



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Produção de lectina em culturas de tecidos de *Bauhinia monandra* (calos, raízes convencionais e transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*); avaliação de extratos das folhas da planta como fonte de compostos antioxidantes e hipoglicemiantes**

**ADRIANA CARLA CAVALCANTE MALTA ARGÔLO**

**Recife-2003**

**Produção de lectina em culturas de tecidos de *Bauhinia monandra*  
(calos, raízes convencionais e transformadas por *Agrobacterium  
rhizogenes*); avaliação de extratos das folhas da planta como fonte de  
compostos antioxidantes e hipoglicemiantes**

**ADRIANA CARLA CAVALCANTE MALTA ARGÔLO**

**Tese de doutoramento  
apresentada ao Doutorado em  
Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de  
Pernambuco como pré-requisito  
para obtenção do título de Doutor  
em Ciências Biológicas, área de  
concentração em Biotecnologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho  
Orientadora externa: Profa. Dra. Marcia Pletsch (UFAL)**

**Recife, abril de 2003**

**Dirige os meus passos nos teus  
caminhos, para que as minhas  
pegadas não vacilem.**

**Salmo 17.5**

A meus pais, Rivaldo e Benedita, a quem devo tudo o que sou; por me fazerem acreditar que o mais importante na vida é crer em Deus e saber que Ele estará sempre presente, olhando por nós.

A meus irmãos, Ana Paula, André e Francisco pelo carinho e constante apoio.

A meus sobrinhos, Gabriel, Maria Eduarda e Renata, por serem o colorido da minha vida.

## Agradeco

À Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela brilhante orientação científica, dedicação e estímulo constantes durante a realização deste trabalho; pela confiança em mim depositada e, principalmente pela amizade nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Márcia Pletsch, por ter aceitado manter o vínculo semeado no mestrado, pelo seu desprendimento e competência, amizade, experiência compartilhada, orientação e colaboração científica.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio G. De Sant'Ana (Universidade Federal de Alagoas), pela oportunidade, confiança e apoio durante o desenvolvimento de parte dos experimentos em seu laboratório.

À Profa. Dra. Ana Durce Oliveira Paixão por ter me recebido em seu laboratório, proporcionando que parte deste trabalho pudesse ser desenvolvida, pela colaboração científica e confiança.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, pela colaboração científica e estímulo constante na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, pela valiosa atenção, pelo incentivo e companheirismo.

À Maria Barbosa Reis da Silva, pela dedicação à minha pessoa, pelo apoio técnico e principalmente pela convivência amiga. A você declaro toda minha admiração e carinho.

Ao Sr. Valeriano Duzi, por ceder os extratos hidroalcoólicos de *B. monandra*, para realização dos testes de atividade hipoglicemiante.

A todos que fazem o Laboratório de Glicoproteínas, pelo ambiente de amizade e colaboração, pela ajuda diária e dedicada; em especial, Andréia Ramalho, Clébia, Cynthia, Elba, Edilson, Jessoneide, Maria Danielly, Marta, Michele, Neila, Regina, Valdenira e Vanessa.

Às minha amigas Ana Conceição, Andréa Santos, Flávia Araújo, Mariana Fernandes, Nathalia Varejão e Renata Angeli pela sincera e dedicada amizade.

À Flávia Guinhos e Janesmar Cavalcanti, pelo simples fato de fazerem parte da minha vida, de quem sempre recebi todo o carinho e incentivo.

Aos colegas do Doutorado em Ciências Biológicas, em especial, Ana Catarina e Laura Bruno, pela sincera amizade e excelente convivência.

A todos que fazem o Departamento de Bioquímica da UFPE, funcionários e técnicos, em especial ao Sr. João, exemplo de competência e profissionalismo.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais da UFAL, Brancilene, Keila, Luiz Alberto e Rui, pelos momentos de troca de idéias, pela amizade sincera.

À secretária do doutorado, Adenilda; à Jaciene e Liane pela atenção e apoio.

À minha família, de quem recebi amor, carinho e estímulo na busca de novos horizontes. Em especial à minha mãe, que sempre esteve ao meu lado e à minha irmã, Ana Paula pelo apoio e incentivo, valorizando assim o meu trabalho.

Um agradecimento especial à minha tia Laura Argollo, por ter me proporcionado uma estrutura familiar com carinho e respeito, decisiva para que eu pudesse me dedicar, nestes quatro anos, ao meu curso. Às minhas primas Larissa e Raissa, pela convivência carinhosa, paciência e amizade.

À querida tia Norma pelo carinho e apoio constante e a meu tio Gerson Argolo sempre acreditando e incentivando meus projetos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

À CAPES pela concessão da Bolsa.

A Deus, por me conceder a graça de viver este momento.

## RESUMO

Lectinas, proteínas que reconhecem especifica e reversivelmente carboidratos, podem ser purificadas por cromatografia de afinidade. O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) inclui espécies nativas ou introduzidas usadas no tratamento de diabetes. Uma lectina específica à galactose foi previamente purificada de folhas de *B. monandra* (BmoLL) e disponível em quantidades de miligramas; IgG anti BmoLL de coelho estava também disponível, como tal e conjugada à peroxidase. O trabalho teve por objetivo produzir lectinas em diferentes culturas de tecidos de *B. monandra* (calos, raízes convencionais e transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*), imunodetectar lectina nas diferentes preparações de *B. monandra* através de técnicas de imunodifusão e transferência eletroforética, assim como avaliar extratos das folhas da planta como fonte de compostos antioxidantes e hipoglicemiantes. Culturas foram obtidas de sementes de *B. monandra*; extratos (10 %, p/v) e preparações F 0-60% foram realizadas com tampão citrato-fosfato 10 mM, pH 6.5. Atividade hemaglutinante foi detectada na F 0-60% das culturas de tecidos quando testadas com eritrócitos de coelho e humanos do grupo sanguíneo AB. Imunodifusão com anti-BmoLL IgG revelou linhas de precipitação em todas as culturas. A eletroforese em gel de poliácridamida da F 0-60% das culturas de tecidos apresentou padrão de bandas de massa molecular similar a BmoLL. Polipeptídeos de diferentes preparações de *B. monandra* interagiram com anti-BmoLL IgG. Folhas de *B. monandra* contêm no mínimo três diferentes compostos com atividade antioxidante. O efeito agudo de extrato etanólico (E) de folhas de *B. monandra* foi investigado sobre os níveis de glicose e insulina em ratos Wistar submetidos a má-nutrição intra-uterina (ME) e em seus respectivos controles (CE) comparando com animais tratados com veículo (V), os grupos CV e MV. A administração aguda do E reduziu o nível de glicose, mas não variou a secreção de insulina em ratos controles. A capacidade dos ratos submetidos à má-nutrição intra-uterina de secretar insulina parece ter sido restaurada; a hipoglicemia induzida pelo E foi devido à secreção de insulina.

## ABSTRACT

Lectins, proteins that recognize carbohydrates specifically and reversibly, can be purified by affinity chromatography. The genus *Bauhinia* (Fabaceae) includes native or introduced species that have been used in the treatment of diabetes. A galactose-specific leaf lectin (BmoLL) has been previously purified from *B. monandra* and available in milligram quantities; rabbit anti-BmoLL IgG was also available, as such and conjugated to peroxidase. The aim of this investigation was to produce lectins in different tissue cultures from *B. monandra* (callus, conventional and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots), immunodetect lectin in different *B. monandra* preparations through double immunodiffusion assays and electrophoretic transfer techniques, as well as to evaluate leaf extracts of the plant as a source of antioxidant and hypoglycemic compounds. Cultures were obtained from *B. monandra* seeds; extracts (10 %, w/v) and F 0-60% preparations were performed with 10 mM citrate phosphate buffer, pH 6.5. Haemagglutinating activity was detected in F 0-60% of different tissue cultures, when tested with erythrocytes from rabbit and human blood group AB. Immunodiffusion with anti-BmoLL IgG revealed precipitation lines in all cultures. SDS-PAGE of F 0-60 % from different tissue cultures showed a band pattern of molecular weights similar to BmoLL. Polypeptides of different preparations from *B. monandra* interacted with anti-BmoLL IgG. *B. monandra* leaves contain at least three different compounds with antioxidant activity. It was investigated the acute effect of an ethanolic extract from *B. monandra* leaves (**E**) on glucose and insulin levels of control (CE) and intrauterine malnutrition (ME) Wistar rats in comparison with animals submitted to vehicle (V) and groups CV and MV. Acute **E** administration reduced the glucose level, but did not change the secretion of insulin in C rats. The capacity of rats submitted to intra-uterine malnutrition to secrete insulin was apparently restored; hypoglycemia induced by **E** was due to insulin secretion.



## SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	7
ABSTRACT	8
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	11
SUMÁRIO	9
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Generalidades sobre lectinas	12
1.2 Definição	13
1.3 Funções e ocorrência na natureza	14
1.4 Classificação	17
1.5 Purificação e caracterização	19
1.6 Desenvolvimento e Imunoaplicação de anticorpos	21
1.7 Generalidades sobre metabólitos secundários	21
1.8 Cultura de tecidos vegetais	25
1.8.1 Culturas não organizadas: calos e suspensões celulares	26
1.8.2 Culturas organizadas: brotos folhares e raízes	28
1.9 Transformação genética de plantas	29
1.9.1 Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	29
1.9.1.1 Transferência do T-DNA	30
1.9.1.2 Organização do T-DNA	32
1.9.2 Vantagens e aplicações das raízes transformadas pela <i>A. rhizogenes</i>	34
<b>1.10 Radicais livres e compostos antioxidantes</b>	<b>35</b>
1.11 Generalidades sobre <i>B. monandra</i>	38

2 Objetivos	40
2.1 Geral	40
2.2 Específicos	40
Referências	41
<b>3 CAPÍTULO I:</b>	<b>52</b>
Antioxidant activity of leaf extracts from <i>Bauhinia monandra</i>	56
<b>CAPÍTULO II:</b>	<b>72</b>
Production of <i>Bauhinia monandra</i> lectin from callus, conventional and <i>Agrobacterium rhizogenes</i> -transformed root cultures: immunodetection with anti- <i>B. monandra</i> leaf lectin IgG	73
<b>CAPÍTULO III:</b>	<b>95</b>
Ethanol extract of <i>Bauhinia monandra</i> leaf increases insulin secretion in rats subjected to intrauterine malnutrition	96
4 Conclusões	110
ANEXOS	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
Figura 1: Principais rotas biossintéticas do metabolismo secundário derivadas do metabolismo primário	12
Figura 2: Principais aplicações do cultivo <i>in vitro</i> de células vegetais. O explante pode ser folha, hipocótilo, caule, raiz, semente ou inflorescências	14
Figura 3: Transferência do T-DNA da <i>Agrobacterium</i> para as células de plantas	19
Figura 4: Organização geral dos plasmídeos: A) Ti (octopina) B) Ri (agropina) em <i>Agrobacterium</i>	21
Figura 5: Mecanismo enzimático de defesa contra as espécies reativas de oxigênio	25
Figura 6: Flores (A) e folhas (B) de <i>B. monandra</i>	28

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>PÁG.</b>
Tabela 1: Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas de plantas	6
Tabela 2: Famílias de lectinas de plantas-ocorrência e especificidade	7
Tabela 3: Exemplos de metabólitos secundários de origem vegetal de interesse para o homem	10
Tabela 4: Exemplos de compostos produzidos por sistemas não organizados	16
Tabela 5: Exemplos de metabólitos secundários produzidos por culturas de raízes transformadas.	23

## 1 Introdução

### 1.1 Generalidades sobre lectinas

A primeira lectina vegetal foi descrita por Herman Stillmark em 1888, enquanto estudava a toxicidade de sementes de mamona (*Ricinus communis*); obteve uma proteína que aglutinava células vermelhas do sangue (Goldstein *et al.*, 1980; Pusztai, 1991; Peumans & Van Damme, 1998). Posteriormente, em 1889, H. Hellin descobriu que o extrato tóxico de sementes de feijão jequiriti (*Abrus precatorius*) também causava aglutinação de células sanguíneas e a nova proteína recebeu o nome de abrina (Sharon & Lis, 1987). Essas proteínas com atividade hemaglutinante, imediatamente atraíram a atenção de Paul Ehrlich em 1891 e foram usadas em seus estudos imunológicos (Kennedy *et al.*, 1995). Ele demonstrou, por exemplo, que camundongos se tornaram imunes a doses letais de ricina após terem recebido pequenas doses subcutâneas da toxina, repetidamente. A primeira determinação quantitativa de um anticorpo *in vitro* foi realizada por Ehrlich em 1897, quando foi demonstrado que o soro de camundongos imunes poderia neutralizar o efeito tóxico da ricina e que esta ação era específica, uma vez que o soro anti-abrina, de animais imunizados com abrina, não neutralizava os efeitos tóxicos da ricina e vice-versa.

Landsteiner e Raubitschek (1908) observaram que um mesmo extrato de planta apresentava diferentes propriedades de aglutinação quando testadas com células sanguíneas de animais distintos. A primeira aglutinina de planta obtida na forma pura foi a concanavalina A (Con A) a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*. Em 1936, Sumner e Howell demonstraram que além da propriedade de aglutinar células, a Con A também precipitava glicogênio e amido a partir de solução e que sua atividade hemaglutinante podia ser inibida pelo açúcar de cana. Eles sugeriram que a aglutinação se dava em consequência de uma reação da proteína com carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos (Lis & Sharon, 1981), abrindo deste modo, o caminho para o reconhecimento de que aglutininas de plantas são específicas a carboidratos. Em 1945, William Boyd relatou que extratos salinos de *Phaseolus lunatos* ou *P. limensis* aglutinavam apenas eritrócitos humanos do tipo A e não os tipos B ou O. Estudos com lectinas específicas ao tipo sanguíneo, em

meados de 1950, mostraram que a atividade hemaglutinante específica por eritrócitos humanos do tipo A, B e O foi inibida por  $\alpha$ -N-acetil-galactosamina,  $\alpha$ -galactose e  $\alpha$ -L-fucose, respectivamente (Sharon & Lis, 1972; Kennedy *et al.*, 1995). Posteriormente, a partir de 1960, duas descobertas contribuíram significativamente para a realização do imenso potencial das lectinas na pesquisa biológica. Peter Nowell observou que a aglutinina de *P. vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina ou PHA, possuía capacidade de estimular a mitose de linfócitos, resultando em um grande impacto na imunologia. A segunda descoberta foi feita por Joseph Aub, em 1963, o qual relatou que a aglutinina de *Triticum vulgaris*, germe de trigo (WGA), aglutinou células malignas em concentrações muito mais baixas do que aquelas necessárias para a aglutinação de células normais (Sharon & Lis, 1987). Essa capacidade de aglutinar preferencialmente células malignas também foi observada para outras aglutininas, tais como a Con A, a lectina de *Glycine max* (feijão-de-soja), iniciando assim, um amplo campo de estudo e aplicação biológica das lectinas.

## 1.2 Definição

A primeira definição de lectinas foi proposta por Boyd e Shapleigh (1954), os quais usaram o termo “lectina”, do latim *lectus*, que significa escolhido, para especificar a propriedade geral que as lectinas possuem em serem seletivas quanto à interação com carboidratos. Tendo em vista o enorme interesse demonstrado pelas lectinas e por estarem amplamente presentes na natureza, Goldstein e colaboradores (1980) definiram lectinas como proteínas de origem não imune, que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos através de pelo menos dois sítios de ligação, aglutinam células vegetais e animais e precipitam polissacarídeos e glicoconjugados. Os sítios de ligação a carboidratos estão localizados na superfície celular da proteína; esta seletividade é obtida através de ligações de hidrogênio e interações de van der Wals entre o açúcar e a molécula protéica. As lectinas se caracterizam pela sua atividade específica de ligação a carboidratos ou oligossacarídeos; a hidrofobicidade é a principal força de interação (Sharon & Lis, 1990; Kennedy *et al.*, 1995; Elgavish & Shaanan, 1997).

Atualmente, a definição mais usada para as lectinas, baseada em suas estruturas, é aquela proposta por Peumans e Van Damme (1995). Deste modo, eles definiram lectinas como proteínas de origem não imune contendo pelo menos um sítio não-catalítico de ligação reversível a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans & Van Damme, 1998; Peumans *et al.*, 2001). Com base na ampla variedade de suas estruturas moleculares, lectinas de plantas foram divididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (Peumans & Van Damme, 1998) e mais recentemente, superlectinas (Peumans *et al.*, 2001). Merolectinas possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos. Devido ao caráter monovalente, as merolectinas não possuem a capacidade de precipitar ou aglutinar células. Exemplos de merolectinas incluem a heveína, lectina de *Hevea brasiliensis* e as proteínas monoméricas ligantes de manose, isoladas de orquídeas. Hololectinas possuem dois ou mais sítios idênticos ou com alto grau de homologia, capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas são hololectinas. Quimerolectinas se caracterizam por apresentar, além de pelo menos um sítio de ligação a carboidratos, um outro domínio com atividade biológica distinta da ligação a carboidratos (atividade enzimática, atividade inativadora de ribossomas, etc.). Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas. Como exemplo, proteínas inativadoras de ribossomas tipo II (RIPs tipo II) aglutinam células, enquanto as quitinases classe I, não. Por último, superlectinas são compostas de pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos. Diferentemente das hololectinas, os sítios de ligação a carboidratos das superlectinas não são idênticos ou similares, que reconhecem carboidratos estruturalmente diferentes. Um exemplo de superlectina é a lectina do bulbo de tulipa, a qual possui dois sítios de ligação a carboidratos, sendo um específico para manose e outro para N-acetilgalactosamina (Peumans *et al.*, 2001).

### **1.3. Funções, aplicações e ocorrência na natureza**

Um grande número de possíveis funções fisiológicas para as lectinas tem sido proposto (Peumans & Van Damme, 1995). O reconhecimento entre lectinas e moléculas receptoras pode ocorrer em três níveis distintos, a saber, dentro da

célula, entre diferentes células do mesmo organismo, ou entre diferentes organismos. Como resultado, as lectinas têm uma função na própria planta, nas interações entre plantas e microrganismos, ou fora das plantas.

Na própria planta, as lectinas estão supostamente envolvidas nos processos tais como transporte de carboidratos, alongamento da parede celular, interações célula-célula, regulação do crescimento, reconhecimento dos receptores nas membranas, ou para funcionar como enzimas ou proteínas de armazenamento (Pusztai, 1991).

Um possível envolvimento das lectinas nas interações entre plantas e microrganismos tem sido proposto para o reconhecimento e/ou ligação de bactéria simbiótica a raízes de leguminosas (van Rhijn *et al.*, 1998) e para a defesa das plantas contra bactérias e fungos. Finalmente, fora da planta, as lectinas são designadas para ter uma função na proteção das plantas contra outros microrganismos e predadores.

Lectinas de plantas não diferem apenas nas suas estruturas moleculares e propriedades bioquímicas, mas exibem também uma ampla variedade de especificidade de ligação a carboidratos (Van Damme *et al.*, 1996; Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Wititsuwannakul *et al.*, 1998). Como consequência, as lectinas são usadas como ferramentas para a investigação funcional e estrutural de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas e para a análise de mudanças que ocorrem na superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, partindo da diferenciação celular ao câncer (Sharon & Lis, 2001). Atualmente, elas despertam intensa atenção por atuarem como determinantes no reconhecimento em diversos processos biológicos, tais como a retirada de glicoproteínas a partir do sistema circulatório, controle do tráfego intracelular de glicoproteínas, adesão de agentes infecciosos às células hospedeiras, recrutamento de leucócitos aos sítios inflamatórios (Sharon & Lis, 2001), bem como, interações no sistema imune, a saber: estimulação mitogênica e produção de interferon sobre linfócitos humanos (Moreira *et al.*, 1998; Ye & Ng, 2002), atividade inibitória da transcriptase reversa do HIV-1 e estimulação da produção de nitrito por macrófagos peritoneais de murinos (Ye & Ng, 2002).

As lectinas constituem ferramentas valiosas para a detecção e isolamento de glicoproteínas e caracterização parcial da porção carboidrato dessas glicoproteínas, assim como o acompanhamento de mudanças que

ocorrem nos açúcares em processos como desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (Lis & Sharon, 1998; Sharon & Lis, 2001). As lectinas possuem a capacidade adicional para distinguir entre diferentes tipos de células, incluindo células normais e malignas. Por exemplo, tem sido relatado que células transformadas são freqüentemente mais sensíveis aos efeitos de lectinas do que as células normais (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003). Uma das aplicações que mais proporcionaram notoriedade às lectinas como ferramentas úteis em imunologia é a capacidade de estimular resposta mitogênica em linfócitos humanos. Essa propriedade foi descoberta em 1960 por Nowell, avaliando o efeito da PHA sobre linfócitos humanos (Nomura *et al.*, 1998; Janeway *et al.*, 2000). Outras lectinas com atividade mitogênica foram identificadas, destacando-se a Con A, a lectina de *Ulex europeus*, a de *Vicia faba*, a “pokeweed mitogen”, PWM (Janeway *et al.*, 2000). A resposta ao estímulo de linfócitos com Con A inclui também o aumento da expressão de receptores de citocinas (IL-2) na superfície linfocitária, favorecendo ainda mais o processo de ativação celular (Janeway *et al.*, 2000). Galectina-3, uma proteína ligante a galactosídeos, mostrou-se capaz de ativar linfócitos através da interação com glicoconjugados da superfície celular, sendo assim conhecida como mitógeno (Inohara *et al.*, 1998).

Lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microorganismos, animais e plantas. Nas plantas, as lectinas estão presentes em todos os tecidos. A maioria das lectinas têm sido purificadas e caracterizadas de sementes de leguminosas, representando cerca de 10 % do conteúdo de proteína total (Spilatro *et al.*, 1996), embora várias lectinas também foram isoladas da família das Moraceae (Moreira *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 1998). Várias lectinas foram isoladas de raízes (Yamaguchi *et al.*, 1997) e entrecasca (Wititsuwannakul *et al.*, 1998), frutos (Peumans *et al.*, 1998), bulbos (Mo *et al.*, 1994), rizomas (Peumans *et al.*, 1997), folhas (Coelho & Silva, 2000; Ratanapo *et al.*, 2001) e tubérculos (Ashford *et al.*, 1982; Allen *et al.*, 1996).

#### **1.4 Classificação**

As lectinas podem ser classificadas em grupos distintos de reconhecimento, de acordo com os carboidratos simples ou complexos que



apresentam maior ação inibitória (Tabela 1). Recentemente, dois novos grupos de especificidade foram incluídos com a descoberta de lectinas monocotiledôneas, ligantes de manose, e de uma lectina específica à manose/maltose isolada de *Calystegia sepium* (Peumans & Van Damme, 1998). Muitas lectinas não se enquadram em nenhum destes grupos de especificidade, por não se ligarem a mono ou dissacarídeos, requerendo glicanos mais complexos para inibição da atividade hemaglutinante, como PHA (Peumans & Van Damme, 1998) e a lectina de *Pisum sativum* (Loris *et al.*, 1998).

Tabela 1: Especificidade de ligação a carboidratos das lectinas de plantas

<b>Especificidade</b>	<b>Exemplo de lectinas</b>
<b>Grupo Fucose</b>	
Fucose	<i>Ulex europaeus</i> I
<b>Grupo Galactose/ N-acetilgalactosamina</b>	
Galactose>>GalNAc	<i>Artocarpus integrifolia</i>
Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	<i>Glicine max</i>
<b>Grupo N-acetilglicosamina</b>	
GlcNAc	<i>Triticum aestivum</i>
(GlcNAc) <sub>n</sub>	<i>Urtica dioica</i>
<b>Grupo Manose</b>	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/ glicose	<i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Cratylia mollis</i>
Manose/ maltose	<i>Calystegia sepium</i>
<b>Grupo Ácido siálico</b>	
Ácido siálico	<i>Triticum aestivum</i>
Neu5Ac $\alpha$ (2,6)gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Ac $\alpha$ (2,3)gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
<b>Grupo Glicano Complexo</b>	
Complexo com especificidade conhecida	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Complexo com especificidade desconhecida	<i>Euonymus europaeus</i>

A maioria das lectinas pode ainda ser classificada em um número relativamente pequeno de famílias, de acordo com a sua relação evolucionária e estrutural (Tabela 2), sendo as lectinas de legumes e as ligadoras de quitinas as mais abundantes (Peumans & Van Damme, 1998; Sharon & Lis, 2001).

Tabela 2: Famílias de lectinas de plantas-ocorrência e especificidade

Grupos de lectinas	Distribuição taxonômica	Ocorrência	
		número de lectinas identificadas	Especificidade
Legumes	Legumes	> 100	Diversas
Ligadoras de quitina	Mono e dicotiledôneas	> 100	GlcNAc ou (GlcNAc) <sub>n</sub>
Ligadoras de manose	Liliales	> 50	Manose
RIP Tipo 2	Mono e dicotiledôneas	> 20	Gal, GalNAc ou Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc
Cucurbitaceae	Cucurbitaceae	< 10	(GlcNAc) <sub>n</sub>
Jacalina	Moraceae	< 10	Gal
Amaranthaceae	Amaranthaceae	< 10	GalNAc

### 1.5 Purificação e caracterização

A primeira etapa para purificação de lectinas de diferentes fontes envolve a preparação de extratos em solução salina ou tampão. Uma vez apresentando atividade hemaglutinante, esses extratos podem ter suas lectinas parcialmente purificadas através de fracionamento salino com sulfato de amônio (diferentes concentrações), diálise exaustiva (Kabir *et al.*, 1998) ou fracionamento dependente de pH. A precipitação com sulfato de amônio pode estabilizar a atividade hemaglutinante, mesmo após longos períodos de armazenamento (Kennedy *et al.*, 1995). Várias técnicas convencionais contribuem para a purificação de lectinas, com base na carga ou tamanho da proteína. A cromatografia de troca iônica pode ser usada para separar as proteínas com cargas elétricas diferentes, uma vez que as proteínas são adsorvidas à matriz

por meio das interações iônicas com o adsorvente. A quebra das interações por modificação do pH ou por agentes que competem pelos grupos carregados da matriz adsorvente leva ao desprendimento de proteínas em frações distintas, dependendo da ligação de cada componente da amostra à matriz (Kennedy *et al.*, 1995). Exemplos de trocadores utilizados para purificação de lectinas são DEAE-Celulose (Ng & Yu, 2001), CM-Celulose (Pajic *et al.*, 2002) e, DEAE-Sephadex (Ratanapo *et al.*, 2001).

A cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel, separa as proteínas de acordo com o tamanho molecular. A coluna contém um polímero entrecruzado com os poros de tamanho selecionado. As proteínas maiores migram mais rapidamente que as menores; as proteínas grandes não penetram nos poros das esferas e, assim, tomam um caminho mais direto através da coluna. O suporte mais utilizado na cromatografia de filtração em gel é Sephadex (Ratanapo *et al.*, 2001).

Através da propriedade de reconhecimento a carboidratos, as lectinas podem ser purificadas por cromatografia de afinidade. Estas proteínas podem ser adsorvidas especificamente e com alta afinidade à molécula ligante imobilizada em suporte, ou em polissacarídeos. A dessorção da lectina da matriz de afinidade pode ser efetuada biosseletivamente, usando um carboidrato como competidor, ou não biosseletivamente, por mudanças de pH ou de força iônica. Diferentes matrizes de afinidade para lectinas são escolhidas de acordo com a especificidade a carboidratos, a qual pode ser definida através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, usando monossacarídeos simples ou carboidratos complexos.

Lectinas específicas para glicose/manose e/ou seus derivados podem ser purificadas com os géis de dextranas, como Sephadex com diferentes limites de exclusão (G-50 a G200). Exemplos de lectinas com especificidade glicose/manose são as lectinas de *Cratylia mollis* (Paiva & Coelho, 1992; Correia & Coelho, 1995) e *Cratylia floribunda* (Assreuy *et al.*, 1997). Lectinas com especificidade para N-acetilglicosamina e seus oligossacarídeos podem usar quitina como uma matriz de afinidade (Sales *et al.*, 1996). Aquelas específicas para galactose e seus derivados podem ser purificadas em matrizes de afinidade, usando géis de Sepharose (Peumans *et al.*, 1996) e gel de guar (Coelho & Silva, 2000).

Os métodos eletroforéticos são utilizados para a caracterização estrutural de proteínas, assim como para o estabelecimento do grau de pureza da proteína. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (presença de sulfato sódico de dodecila-SDS) e redutoras (presença de  $\beta$ -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 uma técnica utilizada para analisar a pureza de estruturas moleculares nativas.

### **1.6 Desenvolvimento e Imunoaplicação de anticorpos**

Com o desenvolvimento de anti-soros e imunoglobulinas G purificadas (IgG) é possível detectar a ligação das lectinas aos diferentes tecidos, sejam eles vegetais ou animais, ou as diferentes espécies que as originam (Ashford *et al.*, 1982; Aoki *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2003). Janković & Vićovac (2000) examinaram placenta humana para detectar a presença de moléculas antigênicamente relacionadas a lectina de planta, WGA. Os resultados iniciais de imunolocalização usando anticorpos policlonais contra WGA mostraram que a placenta humana contém proteínas especificamente reconhecidas.

Uma outra aplicação para os soros anti-lectina ou IgG anti-lectina é a avaliação destas aglutininas quanto à homologia entre lectinas de uma mesma espécie (Correia & Coelho, 1995; Machuka *et al.*, 1999) ou entre espécies diferentes (Nsimba-Lubaki *et al.*, 1986; Peumans *et al.*, 2000). A caracterização dos anticorpos pode ser realizada através de técnicas como imunodifusão (Ashford *et al.*, 1982; Nsimba-Lubaki *et al.*, 1986), transferência eletroforética (Silva *et al.*, 2002a; Villanueva *et al.*, 2002) e ensaio imunoabsorvente ligado à enzima, do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA (Correia & Coelho, 1995; Rawson *et al.*, 2002).

## 1.7 Generalidades sobre metabólitos secundários

As plantas superiores são consideradas como fontes indispensáveis de produtos naturais, muitos dos quais apresentam relevante importância biológica e econômica. Elas têm tido uma função notável na medicina tradicional de diferentes países. Os metabólitos primários são essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta; as reações metabólicas que os originam estão estritamente balanceadas e os intermediários metabólicos, raramente se acumulam (Luckner, 1984).

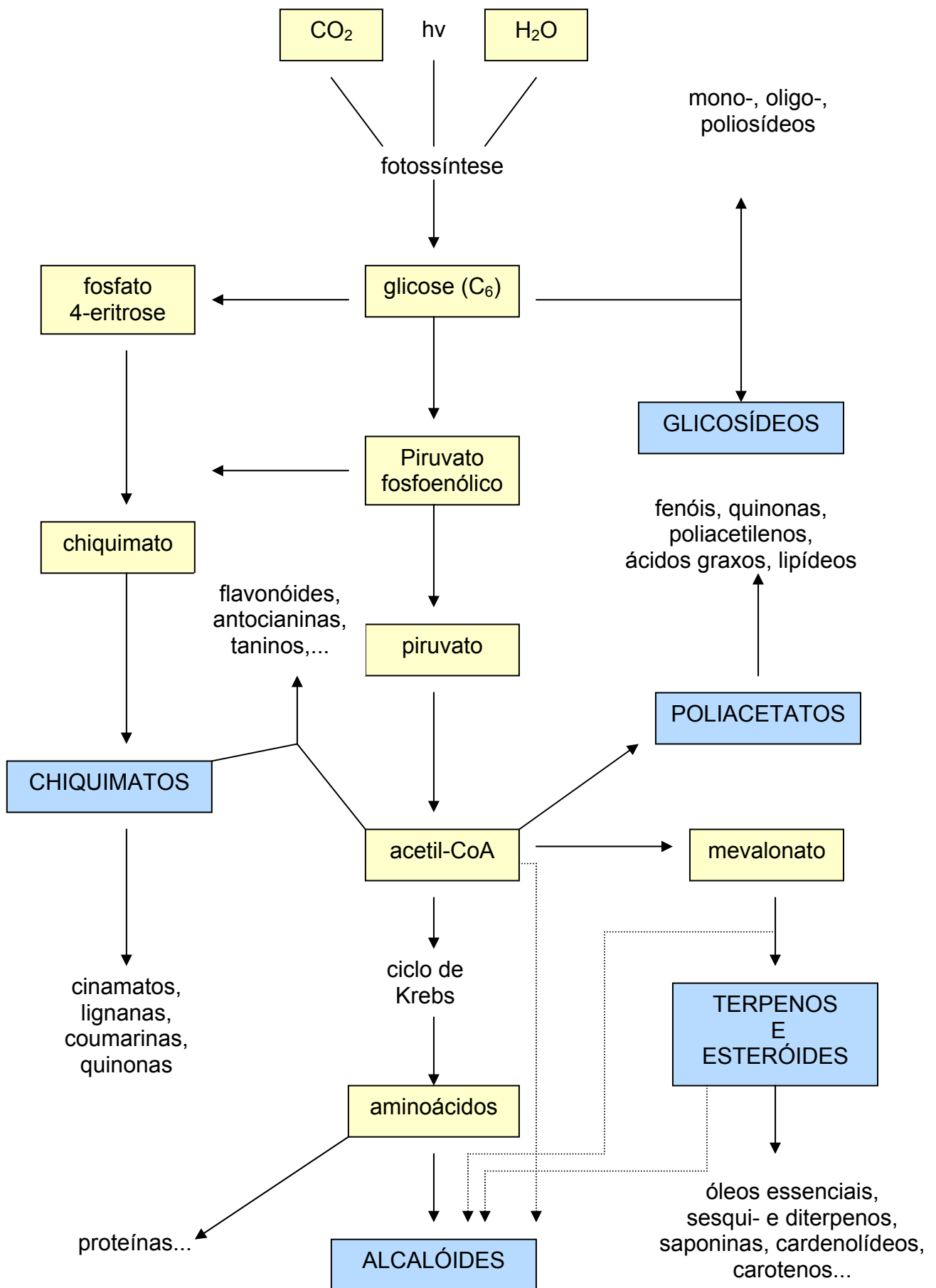
Os metabólitos secundários podem ser definidos como produtos naturais, geralmente de origem vegetal, os quais não desempenham função direta nas atividades que regulam o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos em que eles ocorrem (Bell, 1981). Estes compostos são derivados dos produtos do metabolismo primário, mais freqüentemente da acetil-CoA, de aminoácidos ou do chiquimato (Figura 1) pela ação de enzimas específicas que provavelmente surgem pela duplicação e divergência dos genes que codificam o metabolismo primário (Cavalier-Smith, 1992; Sajc *et al.*, 2000). Suas funções estão mais relacionadas com o meio ambiente, proteção frente a animais predadores, microrganismos patógenos, estresse ambiental e associadas à polinização. Entre os vegetais superiores, os metabólitos secundários podem atuar também como agentes alelopáticos e entre os animais, como precursores de feromônios (Harborne, 1982).

Uma vez que os metabólitos secundários estão envolvidos nas interações bioquímicas entre organismos (planta-planta, planta-microrganismo, planta-animal, animal-animal), muitos deles possuem atividades biológicas úteis ao homem (Wink, 1990). Como conseqüência, um grande número destes compostos são importantes economicamente, servindo como medicamentos, agroquímicos, flavorizantes, fragrâncias e cosméticos. Exemplos de tais produtos incluem a artemisinina, um sesquiterpenóide com atividade antimalarial, presente nas partes aéreas da *Artemisia annua* (Asteraceae) e o paclitaxel, um diterpenóide encontrado em *Taxus brevifolia* (Taxaceae) com propriedades antitumorais (Harborne & Baxter, 1993). A Tabela 3 mostra outros exemplos de metabólitos secundários e suas aplicações.

**Tabela 3: Exemplos de metabólitos secundários de origem vegetal de interesse para o homem**

<b>Espécie</b>	<b>Produto</b>	<b>Aplicação</b>
<i>Atropa belladonna</i>	hiosciamina	anestésico
<i>Catharanthus roseus</i>	vincristina, vinblastina	antileucêmico
<i>Lycopersicon esculentum</i>	licopeno	pigmento usado na indústria alimentícia
<i>Digitalis lanata</i>	digoxina	cardiotônico
<i>Nicotiana</i> spp.	nicotina	inseticida
<i>Rubia</i> spp.	alizarina	pigmento usado na indústria têxtil
<i>Camellia sinensis</i>	cafeína	estimulante do SNC
<i>Jasminum</i> spp.	óleo de jasmim	componente de cosméticos e perfumes

Os processos de produção comercial de compostos vegetais biologicamente ativos incluem as técnicas agrícolas tradicionais, a síntese química, os processos biotecnológicos, além das várias combinações entre os mesmos. O processo biotecnológico é uma alternativa de produção adequada principalmente para aqueles compostos cuja complexidade estrutural não viabiliza a síntese química, aqueles cujas fontes naturais se encontram ameaçadas de extinção ou ainda aqueles oriundos de espécies com longo período vegetativo, isto é, que levam muito tempo para atingir a maturidade (Pletsch, 1998). Por outro lado, o processo biotecnológico oferece a vantagem de ser um sistema de produção bem definido de compostos biologicamente ativos, resultando em altos rendimentos e maior qualidade do produto (Sajc *et al.*, 2002).



Um dos fatores que limitam o emprego de plantas selvagens como fonte de metabólitos secundários é a constância do seu suprimento, pois muitas espécies vegetais de interesse crescem em regiões pouco acessíveis geograficamente ou restritas por imposições políticas. Por outro lado, muitas espécies domesticadas levam vários anos para atingir a maturidade, como pode ser exemplificado pela *Panax ginseng* (Araliaceae), de cujas raízes se extraem as saponinas triterpenóides ginsenosídeos com propriedades estimulante e antitumoral e pela *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae), fonte de naftoquinona shiconina, com atividade antiinflamatória e antisséptica, além de ser um pigmento usado na indústria cosmética. Ambas requerem de 4 a 7 anos para produzir quantidades significativas dos compostos ativos (Nigra, 1990). A síntese química, por sua vez, só é viável economicamente quando o composto de interesse apresentar uma estrutura molecular com poucos centros quirais, o que não é o caso para a maioria destes compostos. Por exemplo, a síntese total do paclitaxel, que representou um desafio durante mais de 20 anos, requer várias etapas de reação (Nicolaou *et al.*, 1994) e, por isso, não pode ser aplicada industrialmente.

Os processos biotecnológicos compreendem técnicas fermentativas, através das quais os compostos são produzidos por células ou órgãos vegetais cultivados em biorreatores e técnicas de micropropagação, através das quais os clones selecionados por sua alta produtividade e livres de doenças são propagados *in vitro*, permitindo a obtenção rápida de um grande número de mudas. As técnicas de engenharia genética podem ser utilizadas em ambos os processos com o objetivo de se aumentar o acúmulo do metabólito desejado. As técnicas biotecnológicas se caracterizam por empregarem a cultura de tecidos vegetais tanto para a produção de biomassa, como para a transformação genética das células vegetais e sua posterior regeneração em plantas íntegras.

### **1.8 Cultura de tecidos vegetais**

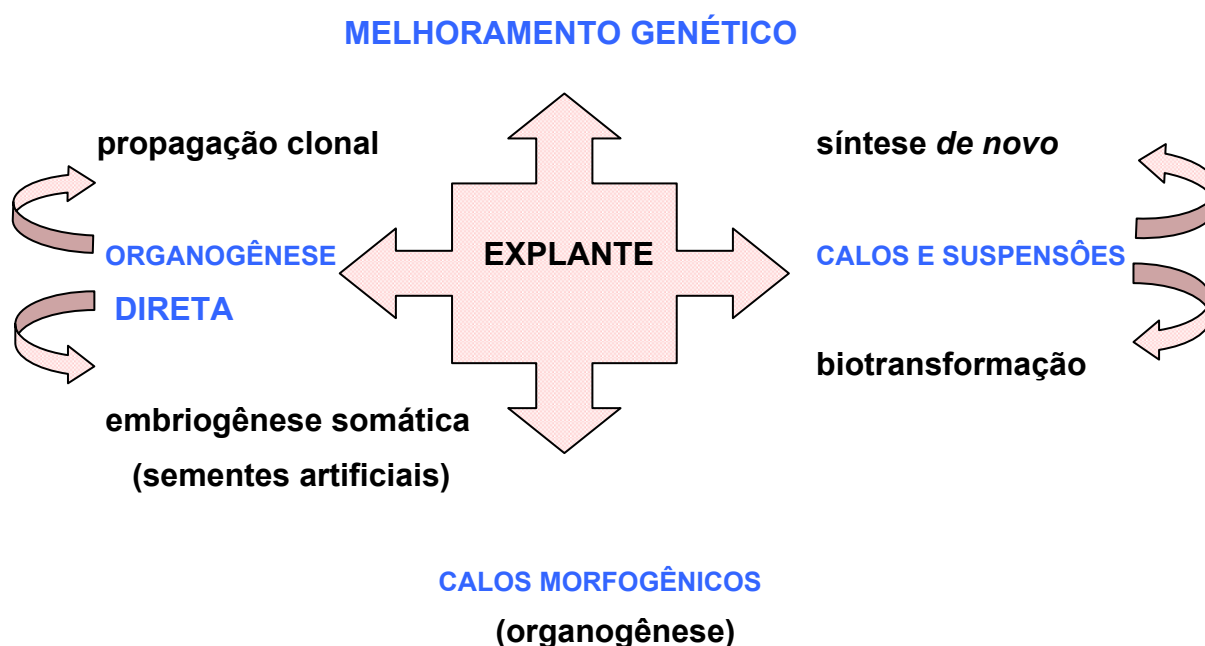
A cultura *in vitro* de células e tecidos vegetais consiste no crescimento e multiplicação dos mesmos em condições estéreis num meio nutritivo artificial, líquido ou sólido, com luminosidade e temperatura controladas. A expressão “cultura de tecidos” é usada para descrever todos os tipos de culturas sejam



plantas íntegras, culturas de órgãos (raízes, caules, folhas, partes imaturas das flores, frutos imaturos), culturas de embriões (maduros ou imaturos), culturas de células (calos ou suspensões) ou culturas de protoplastos (George, 1993; Canto-Canché & Loyola-Vargas, 1999). A Figura 2 resume as principais aplicações da cultura de tecidos vegetais.

### 1.8.1 Culturas não organizadas: calos e suspensões celulares

Os calos são agregados de células que se multiplicam de forma não organizada e podem ser obtidos *in vitro* através do cultivo de pequenos explantes em um meio nutritivo contendo componentes orgânicos e inorgânicos, bem como reguladores de crescimento, do tipo auxinas e citocininas (George, 1993).



**Figura 2:** Principais aplicações do cultivo *in vitro* de células vegetais. O explante pode ser folha, hipocótilo, caule, raiz, semente ou inflorescências.

As culturas de calos podem ser iniciadas a partir de qualquer parte da planta incluindo raízes, brotos e folhas, porém é mais fácil obter calos de órgãos

mais jovens, tais como os meristemas apical e axilar. As culturas de suspensões celulares são iniciadas a partir de calos friáveis ou a partir de protoplastos. Estas crescem mais rapidamente do que as culturas de calos, sendo morfológicamente mais homogêneas o que as torna excelentes sistemas modelos para o estudo da biossíntese de metabólitos secundários, expressão de genes, purificação enzimática e indução do acúmulo de metabólitos secundários (Zenk, 1991; Króllicka *et al.*, 2001).

Em muitos casos, as culturas não organizadas não produzem o composto desejado ou, se o produzem, o mesmo é acumulado em concentrações mais baixas do que aquelas encontradas na planta *in vivo*. Como exemplo, podemos citar os alcalóides indólicos vincristina e vinblastina, potentes anticancerígenos, os quais são acumulados em pequenas quantidades nas partes aéreas da planta *in vivo*, porém não são produzidos em suspensões celulares de *Catharanthus roseus* (Staba, 1985). Uma possível explicação para este fato é que a síntese e acúmulo dos metabólitos secundários estão restritos a órgãos e tecidos específicos e dependem do estágio de desenvolvimento da planta. O acúmulo destes metabólitos não é o resultado de um processo simples, mas de interações complexas entre biossíntese, transporte, armazenagem e degradação (Wink, 1990). Estes processos estão relacionados à diferenciação celular e até o momento não se descobriu como desvinculá-los.

A Tabela 4 ilustra exemplos de compostos produzidos por sistemas não organizados (em níveis inviáveis comercialmente). Existem apenas três exemplos de compostos, berberina, ginsenosídeos e shiconina, cuja produção comercial é feita em reator (Sajc *et al.*, 2000). À luz do conhecimento atual, a produção de compostos vegetais bioativos (síntese *de novo*) em reator é inviável, devido aos enormes custos e à baixa produtividade das culturas a qual é, em parte, consequência também da sua instabilidade genética (euploidia e aneuploidia). Os calos e suspensões celulares, entretanto, são excelentes fontes de enzimas que podem ser utilizadas na bioconversão de intermediários metabólicos (sintéticos ou não).

Tabela 4 Exemplos de compostos produzidos por sistemas não organizados

<b>Espécies</b>	<b>Compostos</b>	<b>Culturas % ps</b>	<b>Planta % ps</b>	<b>Referências</b>
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	shiconina	12,0	1,5	Fujita & Tabata, 1987
<i>Panax Ginseng</i>	ginsenosídeos	27,0	4,5	Stafford, 1991
<i>Catharanthus roseus</i>	ajmalicina	1,0	0,3	Barz <i>et al.</i> , 1977
	serpentina	0,8	0,5	
<i>Coleus blumei</i>	ac. rosmarínico	15,0	3,0	Nigra, 1990
<i>Dioscorea deltoidea</i>	diosgenina	2,0	2,0	Stafford, 1991

ps: peso seco

### 1.8.2 Culturas organizadas: brotos folhaves e raízes

A diferenciação celular é pré-requisito para a produção de certos metabólitos secundários e por isso as culturas de raízes e brotos folhaves acumulam compostos que os calos e suspensões celulares não acumulam. Por exemplo, através da morfogênese de calos em raízes observou-se um aumento no acúmulo de valepotriatos em culturas de *Valeriana* e *Centranthus* spp., os quais são comparáveis aos níveis da planta intacta (Charlwood & Brown, 1988). Da mesma forma as culturas de brotos de *Cinchona ledgeriana* acumulam altos níveis de quinina e seus alcalóides correspondentes, o que não ocorre nas culturas de suspensões celulares. Outro exemplo é a cultura de brotos de *Digitalis*, a qual pode acumular mais glicosídeos cardíacos do que as culturas não organizadas (Stafford, 1991).

Isso pode ser explicado pelo fato de que as culturas diferenciadas expressam os genes que codificam enzimas específicas das rotas biossintéticas secundárias, além de possuírem os sistemas de transporte e armazenamento necessários ao acúmulo do composto. Outra vantagem das raízes e brotos sobre os calos e suspensões celulares é que as primeiras possuem estabilidade cromossômica *in vitro* durante período prolongado.

A morfogênese ou organogênese pode ser induzida em calos ou suspensões celulares sendo a mesma dependente de vários fatores (George, 1993): a) do genótipo do material vegetal cultivado sendo a facilidade de

formação de raízes, brotos ou embriões variáveis entre famílias, gêneros e espécies devido aos diferentes níveis de reguladores de crescimento endógenos; b) dos componentes do meio de cultura sendo essencial que os nutrientes orgânicos, inorgânicos e os reguladores de crescimento estejam corretamente balanceados; c) da natureza física do meio de cultura, sólido ou líquido; d) das condições ambientais, do tipo temperatura e luminosidade; e) da idade da cultura tornando-se mais difícil induzir morfogênese em culturas que tenham sido mantidas no estado indiferenciado durante um longo período de tempo; f) dos fatores relacionados ao tipo de explante que deu origem aos calos e suspensões, condições ambientais em que a planta mãe estava submetida, tipo tamanho e idade do explante usado.

Dentre as culturas organizadas, deve-se destacar um tipo particular de cultura de raízes as quais são induzidas não por reguladores de crescimento, mas através da infecção das plantas ou pequenos explantes com a *Agrobacterium rhizogenes* (seção 1.9.1).

## **1.9 Transformação genética de plantas**

A engenharia genética envolve a transferência de genes específicos para o genoma das células, órgãos ou plantas e a conseqüente obtenção de variedades transgênicas com características morfológicas e bioquímicas alteradas. Basicamente, a metodologia envolve técnicas de transformação genética, seleção do material vegetal transformado, regeneração em planta (na maioria dos casos), comprovação da integração do gene no genoma e análise dos produtos da sua expressão (Walden & Wingender, 1995).

Existem vários métodos de transferência de genes para as plantas, porém os mais usados são: i) a transformação via *Agrobacterium* e ii) a transformação biolística (balística biológica ou bombardeamento), segundo Potrykus & Spangenberg (1995). Dar-se-á ênfase apenas ao primeiro método por ser o mais comum e por ter sido empregado na obtenção das culturas de raízes utilizadas nos experimentos descritos no presente trabalho.

### 1.9.1 Transformação mediada por *Agrobacterium*

Este tipo de método utiliza a *Agrobacterium* como vetor para a transferência de genes e está baseada nas propriedades do plasmídeo indutor de tumor (Ti) da *A. tumefaciens* e do plasmídeo indutor de raiz (Ri) da *A. rhizogenes*. Estes plasmídeos são segmentos circulares de DNA extracromossômicos, com cerca de 200 - 250 kb de tamanho, os quais possuem a capacidade de autoreplicação. A bactéria é capaz de transferir segmentos destes plasmídeos para a planta infectada, cuja integração e expressão na célula vegetal hospedeira resulta nas doenças galha de coroa (*crown gall*) e raízes em cabeleira (*hairy roots*), produzidas respectivamente pela *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*. Os plasmídeos Ti e Ri possuem quatro regiões funcionais: i) o T-DNA (*transferred DNA*), delimitada por segmentos repetidos de 25 pb conhecidos como borda direita (BD) e borda esquerda (BE); ii) a região *vir* constituída por um operon cujos produtos são necessários para a transferência do T-DNA; iii) a região *con*, envolvida com os processos conjugativos da bactéria e iv) a região *ori*, envolvida com a manutenção e replicação do plasmídeo na *Agrobacterium* (Armitage *et al.*, 1988).

#### 1.9.1.1 Transferência do T-DNA

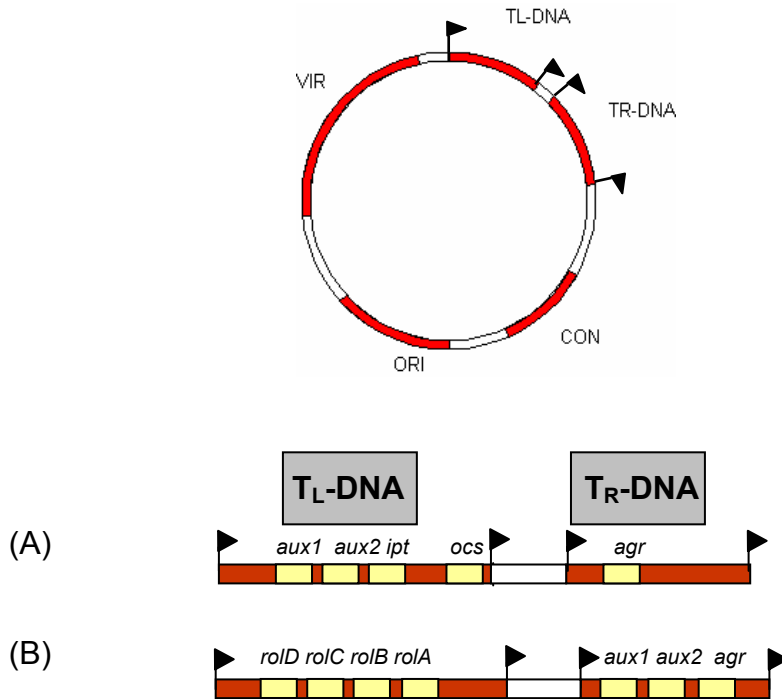
A *Agrobacterium* não infecta células de tecidos intactos, mas apenas tecidos feridos, pois as células danificadas exudam compostos fenólicos que são utilizados na síntese de lignina durante o processo de cicatrização, tais como acetosiringona e  $\alpha$ -hidroxiaacetosiringona, que atuam como indutores do operon *vir*. A região *vir* está organizada em sete grupos de genes *virA*, *virB*, *virD* e *virG*, *virC*, *virE* e *virF*, sendo os 4 primeiros essenciais para a transferência do T-DNA. O produto do gene *virA* atua como sensor dos compostos fenólicos e transmite sinais ao *virG*, cuja expressão resulta na ativação e transcrição dos demais genes do operon (Figura 3). As proteínas do *virD* são responsáveis pelo relaxamento do T-DNA (atividade topoisomerase, *virD1*) e clivagem das bordas do T-DNA (atividade endonuclease, *virD2*). Esta última liga-se à extremidade 5' do T-DNA, protegendo o mesmo durante a transferência, juntamente com a proteína do *virE* (que recobre o T-DNA) e pilotando o mesmo para o núcleo da

planta. Uma vez incorporado no genoma, os genes contidos no T-DNA são expressos, resultando na produção pela planta de aminoácidos essenciais ao metabolismo da bactéria (opinas) e também de auxinas e citocininas que são as responsáveis pela formação de tumores, do tipo galhas ou raízes que resultam da expressão dos oncogenes (Baron & Zambryski, 1995). Uma ou mais cópias de T-DNA podem ser integradas no genoma da planta e a localização das mesmas é aparentemente aleatória.

### 1.9.1.2 Organização do T-DNA

As opinas são moléculas conjugadas de aminoácidos com açúcares que não têm função nas células vegetais; a *Agrobacterium* induz a planta a sintetizar opinas e as utiliza como fonte de energia. A *Agrobacterium* é de acordo com as opinas produzidas: octopina e nopalina são duas opinas encontradas nas galhas induzidas por *A. tumefaciens*, assim como agropina e manopina são encontradas em raízes em cabeleira, induzidas por *A. rhizogenes*.

O T-DNA da *A. tumefaciens* tipo octopina e da *A. rhizogenes* tipo agropina é descontínuo, isto é, está dividido em dois segmentos independentes, T-DNA esquerdo ( $T_L$ ) e T-DNA direito ( $T_R$ ). O T-DNA da *A. tumefaciens* tipo nopalina e o T-DNA da *A. rhizogenes* tipo manopina/cucumopina é contínuo. A seguir encontram-se descritos comparativamente o T-DNA da *A. tumefaciens* tipo octopina e o T-DNA da *A. rhizogenes* tipo agropina (Draper *et al.*, 1988), pois a cepa LBA9402 de *A. rhizogenes* usada nos experimentos descritos abaixo contém o plasmídeo pRi1855, tipo agropina (Figura 4).



**Figura 4: Organização geral dos plasmídeos em *Agrobacterium*, do tipo Ti, octopina (A) e Ri, agropina (B).**

O T<sub>L</sub>-DNA do plasmídeo Ti do tipo octopina contém os genes *tms1*, *tms2* (*aux1*, *aux2*) responsáveis pela síntese de auxinas e os genes *tmr* (*ipt*) responsáveis pela produção de citocininas, denominados oncogenes; além destes, existe um gene que codifica a octopina sintase (*ocs*). O T<sub>R</sub>-DNA contém os genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de manopina e sua conversão a agropina (*agr*). O T<sub>L</sub>-DNA do plasmídeo Ri tipo agropina não é homólogo a nenhum T-DNA de plasmídeo Ti e contém os genes *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD*, os quais não estão envolvidos na síntese de auxinas e citocininas, mas que são capazes de controlar a diferenciação e o desenvolvimento celular (Spena *et al.*, 1987). O produto destes genes regula a concentração endógena de auxinas e citocininas através da clivagem de suas formas glicosídicas conjugadas inativas. Embora cada um destes genes possa influenciar independentemente a morfogênese, a formação e o crescimento das raízes é mais eficiente quando todos estiverem presentes. O T<sub>R</sub>-DNA do plasmídeo Ri contém genes para a produção de manopina ou agropina juntamente com genes que codificam a síntese de auxinas, os quais apresentam grande homologia com os genes do plasmídeo da *A. tumefaciens*, *aux1* e *aux2*.

### **1.9.2 Vantagens e aplicações das raízes transformadas pela *A. rhizogenes***

As culturas de raízes em cabeleira são sistemas *in vitro* muito usados no estudo do metabolismo secundário de plantas, compreendendo estudos sobre:

- i) a função de enzimas específicas na rota biossintética de um composto ou grupo de compostos, a função de enzimas que interconectam o metabolismo primário e secundário e o grau de regulação que exercem sobre uma determinada rota metabólica;
- ii) os mecanismos envolvidos no processo de armazenamento de metabólitos secundários;
- iii) as etapas intermediárias das vias biossintéticas, bem como a comprovação de rotas hipotéticas;
- iv) a origem biogénica de compostos relacionados;
- v) a transformação estrutural de substâncias com o fim de torná-las mais ativas;

Além disso, as raízes transformadas representam uma das alternativas mais promissoras para a produção de compostos economicamente importantes, para a regeneração de plantas transgênicas com características fenotípicas desejáveis, para o incremento da biomassa radicular em plantas que apresentam dificuldade de enraizamento (recalcitrantes), para a produção de enzimas comercialmente importantes, para o estudo do metabolismo degradativo e da enzimologia relacionada a fitorremediação (Canto-Canché & Loyola-Vargas, 1999; Pletsch *et al.*, 1999). Adicionalmente, altos níveis de metabólitos secundários podem ser obtidos em culturas organizadas comparadas a culturas não organizadas (Towler & Weathers, 2003).

Estas culturas são caracterizadas por possuírem uma alta estabilidade genética e bioquímica (Rhodes *et al.*, 1990; Canto-Canché & Loyola-Vargas, 1999). Tais culturas crescem rapidamente, sem a necessidade da adição de reguladores de crescimento, geralmente são muito ramificadas e não apresentam geotropismo (Devi & Rani, 2002).

Em alguns casos, os níveis de metabólitos secundários nas culturas de raízes transformadas são semelhantes aqueles das raízes da planta *in vivo* e às vezes mais elevados (Doerk-Schmitz *et al.*, 1994; Ogasawara *et al.*, 1993). Um bom exemplo da superioridade das raízes transformadas em relação ao acúmulo de metabólitos secundários é dado pelo trabalho de Takeda e



colaboradores (1994), através do qual foram obtidas raízes de *Trichosanthes kirilowii* com um teor de ácido brionólico 50 vezes maior que as raízes da planta mãe. Em outros casos, o perfil qualitativo dos compostos extraídos das raízes *in vivo* é completamente diferente das raízes transformadas e novos compostos foram encontrados nestas últimas, os quais estão ausentes na planta mãe (Kennedy *et al.*, 1993; Granicher *et al.*, 1995).

A Tabela 5 ilustra alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por culturas de raízes em cabeleira.

Tabela 5: Exemplos de metabólitos secundários produzidos por culturas de raízes transformadas.

Metabólitos	Espécies	Referência
Solasodina	<i>Solanum aviculare</i>	Kittipongpatana <i>et al.</i> , 1999
	<i>S. aviculare</i>	Argôlo <i>et al.</i> , 2000
Ginsenosídeos	<i>Panax ginseng</i>	Lodhi, 1995
Hiosciamina	<i>Hyoscyamus niger</i>	Parr <i>et al.</i> , 1990
Nicotina	<i>Nicotiana rustica</i>	Rhodes <i>et al.</i> , 1990
Iridóides monoterpênicos	<i>Valeriana officinalis</i>	Christofides, 1997
Shiconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shimoura <i>et al.</i> , 1991

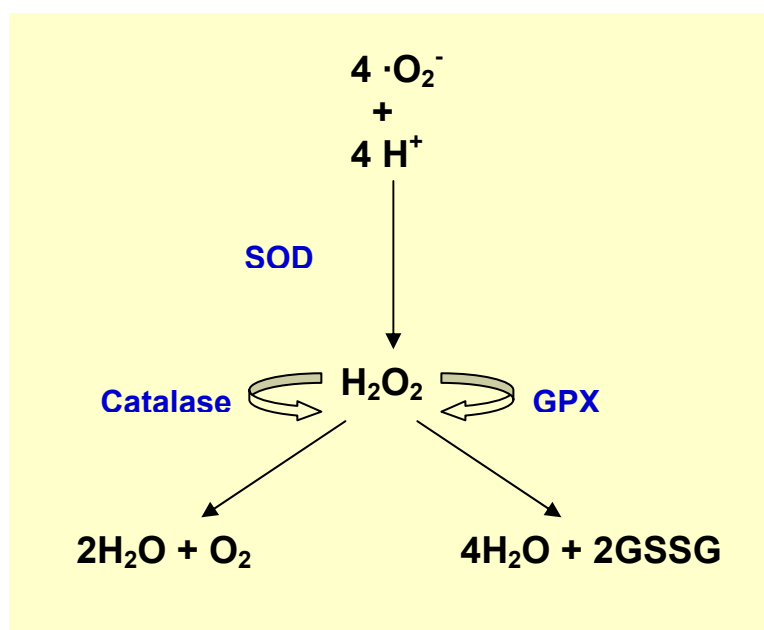
### 1.10 Radicais livres e compostos antioxidantes

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive oxygen species*, ROS) incluindo ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o óxido nítrico (NO) são consideradas como agentes de envelhecimento e de várias doenças humanas, tais como doenças neurodegenerativas, câncer e doenças cardiovasculares (Choi *et al.*, 2002). Superóxido e peróxido de hidrogênio são as espécies reativas de oxigênio formadas primariamente por células fagocíticas. Nos processos inflamatórios o superóxido pode reagir com o peróxido de hidrogênio levando ao mais deletério ROS, o radical hidroxila

(Gomes *et al.*, 2001). O óxido nítrico reage com o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) produzindo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é um radical livre altamente reativo e está relacionado com a mediação da toxicidade do NO. Nos organismos vivos várias espécies reativas de oxigênio podem ser formadas por diferentes caminhos. Na respiração aeróbica normal, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares estimulados e peroxissomas são as principais fontes endógenas de muitos dos antioxidantes produzidos pelas células. Fontes exógenas de radicais livres incluem radiação, tabagismo, poluentes, solventes orgânicos e pesticidas (Gülçin *et al.*, 2002).

Substâncias conhecidas como antioxidantes atuam na destruição dos radicais livres. Antioxidante é qualquer substância que retarda ou previne a deterioração, dano ou destruição provocados pela oxidação. A autooxidação de moléculas biológicas pelo oxigênio molecular, como lipídeos, proteínas e DNA, está envolvida no desenvolvimento de inúmeras patologias (Yoshida *et al.*, 2003). Tal oxidação geralmente procede por um mecanismo de reação em cadeia pelo radical livre e os antioxidantes, tais como vitamina E, ácido ascórbico, catalase, glutathione e carotenóides, suprimem a oxidação e protegem as moléculas biológicas e tecidos dos danos oxidativos.

A glutathione (GSH) atua na proteção contra esses radicais. Trata-se de um tripeptídeo que reage principalmente com peróxidos orgânicos, evitando que estes oxidem outros componentes celulares, como o DNA. Essa reação é catalisada pela enzima glutathione peroxidase (GPX) e tem como produto a glutathione oxidada (Figura 5). A superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPX) transformam as espécies reativas de oxigênio, que incluem os radicais de oxigênio e os peróxidos. A superóxido dismutase converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pode ser convertido a água e oxigênio de duas maneiras: 1) pela ação da catalase presente no citossol, 2) pela ação da glutathione peroxidase localizada no citossol e nas mitocôndrias. Uma vez que sua concentração na célula é altíssima, a glutathione atua como eficiente agente antioxidante.



**Figura 5: Mecanismo enzimático de defesa contra as espécies reativas de oxigênio.**

Plantas constituem uma importante fonte de produtos naturais ativos, os quais diferem em termos de estrutura e propriedades biológicas. Nos últimos anos, a prevenção de câncer e doenças cardiovasculares está associada com a ingestão de vegetais, frutas ou chás como fontes de antioxidantes naturais (Johnson, 2001; Virgili *et al.*, 2001). Existe uma grande evidência de que uma alta ingestão de tais compostos está associada com um baixo risco de mortalidade a partir destas doenças (Lim *et al.*, 2001), assim como diabetes (McCune & Johns, 2002), hipertensão (Ajith & Janardhanan, 2002) e aterosclerose (Tziveleka *et al.*, 2002).

Os efeitos protetores de produtos vegetais são devidos à presença de vários tipos de moléculas, as quais têm mecanismos de ação distintos; algumas são enzimas e proteínas e outras são compostos de baixo peso molecular, tais como vitaminas (Halliwell, 1996; Head, 1998), carotenóides (Edge *et al.*, 1997), flavonóides (Zhang & Wang, 2002), antocianinas e outros compostos fenólicos (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Sakihama *et al.*, 2002). Rice-Evans *et al.* (1997) relataram que compostos fenólicos de plantas, incluindo flavonóides, são potentes antioxidantes com efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos.

O uso do radical sintético estável 1,1-difenilpicrilhidrazila (DPPH) como um reagente para testar a atividade antioxidante de moléculas pequenas tem sido descrito (Brand-Williams *et al.*, 1995; Soler-Rivas *et al.*, 2000). A capacidade de captura de radicais (do inglês *Radical Scavenging Capacity*, RSC) de compostos puros ou extratos de plantas podem ser avaliadas pela reação deste radical em metanol. Neste ensaio, a captura do radical DPPH é acompanhada pelo monitoramento da diminuição da absorbância a 515 nm, o qual ocorre devido à redução pelo composto antioxidante (Sultanova *et al.*, 2001).

O ensaio antioxidante com DPPH é um método conveniente para testar pequenas moléculas; a reação pode ser observada visualmente usando técnicas simples como cromatografia em camada delgada (CCD), bem como análise da intensidade da reação por ensaios espectrofotométricos (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Soler-Rivas *et al.*, 2000). O radical DPPH é capturado por antioxidantes através da doação de hidrogênio para formar a molécula estável de DPPH reduzido. Os radicais antioxidantes são estabilizados através da formação de produtos não radicalares (Brand-Williams *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2002).

### **1.11 Desnutrição intrauterina**

A má-nutrição pré-natal tem sido apontada como um indutor de intolerância à glicose no organismo, sendo portanto um determinante etiológico de alguns casos de diabetes melitus não insulino dependente (DMNID). Uma combinação de resistência tecidual à ação de insulina e uma resposta anormal de insulina à glicose, constituem uma característica de DMNID (Langley *et al.*, 1994). Em adição, tem sido relatado que ratos submetidos à má-nutrição intrauterina exibem oligonefrenia e hipertensão (Paixão *et al.*, 2001), alterações na homeostase de glicose com secreção reduzida de insulina. Hiperglicemia leva a doenças renais e cardiovasculares, em parte, mediada pela aterosclerose induzida pelo estresse oxidativo. A desnutrição pré-natal induz também distúrbios funcionais como resistência à insulina. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, esta patologia apresenta um alto índice de morbimortalidade e, embora seja uma desordem complexa, vários pesquisadores têm sugerido que há uma forte prevalência em populações que

apresentaram baixo peso ao nascimento (Hoy *et al.*, 1999). A diabetes é o maior fator de risco para aterosclerose, que compromete a capacidade de contração das células musculares lisas da parede arterial e a resistência aos exercícios físicos. Adicionalmente, esses estudos corroboram com os dados de doença renal crônica em população com baixo peso no nascimento, fator que também agrava a aterosclerose, compromete a capacidade aos exercícios físicos e, finalmente, piora a qualidade de vida das populações.

### 1.12 Generalidades sobre *B. monandra*

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) compreende aproximadamente 300 espécies encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental e oriental (Lewis, 1987). Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com este gênero indicam que o mesmo é constituído principalmente de lactonas, terpenóides, esteróides, taninos, quinonas e flavonóides, os quais possuem diversas utilidades (Silva & Cechinel Filho, 2002). Por exemplo, os flavonóides da casca de *B. manca* apresentaram propriedades antifúngicas (Achenbach *et al.*, 1988). O gênero *Bauhinia* inclui um número de espécies ornamentais, bem distribuídas nas cidades brasileiras. As espécies nativas ou introduzidas são usadas como agentes terapêuticos para tratamento de diabetes e como diurético. Infusões de folhas de *B. monandra* têm sido usadas freqüentemente na medicina popular. *B. forficata* também apresentou atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Pepato *et al.*, 2002) e por aloxano (Silva *et al.*, 2002b). Os polifenóis (flavonóides) presentes no extrato hidroalcoólico (1000 mg/kg) das sementes de *B. variegata* mostraram efeito hipoglicemiante em ratos, nos quais o diabetes foi induzido por streptozotocina, 55 mg/kg (Silva & Cechinel Filho, 2002).

*B. monandra* (Figura 5) é uma planta nativa da Ásia, sendo encontrada também na Índia, Nigéria, algumas regiões da África e na América do Sul (Badami & Daulatabad, 1969). É conhecida vulgarmente como pata-de-vaca por possuir folhas bifoliadas, podendo também ser conhecida como unha-de vaca, unha-de boi, unha-de-anta e mororó (Baloung & Fetuga, 1985; Caribé & Campos, 1991).

A atividade hemaglutinante detectada em várias espécies de *Bauhinia* está associada à presença de lectinas. Uma lectina específica à galactose (BmoLL) foi purificada das folhas de *B. monandra* (Coelho & Silva, 2000).



**Figura 6: flores (A) e folhas (B) de *B. monandra*.**

Fonte: <http://dsp-159.imerhost.com/mgonline/BauhiniaMonandra/monandra.html>

## 2 Objetivos

### 2.1 Geral

Produzir lectina em culturas de tecidos de *Bauhinia monandra* e avaliar o extrato das folhas da planta como fonte de compostos antioxidantes e hipoglicemiantes.

### 2.2 Específicos

- Induzir a formação de diferentes culturas de tecidos de *B. monandra* (calos, raízes convencionais e transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*).
- Imunodetectar lectina em diferentes culturas de tecidos de *B. monandra* (calos, raízes convencionais e transformadas) através de técnicas de imunodifusão e transferência eletroforética.
- Avaliar preparação de folhas de *B. monandra* como fonte de compostos antioxidantes.
- Avaliar a atividade hipoglicemiante de extrato hidroalcoólico de folhas de *B. monandra* em ratos com diabetes tipo 2.

## Referências

- Achenbach, H., Stöcker, M., Constenla, A. (1988). Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, 27, 1835-1841.
- Ajith, T. A. & Janardhanan, K. K. (2002). Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, 81, 387-391.
- Allen, N. K., Bolwell, G. P., Brown, D. S., Sidebottom, C. & Slabas, A. R. (1996). Potato lectin: a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 28, 1285-1291.
- Aoki, N., Matsuda, T., Sakiyama, T., Iwatsuki, K., Furukawa, K. (1997). Species-specific  $\beta$ -N-acetylgalactosaminylation of serum IgG proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1334, 207-213.
- Argôlo, A. C. C., Charlwood, B. V., Pletsch, M. (2000). The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Solanum aviculare*. **Planta Medica**, 66, 448-451.
- Armitage, P., Walden, R. & Draper, J. (1988). Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*. Em: **Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual** (Draper, J., Scott, R., Armitage, P. & Walden, R. eds.) p. 1. Blackwell, Oxford.
- Ashford, D., Allen, A. K., Neuberger, A. (1982). The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. **Biochemistry**, 201, 641-645.
- Badami, R. C. & Daulatabad, C. D. (1969). Component acids of *Bauhinia* seed oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 20, 99-100.
- Balogun, A. M. & Fetuga, B. L. (1985). Fatty acid composition of seed oils of some members of the Leguminosae family. **Food Chemistry**, 17, 175-182.
- Baron, C. & Zambryski, P. C. (1995). Notes from the underground: highlights from plant-microbe interactions. **Trends Biotechnology**, 13, 356.
- Barz, W., Reinhard, E. & Zenk, M. H. (eds.) (1977). Em: **Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application**. p. 27. Springer-Verlag, Berlin.
- Bell, E. A. (1981). The physiological role(s) of secondary (natural) products. Em **The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise** (Stumppf, P. K. & Conn, E. E. eds.) p. 1. Academic Press, Londres.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Boyd, W. C. & Shapleigh, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 419.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 28, 25-30.

Bruneton, J. (1995) Compounds of Primary Metabolism. Em: **Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants**. p. 1. Intercept Ltd, Andover.

Canto-Canché, B. & Loyola-Vargas, V. M. (1999). **Chemicals from roots, hairy roots, and their application**. Chemicals via Higher Plant Bioengineering (Shahidi et al.) p 235. Kluwer Academic, New York.

Caribé, J. & Campos, J. M. (1991). **Plantas que ajudam o homem: guia prático para a época atual**. São Paulo: Cultrix/Pensamento. 321.

Carlini, C. R., Barcellos, G. B. S., Baeta-Neves, A. D. V., Guimarães, J.A. (1988). Immunoreactivity for concanavalin A among proteins of leguminous seeds. **Phytochemistry**, 27, 25-30.

Cavalier - Smith, T. (1992). Origins of secondary metabolism. Em: **Secondary Metabolites: Their Function and Evolution. CIBA Foundation Symposium 171** (Chadwick, D. J. & Whelan, J. eds.) p. 64. Wiley, Chichester.

Charlwood, B. V. & Brown, J. T. (1988) Transport and storage of secondary metabolites in tissue-cultured plants cells. **Biochem. Soc. Trans.** 16, 61.

Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., Kim & S. K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, 163, 1161-1168.

Coelho, L. C. B. B. & Silva, M. B. R. (2000). Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, 11, 295-300.

Correia, M. T. S. & Coelho, L. C. B. B. (1995). Purification of a Glucose/Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 55, 261-273.

Christofides, C. (1997) *The Alteration of Isoprenoid Production by Manipulation in Artemisia annua and Fedia cornucopiae*. Tese de Doutorado, Universidade de Londres.



Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Devi, P. & Roni, S. (2002). *Agrobacterium rhizogenes* induced rooting of *in vitro* regenerated shoots of the hybrid *Helianthus annuus* x *Helianthus tuberosus*.. **Scientia Horticulturae**, 93, 179-186.

Doerk-Schimitz, K., Witte, L. & Alfermann, A. W. (1994). Tropane alkaloid patterns in plants and hairy roots of *Hyoscyamus albus*. **Phytochemistry**, 35, 107.

Draper, J., Scott, R. & Hamil, J. (1988). Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. Em: **Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual** (Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R. eds.) p. 69. Blackwell, Oxford.

Edge, R., Mcgarvey, D. J. & Truscott T. G. (1997). The carotenoids as antioxidants – A review. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 41, 189-200.

Elgavish, S. & Shaanan, B. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, 22, 462-67.

Fujita, Y. & Tabata, M. (1987). Secondary metabolites from plant cells – pharmaceutical applications and progress in commercial production. Em: **Plant Tissue and Cell Culture**. (Green, E. C., Sommers, D. A., Hackett, W. P. & Biesboer, D. D. eds.) p. 169. Alan R. Liss, New York.

George, E. F. (1993). Plant Tissue Culture Techniques. Em: **Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 The Technology** (George, E. F. ed.) p. 3. Exegetics Ltd, Reading.

Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? **Nature**, 285, 66.

Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Gonzalez, S. & Tedesco, A. C. (2001). The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34, 1487-1494.

Granicher, F., Christen, P., Kamalaprija, P. & Burger, U. (1995). An iridoid diester from *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia* hairy roots. **Phytochemistry**, 38, 103.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Gülçin, I., Oktay, M., Küfrevioğlu, I & Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. **Journal Ethnopharmacology**, 79, 325-329.

Halliwell, B. (1996). Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. **Alternative Medicine Review**, 3, 174-186.

Harborne, J. B. (1982). Biochemical interactions between higher plants. Em: **Introduction to Ecological Biochemistry**. p. 207. Academic Press, Londres.

Harborne, J. B. & Baxter, H. (1993). *Phytochemical Dictionary: Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis, Londres.

Head, K. A. (1998). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant *in vivo*? **Free Radical Research**, 25, 439-454.

Hoy W. E., Rees M., Kile E., Mathews J. D., Wang Z. (1999). A new dimension to the Barker hypothesis: Low birthweight and susceptibility to renal disease. **Kidney Int**; 56, 1072-1077.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Capra, J. D. (2000). O estudo dos linfócitos e Imunidade mediada por células T. **Imunologia. O sistema imunológico na saúde e na doença**, c. 2 e 8, p. 59-60 e 267-69, 4ª ed., Ed Artmed, 2000.

Janković, M. & Vićovac, L. (2000). A specific wheat germ agglutinin-immunoreactive protein in human placenta. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 127, 135-146.

Johnson, I. T. (2001). Antioxidants and antitumour properties. In: **Antioxidants in food**, ed. J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 100-123.

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

Kennedy, J. F., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Cavalcanti, M. S. M. & Coelho, L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, 26, 219-30.

Kennedy, A. I., Deans, S. G., Svoboda, K. P., Gray, A. I. & Waterman, P. G. (1993). Volatile oils from normal and transformed roots of *Artemisia absinthium*. **Phytochemistry**, 32, 1449.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Kittipongpatana, N., Porter, J. R. & Hock, R. S.(1999). An improved high performance liquid chromatographic method for the quantification of solasodine.

**Phytochemical Analysis**, 10, 26.

Królicka, A., Staniszewska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafranek, J. & Łojkowska, E. (2001). Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. **Plant Science**, 160, 259-264.

Landsteiner, K. & Raubitschek, H. (1908). Beobachtungen uber hamolyse und hamagglutination. **Zentralblatt fur Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene**, 45, 660-67.

Langley S. C., Browne R. F., Jackson A. A. (1994). Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. **Comp Biochemical Physiology**. 109A, 223-229

Lewis, G. P. (1987). Legumes of Bahia. Kew Botanic Gardens, 369.

Lim, K-T., Ilu, C. & Kitts, D. D. (2001). Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. **Food and Chemical Toxicology**, 39, 229-237.

Lis, H. & Sharon, N. (1981). **Lectins in higher plants in the biochemistry of plants; a comprehensive treatise. Proteins and nucleic acids** (Marcos, A, 4ed). V. 6, 371-447, Ed. Academic Press, New York, 1981.

Lis, H. & Sharon, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Review**, 98, 637-74.

Lodhi, A. H. (1995). *Biochemical Studies on Rubia tinctorum and R. peregrina: in vitro accumulation and genetic manipulation of anthraquinones*. Tese de Doutorado, Universidade de Londres.

Loris, R. Hamelryck, T., Bouckaert, J. & Wyns, L. (1998) Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1383, 9-36.

Luckner, M. (1984) General Aspects. Em: **Secondary Metabolism in Microorganisms, Plant and Animals**. p. 15. Springer-Verlag, Berlin.

Machuka, J. S., Okeola, O. G., Van Damme, E. J. M., Chrispeels, M. J., Van Leuven, F. & Peumans, W. J. (1999). Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, 51, 721-728.

McCune, L. M. & Johns, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Peoples of North American boreal forest. **Journal of Ethnopharmacology**, 82, 197-205.

Mo, H., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J. & Goldstein, I. J. (1994). Isolation and Characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from Dutch iris bulbs which recognizes the blood group A disaccharide (GalNAc $\alpha$ 1-3Gal). **Journal of Biological Chemistry**, 269, 7666-73.

Moreira, R. A., Castelo-Branco, C. C., Monteiro, A. C. O., Tavares, R. O. & Beltramini, L. M. (1998). Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. Seeds. **Phytochemistry**, 47, 1183-88.

Nomura, K., Ashida, H., Uemura, N., Kushibe, S., Ozaki, T. & Yoshida, M. (1998). Purification and characterisation of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, 49, 667-673.

Nsimba-Lubaki, M., Peumans, W. J., Allen, A. K. (1986). Isolation and characterization of glycoprotein lectins from the bark of three species of elder, *Sambucus ebulus*, *S. nigra* and *S. racemosa*. **Planta**, 168, 113-118.

Nicolaou, K. C., Yang, Z., Liu, J. J., Ueno, H., Nantermet, P. G., Guy, R. K., Clairborne, C. F., Renaud, J., Couladouros, E. A., Paulvannan, K. & Sorensen, E. J. (1994). Total synthesis of taxol. **Nature**, 367, 630.

Nigra, H. M. (1990). *Contribucion al Estudio de la Produccion de Metabolitos Secundarios por Cultivo in vitro de Celulas Vegetales*. Tese de Doutorado. Universidade de Buenos Aires.

Ogasawara, T., Chiba, K. & Tada, M. (1993). Production in high-yield of a naphthoquinone by a hairy root culture of *Sesamum indicum*. **Phytochemistry**, 33, 1095.

Pajic, I., Kljajic, Z., Dogovic, N., Sladic, D., Juranic, Z. & Gasic, M. J. (2002). A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 132, 213-221.

Paiva, P. M. G. & Coelho, L. C. B. B. (1992). Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemical and Biotechnology**, 36, 113-18.

Paixao A. D., Maciel C. R. , Teles M. B., Figueiredo-Silva J. (2001). Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. **Biology Neonate**, 80,

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

239-46.

Parr, A. J., Payne, J., Eagle, J., Chapman, B. T., Robins, R. J. & Rhodes, M. J. C. (1990). Variation in tropane alkaloid accumulation within the Solanaceae and strategies for its exploitation. **Phytochemistry**, 29, 2545.

Pepato MT, Keller EH, Baviera AM, Kettelhut IC, Vendramini RC, Brunetti IL. (2002). Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 81: 191-97.

Peumans, W. J., Van Damme E. J. M., Barre, A. & Rougé, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. Em: The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2, (Wu A. M. ed.) p. 27-54. Kluwer Academic.

Peumans, W. J., Hause, B., Van Damme E. J. M. (2000). The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Letters**, 477, 186-192.

Peumans, W. J., Winter, H. C., Bemer, V., Van Leuven, F., Goldstein, I. J. & Truffa-Bachi, P. (1997). Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate Journal**, 14, 259-265.

Peumans, W. J, Verhaert, P., Pfuller, U. & Van Damme, E. J. M. (1996). Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). **FEBS Letters**, 396, 261-65.

Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M. (1998). Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 15, 199-228.

Peumans, J. W. & Van Damme, E. J. M. (1995) Lectins as plant defence proteins. **Plant Physiology**, 109, 347-352.

Pletsch, M. (1998). A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biociência. Ciência e Desenvolvimento**, 4, 12.

Pletsch, M., Araujo, B. S. & Charwood, B. V. (1999). Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. **Biotechnology Advances**, 17, 679-687.

Potrykus, I. & Spangenberg, G. (1995). Direct gene transfer to protoplasts. Em: **Gene Transfer to Plants**. p. 53. Springer-Verlag, Berlin.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Pusztai, A. (ed.) (1991). **Chemistry & Pharmacology of Natural Products - Plant Lectins**. Cambridge University Press, Cambridge.

Ng, T. B. & Yu, Y. L. (2001). Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 33, 269-277.

Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M. (2001). Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. **Plant Science**, 160, 739-744.

Rawson, R. R., Belov, K., Gigley-Bairol, D., Cooper, W. (2002). Characterization of antisera to recombinant IgA of the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 88, 89-95.

Rhodes, M. J. C., Robins, R. J., Hamil, J. D., Hilton, M. G. & Walton, N. J. (1990). Properties of transformed root cultures. Em: **Secondary Products from Plant Tissue Culture** (Charlwood, B. V. & Rhodes, M. J. C. eds.) p. 201. Clarendon Press, Oxford.

Rosa, J. C., Oliveira, P. S. L., Garrat, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M. C. & Greene, L. J. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the  $\beta$ -prism fold. **Protein Science**, 7, 1-12.

Ross, A., Bouwman, L. H., Munoz, J., Zuiverloon, T., Faber-Krol, M. C., Fallaux-van den Houten, F. C., Klar-Mohamad, N., Hack, C. E., Tilanus, M. G., Daha, M. R. (2003). Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. **Molecular Immunology**, 39, 655-668.

Sajc, L., Grubisic, D. & Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. **Biochemical Engineering Journal**, 4, 89-99.

Sakihama, Y, Cohen, M. F., Grace, S. C. & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, 177, 67-80.

Sales, M. P., Gomes, V. M., Fernandes, K. V. S. & Xavier-Filho, J. (1996). Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 29, 319-326.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76, 270-276.

Sharon, N. & Lis, H. (2001). The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. Em: **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**. (Wu A. M. ed.) p. 1-15. Kluwer Academic.

Sharon, N. & Lis, H (1990). Legume lectins- a large family of homologous proteins. **Journal FASEB**, 4, 3198-208.

Sharon, N. & Lis, H (1987). A century of lectin research (1888-1988). **Trends in Biochemical Sciences**, 12, 488-491.

Sharon, N. & Lis, H (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, 177, 949-959.

Shimoura, K., Sudo, H. & Kamada, H. (1991). Shikonin production and secretion by hairy root culture of *Lithospermum erythrorhizon*. **Plant Cell Reports**. 10, 282.

Silva, L. B., Santos, S. S. S., Azevedo, C. R., Cruz, M. A. L., Venâncio, T. M., Cavalcante, C. P., Uchôa, A. F., Astoli Filho, S., Oliveira, A. E A., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (2002a). The leaves of green plants as well as a cyanobacterium, a red alga, and fungi contain insulin-like antigens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35, 297-303.

Silva FRMB, Szpoganicz B, Pizzolatti MG, Willrich MAV, Sousa E. (2002b). Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 83: 33-7.

Silva, K. L. & Cechinel Filho, V. (2002). Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, 25, 449-454.

Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, 11, 1-9.

Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C. & Schell, J. S. (1987). Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. **EMBO Journal**, 6, 3891.

Spilatro, S. R., Cochran, G. R., Walker, R. E., Cablish, K. L. & Bittner, C. C. (1996). Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, 110, 825-834.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Staba, E. J. (1985). Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products. **Journal Natural Product**, 48, 203.

Stafford, A. (1991). Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. Em: **Plant Cell and Tissue Culture** (Stafford, A. & Warren, G. eds.) p. 124. Wiley, Chichester.

Sultanova, N., Makhmoo, T., Abilov, Z. A., Parween, Z., Omurkamzinova, V. B., Rahman, A., Choudhary, M. I. (2001). Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. **Journal of Ethnopharmacology**. 78, 201-205.

Takeda, T., Kondo, T., Mizukami, H. & Ogihara, Y (1994). Bryonolic acid production in hairy roots of *Trichosanthes kirilowii* Max. var. *japonica* Kitam. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* and its cytotoxic activity. **Chem. Pharm. Bull.** 42, 730.

Towler, M. J. & Weathers, P. J. (2003). Adhesion of plant roots to poly-L-lysine coated polypropylene substrates. **Journal of Biotechnology**, 101, 147-155.

Tziveleka, L. A., Kourounakis, A. P., Kourounakis, P. N., Roussis, V. & Vagias, C. (2002). Antioxidant Potential of Natural and Synthesised Polyprenylated Hydroquinones. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, 10, 935-939.

Van Damme, E. J. M., Barre, A. Rougé, P., Van Leuven, F. & Peumans, W. J. (1996). The NeuAc( $\alpha$ -2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, 235, 128-137.

van Rhijn, P., Goldberg, R. B. & Hirsch, A. M. (1998). *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. **Plant Cell**, 10, 1233.

Virgili, F., Scaccini, C., Packer, L. & Rimbach, G. (2001). Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In: *Antioxidants in food*, ed. J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 87- 99.

Villanueva, M. A. (2002). Elimination of artifacts on native Western blots arising from endogenous lectin activity. **Journal of Biochemical and Biophysical methods**, 50, 141-149.

Walden, R. & Wingender, R. (1995). Gene-transfer and plant-regeneration techniques. **Trends Biotechnology**, 13, 324.



Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Wink, M. (1990) Physiology of secondary product formation in plants. Em: **Secondary Products from Plant Tissue Culture** (Charlwood, B. V. & Rhodes, M. J. C. eds.) p. 23. Clarendon Press, Oxford.

Yamaguchi, M., Jimbo, M., Sakai, R., Muramoto, K & Kamiya, H. (1998). Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 127, 593-597.

Ye, X. Y. & Ng, T. B. (2001). Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 285, 424-429.

Yoshida, Y., Niki, E. & Noguchi, N. (2003). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, 1-13.

Zhang, H.Y. & Wang, L. F. (2002). Theoretical elucidation on structure-antioxidant activity relationships for indolinonic hydroxylamines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 12, 225-227.

Zenk, M. H. (1991). Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. **Phytochemistry**, 30, 3861.

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

### **3 Capítulos**

#### *Capítulo 1*

##### **HAEMAGGLUTINATING ACTIVITY IN TISSUE CULTURES AND ANTIOXIDANT PROPERTIES FROM LEAF PREPARATIONS OF *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca, pulse)**

**VI PHARMATECH/ International Conference on Pharmaceutics and  
Pharmaceutical Technology. Recife, PE, Brasil. 5 a 8 de agosto de 2001.  
Painel Bi-25.**

**Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra***

**Artigo submetido ao periódico Bioresource Technology em 05/03/2003.**

## HAEMAGGLUTINATING ACTIVITY IN TISSUE CULTURES AND ANTIOXIDANT PROPERTIES FROM LEAF PREPARATIONS OF *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca, pulse)

A. C. C. Argôlo<sup>1,2</sup>, M. Pletsch<sup>2</sup> and L. C. B. B. Coelho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife, PE, Brasil.

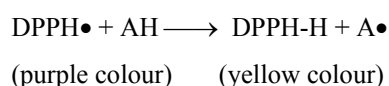
<sup>2</sup>Departamento de Química – CCEN, Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Maceió, AL, Brasil. E-mail:

[adrianaargolo@bol.com.br](mailto:adrianaargolo@bol.com.br)

### Introduction

The use of plants as therapeutic agents have had a remarkable role in the medicine of different countries. The genus *Bauhinia* (Fabaceae) includes a number of ornamental species which are well distributed in Brazilian cities. Native or introduced species have been used as forage, human food or as phytotherapies for treatment of diabetes and as a diuretic. Infusions from leaves of *B. monandra* have been frequently used in popular medicine. Haemagglutinating activity (HA) detected in various species of *Bauhinia* has been associated with the presence of lectins. A galactose-specific lectin (BmoLL) was identified in leaves of *B. monandra* (1).

Plant tissue cultures may provide a source to obtain homogeneous substances which could be valuable biotechnological tools. According to investigations carried out in recent years, the prevention of cancer and cardiovascular diseases are associated with the ingestion of fresh fruits, vegetables or teas containing antioxidant compounds. A method has been used to evaluate these compounds, based on the reduction of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) by antioxidant compounds in methanol solution (2). In its radical form DPPH absorbs at 515 nm, but upon reduction by an antioxidant, this absorption is reduced according to the reaction:



In order to study the HA of different types of tissues originated from *B. monandra*, *in vitro* cultures (callus, axenic and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed root cultures) were established. Also, the antioxidant activity of five preparations (crude ethanol extract as well as hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol:water fractions) obtained from leaves of *B. monandra* was tested

### Experimental methods

#### *B. monandra* tissue cultures

Sterile plantlets were obtained from seeds of *B. monandra* germinated in Murashige and Skoog medium (MSO) containing sucrose (30 g/L) and agar (10 g/L). Callus cultures were obtained from *B. monandra* leaves (3-month-old sterile plantlets) cultivated in MSO supplemented with 1-naphtaleneacetic acid (NAA; 1 mg/mL) and 6-benzylaminopurine (BAP; 5 mg/mL). Axenic root cultures were established from the plantlets and cultivated in MSO liquid medium supplemented with NAA and kinetin (0.2 mg/mL each).

Transformed root cultures were obtained by infection of the plantlets with *A. rhizogenes* LBA 9402, using a hypodermic syringe containing 50  $\mu$ L of the previously prepared bacteria. The emerged roots were excised and cultivated in MSO liquid medium supplemented with indolbutiric acid (IBA; 2 mg/L) and kinetin (0.1 mg/L), designated MSIC medium and incubated at 100 rpm. All cultures were incubated at  $25 \pm 1$  °C, under constant light.

#### **Extraction of lectins and HA test**

Callus, as well as axenic and transformed roots from *B. monandra* were macerated (10%, w/v) with 0.01 M citrate phosphate buffer containing 0.15 M sodium chloride, pH 6.5, selected buffer, and the homogenate was shaken gently for 16 h at 4 °C. The suspension was submitted to 60% (w/v) ammonium sulphate fractionation (F 0-60%) by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the precipitate was resuspended in the selected buffer and dialyzed against distilled water, followed by the buffer. HA was tested using rabbit erythrocytes and human erythrocytes of blood groups A, B, O and AB treated with glutaraldehyde. The inhibition assay was performed using the sugars D(+)-galactose, D(+)-rafinose, methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, N-acetyl- D-galactosamine, D(-)-fucose, D(-)-fructose, D(+)-xylose, sucrose and D(+)-maltose.

#### **Extraction of leaves**

Solvents for the extraction were purchased from Merck. (-)-Catechin and (-)-epi-gallocatechin were acquired from Sigma. Leaves were finely ground using a multiprocessor and the powder was soaked in ethanol for one week extraction (two times repeated). After filtration the combined extracts were evaporated to dryness to yield the ethanolic extract from *B. monandra* (BmoEtOH). An aliquot (1 g) of BmoEtOH was redissolved in a mixture of methanol:water (3:2 v/v) at room temperature, which was fractionated further with hexane (BmoHex), chloroform (BmoChl) and ethyl acetate (BmoEtAc). The residual methanol-water fraction (BmoMeOH), as well as the other fractions were concentrated under vacuum.

#### **Radical Scavenger Capacity (RSC) towards DPPH – Dot blot assay**

BmoEtOH, BmoHex, BmoChl, BmoEtAc and BmoMeOH fractions were redissolved in the respective solvents (0.05 g/mL). A serial dilution (2 to 256) of the stock solution was prepared. The negative controls were pure solvents used for dissolution of extracts; the positive controls were the tannins (-)-catechin and (-)-epi-gallocatechin in methanol (5 mg/mL). A drop of 2  $\mu$ L of the stock solution and each of the dilutions were carefully placed on a thin layer chromatography plate, TLC (Merck; silica gel 60F<sub>254</sub> aluminium sheets; 20 x 10 cm). The drops were applied in triplicate and left to dry for a few min. The silica sheet was placed up-side down in a 0.4 mM DPPH in methanol for 10 s. Stained silica sheets (purple colour) showed yellow spots where the drops were placed depending on the RSC of the samples. The intensity of the yellow colour depended on the amount and nature of radical scavengers present in the sample (2).

#### **Thin layer chromatography**

A drop (2  $\mu$ L) of BmoEtOH, fractions and catechins were placed individually on the base line of the TLC plate which was developed with eluents A and B [toluene: ethyl acetate: formic acid (8.5:5.0:1.5) and (5.0:4.0:1.0), respectively].

## Results and Discussion

### Evaluation of lectin activity

HA was detected in the protein fraction (F0-60%) obtained from callus, as well as axenic and transformed root cultures of *B. monandra*, when tested with rabbit erythrocytes and human erythrocytes of blood group AB. The HA of tissues was inhibited with galactose and *N*-acetyl-D-glucosamine. The present work indicates that *B. monandra* tissue cultures provide an interesting model and an alternative supply for the production of homogeneous lectins.

### Radical scavenger capacity (RSC)

The dot blot assay (not shown), revealed that BmoEtOH, BmoHex, BmoChl, BmoEtAc and BmoMeOH reacted strongly and quickly with the DPPH solution, almost in the same manner as the potent positive controls (tannins). Qualitative TLC was performed in order to separate the compounds present in the leaf extract (BmoEtOH). The best solvent system for the elution of BmoHex and BmoChl was solvent A. This system revealed the presence of only one compound with antioxidant activity in BmoHex ( $R_f = 0.88$ ), whilst in BmoChl there were two compounds ( $R_f = 0.88$  and  $0.40$ ). BmoEtAc was eluted with solvent B, which revealed the presence of one compound with antioxidant activity ( $R_f = 0.46$ ). The compounds present in BmoMeOH were submitted to solvents A and B but remained in the base line. The different compounds detected are being separated by column chromatography and their RSC will be tested by a spectrophotometric assay using DPPH. This test will allow the comparison of the kinetic behaviour of the compounds with tannin standards (strong antioxidants). The compounds could be a mixture of fast, moderate and slow antioxidants.

### Conclusions

HA was detected in the F 0-60% from the different tissue cultures of *B. monandra*.  
The leaves of *B. monandra* contain at least four different antioxidant compounds.

### Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### References

- [1] L.C.B.B. Coelho and M. B. R. Silva (2000)  
Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*.  
*Phytochem. Anal.*, **11**, 295-300.
- [2] C. Soler-Rivas, J. C. Espín and H. J. Wichers (2000).  
An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs.  
*Phytochem. Anal.*, **11**, 1-9.

**Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra***

**A. C. C. Argolo<sup>a</sup>, A. E. G. Sant'Ana<sup>b</sup>, M. Pletsch<sup>b</sup> and L. C. B. B Coelho<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal

de Alagoas, Cidade Universitária, Alagoas, Brazil.

\*Corresponding author:

Dr. Luana C. B. B. Coelho

Av. José Augusto Moreira, 294 – Casa Caiada

CEP 53130-410, Olinda, PE

Brazil

E-mail: [adrianaargolo@bol.com.br](mailto:adrianaargolo@bol.com.br)

Phone/Fax: 55 81 32718354

## **Abstract**

A leaf ethanolic extract from *Bauhinia monandra* Kurz. (pata-de-vaca, pulse) was taken up in aqueous methanol and partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate to yield three organic extracts; an aqueous final extract was also obtained. These extracts exhibited antioxidant activity and their free radical scavenging capacity (RSC) was determined spectrophotometrically using the 1,1-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) assay. A qualitative evaluation was performed on thin layer chromatographic (TLC) plates. Chloroform and ethyl acetate extracts contained 3 antioxidant compounds of different polarities, which were readily separated on TLC using toluene: ethyl acetate: formic acid as a solvent system. Dot blot assay revealed a purple background with yellow spots at the location of drops. The amount of antioxidant (mg/g) necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50 %, inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) values, of ethanol (2.25 ± 0.02), chloroform (2.06 ± 0.02), ethyl acetate (2.16 ± 0.01) and aqueous extracts (2.32 ± 0.02) showed similar RSC. The inhibition percentage (IP) was found for leaf extracts from *B. monandra*, showing 60-65 % inhibition range while the controls ranged from 89-93% inhibition. The kinetics of reaction was faster for chloroform, followed by ethyl acetate, ethanol and aqueous extracts. The results obtained in the present study indicated that *B. monandra* is a potential source of antioxidants.

**Keywords:** antioxidant activity; *Bauhinia monandra*; leaf extracts; DPPH; dot-blot assay.

## 1. Introduction

Plants constitute an important source of active natural products which differ widely in terms of structure and biological properties. They have had a remarkable role in traditional medicine of different countries. In recent years, the prevention of cancer and cardiovascular diseases has been associated with the ingestion of fresh fruits, vegetables or teas rich in natural antioxidants (Virgili et al., 2001; Johnson, 2001). There is a great deal of evidence to suggest that a higher intake of such compounds is associated with a lower risk of mortality from these diseases (Lim et al., 2001) as well as from diabetes mellitus (McCune and Johns, 2002), acute hypertension (Ajith and Janardhanan, 2002) and arteriosclerosis (Tziveleka et al., 2002). These pathological conditions are the major causes of mortality in industrialized countries.

The protective effects of plant products are due to the presence of several types of molecules which have distinct mechanisms of action; some are enzymes and proteins and others are low molecular weight compounds such as vitamins (Halliwell, 1996; Head, 1998), carotenoids (Edge et al., 1997), flavonoids (Zhang and Wang, 2002), anthocyanins and other phenolic compounds (Sánchez-Moreno et al., 1998).

The use of 1,1-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) as a reagent for screening the antioxidant activity of small molecules has been reported (Soler-Rivas et al., 2000). The radical scavenging capacity (RSC) of pure compounds or plant extracts can be assessed by the trapping of this synthetic and stable radical in methanol solution at room temperature. In this assay, the scavenging of DPPH radical is followed by monitoring the decrease in absorbance at 515 nm, which occurs due to reduction by the antioxidant (Sultanova et al., 2001).



Trees of the genus *Bauhinia* (Fabaceae) are widely distributed in Brazilian cities by virtue of their ornamental attributes. Native or introduced species have been used as forage, human food or as phytomedicines for the treatment of diabetes and as a diuretic (Coelho and Silva, 2000; Pepato et al., 2002); antioxidant properties may be associated with the anti-diabetic activity. Such a relationship has already been demonstrated for extracts from species of *Terminalia* and *Emblica* (Sabu and Kuttan, 2002). In the present work leaf extracts of *B. monandra* were evaluated as a source of natural antioxidants.

## **2. Methodology**

### **2.1. Materials and chemicals**

All chemicals were of analytical grade. Solvents for the extraction were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The (-)-catechin, (-)-epigallocatechin and DPPH radical were acquired from Sigma (St. Louis, MO, USA). Leaves of *B. monandra* Kurz were harvested from ornamental trees in Recife and Maceió, Northeast of Brazil. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 57462, at the herbarium Dárdano de Andrade Lima, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife.

### **2.2. Extraction of leaves**

Dried and powdered leaves of *B. monandra* (1.8 kg) were extracted with 95% ethanol. After filtration, the combined extracts were evaporated to dryness to yield the

ethanolic extract **A** (183 g). Extract **A** (180 g) was dissolved in a mixture of methanol:water (2:3, v/v) at room temperature and partitioned successively with hexane, chloroform and ethyl acetate, yielding extracts **B** (23 g), **C** (49 g) and **D** (65 g), respectively. An aqueous final extract **E** (33.5 g) was also obtained. The extracts were concentrated under vacuum.

## **2.3. Determination of antioxidant activity**

### **2.3.1. Qualitative assay**

The protocol was based on the method described by Soler-Rivas et al. (2000). Initially stock solutions containing 5 mg/ml of extracts **A**, **B**, **C**, **D** and **E** were prepared in methanol. The RSC towards DPPH was tested using thin layer chromatographic (TLC) plates (Merck; silica gel 60F<sub>254</sub> 20 x 10 cm aluminium backed), in which a drop (2 µl) of each extract was placed. Some extracts were further diluted (twice or three times) in order to avoid background colour of the samples which could mask the reaction with DPPH. The negative control was pure methanol used for dissolving the extracts; the positive controls were the flavonoids (-)-catechin and (-)-epigallocatechin in methanol (1 mg/ml). Drops were applied in triplicate and left to dry for 2 to 3 min and the TLC sheet was immersed upside down in a 0.4 mM DPPH methanolic solution for 10 s. The stained layer (purple colour) showed yellow spots where the drops were placed depending on the RSC of the samples. The intensity of the yellow colour depended upon the amount and nature of radical scavengers present in the sample.

In order to determine the number of active compounds present in the extracts, a drop (2 µl) of extracts **A**, **B**, **C**, **D** and **E** together with the positive controls were placed

individually on the base line of a TLC plate which was eluted with either toluene: ethyl acetate: formic acid (17:10:3, v/v/v; eluent I) or (5:4:1, v/v/v; eluent II). Spots were visualized under UV light (UVP, Model UVGL-25, Upland, CA, USA) and after treatment with 0.4 mM methanolic solution of DPPH.

### 2.3.3. Quantitative assay

Spectrophotometric analysis was utilized in order to determine the  $IC_{50}$  and IP of the samples, which are widely used parameters for determining RSC of pure samples and plant extracts.  $IC_{50}$  (inhibition concentration) is the amount of antioxidant necessary to decrease the initial concentration of DPPH radical (90  $\mu$ M) by 50 %. IP is the inhibition percentage of total DPPH radical (90  $\mu$ M) which reacted with the antioxidant at the steady state (20 min). The experiments were performed using a Perkin-Elmer Lambda-2 UV-VIS spectrophotometer according to the methods of Soler-Rivas et al. (2000) and Moure et al. (2001).

An aliquot (20  $\mu$ l) of each extract (5 mg/ml) was mixed separately with 90  $\mu$ M methanolic solution of DPPH radical to a final volume of 1 ml. An equal volume of pure methanol was added to the control tube. The disappearance of DPPH radical was monitored by the decrease in absorbance at 515 nm, which was recorded after 0, 1, 2, 3, 4 and 5 min, and then every 5 min up to 30 min, during which time the radical was stable. The concentration of the DPPH radical in the reaction mixture was calculated from a calibration curve according to the following linear regression equation ( $r = 0.997$ ):  $A_{515 \text{ nm}} = 0.01029[\text{DPPH}] - 0.0177$ , where [DPPH] is expressed in mg/ml.

The percentage of remaining DPPH (%DPPH<sub>REM</sub>) was calculated according to Brand-Williams et al. (1995), as follows:  $\%DPPH_{REM} = [\text{DPPH}]_T / [\text{DPPH}]_{T0} \times 100$ ,

where T is the time when absorbance was determined (1 to 30 min) and T<sub>0</sub> is the time zero. IC<sub>50</sub> was calculated by plotting the %DPPH<sub>REM</sub> at the steady state (20 min) against various concentrations of each extract (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg/ml). All experiments were carried out in triplicate and the results were expressed as mg antioxidant/g DPPH ± standard deviation.

For the determination of IP, an aliquot (50 µl) of sample was added to 2 ml of a 90 µM methanolic solution of DPPH radical and the absorbance was determined (515 nm) at the steady state (20 min). IP was calculated according to the expression:  $IP = [(A_{T_0} - A_{T_S})/A_{T_0}] \times 100$ , where A<sub>T<sub>0</sub></sub> is the absorbance at time zero and A<sub>T<sub>S</sub></sub> is the absorbance at the steady state. The results were expressed as % of inhibition.

#### **2.3.4. Statistical analysis**

Computer package used in the graphic and statistical analysis was Microcal (TM) ORIGIN, version 6.0, Microcal Software. The values represent mean of three assays ± standard deviation. The Student's *t*-test was applied for detecting the significance of difference between different groups. *P* < 0.05 was considered as significant.

### **3. Results and Discussion**

The bioactivity evaluation of *B. monandra* leaf preparations is of great importance since infusions as well as ethanolic extracts have been widely ingested in popular medicine for treating human diabetes. A galactose specific leaf lectin has already been highly purified from *B. monandra* in milligram quantities (Coelho and

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ... Silva, 2000). An ethanolic extract of the leaves has already shown to induce an hypoglycaemic effect in rats with type 2 diabetes (L. C. B. B. Coelho, unpublished results). In order to continue investigating the therapeutic properties of *B. monandra* leaves we have tested the ethanol (**A**), hexane (**B**), chloroform (**C**), ethyl acetate (**D**) and aqueous (**E**) extracts for antioxidant activity.

The DPPH assay is a very convenient method for screening small antioxidant molecules; the reaction can be observed visually using common TLC and dot blot techniques. The reaction intensity can also be analysed by simple spectrophotometric or chromametric assays (Sánchez-Moreno et al., 1998; Soler-Rivas et al., 2000). In principle, the DPPH radical is scavenged by antioxidants through donation of hydrogen to form the stable reduced DPPH molecule. The antioxidant radicals formed are stabilized through the formation of non-radical products.

In order to visualize the scavenger activity, the RSC of tested samples was detected on dot blot assay that was later stained with DPPH solution. The qualitative analysis revealed that extracts **A**, **C**, **D** and **E** reacted strongly and rapidly with the radical DPPH, almost in the same manner as the potent positive controls (Figure 1). Extract **B**, however, gave a very weak reaction which progressed much slower when compared with the strong antioxidants, flavonoids. The TLC development of these extracts using solvent system I revealed the presence of a unique compound with antioxidant activity in extract **B** ( $R_f = 0.88$ ), whilst in extract **C** two compounds were shown ( $R_f = 0.88$  and  $0.40$ ). Extract **D** was best eluted with solvent system II; a more polar compound was detected with antioxidant activity ( $R_f = 0.46$ ). Eluents I or II did not resolve extract **E**. The results demonstrated that various compounds of different polarities can be isolated from *B. monandra* leaves. The compounds with antioxidant activity were also visualized by UV light.

The IC<sub>50</sub> value showed in Table 1 was very high for extract **B** (17.0) compared with the other extracts, which gave values in the range of 2.06 to 2.32. Based on Rf and IC<sub>50</sub> values, extract **D** also contained a reasonable quantity of an antioxidant compound, with chemical properties different from the compounds present in extracts **B** and **C**. The IP values showed in Table 1 confirmed the statements made above. The amount of DPPH radical which reacted with extract **B** was very low (IP = 11.2 %), whilst for extracts **A**, **C**, **D** and **E** was above 60 %, suggesting that antioxidants of most extracts did not react in the same way and could be more effective against different free radicals. Although there is a significative difference between the controls utilized and all the extracts, **A**, **C**, **D** and **E** demonstrated IP values compatible with other preparations mentioned as sources of antioxidants (Moure et al., 2001; Sandoval et al., 2002). IC<sub>50</sub> and IP values characterize antioxidant power of pure compounds; for mixed fractions these parameters also showed which fractions are more suitable as a source of pure antioxidant compounds and may be used to guide further purification and isolation (Choi et al., 2002).

In the present paper, the kinetics of the reaction was dependent on the nature and concentration of the antioxidants being tested. The capacity for scavenging free radicals was evaluated for extracts **A**, **B**, **C**, **D** and **E** and the results are showed in Figure 2. RSC was faster for **C**, followed by **D**, **A** and **E**, reaching a steady state in less than 15 min. Extract **B** reacted very slowly with DPPH radical, showing low RSC during the time in which the experiment was performed. Sánchez-Moreno et al. (1998) have shown that this behaviour is correlated with the concentration of antioxidant compounds in the sample. Also, Choi et al. (2002) reported that in root bark extracts of *Morus alba*, the antioxidant potential depended upon the amount and nature of radical scavenger. This work revealed that *B. monandra* extracts possess antioxidant activity and there are at

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

least three compounds to be purified, indicating that the leaves constitute a potential source of natural antioxidants.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Brazilian Coordination of Improving from Superior Level Personal (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

## References

- Ajith, T. A., Janardhanan, K. K., 2002. Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology*. 81, 387-391.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28, 25-30.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., Kim, S. K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 163, 1161-1168.
- Coelho, L. C. B. B., Silva, M. B. R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*. 11, 295-300.
- Edge, R., Mcgarvey, D. J., Truscott T. G., 1997. The carotenoids as anti-oxidants – A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*. 41, 189-200.
- Halliwell, B., 1996. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Alternative Medicine Review*. 3, 174-186.
- Head, K. A., 1998. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant *in vivo*? *Free Radical Research*. 25, 439-454.
- Johnson, I. T., 2001. Antioxidants and antitumour properties. In: *Antioxidants in food*, ed. J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 100-123.
- Lim, K-T., Iiu, C., Kitts, D. D., 2001. Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food and Chemical Toxicology*. 39, 229-237.



- Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...
- McCune, L. M., Johns, T., 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 197-205.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J., Lema, J. M., 2001. Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International*. 34, 103-109.
- Pepato, M. T., Keller, E. H., Baviera, A. M., Kettelhut, I. C., Vendramini, R. C., Brunetti, I. L., 2002. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 81, 191-197.
- Sabu, M. C., Kuttan, R., 2002. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacology*. 81, 155-160.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76, 270-276.
- Sandoval, M., Okuhama, N. N., Angeles, F. M., Melchor, V. V., Condezo, L. A., Lao, J., Miller, M. J. S., 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*. 79, 207-213.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Wichers, H. J., 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*. 11, 1-9.
- Sultanova, N., Makhmoo, T., Abilov, Z. A., Parween, Z., Omurkamzinova, V. B., Rahman, A., Choudhary, M. I., 2001. Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *Journal of Ethnopharmacology*. 78, 201-205.

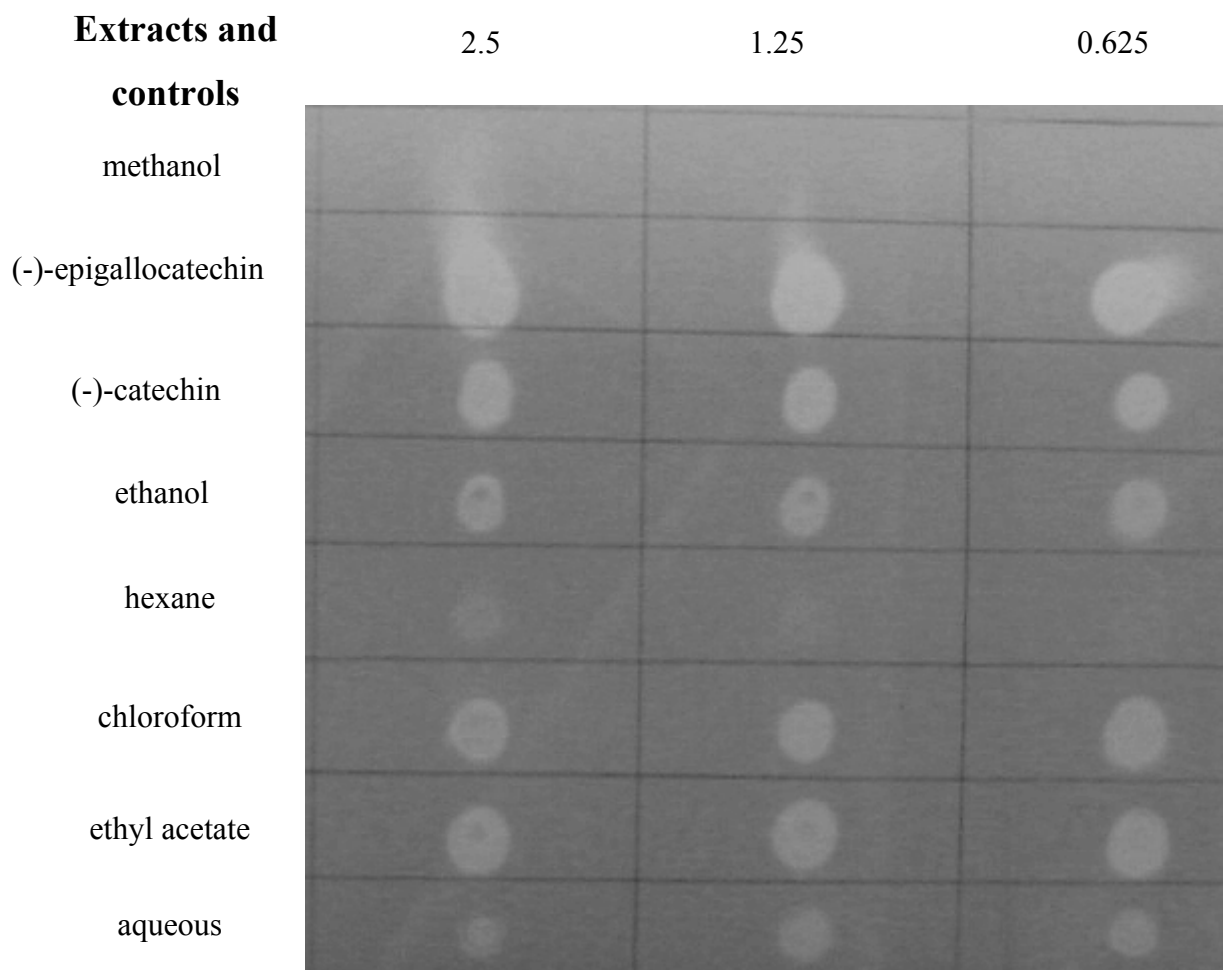
- Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...
- Tziveleka, L. A., Kourounakis, A. P., Kourounakis, P. N., Roussis, V., Vagias, C., 2002. Antioxidant Potential of Natural and Synthesised Polyprenylated Hydroquinones. *Biorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 935-939.
- Virgili, F., Scaccini, C., Packer, L., Rimbach, G., 2001. Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In: *Antioxidants in food*, ed. J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 87- 99.
- Zhang, H.Y., Wang, L. F., 2002. Theoretical elucidation on structure-antioxidant activity relationships for indolinonic hydroxylamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12, 225-227.

**Table 1: Free radical scavenging activities of *B. monandra* extracts determined by the reduction of DPPH free radical.**

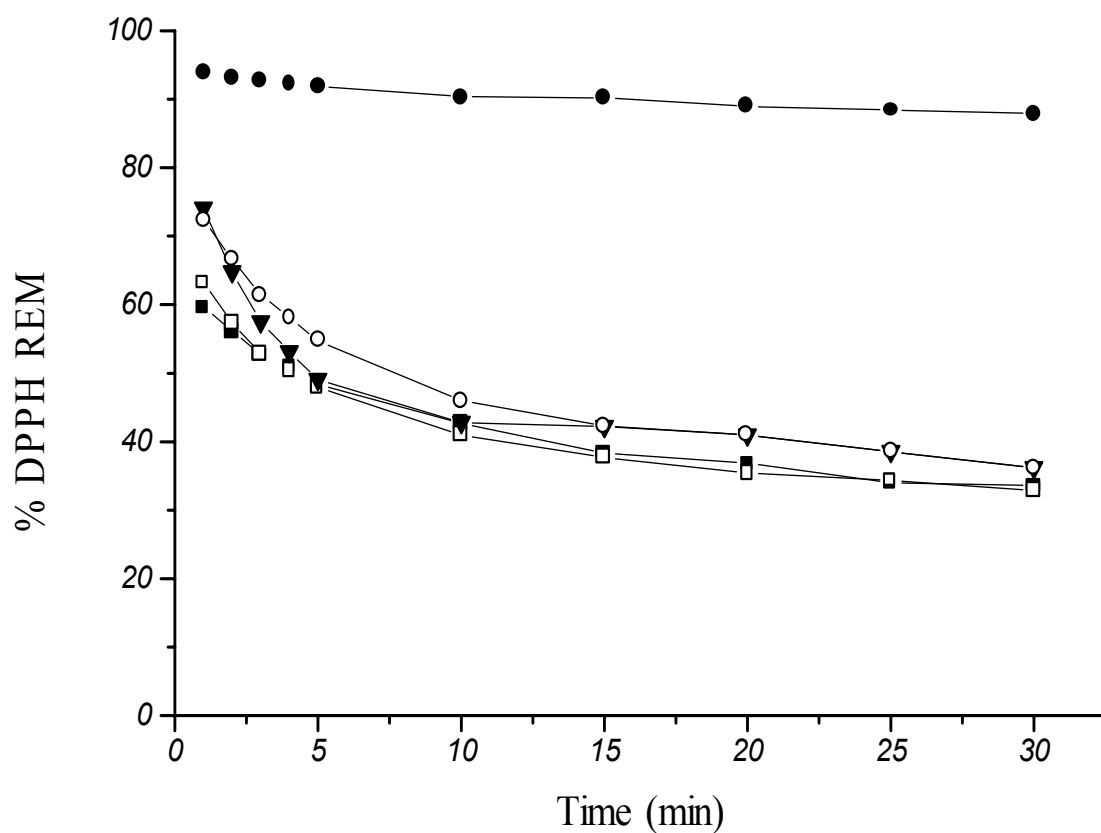
Extracts and controls	IP(%) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (mg/g DPPH) <sup>b</sup>
A	64.4	2.25 ± 0.02
B	11.2	17.0 ± 0.03
C	65.7	2.06 ± 0.02
D	64.5	2.16 ± 0.01
E	60.2	2.32 ± 0.02
(-)-catechin	89.7	–
(-)-epigallocatechin	93.4	–

<sup>a</sup> Inhibition percentage (IP) of extracts (5 mg/ml) and standard antioxidants (1 mg/ml) at the steady state (20 min).

<sup>b</sup> Inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) calculated at the steady state (20 min).



**Figure 1: Qualitative assay using TLC plates stained with 0.4 mM methanolic solution of DPPH.**



**Figure 2: Kinetics behaviour of extracts from *B. monandra* leaves determined spectrophotometrically at 515 nm, by reaction with a 90  $\mu$ M methanolic solution of DPPH. Extracts in ethanol (■), hexane (●), chloroform (□), ethyl acetate (▼) and aqueous fraction (○).**

## *Capítulo 2*

### **PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE RAÍZES TRANSFORMADAS DE *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca)**

I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia- Fronteiras da Biologia, 2001, São Paulo.

**Production of *Bauhinia monandra* lectin from callus, conventional and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed root cultures: immunodetection with anti-*B. monandra* leaf lectin IgG**

**Artigo a ser submetido ao Periódico Planta Medica**

## **PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE RAÍZES TRANSFORMADAS DE *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca)**

**Argolo, A. C. C.<sup>1,2</sup>, Pletsch, M.<sup>2</sup> e Coelho, L. C. B. B.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica – CCB, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

<sup>2</sup>Departamento de Química – CCEN, Universidade Federal de Alagoas – UFAL.

E-mail: [adrianaargolo@bol.com.br](mailto:adrianaargolo@bol.com.br)

### **Introdução**

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos sem alterar suas estruturas, através de sítios de ligação. Estas proteínas diferem quanto à especificidade aos carboidratos, aglutinam células e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos [1]. Por serem altamente seletivas para os carboidratos aos quais se ligam, as lectinas podem ser purificadas por cromatografia de afinidade. Deste modo, estas proteínas podem ser adsorvidas especificamente e com alta afinidade à molécula disponível como ligante no suporte. A dessorção da lectina da matriz de afinidade pode ser efetuada biosseletivamente, usando um carboidrato como competidor, ou não biosseletivamente, por mudanças de pH ou de força iônica.

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) inclui um número de espécies ornamentais, bem distribuídas nas cidades brasileiras. As espécies nativas ou introduzidas são usadas como agentes terapêuticos para tratamento de diabetes e como diurético. Infusões de folhas de *B. monandra* têm sido usadas freqüentemente na medicina popular. A atividade hemaglutinante (AH) detectada em várias espécies de *Bauhinia* está associada à presença de lectinas. Uma lectina específica à galactose (BmoLL) foi purificada nas folhas de *B. monandra* [2].

A obtenção de raízes transformadas a partir de material vegetal (caules e folhas) é feita através da transformação mediada pela *Agrobacterium rhizogenes* [3], a qual é usada como vetor para a transferência de genes e para a produção de raízes. As culturas de raízes transformadas geneticamente (*hairy roots*) representam uma das alternativas mais promissoras para produção de compostos economicamente importantes, para regeneração de plantas transgênicas com características fenotípicas desejáveis, para o incremento de biomassa em plantas que apresentam dificuldade de enraizamento (recalcitrantes), para

produção de enzimas comercialmente importantes, assim como, para o estudo do metabolismo degradativo e da fitorremediação [4]. Deste modo, grandes quantidades de biomassa de raízes transformadas potencialmente produtoras de lectinas poderão ser obtidas em biorreatores apropriados, possibilitando a produção desta proteína através de um processo biotecnológico economicamente viável. Este trabalho tem como objetivo purificar a lectina de raízes transformadas de *B. monandra* e avaliar a AH frente a eritrócitos humanos do tipo A, B, O, AB e eritrócitos de coelho.

## **Material e Métodos**

### **• Germinação das sementes de *B. monandra* e indução das raízes transformadas**

As sementes de *B. monandra* foram esterilizadas com uma solução de água sanitária comercial Brilux™ (2 a 6% de Cl<sub>2</sub> ativo) durante 30 min, seguidas por imersão em etanol (70%) durante 5 min, enxaguadas repetidamente com água destilada esterilizada e colocadas sobre meio de MS (5), suplementado com sacarose (3%) e ágar (1%). Plântulas jovens de *B. monandra* (2 meses), cultivadas *in vitro*, foram infectadas com a *A. rhizogenes* cepa LBA9402, nas partes meristemáticas apical e axilar, através de agulha hipodérmica acoplada à seringa contendo a suspensão da bactéria previamente preparada. As plântulas foram incubadas a 25±1°C, sob luminosidade constante. Dois meios de cultura foram investigados para fins de manutenção das culturas de raízes e para aumentar o crescimento de biomassa, a saber, o meio de Gamborg B5 [6] e o meio MS, com e sem reguladores de crescimento, suplementados com sacarose.

### **• Obtenção dos extratos e fracionamento com sulfato de amônio das raízes transformadas**

Raízes transformadas de *B. monandra* foram trituradas em almofariz e, com o material finamente pulverizado, foi efetuada uma suspensão a 5% (p/v) em tampão citrato-fosfato 0,1 M contendo NaCl 0,15 M, pH 6,5, tampão selecionado, sendo a extração procedida por 16 h a 4 °C, sob agitação constante. A suspensão foi submetida a fracionamento 60% (p/v) com sulfato de amônio (F 0-60%) pela adição do sal sólido. Após 4 h em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuscitado em tampão selecionado e dialisado contra água destilada, seguido pelo tampão. As determinações quantitativas de proteínas foram realizadas de acordo com Lowry e cols., [7].



- **Determinação da Atividade Hemaglutinante**

Para a determinação da AH foram utilizadas placas de microtitulação (Biolab, Brasil), contendo 8 fileiras de 12 poços. Em cada poço foram colocados 50  $\mu$ L de NaCl 0,15 M e, a partir do segundo poço, foram adicionados 50  $\mu$ L da amostra (extrato a 5%, p/v, em tampão selecionado e F 0-60%) de raízes de *B. monandra*, com agitação e transferência de 50  $\mu$ L para o terceiro poço; em seguida, foram realizadas sucessivas diluições até o último poço da mesma fila, desprezando os últimos 50  $\mu$ L. Após as diluições, 50  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos a 2,5% (v/v) em NaCl 0,15 M foram adicionados a todos os poços. As placas foram mantidas em repouso, por 45 min; a AH foi definida pelo inverso da maior diluição em que se observou a aglutinação total.

- **Ensaio de Inibição da AH com Carboidratos**

O ensaio de inibição da AH foi realizado usando os carboidratos D(+)-galactose, D(+)-glicose, D(+)-rafinose, D(+)-manose, D(-)-frutose, D(-)-fucose, D(+)-xilose, *N*-acetil-D-glicosamina, metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo e sacarose.

- **Eletroforese em Gel de Poliacrilamida de Proteínas Desnaturadas e Reduzidas**

Amostras desnaturadas e reduzidas foram avaliadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com Laemmli [8].

## **Resultados e Discussão**

- **Características de Crescimento das Raízes Transformadas**

O aparecimento de raízes nas plântulas infectadas com *A. rhizogenes* foi observado entre 15 e 20 dias após o início do experimento. Dos 28 clones obtidos, apenas 1 (TRBm14) foi escolhido, com base no seu tempo de duplicação de biomassa, ou seja, foi o clone que melhor se desenvolveu em meio de cultura apropriado. Em síntese, culturas de raízes transformadas se desenvolveram eficientemente. A eficiência da transformação depende da competência da espécie vegetal escolhida, sendo algumas espécies mais susceptíveis que outras [9].

- **Avaliação da AH e Inibição com Carboidratos das Raízes Transformadas**

AH foi detectada no extrato 5% (p/v), em tampão selecionado, e na F 0-60% obtidos a partir das raízes transformadas de *B. monandra*, quando testada com eritrócitos de coelho e

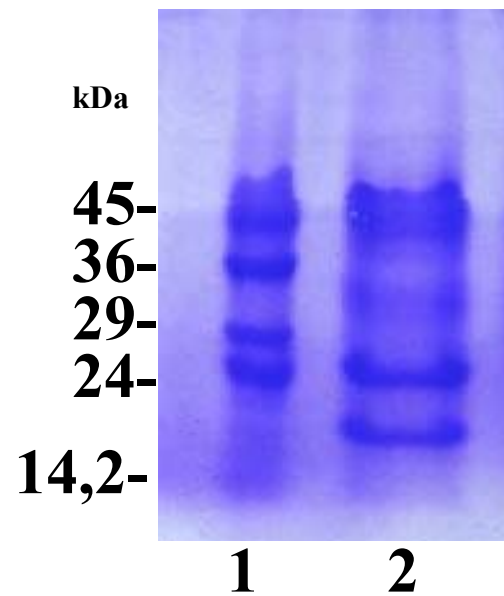
eritrócitos humanos do grupo sanguíneo AB (tabela 1). A AH da F 0-60% foi inibida parcialmente com D(+)-galactose (0,2 M), D(+)-glicose e *N*-acetil-D-glicosamina (0,2 M). Como demonstrado na figura 1, a eletroforese em gel de poliacrilamida da F 0-60% de raízes transformadas apresentou o mesmo padrão eletroforético da BmoLL [2]. O presente trabalho indica que culturas de raízes transformadas de *B. monandra* fornecem um modelo alternativo para a produção de lectinas, de forma mais homogênea.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

### **Referências Bibliográficas**

- 1- Kennedy, J. F.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Cavalcanti, M. S. M. and Coelho, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219, 1995.
- 2- Coelho, L. C. B. B. and Silva, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295, 2000.
- 3- Potrykus, I. and Spangenberg, G. Direct gene transfer to protoplasts. In: **Gene Transfer to Plants**. Springer-Verlag, Berlin, p. 53, 1995.
- 4- Pletsch, M. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, v. 4, p. 12, 1998.
- 5- Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473, 1962.
- 6- Gamborg, L. O.; Miller, R. A. and Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151, 1968.
- 7- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.
- 8- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 660, 1970.
- 9- Bhadra, R.; Vani, S. and Shanks, J. V. Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. **Biotechnology Bioengineering** v. 41, p. 581, 1993.



**Figura 1.** SDS-PAGE da F 0-60% de raízes transformadas de *B. monandra* sob condições redutoras e desnaturantes.

Linha 1, corresponde ao marcador padrão (kDa); linha 2, F 0-60%.

**Tabela 1.** Determinação da AH das Raízes Transformadas e Inibição com Carboidratos.

Amostras	Eritrócitos (AH)							
	Coelho	Humanos			Inibição <sup>1</sup>			
		A	B	O	AB	Galactose	Glicose	N-acetil-D-glicosamina
EB	128 <sup>-1</sup>	8 <sup>-1</sup>	16 <sup>-1</sup>	16 <sup>-1</sup>	32 <sup>-1</sup>	4 <sup>-1</sup>	8 <sup>-1</sup>	16 <sup>-1</sup>
F 0-60%	64 <sup>-1</sup>	16 <sup>-1</sup>	32 <sup>-1</sup>	32 <sup>-1</sup>	64 <sup>-1</sup>	2 <sup>-1</sup>	16 <sup>-1</sup>	8 <sup>-1</sup>

EB – Extrato bruto 5% (p/v) em tampão citrato-fosfato 0,01 M contendo NaCl 0,15 M, pH 6,5.

F 0-60% - Precipitado da fração 60 % com sulfato de amônio.

<sup>1</sup>Eritrócitos de coelho.

#### Abstract

Plant lectins are a heterogenous group of proteins, differing from each other with respect to their molecular structure, carbohydrate-binding specificity and biological activities. Haemagglutinating activity (HA) has been detected in the 0-60% ammonium sulphate fractionation (F 0-60%) from the *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *B. monandra* when tested with rabbit erythrocytes and human erythrocytes of blood group AB. The HA was totally inhibited with galactose and partially inhibited with glucose and *N*-acetyl-D-glucosamine. Under denaturing and reducing conditions F 0-60% was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis. In conclusion, *B. monandra* tissue cultures provide an interesting model and an alternative supply for the production of homogeneous lectins.

*Keywords:* lectins, transformed roots, *Agrobacterium rhizogenes*, *Bauhinia monandra*, haemagglutinating activity.

**Production of *Bauhinia monandra* lectin from callus, conventional  
and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed root cultures:  
immunodetection with anti-*B. monandra* leaf lectin IgG**

**A. C. C. Argolo<sup>a</sup>, N. J. Haver<sup>a</sup>, M. B. R. Silva<sup>a</sup>, M. T.S. Correia<sup>a</sup>,  
M. Pletsch<sup>b</sup> and L. C. B. B Coelho<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
de Pernambuco, Cidade Universitária, Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal  
de Alagoas, Cidade Universitária, Alagoas, Brazil.

\*Corresponding author:

Dr. Luana C. B. B. Coelho

Av. José Augusto Moreira, 294 – Casa Caiada

CEP 53130-410, Olinda, PE

Brazil

E-mail: [adrianaargolo@bol.com.br](mailto:adrianaargolo@bol.com.br)

Phone/Fax: 55 81 32718354

## **Abstract**

Plant lectins are a heterogeneous group of proteins, differing from each other with respect to their molecular structures, carbohydrate-binding specificities and biological activities. A galactose-specific leaf lectin (BmoLL) has been previously purified from *B. monandra*; a rabbit anti-BmoLL IgG was also available, successfully conjugated to peroxidase. The aim of this investigation was the production of tissue cultures from *B. monandra* (callus, conventional and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots) and the detection of immunoreactive proteins and polypeptides from *B. monandra* tissue culture preparations through double immunodiffusion assays and electrophoretic transfer techniques. Cultures were originated from *B. monandra* seeds; extracts (10 %, w/v) and F 0-60% preparations were performed with 10 mM citrate phosphate buffer, pH 6.5. Immunodiffusion revealed precipitation lines in all cultures. F 0-60 % from different tissue cultures were resolved with common and distinct polypeptides by SDS-PAGE under reducing conditions. Polypeptides from conventional and transformed roots interacted weakly with anti-BmoLL IgG; however, a strong interaction was detected with callus preparation. *B. monandra* tissue cultures may provide a source to obtain homogeneous lectin(s) which could be a valuable biotechnological tool.

**Keywords:** plant tissue culture, lectin, *Bauhinia monandra*, immunodetection.

## Introduction

Lectins are a heterogeneous group of proteins or glycoproteins, differing from each other with respect to their molecular structure, carbohydrate-binding specificity and biological activities (Peumans & Van Damme, 1998). Lectins were discovered in plant seeds and since then they have been isolated from different plant tissues, animals and microorganisms. 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). The physiological functions of lectins are not clearly defined. Plant lectins have been suggested to play different roles including transport of carbohydrates, packaging and/or mobilization of storage proteins and carbohydrates (Ratanapo *et al.*, 2001), cell wall elongation, interaction between plants and microorganisms (Wititsuwannakul *et al.*, 1998) and defense against the attack of fungi, virus, pest and insects (Peumans & Van Damme, 1995). In addition, plant lectins serve as mediators of the symbiosis between nitrogen fixing microorganisms and leguminous plants (van Rhijn *et al.*, 1998).

Plant tissue cultures may provide a source to obtain homogeneous substances which could be valuable biotechnological tools (Pletsch *et al.*, 1999; Sajc *et al.*, 2000). It can be surely said that *in vitro* cultures represent a future commercial alternative for the production of high value plant-derived medicines (Villarreal *et al.*, 1999; Towler & Weathers, 2003).

Haemagglutinating activity (HA) detected in various species of *Bauhinia* has been associated with the presence of lectins. A galactose-specific leaf lectin (BmoLL) was highly purified from *B. monandra* (Coelho & Silva, 2000). The electrophoretic transfer of polypeptides followed by immunodetection is a very common and powerful tool for the

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

identification and characterization of antigens from complex mixtures of proteins (Villanueva, 2002). An antibody was previously raised against BmoLL, anti-BmoLL IgG was purified on a Protein A-Sepharose CL-4B column and conjugated with peroxidase (anti-BmoLL IgG Per), unpublished data.

The present work reports the development of different tissue cultures originated from *B. monandra* seeds, namely, callus, conventional and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots, as well as the partial purification and immunodetection of expressed *B. monandra* lectin from tissues.

## **Materials and Methods**

### Plant material

Seeds of *B. monandra* were collected from ornamental trees in Recife and Maceió, Northeast of Brazil. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 57462, at the herbarium Dárdano de Andrade Lima, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, State of Pernambuco.

### *B. monandra* tissue cultures

Sterile plantlets were obtained from seeds of *B. monandra* germinated in Murashige and Skoog medium (1962), designated medium MSO, containing sucrose (30 g/L) and agar (10 g/L). Callus cultures were obtained from leaves of *B. monandra* plantlets (3-month-old sterile) cultivated in MSO supplemented with 1-naphthaleneacetic acid (NAA; 1 mg/mL) and 6-benzylaminopurine (BAP; 5 mg/mL). Conventional root



cultures were established from the plantlets and cultivated in MSO liquid medium supplemented with NAA and kinetin (0.2 mg/mL each). Transformed root cultures were obtained by infection of the plantlets with *A. rhizogenes* LBA 9402, using a hypodermic syringe containing 50  $\mu$ L of the previously prepared bacteria. The emerged roots were excised and cultivated in MSO liquid medium supplemented with indolbutiric acid (IBA; 2 mg/L) and kinetin (0.1 mg/L) designated MSIC medium and incubated at 100 rpm. All cultures were incubated at  $25 \pm 1$  °C, under constant light.

#### Tissue culture lectin preparations and protein assay

Callus, as well as conventional and transformed roots from *B. monandra* were macerated (10%, w/v) with 0.01 M citrate phosphate buffer containing 0.15 M sodium chloride, pH 6.5, selected buffer, and the homogenate was shaken gently for 16 h at 4 °C. The suspension was submitted to 60% (w/v) ammonium sulphate fractionation (F 0-60%) by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the precipitate was resuspended in the selected buffer and dialyzed against distilled water, followed by the buffer. The protein concentration was measured according to Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

#### Haemagglutinating activity and inhibition assays

Haemagglutinating activity (HA) was evaluated using erythrocytes from rabbit and human blood groups A, B, O and AB treated with glutaraldehyde (Bing *et al.*, 1967). Serial 2-fold dilution of proteins (50  $\mu$ L) were made in microtiter plates contained 0.15M NaCl. Equal volume of erythrocyte suspension (2.5% v/v in 0.15 M NaCl) was added and

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

incubated at room temperature. Agglutination was visualised after 45 min. HA was defined as inverse of the last dilution presenting hemagglutination and the specific HA (SHA) corresponded to HA divided by the protein concentration (Correia & Coelho, 1995). To test the divalent cation requirement of *B. monandra* preparations, the HA was then tested in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> or MnCl<sub>2</sub> in NaCl 0.15 M.

The HA inhibition (HAI) assay was performed using various sugars at 200 mM. These were D(+)-galactose, D(+)-glucose, D(+)-raffinose, methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, *N*-acetyl-D-galactosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, D(-)-fucose, D(-)-fructose, sucrose, D(+)-xylose and D(+)-maltose.

#### Immunodiffusion assay and Electrophoresis transfer

BmoLL (150  $\mu$ g) in 1 mL of 0.1 M citrate phosphate buffer pH 6.5, with 1 mL of Freund's complete adjuvant was inoculated subcutaneously, followed by three lectin inoculations plus Freund's incomplete adjuvant. Anti-BmoLL IgG was purified on a Protein A-Sepharose CL-4B column (Pharmacia) and conjugated with peroxidase (Beltrão *et al.*, 1998).

Double immunodiffusion was carried out according to Ashford *et al.* (1982). Gels of 1% (w/v) agarose containing 0.15 M NaCl were cast on squares of 2.5 cm x 2.5 cm with 3 mm thickness. In each gel 5 wells of 3 mm diameter were cut. Diffusion was allowed to take place for 24-36 h at 4 °C in humidity chambers. The gels were washed with 0.15 M NaCl and distilled water, dried and stained with 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 45 % (v/v) ethanol containing 10 % (v/v) acetic acid.

Protein samples were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE), according to Laemmli (1970). Electrophoretic

transfer onto polyvinylidene difluoride membrane, PVDF (Pharmacia) was performed with a Pharmacia transfer apparatus according to the manufacturer's directions. Polypeptides were incubated with rabbit anti-BmoLL IgG conjugated to peroxidase and revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (10 mg).

## Results and Discussion

A lectin was previously purified from *B. monandra* leaves in milligram quantities (Coelho & Silva). Also, free and peroxidase conjugate anti-BmoLL IgG were available. The expectation to obtain homogeneous lectins through tissue cultures could offer two advantages: (1) a controlled supply of biochemicals, independently of plant availability (geographic, climatic and sazonal variability) or physiological stress (attack by pests); (2) well defined systems which result in higher yields and more consistent quality of products (Giri & Narasu, 2000). In the present study *in vitro* cultures from *B. monandra*, namely callus, conventional and *A. rhizogenes*-transformed roots expressed lectins. The production of large scale tissue cultures have been considered as an alternative source of biochemicals in the last 40 years (Sajc *et al.*, 2000). The successful development and growth of plant tissue cultures have been of great importance to study plant metabolism, as well as to improve the understanding of cell biology and tissue physiology.

*B. monandra* lectin preparations were partially purified by ammonium sulphate fractionation. HA was detected in F0-60% when tested with rabbit and human erythrocytes; the highest SHA was detected with rabbit and human blood group AB erythrocytes (Table 1). HA was not altered after the addition of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$  to lectin preparations. Tissue lectin activities were partially inhibited with galactose, glucose and *N*-acetyl-D-glucosamine (Table 2). Data are in agreement with galactose inhibited

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

BmoLL (Coelho & Silva, 2000). The latter lectin was highly purified in gel guar columns, however, *B. monandra* lectin preparations did not bind to the affinity matrix (not showed).

Immunodiffusion assays were carried out using purified anti-BmoLL IgG. There are common antigenic determinants among BmoLL and the lectin(s) from callus, conventional and transformed roots from *B. monandra* which were showed by precipitation lines in all cultures (Figure 1). The antibody was raised against native BmoLL with the purpose to evaluate the expression of lectin molecular forms, in natural or transformed tissues. Ouchterlony double diffusion analysis (Ouchterlony, 1958) has been used for decades; Carlini *et al.* (1988) used the immunodiffusion technique and found immunological relationships between anti-*Canavalia ensiformis* lectin IgG and lectins from *C. gladiata* extract. In the present work the technique was efficient to reveal common epitope interactions in all preparations.

Electrophoresis under denatured and reduced conditions resolved lectin preparations from callus, conventional and transformed roots in common and distinct polypeptides; bands similar to highly purified BmoLL were detected in all preparations (Figure 2). Polypeptides from conventional and transformed roots interacted weakly with anti-BmoLL IgG; however, a strong interaction was detected with polypeptides from callus preparation (Figure 3). Immunodetection of polypeptides using polyclonal anti-lectin antibodies has also been reported for other lectins. Nahálková *et al.* (2001) revealed with immuno dot assays that anti-*Pinus nigra* lectin IgG exhibited strong cross reaction to both Scots pine and Norway spruce seed extracts.

Anti-BmoLL IgG could be used to evaluate the immunolocalization of native lectins in different tissue cultures from *B. monandra*. This technique is broadly applied to examine tissues for the presence of molecules antigenically related to a plant lectin (Etzler *et al.*, 1984; Peumans *et al.*, 2000). A similar observation was made on the

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

immunocytochemical localization of *P. nigra* lectin, which possessed a related specificity; the lectin was found in cells of all tissues from juvenile plants (Nahálková *et al.*, 2001). Janković and Vićovac (2000) reported immunohistochemical localization of wheat germ agglutinin-like (WGA) proteins in human placenta, using anti-WGA IgG. This work established for the first time an efficient protocol to obtain *B. monandra* callus, conventional and transformed root cultures, a source to obtain homogeneous lectin(s), a valuable biotechnological tool.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq).

### **References**

Ashford D, Allen AK, Neuberger A. The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. *Biochemistry*. 1982; 201: 641-645.

Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1998; 74: 125-134.

Bing DH, Weyand JGM, Stavitsky AB. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1967; 124: 1160-1170.

- Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...
- Carlini CR, Barcellos GBS, Baeta-Neves ADV, Guimarães JA. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalina A among proteins of leguminous seeds. *Phytochemistry*. 1988; 27: 25-30.
- Coelho LCBB, Silva MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*. 2000; 11: 295-300.
- Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a Glucose/Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1995; 55: 261-273.
- Etzler ME, MacMillan S, Scates S, Gibson DM. Subcellular localizations of two *Dolichos biflorus* lectins. *Plant Physiology*. 1984, 76: 871-878.
- Giri A, Narasu ML. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. 2000; 18: 1-22.
- Janković M, Vićovac L. A specific wheat germ agglutinin-immunoreactive protein in human placenta. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 2000; 127: 135-146.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-83.
- Lowry OH.; Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-75.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 1962; 15: 473-97.
- Nahálková J, Asiegbu FO, Daniel G, Hřib J, Vooková B, Pribulová B, Gemeiner P. Isolation and immunolocalization of a *Pinus nigra* lectin (PNL) during interaction with the necrotrophs-*Heterobasidion annosum* and *Fusarium avenaceum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2001; 59: 153-163.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Ouchterlony O. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of Diphtheria Bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1958; 25: 186-196.

Peumans WJ, Van Damme EJM. Lectins as plant defence proteins. *Plant Physiology.* 1995; 109: 347-52.

Peumans WJ, Van Damme EJM. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 1998; 15: 199-228.

Peumans WJ, Hause B, Van Damme EJM. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Letters.* 2000; 477: 186-92.

Pletsch M, Araujo BS, Charlwood BV. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnology Advances.* 1999; 17: 679-87.

Ratanapo S, Ngamjunyaporn W, Chulavatnatol M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. *Plant Science.* 2001; 160: 739-44.

Sajc L, Grubsic D, Vunjak-Novakovic G. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal.* 2000; 4: 89-99.

Towler MJ, Weathers PJ. Adhesion of plant roots to poly-L-lysine coated polypropylene substrates. *Journal of Biotechnology.* 2003; 101: 147-55.

Van Rhijin P, Goldberg RB, Hirsch AM. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *The Plant Cell* 1998; 10: 1233-49.

Villanueva MA. Elimination of artefacts on native Western blots arising from endogenous lectin activity. *Journal of Biochemical and Biophysical methods.* 2002; 50: 141-9.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

Villarreal ML, Nicasio P, Rojas G, Alvarez L, Quintero R. Recent progress in biotechnology of Mexican medicinal plants. Chemicals via Higher Plant Bioengineering.

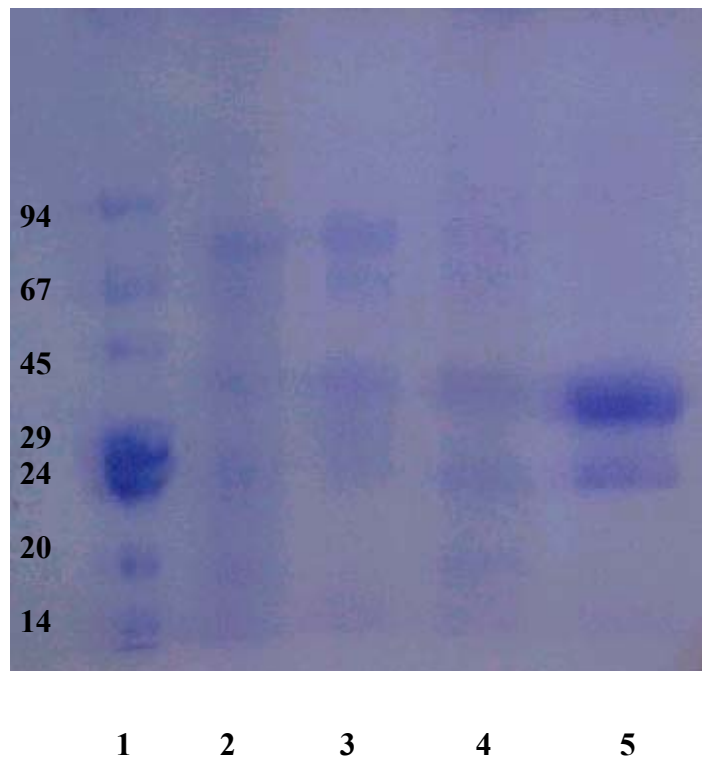
In: Shahidi *et al.*, editors. Kluwer Academic, New York 1999; 221-233.

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

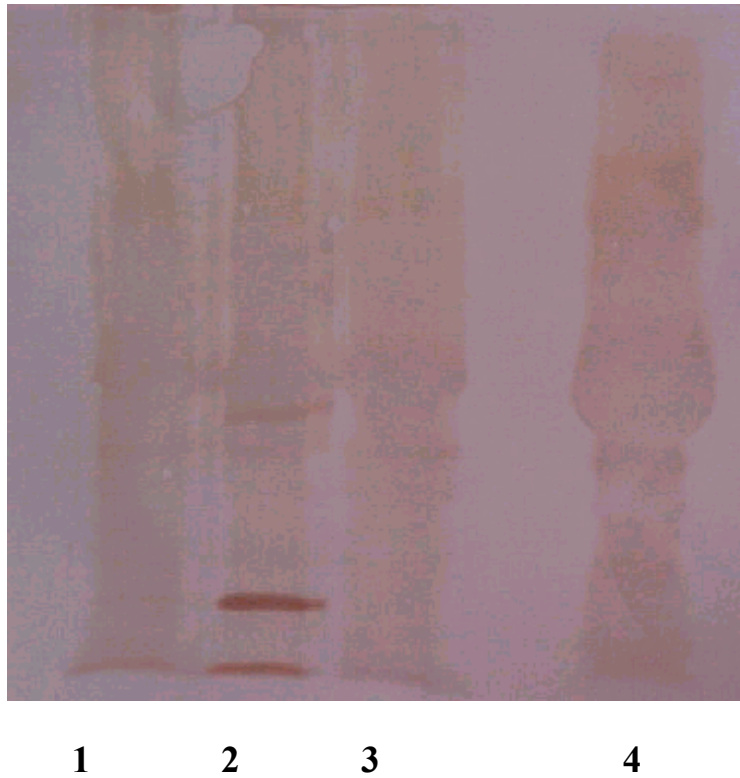




**Figure 1: Immunodiffusion of extracts and fractions from *B. monandra* tissue cultures. Central wells: anti-BmoLL IgG. Lateral wells: 1, 5, 11 and 15, BmoLL; 2 and 7, transformed root extracts; 4 and 6, conventional root extracts; 3 and 8, callus extract; 9 and 14, transformed root fractions; 10 and 16, conventional root fractions; 12 and 13, callus fraction.**



**Figure 2: SDS-PAGE of *B. monandra* tissue cultures. Lines: 1- Standard Mr markers: phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovoalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsinogen (24), trypsin inhibitor (20 kDa) and  $\alpha$ -lactoalbumin (14 kDa), 2- conventional roots, 3- callus, 4- transformed roots, 5- BmoLL.**



**Figure 3: Electrophoretic transfer from *B. monandra* tissue cultures probed with anti-BmoLL IgG raised against native lectin. Lines: 1- conventional roots, 2- callus, 3- transformed roots 4- BmoLL.**

**Table 1: Agglutination of human and rabbit erythrocytes by lectins from callus, conventional and *A. rhizogenes*-transformed roots of *B. monandra* cultures.**

Preparations	Erythrocytes (SHA)					Protein concentration (mg/mL)
	Rabbit	Human				
F 0-60 %		A	B	O	AB	
Conventional roots	29	3.6	3.6	3.6	7.3	4.4
Transformed roots	17.3	4.3	8.6	8.6	17.3	3.7
Callus	36.6	4.6	9.1	9.1	36.6	3.5

Haemagglutinating activity (HA) was performed with 2.5 % (v/v) suspension of glutaraldehyde treated erythrocytes. SHA-specific HA.

**Table 2: Inhibition of F 0-60 % activity from preparations of *B. monandra*.**

Preparations	SHA		
	Carbohydrate (200 mM)		
F 0-60 %	Galactose	Glucose	<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine
Conventional roots	0.9	3.36	3.36
Transformed roots	1.08	4.3	2.16
Callus	1.14	4.57	1.14

Haemagglutinating activity (HA) was performed with 2.5 % (v/v) suspension of glutaraldehyde treated erythrocytes. SHA-specific HA.

## *Capítulo 3*

**Leaf ethanolic extract of *Bauhinia monandra* increases insulin secretion in rats subjected to intrauterine malnutrition**

**Artigo a ser submetido ao Periódico Life Sciences**

**Leaf ethanolic extract of *Bauhinia monandra* increases insulin secretion  
in rats subjected to intrauterine malnutrition**

**A.C. C. Argolo<sup>a</sup>, A. C. R. D. Saturnino<sup>c</sup>, L. S. Guedes<sup>a</sup>, J. A. L. Rodriguez<sup>c</sup>,**

**A. D. O. Paixão<sup>b</sup> and L. C. B. B Coelho<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, <sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil. <sup>c</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil.

\*Corresponding author:

Prof. Dr. Luana C. B. B. Coelho

Av. José Augusto Moreira, 294 – Casa Caiada

CEP 53130-410, Olinda, PE

Brasil

E-mail: [adrianaargolo@bol.com.br](mailto:adrianaargolo@bol.com.br)

Fone/Fax: 55 81 32718354

## Abstract

Leaf ethanolic extract of *B. monandra* has been used as a popular medicinal treatment of type 2 diabetes; however, the mechanism of action has not been clarified. On the other hand, pre-natal malnutrition has been shown to induce glucose intolerance in rats, typical of non-insulin dependent diabetes mellitus. In the current work, it was investigated the acute effect of an ethanolic extract from *B. monandra* leaves (**E**) on glucose and insulin levels of control (C) and pre-natal malnourished (M) rats; measurements of kidney thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were also evaluated. At adult age, the animals were subjected to an overload of glucose (1.5 mg/kg, po.) and sequentially divided into 4 groups: a) C and M receiving vehicle (V, 0.1% DMSO, 2.5 ml/kg, po), the groups CV (n=8) and MV (n=8); C and M receiving **E** (500 mg/kg, po.), the groups CE (n=8) and ME (n=7). Blood samples were withdrawn from retro-orbital plexus prior to and 1, 2 and 4 h after V and **E** administration. Basal fasting serum glucose ( $104 \pm 4$  and  $127 \pm 6$  mg/dl, respectively,  $p < 0.05$ ) and insulin ( $0.28 \pm 0.07$  vs.  $1.18 \pm 0.51$   $\mu$ IU/ml,  $p < 0.05$ , respectively) were lower in C than in M rats. Both, CV and MV presented a peak of glucose in the first hour after glucose overload ( $188 \pm 6$  and  $170 \pm 8$ , respectively) however, different from CV, the MV group did not show a peak of insulin ( $1.36 \pm 0.45$  and  $0.38 \pm 0.24$   $\mu$ IU/ml, respectively) secretion. CE and ME presented lower peaks of glucose ( $161 \pm 6$  and  $156 \pm 5$  mg/dl, respectively) than CV and MV. Different from MV, ME presented a peak of insulin secretion in the first hour after glucose overload ( $1.93 \pm 1.03$   $\mu$ IU/ml); CE did it in the second hour ( $0.91 \pm 0.16$   $\mu$ IU/ml). Acute **E** administration reduced the glucose level, but did not change the secretion of insulin in C rats. In contrast, it seemed to restore the capacity of M rats to secrete insulin; **E**-induced hypoglycemia was due to insulin secretion.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

**Keywords:** *Bauhinia monandra*, intrauterine malnutrition, blood glucose, serum insulin, kidney TBARS.



## Introduction

Pre-natal malnutrition has been shown to induce glucose intolerance [1], therefore it may be an etiology determinant of some cases from non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). A combination of tissue resistance to insulin action and an abnormal insulin response to glucose constitute a characteristic of NIDDM [2, 3]. The disease is a major health problem because of the high frequency and incidence of chronic complications, which contribute to the prevalence of accelerated atherosclerosis and coronary heart disease [4], a worldwide problem, considered an important cause of morbidity and mortality [5]. According to the World Health Organization, the prevalence of diseases is over 150 million diabetics worldwide and this is likely to increase to 300 million or more by the year 2025 [6, 7].

In developing countries, medicinal plants have been an alternative method for the treatment of diabetes [8, 9]. Literature reports more than 800 species that have been used to reduce blood glucose [2, 10]. Evaluation of these plants and especially of their natural active compounds is an alternative way to develop new drugs for treatment of diabetes. In Northeastern of Brazil, the leaves of *Bauhinia monandra*, regionally known as “pata de vaca” (pulse), is a common popular medicine used as oral infusions for treating diabetes.

Plants of the genus *Bauhinia* are widely distributed in most countries and have been frequently used in folk medicine to treat several ailments, especially diabetes [11, 12, 13]. In recent years, the interest in these plants has increased considerably in all world [14]. The studies carried out with the extracts and purified compounds from these plants support most of their reported therapeutic properties. It also gives an account of some compounds including terpenes, steroids, lactones and flavonoids which were isolated from the genus *Bauhinia* [15]. A n-Butanol fraction from *B. forficata* leaf reduced blood glucose levels in

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

rats [13]. Previous studies indicated that leaf preparations from *B. monandra* induced hypoglycemia in rats. Also, *B. monandra*, it contains a galactose specific leaf lectin which has been highly purified in milligram quantities [11].

The aim of this work was to investigate the acute hypoglycemic effect of an ethanolic extract from *B. monandra* leaves, expressed as blood levels of glucose and insulin, as well as kidney TBARS, when administered orally to pre-natal malnourished (experimental type 2 diabetes) and control rats.

## **Materials and methods**

### *Preparation of the extracts*

All chemicals were of analytical grade. Solvents for the extraction were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Leaves of *B. monandra* Kurz were harvested from ornamental trees in Recife (State of Pernambuco, Northeast of Brazil). A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 57462, at the herbarium Dárdano de Andrade Lima, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife. Dried and powdered leaves of *B. monandra* (200 g) were extracted with 95% ethanol (1 L) until exhaustion. After filtration, the combined extracts were concentrated at 40 °C to dryness, the ethanolic extract (**E**).

### *Diets*

Intrauterine malnutrition was induced using a multideficient diet, as previously described [16, 17]. The content of its main nutrients was (g/g%): proteins 9, carbohydrates 78, lipids 1.1, fiber 7, minerals 4, sodium chloride 0.17 and Kcalories 356. No vitamin supplement was added. However, part of the diet was supplemented with 0.2% (g/g)

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

sodium chloride. The same nutrient in the standard diet (as indicated by the manufacturer, Purina, Agribands do Brasil, Paulínia, SP, Brazil) contains the following content (g/g%): protein 23, carbohydrates 41, lipids 2.5, fibers 9, minerals 8, sodium chloride 0.37 and Kcalories 278.

#### *Protocol design*

All experiments were performed on control (C) and intrauterine malnourished (M) Wistar rats of both genre. C and M rats were obtained of dams on a standard or on a multideficient diet, respectively, during mating and pregnancy. After parturition all rats were maintained on standard diet. Animals were kept under a constant 12 h light and dark cycle and an environmental temperature of 23 °C. At adult age, the animals were subjected to an overload of glucose (1.5 mg/kg, po.) and sequentially divided into 4 groups: a) C and M receiving vehicle (V, 0.1% DMSO, 2.5 ml/kg, po), the groups CV (n=8) and MV (n=7); C and M receiving E (500 mg/kg, po.), the groups CE (n=8) and ME (n=7). Blood samples were withdrawn from retro-orbital plexus prior to and 1, 2 and 4 h after V and E administration and serum glucose levels were measured. The serum insulin was measured before the animals received E and vehicle.

#### *Determination of serum glucose and insulin concentrations*

Blood glucose levels were determined by the glucose oxidase method [Trinder, 1969]. Insulin was measured by radioimmunoassay (Bio-Rad international® µU/mL).

#### *Measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)*

Kidney was minced finely and homogenized in ice-cold 1.15 % KCl to make a 10 % homogenate. The determination of TBARS values was performed by the modified

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

method of Pushparaj *et al.* [8]. To 0.1 mL homogenate, 0.9 mL of 1.15 % KCl and 2.0 ml of TBA reagent (0.375% thiobarbituric acid and 75% trichloroacetic acid) were added. Malonaldehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation, reacts with TBA to form a colored substance. The mixture was heated for 15 min in a boiling water bath; after reaction, the mixture was cooled in an ice bath. Cold TBA reactants were extracted with 3 mL of n-butanol. After centrifugation at 3,000 rpm for 5 min, the absorbance of the n-butanol layer was determined at 535 nm. Values are expressed as nmol MDA/25 mg wet tissue.

#### *Statistical analysis*

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by Student-Newman-Keuls for multiple comparison. *P* values of  $< 0.05$  were considered to be statistically significant.

### **Results and discussion**

Infusions and ethanolic extracts of *B. monandra* leaves have been broadly used in popular medicine. Serum glucose homeostasis and insulin levels of Wistar rats subjected to intrauterine malnutrition, followed by an overload of glucose in the adult life were investigated as an experimental model of type 2 diabetes [16]. This model was very adequate to evaluate the effect of ethanolic extracts already used by diabetics.

Table 1 shows data for body weight at birth and adult age. Birth weight was 19 % lower ( $p < 0.05$ ) in M than in C rats, while at adult age the weight was the same for both groups. Similar studies of the effects of pre-natal malnutrition have been reported as a

factor for intrauterine growth retardation, as well as association of low birth weight and glucose intolerance [1].

The effect of **E** on serum glucose levels is shown in Fig. 1. Basal fasting serum glucose was lower ( $p < 0.05$ ) in C than in M rats; these data suggest that M rats showed glucose intolerance. Both, CV and MV presented a peak of glucose in the first hour after glucose overload ( $188 \pm 6$  and  $170 \pm 8$  mg/dL, respectively). On the other hand, CE and ME presented lower peaks of glucose ( $161 \pm 6$  and  $156 \pm 5$  mg/dL, respectively) than CV and MV. After 4 h the serum glucose levels returned to their basal values. It was reported by Silva et al. [13] that acute treatment with the n-butanol fraction of *B. forficata* caused a significant decrease in blood glucose levels in control and aloxan-diabetic rats; a maximum effect on blood glucose level was observed at 1 and 2 h to both doses (400 and 600 mg/kg), respectively. Based on the hypoglycemic effect in control and malnourished rats, these results reinforce the hypothesis that the hypoglycemic mechanism involves an insulin-like effect through peripheral glucose consumption, to act on insulin receptors or inhibition of glucose reabsorption by the kidney.

Basal serum insulin in C was lower than in M rats,  $0.28 \pm 0.07$  and  $1.18 \pm 0.51$   $\mu\text{IU/mL}$ ,  $p < 0.05$ , respectively (Fig. 2). Different from CV, the MV group did not show a peak of insulin secretion in the first hour after glucose overload ( $1.36 \pm 0.45$  vs.  $0.38 \pm 0.24$   $\mu\text{IU/mL}$ , respectively). However, ME presented a peak of insulin secretion in the first hour ( $1.93 \pm 1.03$   $\mu\text{IU/mL}$ ), while CE did it in the second hour after glucose overload ( $0.91 \pm 0.16$   $\mu\text{IU/mL}$ ). Acute **E** administration reduced the glucose level in C rats, however the peak of insulin secretion in CE rats was retarded to 2 h (Figure 2 A). In contrast, it seemed to restore the capacity of M rats to secrete insulin (Figure 2 B). These data are in agreement with extract hypoglycemic activity induced by other species, such as *B. purpurea*, *B. manca*, *B. forficata* and *B. divaricata* [12, 20]. However, Russo et al. [18] reported that leaf

infusion from *B. forficata* did not affect glucose or insulin levels in control individuals or in diabetic patients. It has also been reported [2] that a single dose of a water extract of *Equisetum myriochaetum* aerial parts induced a significant reduction of the glucose levels; however there was no reduction of the insulin levels in diabetic patients, implying that the mechanism of action is not due to stimulation of insulin secretion.

Kidney TBARS were unaltered in pre-natal malnourished rats exhibiting hiperglycemia and alteration in insulin secretion (Table 1). As these results are not consistent with some studies published on oxidative stress in diabetes [5, 8], chronic studies are needed to elucidate the exact mechanism of peroxidative processes in malnourished and control rats treated with *B. monandra*. Hypoinsulinemia in diabetes increases the activity of fatty acyl coenzyme A oxidase, which initiates  $\beta$ -oxidation of fatty acids, resulting in lipid peroxidation [8]. It has been suggested that oxidative stress plays an important role in the development of chronic complications of diabetes [19].

The results obtained provided evidence for a direct pancreatic action of **E**, probably through a direct action on endocrine pancreatic  $\beta$  cells. This study reports for the first time that an hypoglycemic effect of *B. monandra* leaf ethanolic extract was due to an increased secretion of insulin.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq).

## Referências

- [1] Langley SC, Browne RF, Jackson AA. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets *in utero*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994; 109A: 223-29.
- [2] Revilla MA, Andrade-Cetto A, Islas S, Wiendenfeld H. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 81:117-20.
- [3] Nmila R, Gross R, Rchid H, Roye M, Manteghetti M, Petit P, Tijane M, Ribes G, Sauvaire Y. Insulinotropic effect of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. *Planta Medica* 2000; 66: 418-23.
- [4] Adallu B, Suryakantham V, Srikanthi BL, Reddy GK. Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clinica Chimica Acta* 2001; 314: 47-53.
- [5] Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clinica Chimica Acta* 2002; 321: 89-96.
- [6] King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes 1995-2025 prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-31.
- [7] Boyle, J. P., Honeycutt, A. A., Narayan, K. M., Hoerger, T. J., Geiss, L. S., Chen, H., Thompson, T. J. Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the US. *Diabetes Care* 2001; 24: 1936-40.
- [8] Pushparaj PN, Tan BKH, Tan CH. The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocin-diabetic rats. *Life Sciences* 2001; 70: 535-47.

Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

[9] Chakrabarti S, Biswas TK, Rokeya B, Ali L, Mosihuzzaman M, Nahar N, Khan AKA, Mukherjee B. Advanced studies on the hypoglycemic effect of *Caesalpinia bonducella* F. in type 1 and 2 diabetes in Long Evans rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 84: 41-6.

[10] Acosta-Patiño JL, Jiménez-Balderas E, Juárez-Oropeza MA, Díaz-Zagoya JC. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 77: 99-101.

[11] Coelho LCBB, Silva MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*. 2000; 11: 295-300.

[12] Pepato MT, Keller EH, Baviera AM, Kettelhut IC, Vendramini RC, Brunetti IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 81: 191-97.

[13] Silva FRMB, Szpoganicz B, Pizzolatti MG, Willrich MAV, Sousa E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 83: 33-7.

[14] Achenbach H, Stocker M, Constenha, MAF. Constituents of tropical medicinal plants. 31. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry* 1988; 27: 1835-1841.

[15] Okwute SK, Ndukwe GI, Watanabe K. Isolation of griffonilide from the stem bark of *Bauhinia thonningii*. *Journal Natural Products* 1986; 49: 716-717.

[16] Paixão ADO, Maciel CR, Teles MBB, Figueiredo-Silva J. Regional brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biology of the Neonate* 2001; 80: 239-246.



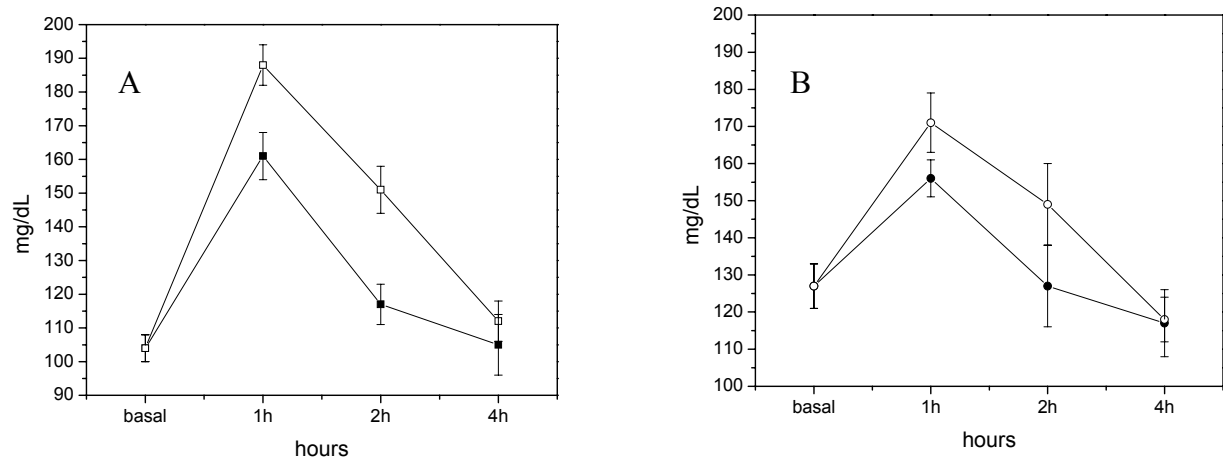
Argolo, A. C. C. M. Produção de lectina em cultura de tecidos de *Bauhinia monandra* ...

[17] Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. Arch Latinoam Nutr 1990; 40: 533-47.

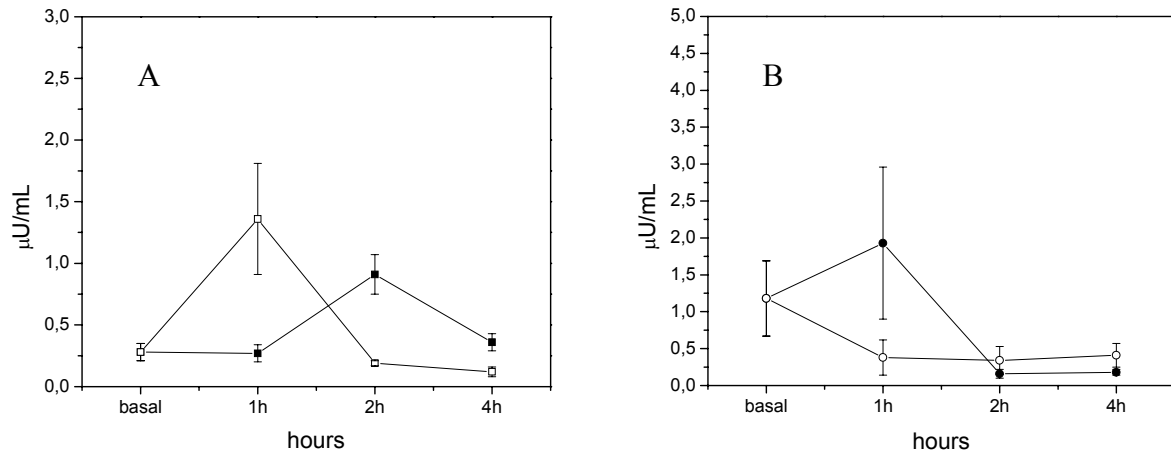
[18] Russo EMK, Reichelt AAJ, De-Sá JR, Furnaletto RP, Moisés RCS, Kasamatsu TS, Chacra AR. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf tracts in normal and diabetic patients. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1990; 23: 11-20.

[19] Busserolles J, Zimowska W, Rock Edmond, Rayssiguier Y, Mazur A. Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. Life Sciences 2002; 71: 1303-12.

[20] Ivorra MD, Payá M, Villar A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. Journal of Ethnopharmacology 1989; 27: 243-45.



**Figure 1: Effect of leaf ethanolic extract from *B. monandra* on serum glucose level of control (A) and pre-natal malnourished (B) rats. CE (■), CV (□), ME (●) and MV (○).**



**Figure 2: Effect of leaf ethanolic extract from *B. monandra* on serum insulin level of control (A) and pre-natal malnourished (B) rats. CE (■), CV (□), ME (●) and MV (○).**

Table 1: Body weights and kidney TBARS of control and malnourished rats

Parameters	Control	Malnourished
Body weight at birth (g)	6.4 ± 0.08*	5.2 ± 0.2** #
Body weight during adult life (g)	323 ± 19*	364 ± 24**
Kidney TBARS (nmol MDA/25 mg)	240 ± 24***	167 ± 27****

Results are expressed as means ± SEM.

MDA: malonaldehyde.

\* n=8; \*\* n=7; \*\*\* n=8; \*\*\*\* n=5.

#  $P < 0.05$  (against control).

#### **4 Conclusões**

- 1- Culturas de tecidos de *B. monandra* foram obtidas com sucesso.
- 2- Atividade hemaglutinante foi detectada em diferentes preparações de *B. monandra*.
- 3- Folhas de *B. monandra* contêm no mínimo três diferentes compostos com atividade antioxidante.
- 4- Imunodifusão revelou linhas de precipitação em todas as culturas de *B. monandra*.
- 5- Polipeptídios de diferentes preparações de *B. monandra* foram detectadas com IgG anti-BmoLL.
- 6- Administração aguda do extrato etanólico de folhas de *B. monandra* reduziu o nível de glicose no sangue e restaurou a capacidade de ratos submetidos à má-nutrição intrauterina de secretar insulina.

## *Anexos*

## **SBBq-2001 Livro de Resumos p. 52**

### **EVALUATION OF LECTIN ACTIVITY IN *Bauhinia monandra* TISSUE CULTURES.**

Argolo, A. C. C.<sup>1</sup>; Pletsch, M.<sup>2</sup> and Coelho, L. C. B. B<sup>1</sup>.

1- Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 2- Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL.

Plant lectins are a heterogeneous group of proteins, differing from each other with respect their molecular structure, carbohydrate-binding specificity and biological activities. Haemagglutinating activity (HA) has been detected in various species of the genus *Bauhinia* (Fabaceae). In order to study the HA of different tissue cultures of *B. monandra*, callus cultures, conventional and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed root cultures were established. Callus cultures were obtained from *B. monandra* leaves (3-month-old sterile plantlets) in Murashige and Skoog (MS) medium containing sucrose (30 g/L), indolbutiric acid (2 mg/L) and kinetin (0.1 mg/L). For infection with *A. Rhizogenes* LBA 9402, 3-month-old sterile plantlets were wounded at the leaf nodes using a hypodermic syringe containing 50 µL of the previously prepared bacteria. HA was detected in the 0-60% ammonium sulphate fractionation (F 0-60%) from the different cultures of *B. monandra*, when tested with glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes and human erythrocytes of blood group AB. The HA of tissues was commonly inhibited with common and distinct polypeptides by SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions. In conclusion, *B. monandra* tissue cultures provide an interesting model and an alternative supply for the production of homogeneous lectins.

Supported by CAPES and CNPq.

## **SBBq-2002 Livro de Resumos p. 91**

### **PHYTOCHEMICAL EVALUATION OF LEAF EXTRACTS FROM *Bauhinia monandra*.**

Argolo, A. C. C.<sup>1,2</sup>; Sant'Ana, A. E. G.<sup>2</sup>; Pletsch, M.<sup>2</sup> and Coelho, L. C. B. B<sup>1</sup>.

1- Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 2- Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL.

Trees of the genus *Bauhinia* (Fabaceae) are widely distributed in Brazilian cities by virtue of their ornamental attributes. Native or introduced species have been used as forage, human food or as phytotherapies for treatment of diabetes and as a diuretic. Infusions from leaves of *B. monandra* Kurz have been frequently used in popular medicine to treat diabetes. The aim of this work was to evaluate *B. monandra* leaves as source of antioxidant compounds. Dried and ground leaves (1.8kg) were extracted with ethanol 95% (EtOH). After filtration the combined extracts were evaporated to dryness to yield the ethanolic extract (BmoEtOH, 183g), which was dissolved in a mixture of methanol:water (2:3 v/v) and partitioned with hexane (BmoHex, 23.3g), chloroform (BmoChl, 2.8g) and ethyl acetate (BmoEtAc, 23.8g); an aqueous final part was obtained (BmoAq, 33.5g). These fractions exhibited antioxidant activity, except BmoAq, based on the reduction of the stable radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. BmoHex soluble fraction was filtered on silica gel and eluted with a gradient containing hexane and chloroform consisting of 5 steps, with 10, 20, 30, 50, 100% chloroform, respectively; another gradient with chloroform contained 10 and 100% methanol, respectively. Qualitative thin layer chromatography was performed in order to separate the compounds present in BmoEtOH; the best solvent system for the elution of BmoHex and BmoChl was toluene: ethyl acetate: formic acid (8.5:5.0:1.5). This system revealed the presence of a unique compound with



antioxidant activity in BmoHex ( $R_f = 0.88$ ); BmoChl revealed two compounds ( $R_f = 0.88$  and  $0.40$ ). BmoEtAc was eluted with toluene: ethyl acetate: formic acid (5.0:4.0:1.0), which revealed the presence of one compound with antioxidant activity ( $R_f = 0.46$ ). The fraction (2.3g) eluted by 10% hexane:chloroform is being chromatographed over silica gel, guided by the antioxidant activity. The phytochemical evaluation of *B. monandra* will reveal compounds present in leaves used as hypoglycaemic trials.

Supported by CAPES and CNPq.

**Trabalhos apresentados da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira  
de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq**

**17 a 20 de maio de 2003 – Caxambu, MG**

## ETHANOLIC EXTRACT OF *Bauhinia monandra* LEAVES INCREASES INSULIN SECRETION IN RATS

Argolo, A. C. C.<sup>1</sup>; Saturnino, A. C. R. D.<sup>1,3</sup>; Rodriguez, J. A. L.<sup>3</sup>; Paixão, A. D. O.<sup>2</sup> and Coelho, L. C. B. B.<sup>1</sup>.

1- Departamento de Bioquímica; 2- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CCB - UFPE, Recife, PE. 3-

Departamento de Farmácia, UFRN, Natal, RN. e-mail: adrianaargolo@bol.com.br

The mechanism of action of *B. monandra* extract on the popular medicinal treatment of diabetes has

not yet been clarified. On the other hand, pre-natal malnutrition has been shown to induce glucose

intolerance. In the current work, it was investigated the acute effect of an ethanolic extract from

*B. monandra* leaves (E) on glucose and insulin levels of control (C) and pre-natal malnourished (M)

Wistar rats of both genre. C and M rats were obtained of dams on a standard (Labina) or on a

multideficient diet, respectively. At adult age, the animals were subjected to an overload of glucose

(1.5 mg/kg, po.) and sequentially divided into 4 sub-groups: a) C and M receiving vehicle (V, 0.1%

DMSO, 2.5 ml/kg, po), the groups CV (n=8) and MV (n=8); C and M receiving E (500 mg/kg, po.),

the groups CE (n=8) and ME (n=7). Blood samples were withdrawn from retro-orbital plexus prior to

and 1, 2 and 4 h after V and E administration. Statistical analysis was performed by Student-Newman-

Keuls for multiple comparison. Basal fasting serum glucose (83 ± 4 vs. 112 ± 4 mg/dl, respectively; p

≥ 0.05) and insulin (0.28 ± 0.07 vs. 1.18 ± 0.51 µIU/ml, p ≥ 0.05; respectively) were lower in C than

in M rats. Both, CV and MV presented a peak of glucose in the first hour after glucose overload (188

± 6 vs. 170 ± 8, respectively), however, differently from CV, the MV group did not show a peak of

insulin (1.36 ± 0.45 vs. 0.38 ± 0.24 µIU/ml, respectively) secretion. CE and ME presented lower

peaks of glucose (161 ± 6 vs. 156 ± 5 mg/dl, respectively) than CV and MV. Differently from MV,

ME presented a peak of insulin secretion in the first hour after glucose overload (1.93 ± 1.03 µIU/ml),

while CE did it in the second hour after glucose overload (0.91 ± 0.16 µIU/ml). These data suggest

that M rats showed glucose intolerance. Acute E administration reduced the glucose level, but did

not change the secretion of insulin in C rats. In contrast, it seemed to restore the capacity of M rats

to secrete insulin. In summary, the E-induced hypoglycemia was due to insulin secretion

Supported by CAPES and CNPq

#### DETECTION OF A WATER SOLUBLE ANTIOXIDANT COMPONENT FROM *Moringa oleifera* SEEDS

Santos, A. F. S.; Argolo, A. C. C.; Coelho, L. C. B. B. & Paiva, P. M. G.

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

*Moringa oleifera* (Lam.) is a tropical plant belonging to the family Moringaceae.

The seeds can

be used in developing countries as a natural coagulant for drinking water treatment. Food antioxidants

are important for human nutrition since they decrease the oxidative damage induced

by free radicals to lipids, proteins and nucleic acids. The aim of this work was to investigate

the presence of antioxidant components in the water obtained after immersion of intact seeds

from *M. oleifera* (2.5 g) into distilled water (40 ml), at room temperature, during 5 (T<sub>5</sub>), 15

(T<sub>15</sub>) and 37 h (T<sub>37</sub>). The free radical-scavenger capacity of non-treated and heated (100 °C,

15 min) extracts (50 mg/ml, 2 µl) and catechin standard (5 mg/ml, 2 µl) were determined

using dot-blot on thin layer chromatography (TLC) stained with a 0.4 mM 1,1-diphenyl-2-

picrylhydrazyl radical (DPPH) solution. The dilutions of applied samples were 1:2, 1:4, 1:8,

1:16, 1:32, 1:64, 1:128 and 1:256. Positive results were observed by a yellow color on silica sheet.

The spectrophotometric assays were recorded using a Perking-Elmer UV-VIS Lambda-2 (515

nm) in a cuvette containing 20 µl of the sample (T<sub>37</sub>) with 90 µM DPPH dissolved in methanol

(1ml). The reactions were monitored for 1 h during which time the radical was stable. The

water soluble *M. oleifera* antioxidant component (WSMoAC) was detected similarly in T<sub>5</sub>, T<sub>15</sub>

and T<sub>37</sub> by DPPH reduction after 30 min. Spectrophotometric assay revealed the component

after a slow reaction, in comparison to standard catechin. Water obtained after immersion of

*M. oleifera* seeds may be beneficial for human health by its antioxidant activity. Supported by CNPq.

Immunointeraction of anti-Bauhinia monandra Leaf Lectin IgG with preparations from Callus Culture, Conventional and Agrobacterium rhizogenes-Transformed Root Cultures of *B. monandra*.

Argolo, A. C. C.1; Haver, N. J.1; Silva, M. B. R.1; Correia, M. T. .1; Pletsch, M.2 and Coelho, L. C. B. B.1

1- Departamento de Bioquímica, CCB, UFPE, Recife, PE. 2- Departamento de Química, CCEN, UFAL.

e-mail: adrianaargolo@bol.com.br

Plant lectins are a heterogenous group of proteins, differing from each other with respect to their

molecular structures, carbohydrate-binding specificities and biological activities.

Haemagglutinating

activity (HA), associated with the presence of lectins, has been detected in various species of the

genus *Bauhinia* (Fabaceae). A galactose-specific leaf lectin (BmoLL) was highly purified from *B.*

*monandra*. The aim of this investigation was the immunodetection of lectin in different tissue cultures

of *B. monandra* (callus, conventional and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots) through

immunodiffusion and electrophoretic transfer techniques. Double immunodiffusion assays were performed

(*Biochem J.*, 1982, 201, 641-645). Protein samples were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis

containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE). Electrophoretic transfer onto PVDF membrane was performed with a transfer apparatus. Polypeptides were incubated with rabbit anti-

BmoLL IgG conjugated to peroxidase and revealed with diaminobenzidine. The antibody was raised

against native BmoLL with the purpose to evaluate expression of lectin molecular forms, natural or

transformed. Immunodiffusion revealed precipitation lines in all cultures. From 0-60% from different

tissue cultures were resolved with common and distinct polypeptides by SDS-PAGE under reducing

conditions. Polypeptides from different *B. monandra* preparations reacted with anti-BmoLL IgG. In

summary, *B. monandra* tissue cultures may provide a source to obtain homogeneous lectin(s) which

could be a valuable biotechnological tool.

Supported by CAPES and CNPq.



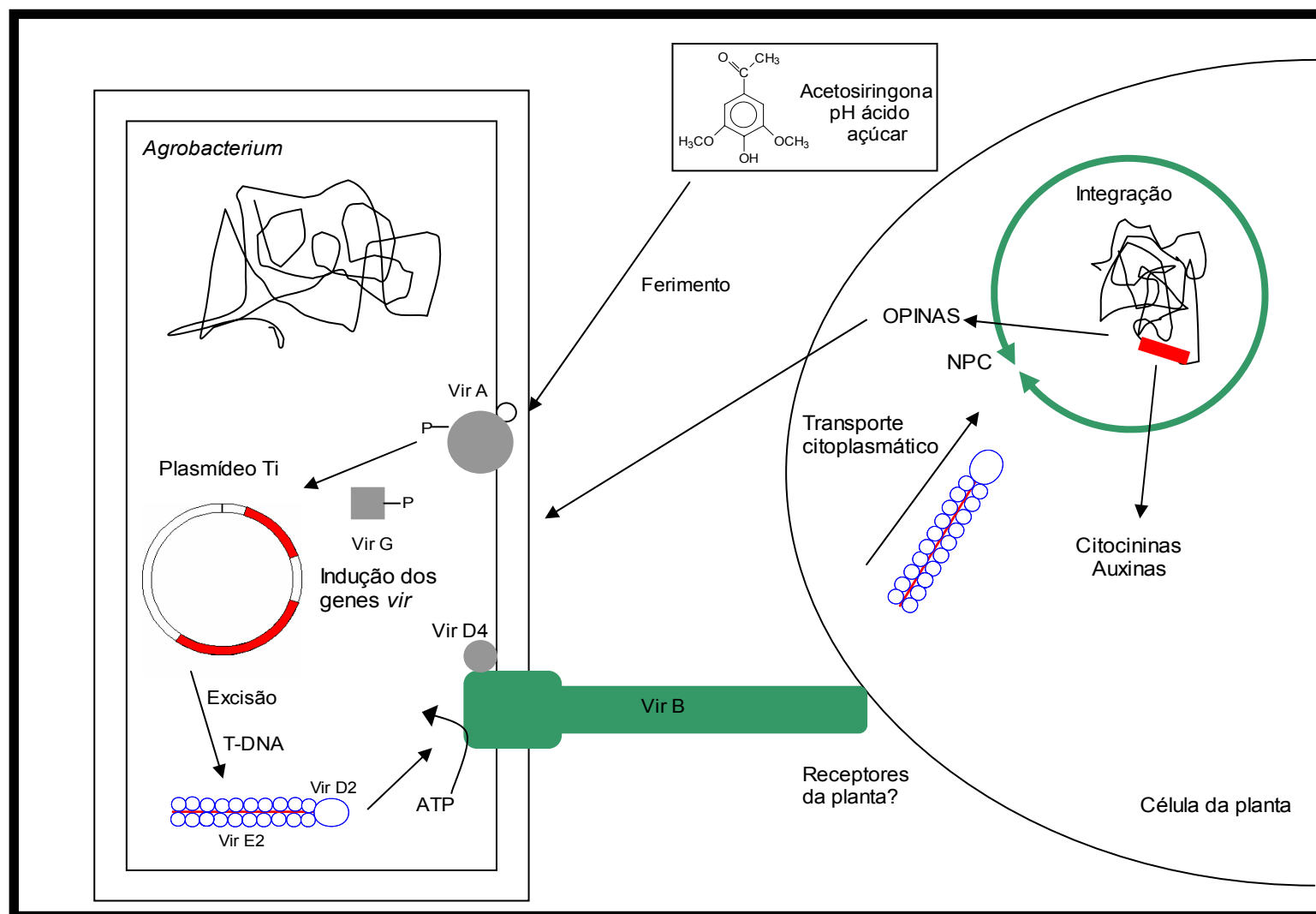


Figura 3: Transferência do T-DNA da *Agrobacterium* para as células vegetais (Baron & Zambryski, 1995).