

# **AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM EXTRATOS METANÓLICO, SALINO E LECTINA DE *Stryphnodendron adstringens***

Melo, A.S. (UFPE) ; Silva, D.G.R. (UFPE) ; Cunha, M.C. (UFPE) ; Gomes, F.S. (UFPE) ; Napoleão, T.H. (UFPE) ; Coelho, L.C.B.B. (UFPE) ; Paiva, P.M.G. (UFPE) ; Sá, R.A. (UFPE)

## **RESUMO**

Lectinas são proteínas extraídas de plantas com diversas propriedades biológicas, inclusive a antibacteriana. O presente trabalho objetivou investigar a atividade antibacteriana em extratos metanólico (EM), salino (ES<sub>8</sub>) e lectina (PII) da entrecasca de *Stryphnodendron adstringens*, o 'barbatimão'. F<sub>4</sub> apresentou melhor AHE (270034 mg/mL), sendo levada à purificação da lectina de *S. adstringens*. Quanto à concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) (COURVALIN et al., 1985), o EM apresentou excelentes índices de CMI e CMB (µg/mL) para *S. aureus* (15,62 e 31,25) e *S. enteritidis* (0,97 e 3,9); enquanto ES<sub>8</sub>, (13875 e 27750) e (216,79 e 6937), respectivamente. PII apresentou índices de CMI apenas para *S. enteritidis* e *E. coli* (2,93 e 1500, resp.).

## **PALAVRAS CHAVES**

*S. adstringens*; Lectinas; Antibactericida

## **INTRODUÇÃO**

As bactérias são organismos micro ou submicroscópicos de organização celular simples, distribuídos isoladamente ou em colônias. Podem viver na presença de ar (aeróbias), na ausência de ar (anaeróbias), ou serem anaeróbias facultativas. Suas estruturas podem ser observadas através da Técnica de Gram (GRAM, 1884), dividindo por análise colorimétrica as bactérias em Gram-positivas (azuis/roxas) e Gram-negativas (vermelhas). Elas exercem importantes funções ecológicas, sendo sua relação com outros organismos benéfica ou parasitária. Das mais simples às mais complexas, estima-se que boa parte das doenças que atingem os humanos é de origem bacteriana. Estes patógenos vêm criando resistência cada vez maior frente aos antibióticos já utilizados na medicina, justificando então a necessidade da investigação de novos medicamentos que possam combatê-los. As lectinas são proteínas que interagem seletiva e reversivelmente com monossacarídeos e glicoconjugados (LIS & SHARON, 1986). Em vegetais, são frequentemente isoladas de sementes, folhas e entrecascas. De acordo com esta especificidade, elas apresentam várias propriedades biológicas, como inseticidas, antimicrobianas e antitumorais (VAN DAMME et al., 1998). *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae- Mimosoidae), o "barbatimão", é uma árvore nativa do cerrado brasileiro que se destaca pelo elevado teor de taninos em sua casca, sendo muito utilizada como cicatrizante e adstringente. Além de taninos, ela possui diversos metabólitos secundários, tais como alcaloides, flavonoides e saponinas (SIMÕES et al., 2004). Este trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana de preparações da entrecasca em extratos metanólico e salino, preparação lectínica e lectina isolada de *S. adstringens*, utilizando quatro cepas de bactérias distintas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

3 g da farinha da entrecasca de *S. adstringens* foram submetidas à infusão metanólica (10 mL) com agitação por 30 minutos (EM), posteriormente submetido à filtração simples. Outros 10g de farinha da planta foram submetidos à extração proteica em NaCl 0,15 M por 8h (ES<sub>8</sub>). A atividade lectínica (AH) de ES<sub>8</sub>, relacionada à especificidade e afinidades dos sítios de ligação das lectinas a carboidratos das paredes dos eritrócitos, foi realizada de acordo com KENNEDY et al. (1995), onde a AH correspondeu ao inverso da maior diluição (título<sup>-1</sup>) que ainda se observou a aglutinação total dos eritrócitos. EB<sub>8</sub> foi avaliado quanto à presença de proteínas por espectrofotometria através do método de LOWRY et al. (1951). A etapa inicial de purificação foi realizada com o fracionamento das proteínas de EB<sub>8</sub> através da adição de Sulfato de Amônio 1,0 M, segundo GREEN e HUGHES (1955). Em seguida, o precipitado (F<sub>4</sub>) foi submetido à diálise exaustiva com H<sub>2</sub>O e NaCl 0,15 M (4h cada) e

avaliado na presença de carboidratos. F<sub>4</sub> foi aplicado em coluna de quitina, equilibrada com NaCl 0,15 M. O Pico Protéico Ativo (PII) foi eluído com Ácido Acético 1,0 M, sendo submetido à diálise exaustiva com H<sub>2</sub>O (4h) e liofilização. EM, EB<sub>8</sub> e PII foram filtrados e avaliados quanto à atividade bactericida pelo ensaio de microdiluição seriada. As bactérias foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE, sendo elas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC-13076) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-29665), sendo cultivadas num Erlenmeyer (250 mL) contendo Caldo Nutritivo Difco™ (CN) e incubadas overnight a 37°C sob agitação orbital (100 rpm).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração F<sub>4</sub> apresentou a melhor AHE (270034,0), determinada pela razão entre AH e concentração de proteínas (mg/mL); caracterizando-se então material adequado para a purificação da lectina de *S. adstringens*. A AH de F<sub>4</sub> foi parcialmente inibida por N-acetilglicosamina (quitina), apontando a possibilidade de purificação da lectina através de cromatografia em colunas de Quitina. O Pico Proteico Ativo (PII) obtido através desta cromatografia (1,0 mg/mL de proteínas) e eluído com Ácido Acético 1,0 M foi definido como a Lectina de *S. adstringens*. O método de atividade antibacteriana escolhido é muito utilizado para a análise de extratos vegetais, classificado por Eloff (1998) como um método 30 vezes mais sensível e de melhor relação custo-benefício em relação às demais técnicas, garantindo maior confiabilidade aos resultados obtidos nestes ensaios. Quanto à avaliação do crescimento bacteriano, foram obtidos os seguintes resultados, expressos na tabela 2. Observou-se que o extrato metanólico apresentou os melhores índices de CMI e CMB para as cepas de *S. aureus* e *S. enteritidis*, indicando que, em concentrações muito baixas, o EM é capaz tanto de inibir visivelmente o crescimento das mesmas como de conseguir eliminar 99,9% dos seus inóculos originais. O extrato salino também se mostrou eficiente na inibição do crescimento destas bactérias, mas em concentrações superiores ao EM. A lectina de *S. adstringens* apresentou bons índices de CMI apenas para as cepas Gram-negativas, não sendo detectadas porcentagens significativas de eliminação dos inóculos originais nas concentrações testadas (CMB). Nenhuma atividade bactericida foi detectada para a *E. coli* e *K. pneumoniae*, com exceção do PII para esta última (CMI = 1500 µg/mL).

Tabela 1

**Tabela 1. AH, AHE e Proteínas presentes no Extrato salino, Fração proteica e Lectina de *S. adstringens***

Tampão/ Amostra	AH	AHE	Proteínas (mg/ mL)
NaCl 0,15 M	ES <sub>8</sub>	131072	222,000
	F <sub>4</sub>	8388608	31,065
	PII	1024	5,936

AH, AHE e Proteínas presentes no Extrato salino, Fração proteica e Lectina de *S. adstringens*.

Tabela 2

**Tabela 2. Atividade antibacteriana de EM, ES<sub>8</sub> e PII sobre cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *K. pneumoniae***

		Gram-positiva	Gram-negativas		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
EM	CMI (µg/mL)	15,62	ND	0,97	ND
	CMB (µg/mL)	31,25	ND	3,9	ND
ES <sub>8</sub>	CMI (µg/mL)	13875	ND	216,79	ND
	CMB (µg/mL)	27750	ND	6937	ND
PII	CMI (µg/mL)	ND	ND	2,93	1500
	CMB (µg/mL)	ND	ND	ND	ND

\* CMI - Concentração mínima inibitória, CMB - Concentração mínima bactericida, ND - Não detectado.

Atividade antibactericida de EM, ES<sub>8</sub> e PII em *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *K. pneumoniae*.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que EM, ES<sub>8</sub> e PII de *S. adstringens* possuem melhor atividade bactericida em cepas Gram-negativas (com exceção de *K. pneumoniae*), podendo ser úteis na formulação de novos fármacos destinados a estes e outros patógenos. Segundo SHARON & LIS, 1990; elas inibem estas bactérias em função da presença da N-acetilglicosamina na camada de peptidoglicanos destas. Uma vez ligados à lectina, os peptidoglicanos não mais auxiliam na sua alimentação, afetando seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, a presença de metabólitos secundários importantes nos extratos reforça a ação bactericida.

## AGRADECIMENTOS

À Propesq - UFPE, pelo apoio financeiro; ao Departamento de Antibióticos e ao laboratório de Glicoproteínas da UFPE pelo material biológico cedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73: 69-91, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais do Brasil - Nativas e Exóticas*. Ed. Plantarum, 2ª Ed., 2008.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod.*1996; 59:205-15.

SIMÕES, C. M. O.; SCHEMKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L.; SOUSA, C.R., *Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Ceará*, Fortaleza. 1999.

LOWRY, O.H et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275, 1951.

SUTTON, S. The Grain Stain. In: PMF Newsletter, Feb/2006.

SÁ, R.A. et al. Antibacterial and antifungal activities of Myracrodruon urundeuva heartwood. Wood Science and Technology, in press, 2008a.

OSTROSKY, E. O.; MIZUMOTO, M. K; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. L.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev. bras. farmacognosia, vol.18, nº 2. João Pessoa, Apr./June 2008.

BURNETT, G. W.; SCHUSTER, G. S. Microbiologia Oral e Enfermidade infecciosas. Ed. Panamericana. Buenos Aires, 1982, p. 31-70.