

# **ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS EM SEMENTES DE *EUGENIA PYRIFORMIS* E SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

FAVERO, Adriano<sup>1</sup>

LUCCA, Rosemeire Aparecida da Silva de<sup>2</sup>

## **RESUMO**

Lectinas são proteínas de origem não imune, que despertam interesse biotecnológico devido à sua capacidade de ligação seletiva e reversível aos carboidratos, mediando processos de reconhecimento celular. O objetivo deste trabalho foi extrair lectinas, caracterizá-las e avaliar o potencial antimicrobiano das sementes de *Eugenia pyriformis*. O extrato aquoso foi fracionado em duas saturações de sulfato de amônio (0-40% e 40-80%). Amostras foram dosadas em relação ao conteúdo fenólico e proteínas. A presença de lectinas e a sua especificidade aos carboidratos foram investigadas utilizando-se ensaios de hemaglutinação, em eritrócitos humanos. O potencial antimicrobiano foi avaliado em ensaios de discos de difusão. As dosagens revelaram baixo teor de proteínas e fenóis nas amostras. As atividades hemaglutinantes foram positivas em todas amostras, que aglutinaram preferencialmente o grupo A, o aumento da atividade específica na fração 40-80% revelou que a pré-purificação foi eficiente. O perfil de inibição dessa atividade pelos carboidratos galactose, galactosamina, lactose e arabinose sugere a presença de ao menos duas lectinas. Os testes antibacterianos mostraram halos de inibição em bactérias Gram Positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Enterococcus faecalis*), e Gram Negativas (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Serratia sp.* e *Klebsiella sp.*) demonstrando o potencial dessa espécie como antibiótico de amplo espectro.

**PALAVRAS-CHAVE:** antibacteriano; antifúngico; biotecnologia; Myrtaceae; uvaia.

## **ISOLATION, PARTIAL CHARACTERIZATION OF *EUGENIA PYRIFORMIS* SEED LECTINS AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL**

## **ABSTRACT**

Lectins are proteins of non-immune origin, which arouse biotechnological interest due to their capacity of selective and reversible binding to carbohydrates, mediating processes of cell recognition. The objective of this work was to extract lectins, partially characterize them and evaluate the antimicrobial potential of *Eugenia pyriformis* seeds. The aqueous extract was fractioned in two saturations of ammonium sulfate (0-40% and 40-80%). Samples were measured in relation to phenolic content and proteins. The presence of lectins and their specificity to carbohydrates were investigated using hemagglutination assays in human erythrocytes. The antimicrobial potential was evaluated in diffusion disc assays. The dosages revealed low levels of proteins and phenols in the samples. The hemagglutinating activities were positive in all samples, which preferably grouped group A, the increase of the specified activity in the fraction 40-80% revealed that the pre-purification was efficient. The profile of inhibition of the activity by carbohydrates galactose, galactosamine, lactose and arabinose suggest the presence of at least two lectins. The antibacterial tests showed inhibition in Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Enterococcus faecalis*), and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Serratia sp.* and *Klebsiella sp.*) demonstrating the potential of this species as a broad-spectrum antibiotic.

**KEYWORDS:** antibacterial; antifungal; biotechnology; Myrtaceae; uvaia.

## **1. INTRODUÇÃO**

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que possuem a capacidade de se ligar seletiva e reversivelmente aos carboidratos e glicoproteínas sem alterar a suas estruturas

---

1 Mestre E-mail: [adriano.favero@uffs.edu.br](mailto:adriano.favero@uffs.edu.br)

2 Doutora E-mail: [roselucca@gmail.com](mailto:roselucca@gmail.com)

glicosídicas, isto é, sem processá-los enzimaticamente (LANNO; VAN DAMME, 2010; LAM; NG 2011; SHEELA; DEVI *et al*, 2013).

Altamente variáveis em suas sequências de aminoácidos, as lectinas são amplamente distribuídas nas mais variadas formas de vida, desde microrganismos até animais e plantas (CAVADA *et al*, 2001; SAHA *et al*, 2014). Elas ocorrem com mais abundância no reino vegetal, onde são detectadas e isoladas em diversas partes, como caule, folhas, frutos e principalmente sementes. As funções endógenas das lectinas, por exemplo, como proteínas de reserva e defesa, estão relacionadas com a localização dessas nos vegetais e com as propriedades de seus sítios ligantes de carboidratos (LANNO; VAN DAMME, 2014).

A aplicabilidade dessas biomoléculas nas áreas da saúde e biotecnologia decorre da sua capacidade de ligação específica aos carboidratos e glicoconjungados na superfície das células, atuando como mediadoras de processos de interação e reconhecimento celular dependente de carboidratos, dentre eles, alguns relacionados às patologias humanas, como infecções e metástase. De fato, quando isoladas, as lectinas vegetais apresentam ampla variedade de atividades biológicas, dentre elas, a ação inseticida (MACEDO *et al*, 2015), mitogênica (MOVAFAGH *et al*, 2016), antitumoral (HASHIM *et al*, 2017), anti-inflamatória (MOVAFAGH *et al*, 2016), antiviral (HAMID *et al*, 2013), antifúngica (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2018), e antibacteriana (PROCOPIO *et al*, 2017).

As doenças infecciosas sempre foram a principal motivo de morbidade e mortalidade em animais e seres humanos. Os antimicrobianos foram responsáveis por conter consideravelmente esses números, porém, o uso indiscriminado desse artifício, principalmente em procedimentos agrícolas, veterinários e médicos tem favorecido a emergência de cepas de microrganismos resistentes às drogas conhecidas e causam infecções graves (NASCIMENTO *et al*, 2000; GOMES *et al*, 2013; YIM *et al*, 2013; WHO, 2014).

A função imunológica que as lectinas endógenas desempenham nos vegetais, principalmente no antagonismo a microrganismos patogênicos, tem levado a um crescente interesse na investigação do papel dessas proteínas na interação célula/patógeno, no desenvolvimento das infecções e no seu potencial antimicrobiano (DIAS *et al*, 2015; LAGARDA-DIAZ *et al*, 2017; BREITENBACH; BARROSO; COELHO *et al*, 2018).

A abundante biodiversidade da flora brasileira traz consigo um grande potencial farmacológico pouco explorado, grande parte de seus representantes ainda não foram estudados (SANTOS *et al*, 2009). Dentre eles, a *Eugenia pyriformis cambess*, pertencente à família Myrtaceae, uma espécie nativa da região sul do Brasil, possui fruto amarelo, globoso e indeiscente, popularmente conhecido na região como uvaia (LORENZI, 2002; FELIPHE, 2015). Essa espécie apresentou

potencial antibiótico em óleos essenciais dos frutos (STIEVEN, 2009) e nos extratos hidroalcólicos das sementes (CHAVASCO *et al.*, 2014). Avaliação do potencial antimicrobiano e investigação das lectinas não foram relatados para os extratos aquosos das sementes dessa espécie. Por outro lado, lectinas foram purificadas a partir de sementes de *Eugenia uniflora* (OLIVEIRA, 2008) e *E. malaccensis* (BRUSNTEIN *et al.*, 2012).

O fato de a *Eugenia pyriformis* ser uma árvore nativa da região sul do Brasil, a carência de estudos de metabólitos primários dessa espécie e os relatos científicos desse gênero sobre seu potencial antibiótico, torna a espécie um grande alvo para pesquisas. O presente estudo teve por objetivo a detecção, o isolamento e a caracterização da lectina de sementes de *Eugenia pyriformis*. A lectina foi caracterizada em relação às especificidades de eritrócitos do sistema ABO humano e de ligação aos carboidratos. Adicionalmente, avaliou-se a presença de compostos antibacterianos e antifúngicos nos extratos e frações precipitadas das sementes dessa planta.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 ISOLAMENTO DE LECTINA**

Os frutos de *Eugenia pyriformis* foram coletados na região sudoeste do estado do Paraná. As sementes foram separadas da polpa e secas à temperatura ambiente para retirada completa da umidade e moídas em um micro-moinho para a obtenção da farinha. A farinha foi adicionada ao tampão fosfato salino (PBS - *phosphate buffer saline*), pH 7,4, na proporção 1/10 (m/v), sob agitação magnética em refrigerador durante 4 horas. O conteúdo total foi filtrado e rotacionado em uma centrífuga Sigma 3-16L refrigerada a 10 °C, por 30 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi precipitado fracionadamente com sulfato de amônio a 0-40% e 40-80% de saturação, em banho de gelo. As frações precipitadas foram dialisadas utilizando uma membrana filtrante YM 14 kDa com o objetivo de retirar o excesso de sulfato de amônio presente nas frações e recuperar a solubilidade das proteínas. Após diálise, as frações precipitadas foram denominadas FPD 0-40 e FPD 40-80 (FPD – Frações Precitadas Dialisadas).

### **2.2 DOSAGEM DO CONTEÚDO PROTEICO**

Para determinar a presença e a concentração de proteínas foi utilizado o método de Bradford, baseado na interação entre o corante comassie brilliant blue BG-250 (Sigma-Aldrich) e as macromoléculas das proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas

(Badford 1976; Sperotto 2014). A proteína albumina bovina sérica (BSA-*bovine serum albumin*) foi utilizada para a construção de uma curva padrão de dosagem compreendendo o intervalo entre 0,1 – 1,0 mg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Evolution 201/220 UV-Vis – Thermo Scientific) a uma absorbância de 595 nm.

### **2.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS**

Para quantificar os fenóis presentes nas amostras foi utilizado o método de Folin-Ciocalteau (Singleton *et al*, 1999; Alves e Kubota 2013). Para uma curva de calibração foi utilizado o ácido gálico (100, 125, 250, 500 e 1000 µg/ml) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Evolution 201/220 UV-Vis - Thermo Scientific) a uma absorbância de 740 nm.

### **2.4 ENSAIOS DE ATIVIDADES HEMAGLUTINANTES**

A atividade hemaglutinante (AH) do extrato bruto e das frações precipitadas e dialisadas foram testadas em placas de microtitulação de 96 poços, fundo U, utilizando-se NaCl, 0,15 M, e hemácias humanas 2% (Correia *et al*, 2008). Resumidamente, as amostras (50 µL) foram submetidas a uma diluição de fator 2 em NaCl (50 µL), previamente pipetados na microplaca. Desse modo, as diluições das amostras variaram de 1/2 a 1/2048 (títulos). Em seguida, 50 µL da solução de hemácias 2% foram adicionados e realizou-se a incubação por 1 h, em temperatura ambiente. Os resultados foram visualizados macroscopicamente, o aparecimento de uma rede reticulada no fundo do poço da microplaca é a AH positiva, enquanto na ausência dessa atividade as hemácias precipitam-se na base. Os testes foram realizados em duplicatas e o mesmo procedimento foi aplicado em amostras desnaturadas termicamente (100 °C, 30 minutos) para a comprovação de que a AH era de origem proteica.

A atividade hemaglutinante (AH, inverso do título) foi definida como a diluição de menor concentração das amostras que apresentou nítida aglutinação dos eritrócitos. A comparação entre esses valores permite avaliar qual o tipo sanguíneo apresenta maior especificidade para cada amostra. A atividade hemaglutinante específica (AHE), nas hemácias do tipo A, foi calculada pelo quociente entre a AH e a concentração de proteínas (mg/mL) da amostra. Esses dados permitem traçar um comparativo entre a concentração de lectinas nas diferentes amostras.

## 2.5 TESTE DE ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS

A especificidade das lectinas a carboidratos, geralmente é determinada pelo ensaio de inibição da hemaglutinação de células ou precipitação de glicoproteínas (Rudger e Gabius 2001). Desse modo, os ensaios da atividade hemaglutinante das amostras (EB, FPD 0-40, FPD 40-80) foram realizados na presença dos carboidratos: D(+)-glicose, D(+)-fucose, D(+)-arabinose, D(+)-ribose, D(+)-manose, D(+)-galactose, D(+)-glicosamina, D(+)-lactose, D(+)-sacarose, D(+) trealose di-hidratada, N-acetil D-glicosamina, L-ramnose, D(+)-maltose, D(+)-galactosamina e D-(+)-rafinose penta-hidratada, adquiridos da Sigma-Aldrich.

A metodologia utilizada é a descrita por Silva *et al.*(2012), e é semelhante ao ensaios de hemaglutinação com a diferença de que a diluição seriada (fator 2) das amostras (50 µL) é realizada com diversas soluções de carboidratos 0,4 M (50 µL), em NaCl, 0,15 M. Após a incubação de 30 minutos com os carboidratos, à temperatura ambiente, adicionou-se 50 µL de uma suspensão de hemácias 2% (grupo A). Os resultados das AHs foram observados após 1 h. Simultaneamente, foram realizados ensaios das amostras na ausência de carboidratos como um controle dessa atividade. Para efeitos de comparação foram calculadas as atividades hemaglutinantes específicas (AHE).

## 2.6 CULTURAS MICROBIANAS

Os inóculos bacterianos foram cultivados em caldo Nutriente durante 24 horas a 37 °C. As cepas utilizadas como microrganismos testes foram os seguintes, Gram Negativos: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexneri* NP 0122, *Escherichia coli* NP 0022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella* sp., *Morganella* sp., *Serratia* sp. e *Proteus mirabilis*, as Gram Positivas foram: *Staphylococcus aureus* Np 0023, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* B24, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*.

Os fungos também foram cultivados em caldo Nutriente a 28 °C durante 48 horas. Para esse ensaio foram utilizados cepas das leveduras: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gattii* WM178 e *Cryptococcus gattii* WM179.

A turbidez da cultura foi ajustada com solução salina estéril (NaCl 0,9%- 0,15M) até obter uma turbidez compatível com a solução padrão de McFarland a 0,5 (580 – 600 nm/ absorbância de 0,10 a 0,15, o correspondente a 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Os ajustes finos na absorbância foram realizados com o auxílio do espectrofotômetro.

## 2.7 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

Os ensaios foram realizados em triplicata através da metodologia de Kirby-Bauer (BAUER *et al*, 1966) ou método de difusão em disco. O teste fornece resultados qualitativos e seu princípio básico é a difusão de um composto antimicrobiano na superfície de um ágar a partir de um disco impregnado com o antimicrobiano em questão (ANVISA, 2018).

Para as culturas bacterianas foram utilizadas placas contendo ágar MH (Muller-Hinton), as bactérias testadas foram inoculadas com auxílio de um swab estéril preenchendo toda superfície da placa. Nos discos brancos estéreis (6 mm) para antibiograma foram pipetados 5 µL das amostras a serem testadas e os mesmos foram distribuídos na placa conforme padronizado pela ANVISA (CLSI 2009). Como controle foram utilizados discos de antibiograma comerciais de Amoxacilina 10 mcg (AMO 10), Ciprofloxacina 5 Mcg (CIP 5) e Penicilina G. 10 UI (PEN 10), pois os mesmos conferem o espectro de ação necessário as cepas bacterianas testadas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. A mesma metodologia foi aplicada para as culturas de fungos, porém, o meio utilizado para a metodologia foi o ágar Saubaud Dextrose e as placas foram incubadas por de 24 a 48 horas, a 35 °C.

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da média das medidas dos halos de inibição expressos em milímetros (mm).

Os ensaios antimicrobianos foram repetidos para os resultados positivos, utilizando a mesma metodologia (Kirby-Bauer), porém, desta vez após as amostras sofrerem desnaturação térmica (100 °C, 30 minutos).

## 3. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO (EB), FPD-0-40 E FPD-40-80

A farinha das sementes trituradas da *Eugenia pyriformis* incubada com o tampão PBS, pH 7,4, resultou em 575 mL de extrato bruto (EB). A finalidade foi extrair os componentes polares presentes nas sementes, como proteínas e peptídeos, porém, alguns metabólitos secundários, tais como os fenóis (taninos, flavonoides), lipídeos e os pigmentos das sementes também podem ser extraídos em menor proporção.

Na sequência, o EB foi fracionado com sulfato de amônio em duas etapas: 0-40% e 40-80% de saturação. Este processo segregava as proteínas por solubilidade e polaridade, facilitando a purificação. Os sais têm afinidade com as moléculas de água do meio, diminuindo a solubilidade das moléculas

de proteínas, que tendem a interagir entre si formando precipitados. A quantidade de sal para que ocorra a precipitação varia conforme a proteína, sendo este método um frequente primeiro passo para a purificação.

Diversas pesquisas utilizam o fracionamento com sulfato de amônio para isolamento de lectinas. Como exemplos Siebra Paes Barreto (2007) com a purificação e caracterização da lectina da entrecasca da *Caesalpinia ferrea var. leiostachya Benth* (CfeBL), e Silva *et al* (2012) na purificação da BfL, lectina extraída das sementes de *Bauhinia forficata*.

Na purificação das proteínas, a diálise mostrou-se um método essencial após o fracionamento, pois separou a fração precipitada das partículas menores que 14 kDa (como os sais, pequenos metabólitos e pigmentos) recuperando a solubilidade das proteínas. Nesse sentido, o processo de diálise das frações foi eficiente, visto que as todas as frações apresentaram características solúveis, com uma fase única. Após esse processo, obtiveram-se as frações precipitadas dialisadas nas saturações 0-40 (FPD 0-40) e 40-80 (FPD 40-80).

### 3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS E FENÓIS

O método utilizado para a extração, a precipitação e a diálise das proteínas nas 50 gramas de sementes da *E. pyriformis* obteve 550 mg para o EB, valor quatro vezes superior aos 275 mg extraídos em 100 gramas de *Bauhinia cheilantha* por Cruz (2015). O total de proteína recuperada das sementes de *Eugenia pyriformis* foi aproximadamente 1% da massa total das sementes, número relativamente pequeno, visto que em muitas sementes, esse valor pode chegar próximo a 10%.

Para as frações precipitadas dialisadas 0-40% e 40-80% obteve-se 55 e 66 mg após o processo de dialise, mostrando uma recuperação de aproximadamente 20% das proteínas do EB nas frações FPD. Pereira Junior (2014), obteve 2,39 mg/mL no extrato bruto da semente de *Dioclea reflexa*, mas Cruz (2015) conseguiu apenas 0,55 mg/mL no extrato bruto de *Bauhinia cheilantha*, mostrando que a metodologia de extração utilizada para *E. pyriformis* foi parcialmente eficiente, alcançando aproximadamente 1,0 mg/mL no EB.

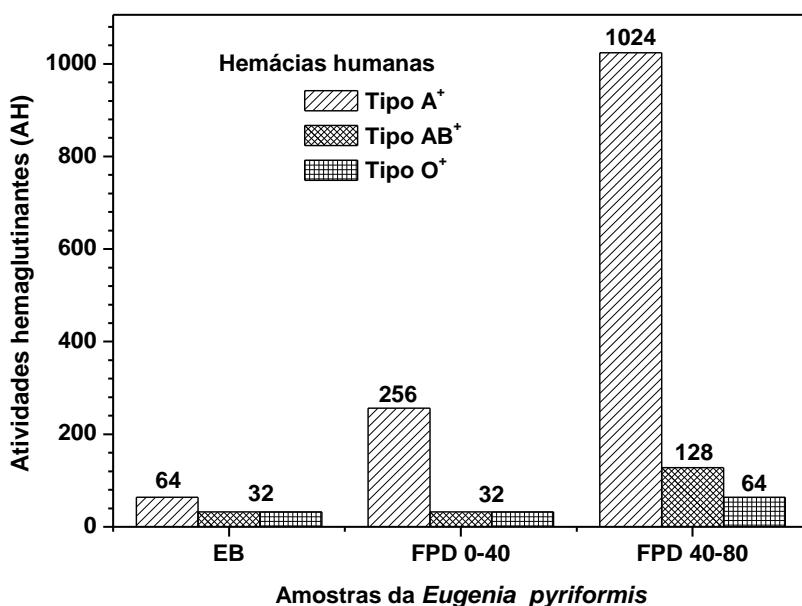
Os fenóis podem apresentar tanto atividade hemaglutinante quanto atividade antimicrobiana, por isso, é importante quantificá-los para evitar o mascaramento de resultados. As concentrações fenólicas de 71 mg no EB, valor aproximadamente dez vezes menor que de proteínas. Nas FPD 0-40% e 40-80% foi obtido 1,9 e 3,6 mg, respectivamente. Os valores obtidos, embora muito pequenos, podem ser responsáveis por uma pequena parcela da atividade hemaglutinante. Stieven (2009) não encontrou compostos fenólicos detectáveis nos, extrato etanólico e extrato aquoso de sementes de *E. pyriformis*.

### 3.3 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Os ensaios de atividade hemaglutinante são uma forma rápida e simples de detectar lectinas em amostras. O resultado de hemaglutinação positiva consiste na formação de uma rede reticulada no fundo do micropoço, enquanto a hemaglutinação negativa é a precipitação das hemácias em sua integridade.

A Figura 1 representa os resultados das atividades hemaglutinantes das amostras (EB, FPD 0-40, FPD 40-80) para cada tipo sanguíneo testado (A, AB e O). As amostras promoveram a aglutinação dos três tipos sanguíneos, não demonstrando especificidade para as hemácias humanas, porém notou-se uma maior afinidade pelo tipo A, evidenciada pelos seus maiores valores de atividade hemaglutinante (AH).

Figura 1 – Atividades hemaglutinantes das sementes da *Eugenia pyriformis* em hemácias humanas. As atividades do extrato bruto (EB) e das frações precipitadas e dialisadas 0-40% e 40-80% (FPD 0-40 e FPD 40-80), foram ensaiadas em hemácias 2%. A AH (inverso do título) é a diluição menos concentrada da amostra que apresentou aglutinação. Cada valor de AH é o resultado idêntico obtido dos ensaios em duplicatas.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Observa-se que para estas hemácias, a fração FPD 40-80 alcança AH de 1024, sendo oito vezes mais eficiente que nas hemácias tipo AB<sup>+</sup> (128 AH) e dezesseis vezes comparadas às do tipo O<sup>+</sup>. O teste sugere que existe a presença de lectinas em todas as frações.

Nas hemácias do tipo A, pode-se ordenar a atividade hemaglutinante na seguinte ordem decrescente: FPD 40-80 > FPD 0-40 > EB, sugerindo que as proteínas de interesse se encontram mais concentradas na FPD 40-80.

Além de lectinas, outros compostos presentes em extratos vegetais podem aglutinar hemácias, como os fenóis, por exemplo. Uma maneira de separar a aglutinação de lectinas, daquela promovida pelos metabólitos secundários, é realizando a desnaturação térmica das amostras para inibir a AH das proteínas. Após esse tratamento, verificou-se uma diminuição drástica dessa atividade para todas as amostras nos diversos tipos de eritrócitos (**Tabela 1**). Por exemplo, a AH da FPD 40-80 (hemácias tipo A+), diminuiu de um fator igual a 64 (1024 → 16 AH).

**Tabela 1 – Atividades hemaglutinantes das amostras nativas e desnaturadas da *E. pyriformis***

<b>Amostras</b>	<b>Hemácias</b>	<b>AH<sup>a</sup> (nativas)</b>	<b>AH (desnaturadas)</b>
<b>EB</b>	A+	64	2
	AB+	32	2
	O+	32	2
<b>FPD 0-40</b>	A+	256	8
	AB+	32	4
	O+	32	2
<b>FPD 40-80</b>	A+	1024	16
	AB+	128	2
	O+	64	4

Fonte: Dados da Pesquisa.

Nota:

<sup>a</sup>A atividade hemaglutinante foi testada nas hemácias 2% do grupo ABO.

A atividade hemaglutinante residual verificada com as amostras desnaturadas sugere a presença de outros compostos com tal atividade. Uma alternativa seria a presença de mais de uma lectina, sendo uma delas termorresistente e em baixos níveis de concentração. Contudo, a detecção de fenóis, previamente estimados, mesmo em concentrações baixas, pode ser a responsável por essa hemaglutinação.

### 3.4 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE ESPECÍFICA (AHE)

Os cálculos da atividade específica auxiliam na avaliação a cada passo do isolamento proteico, a cada etapa é esperada uma diminuição da proteína total e o aumento da atividade específica. Após o fracionamento, notou-se que atividade hemaglutinante específica (AHE) foi levemente superior na

FPD 0-40 em relação ao EB, essa atividade foi 4,4 vezes superior na FPD 40-80 indicando uma maior concentração de lectinas nessa fração, conforme verificado na tabela 2.

Tabela 2 – Etapas do processo de pré - purificação do extrato bruto das sementes de *E. pyriformis*.

Fração	Proteínas [[mg/mL]]	Proteínas (mg)	AH <sup>a</sup>	AHE <sup>b</sup> (AH/mg.mL <sup>-1</sup> )	AH <sup>c</sup> Total	FP <sup>d</sup>	RAH <sup>e</sup> (%)
EB	1,0	550	64	64	35.200	1	100
FPD 0-40	3,1	54	256	83	1.446	1,3	4,1
FPD 40-80	3,6	67	1024	284	5.286	4,4	15

Fonte: Dados da Pesquisa

Notas:

<sup>a</sup>Atividade hemaglutinante – maior diluição que apresentou atividade nas hemácias 2% (A<sup>+</sup>).

<sup>b</sup> Atividade hemaglutinante específica – AH/(mg.mL<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup> Atividade hemaglutinante total – AHE x volume (mL)

<sup>d</sup> Fator de Purificação (AHE (Fração)/AH EB)

<sup>e</sup> Recuperação da atividade hemaglutinante (AH Total (Fração)/ AH Total (EB) x 100)

O aumento da atividade específica das amostras sugere que a sequência do isolamento e pré-purificação foram eficientes, porém o rendimento da atividade hemaglutinante (RAH) foi de aproximadamente 20% da AHT é geralmente é considerado baixo para essa etapa. Essa característica dificulta a purificação, pois o rendimento diminui a cada passo do processo, necessitando-se de maiores quantidades de sementes para a sua conclusão.

### 3.6 ESPECIFICIDADE AOS CARBOIDRATOS

A especificidade da ligação das lectinas de *E. pyriformis* a carboidratos foi determinada por ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por mono e oligossacarídeos. Trata-se de um método semiquantitativo e concede informações quanto à habilidade do carboidrato em inibir a atividade da lectina (CORREIA *et al*, 2008).

A Tabela 3 compara as atividades hemaglutinantes específicas (AHE) das amostras incubadas com diversos carboidratos com um controle positivo. Os ensaios de inibição da AH demonstraram que de modo geral as lectinas das sementes de *E. pyriformis* possuem afinidade pela galactose, e também são inibidas pelos seus derivados, a galactosamina e a lactose, em menor grau. Em ordem decrescente, os fatores de diminuição para AHE na FPD 40-80 foram: galactose (130 x) > galactosamina (60 x) > lactose (16 x).

Tabela 3 – Especificidade das lectinas da *E. pyriformis* aos carboidratos

Carboidratos <sup>c</sup> (0,2 M)	AHE <sup>a</sup> (AH/mg.mL <sup>-1</sup> )		
	EB	FPD 0-40	FPD 40-80
Controle <sup>b</sup>	512	661	569
D(+)-arabinose	32	661	35,5
D(+)-galactosamina	16	10	8,9
D(+)-galactose	8	5,2	4,4
D(+)-lactose	16	82,3	35,5

Fonte: Dados da Pesquisa

Notas:

<sup>a</sup>Atividade hemaglutinante específica;

<sup>b</sup> Controle – ensaios de hemaglutinação na ausência dos carboidratos;

<sup>c</sup>Os carboidratos D(+)-glicose, D(+)-fucose, D(+)-ribose, D(+)-manose, D(+)- glicosamina, D(+) sacarose, D(+) trealose, N-acetil D-glicosamina, L-ramnose, D(+) maltose e D-(+)-rafinose não inibiram a aglutinação dos eritrócitos e AHE das amostras foram iguais aos controles.

O monossacarídeo arabinose tem baixa afinidade pelo EB e pela fração FPD 40-80 pois diminui a AHE de um fator 16. Entretanto, não inibe a FPD 0-40, sugerindo a presença de duas lectinas nas sementes de *E. pyriformis*. Os demais carboidratos não apresentaram afinidade para as amostras, as quais mantiveram suas AHE inalteradas em relação ao controle.

Considerando os resultados da especificidade, as sementes da *E pyriformis* contém duas lectinas, ao menos uma pertencente à família galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc).

A especificidade por galactose/N-acetil-galactosamina é comum nas lectinas vegetais, por exemplo, a jacalina, uma proteína antiviral e anti-inflamatória, extraída das sementes da *Artocarpus integrifolia*, considerada como modelo na classificação de uma família de lectinas (VAN DAMME *et al*, 1998). Outro exemplo é a lectina purificada da espécie *Morus alba*, MAL (KHURTSIDZE *et al*, 2017), que apresenta efeito similar ao hormônio do crescimento em plantas.

A afinidade entre a FPD 40-80 e o carboidrato arabinose, ainda que baixa, revelou uma propriedade rara, pois lectinas ligantes desse monossacarídeo não são comumente encontradas no reino vegetal. Elas são frequentemente isoladas de bactérias, como as lectinas da *Pseudomonas aeruginosa* e da *Ralstonia solanacearum* (Sudakevitz *et al*, 2002). As ocorrências em esponjas marinhas e cogumelos também são consideradas raras (WANG *et al*, 2005).

Quadro 2 – Especificidade a carboidratos das lectinas da *E. pyriformis*.

Carboidratos	Amostras	AH	AHE (AH/mg.mL <sup>-1</sup> )
Controle	EB	512	512
	FPD 0-40	2048	661
	FPD 40-80	2048	569
D(+) galactose	EB	8	8
	FPD 0-40	16	5,2
	FPD 40-80	16	4,4
D(+) lactose Monohidratada	EB	16	16
	FPD 0-40	256	82,3
	FPD 40-80	128	35,5
D(+) galactosamina	FPD 0-40	32	10
	FPD 40-80	32	8,9
D(+) arabinose	EB	32	32
	FPD 0-40	2048	661
	FPD 40-80	128	35,5

Fonte: Dados da Pesquisa

As especificidades aos carboidratos encontradas nas lectinas das sementes de *Eugenia pyriformis* foram bem diferentes das encontradas para as espécies do mesmo gênero. A lectina EuniL, purificada das sementes de *E. uniflora*, teve sua atividade hemaglutinante inibida por glicoproteínas, como a caseína e a fetuína, porém não se ligou nem a mono ou oligossacarídeos (Oliveira et al, 2008). Por sua vez a lectina extraída das sementes da *E. malaccensis*, foi inibida por glicose, mas também por azocaseína e fetuina (Brusstein et al, 2012).

### 3.7 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

Poucas lectinas estudadas apresentaram atividade antifúngica devido à dificuldade de as lectinas se ligarem a glicoconjungados e penetrar no citoplasma por causa da barreira imposta pela parede celular, isso torna a inibição direta de crescimento um fato improvável (LAGARDA-DIAZ et al, 2017). Porém, as lectinas podem afetar indiretamente a sobrevivência e outras atividades fisiológicas pela sua interação com a parede celular de fungos que é composta por quitina, glicanos e outros polímeros (WONG et al, 2010; LAGARDA-DIAZ et al, 2017).

Os testes antifúngicos não apresentaram halo de inibição em nenhuma das cepas testadas, indicando que não existe atividade antifúngica para essas leveduras.

Diversas lectinas apresentam atividade antibacteriana comprovada, geralmente essa atividade é devido a interação da lectina com componentes da parede celular bacteriana, como é o caso da N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e tetrapeptídeos ligados a MurNAc presentes

na parede celular de bactérias gram-positivas ou de lipopolissacáideos (LPS) presentes em paredes celulares de bactérias gram-negativas (KLAFKE *et al*, 2013; IORDACHE *et al*, 2015). Nas bactérias Gram Negativas, que sofreram interferência no seu crescimento, tem em sua composição de LPS, um ou mais carboidratos para os quais as lectinas demonstraram afinidade (POMPEU *et al*, 2015).

Os resultados foram medidos pelos halos de inibição do crescimento bacteriano em torno de cada um dos discos de 6mm de diâmetro e expressos em termos de diâmetro de inibição: < 8mm, inativo; 8- 11 mm parcialmente ativo; 12- 17mm ativo; > 17 mm muito ativo (ALVES *et al*, 2000). Os antibióticos utilizados como controle positivo foram escolhidos de forma a contemplar todas as cepas testadas e serviram como um indicativo para os resultados obtidos.

Os ensaios antibacterianos apresentaram atividade tanto em bactérias Gram Positivas (*S. aureus*, *S. úberes* e *E. faecalis*), quanto Gram Negativas (*E. coli*, *S. flexnerii*, *Serratia sp.* e *Klebsiella sp.*), o diâmetro dos halos de inibição apresentado no Quadro 3, revela que as lectinas de *E. pyriformis* tem um amplo espectro de ação, atuando de forma não seletiva sobre muitos grupos de bactérias possivelmente patogênicas humanas. Para os resultados positivos, as amostras (EB e FPD) não apresentaram diferenças significativas entre os halos para as mesmas cepas. Por exemplo, a *Klebsiella sp.* os halos mostraram que as amostras foram todas ativas com um halo médio de 15 mm, o mesmo aconteceu com a *Serratia sp.* com um halo médio de 13 mm. As demais cepas testadas não demonstraram nenhuma atividade antibacteriana.

Para comprovação que a atividade antibacteriana tem origem proteica, os testes positivos foram repetidos após as amostras (EB e FPDs) sofrerem desnaturação térmica. Como resultado, houve uma total perda de atividade antimicrobiana. Os extratos vegetais comumente possuem dois tipos de proteínas que apresentam atividade antimicrobiana, as lectinas e os inibidores de proteases, que também estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas (PAIVA *et al*, 2014).

Em pesquisa realizada com o extrato aquoso de sementes de *Eugenia pyriformis*, Stieven (2009), também encontrou atividade antibacteriana para as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Oliveira (2008), em trabalho realizado com lectinas de *Eugenia uniflora* (EuniL) também notou um amplo espectro de ação antibacteriana da lectina purificada, conseguindo inibir o crescimento de cepas tanto Gram Positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* e *Bacillus subtilis*), quanto Gram Negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Corinebacterium sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*).

*Isolamento, caracterização parcial de lectinas em sementes de Eugenia pyriformis e seu potencial antimicrobiano.*

Quadro 3 – Medidas das médias dos halos de inibição da atividade antibacteriana das sementes de *E. pyriformis* bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Microrganismo	Halo de inibição (mm)					
	EB	FPD 0-40	FPD 40-80	PEN 10	AMO10	CIP 5
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	14±2	13,5±1,5	12,5±2,5	30	34	-
<i>Np 0023</i>						
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	13±1	12±2	9±1	24	32	26
<i>ATCC 25923</i>						
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup> <i>B24</i>	15,5±1,5	17	12	17	25	25
<i>Shigella flexneri</i>	7	11,5±1,5	10	12	19	-
<i>NP 0122</i>						
<i>E. col</i> <sup>2</sup> <i>i NP 0022</i>	7	9±1	8	-	20	30
<i>E. coli</i> <sup>2</sup>	7,5±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5	-	18	26
<i>ATCC 25922</i>						
<i>Streptococcus</i>	11±1	11,5±3,5	15,5±1,5	6	18	-
<i>uberis</i>						
<i>Enterococcus</i>	13,5±1,5	12	10	10	26	32
<i>faecalis</i>						
<i>Klebsiella sp.</i>	14±2	13,5±1,5	16±1	12	24	30
<i>Serratia sp.</i>	12	14±2	12±2	20	26	35
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	8	-	-
<i>aeruginosa ATCC 27853</i>						
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	9	9,5±0,5	23
<i>agalactiae</i>						
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	12	-	-
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	12	10	30
<i>pyogenes</i>						
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	21±2
<i>Morganella sp.</i>	-	-	-	-	-	-

Fonte: Dados da Pesquisa

Notas:

<sup>1</sup>*Staphylococcus aureus*

<sup>2</sup>*Escherichia coli*.

A lectina (EmaL), isolada de *Eugenia malaccensis* apresentou também um amplo espectro antibacteriano no tratamento da cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Das cepas testadas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., tiveram melhores resultados obtendo um MIC de 1,5 µg/ml e MBC de 15 µg/ml. A *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* também mostraram atividade bactericida com um MIC de 15 µg/ml e MBC de 150 µg/ml (BRUSTEIN *et al.*, 2012).

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo demonstrou o potencial do extrato de *E. pyriformis* como uma importante ferramenta antimicrobiana e biotecnológica. Nesse sentido é crucial a purificação dessas lectinas para a sua caracterização biológica, físico-química e estrutural. Pesquisas futuras da aplicação de lectinas de plantas podem ser de grande importância para microbiologia clínica, além das possíveis aplicações terapêuticas

#### **REFERÊNCIAS**

- ALVES, T. M. D. A. *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ALVES E.; KUBOTA, E. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ANVISA. **Agência nacional de vigilância sanitária.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>>. Acesso em: 10 Nov. 2018.
- ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. D. S.; DE ALMEIDA NEVES, F. P.; DIONÍZIO, B. P.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. D. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural product research**, v. 28, n. 16, p. 1297-1301, 2014.
- BAUER A W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BREITENBACH, E.; BARROSO, P.; COELHO L. C. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

BRUSTEIN, V. P. *et al.* A novel antimicrobial lectin from Eugenia malaccensis that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 315-322, 2012.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL NETTO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Sciences**, v. 2, p. 123-135, 2001.

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S19. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute. 2009.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic. **Recent trends in toxicology**, v. 37, p. 47-59, 2008.

DIAS R. *et al.* Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

FELIPHE, B. H. **Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados à Eugenia pyriformis (Myrtaceae)**. Alfenas/MG, 2015.

GOMES, F. S. *et al.* Antimicrobial lectin from S chinus terebinthifolius leaf. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672-679, 2013.

HAMID, R. *et al.* Lectins: Proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 4, p. S93-S103, 2013.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, v. 5, p. e3784, 2017.

IORDACHE, F. *et al.* Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

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

KLAFKE, G. B. *et al.* Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from B auhinia variegata L. var. variegata expressed in E scherichia coli. **Journal of applied microbiology**, v. 115, n. 5, p. 1222-1230, 2013.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2011.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1800, p. 190-201, 2010.

**LORENZI, H. Árvores Brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACEDO, M.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, C. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MOVAFAGH, A. *et al.* Laboratory Use of Lectin Mitogens for Mitotic Stimulation of Human Lymphocytes. **Trends in Peptide and Protein Sciences**, v. 1, n. 2, p. 83-88, 2016.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Purification of a lectin from Eugenia uniflora L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.

POMPEU, D. *et al.* Purification, partial characterization and antimicrobial activity of lectin from Chenopodium quinoa seeds. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 696-703, 2015.

PROCÓPIO, T. F. *et al.* Casul: A new lectin isolated from Calliandra surinamensis leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017.

SAHA, R. K. *et al.* Antibacterial and Antioxidant Activities of a Food Lectin Isolated from the Seeds of Lablab purpureous. **American Journal of Ethnomedicine**, v. 1, n. 1, p. 008-017, 2014.

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

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n. 11, p. 53R- 62R, 2004.

SHEELA, D. S.; DHANALAKSHMI, J.; SELVI, S. Antibacterial and antifungal activity of lectin from seeds of Pongamia glabra. **Int. J. Curr. Biotech.**, v. 1, n. 8, p. 10-14, 2013.

SIEBRA, P. B. R. **Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina da entrecasca da Caesalpinia ferrea var. leiostachya Benth.** 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, M. C. C. *et al.* Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from Bauhinia forficata seeds. **Process biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049-1059, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Methods in enzymology. **Academic press**, p. 152-178, 1999.

SPEROTTO, R. A. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana.** Lajeado: Univates, 2014.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis Cambess*): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7-16. 2009.

SUDAKEVITZ, D.; IMBERTY, A.; GILBOA-GARBER, N. Production, properties and specificity of a new bacterial L-fucose-and D-arabinose-binding lectin of the plant aggressive pathogen *Ralstonia solanacearum*, and its comparison to related plant and microbial lectins. **The Journal of Biochemistry**, v. 132, n. 2, p. 353-358, 2002.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. **Biochem Soc Tran** v. 46, p. 217-233, 2018.

WANG, H.; NG, T. B. First report of an arabinose-specific fungal lectin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 337, n. 2, p. 621-625, 2005.

WHO - World Health Organization. **Public Health Importance of Antimicrobial Resistance**. Disponível em: [www.who.int/drugresistance/AMR\\_importance/en/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_importance/en/). Acesso em: 15 Ago. 2018.

WONG, J. H. *et al.* Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1221-1235, 2010.

YIM, N. *et al.* Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. **Integrative medicine research**, v. 2, n. 1, p. 18-24, 2013.