E-06 | 0.86497 | |
| | | 6723 | 3,06E-06 | 0.86622 | |

CONCLUSÕES

- As raízes de *B. monandra* contêm BmoRoL, a qual foi purificada por cromatografia de afinidade em gel de guar em quantidades de miligramas e com elevada atividade hemaglutinante específica.
- Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos de coelho revelaram que o tampão citrato fosfato 0,01 M, pH 6,5, contendo NaCl 0,15 M (tampão selecionado) foi eficiente para extração da lectina BmoRoL.
- BmoRoL não teve sua atividade hemaglutinante aumentada em presença de íons Ca^{++} e Mg^{++} .
- O aquecimento demonstrou que BmoRoL é uma lectina que perde atividade à 70 °C.
- BmoRoL em PAGE para proteínas nativas revelou sua natureza básica; SDS-PAGE mostrou a lectina purificada, apresentando massa molecular aparente de 26 kDa; coloração com reagente de Schiff revelou a natureza glicoprotéica de BmoRoL.
- BmoRoL possui atividade antifúngica, com inibição de mais de 30% no crescimento de *Fusarium solani*.
- BmoRoL foi capaz de induzir a morte de cupins, operários e soldados, da espécie *N. Corniger*; foi ativa sobre as duas castas, sendo mais eficiente sobre os operários.
- As técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica demonstraram que BmoRoL adsorve em superfícies de eletrodos de platina ou grafite, aumentando a resistência impedimétrica após sua adsorção.
- A técnicas de AFM mostrou que BmoRoL apresentou 2 nm de altura.
- A caracterização por IES mostrou respostas impedimétrica diferentes para glicoproteínas comerciais, bem com, para interação com soro de pacientes contaminados e não contaminados com Leishimania.
- A caracterização por AFM mostrou que BmoRoL apresenta uma altura de 2 nm.

