



## POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE LECTINAS ISOLADAS EM SEMENTES DE *EUGENIA PYRIFORMIS*

ADRIANO FAVERO; ROSEMEIRE APARECIDA DA SILVA DE LUCCA

### RESUMO

**Introdução:** Lectinas são proteínas de origem não imune, que despertam interesse biotecnológico na área da saúde, devido à sua capacidade de ligação seletiva e reversível a carboidratos, mediando processos de reconhecimento celular. **Objetivo:** Extrair, determinar sua especificidade aos carboidratos e avaliar o potencial antibacteriano no extrato e frações das lectinas em sementes de *E. pyriformis*. **Material e métodos:** A extração aquosa foi realizada em PBS (pH 7,4), seguida de fracionamento com sulfato de amônio nas saturações FPD 0-40 e FPD 40-80. As dosagens de fenóis e proteínas foram realizadas pelos métodos de Folin-Cicalteau e Bradford, respectivamente. Para a detecção das lectinas, as amostras nativas e termicamente desnaturadas foram submetidas a testes de atividade hemaglutinante (AH) em eritrócitos humanos (ABO), pelo método de diluição seriada. A inibição da AH das lectinas foi ensaiada com a pré-incubação das amostras nativas com os carboidratos D (+) -glicose, D (+) -maltose, D(+)-manose, D(+)-arabinose, D(+)-galactose, D(+)- galactosamina, D(+)-lactose e D(+)-fucose. Os ensaios antibacterianos foram realizados por meio de disco-difusão para as cepas: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. flexneri* NP 0122, *E. coli* (NP 0022 e ATCC 25922), *Klebsiella sp.*, *Morganella sp.*, *Serratia sp.*, *P. mirabilis*, *S. aureus* (Np 0023, ATCC 25923 e B24), *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* e *B. cereus*. **Resultados:** As dosagens revelaram que as sementes contêm baixo teor de proteínas (1%) e fenóis (0,1%). Os ensaios de AH das amostras nativas resultaram positivos para hemácias ABO, com preferência para o tipo A e maior AH para a FPD 40-80 (diluição 1:1024). Após a desnaturação térmica das amostras, as AHs sofreram considerável diminuição (1:16), mostrando que a maior parte da AH é devida à presença de lectinas, que apresentaram afinidade principalmente por D(+)-arabinose, D(+)-lactose e D(+)-galactosamina. Os testes antibacterianos inibiram as cepas *S. aureus*, *S. uberis*, *E. faecalis*, *S. flexneri*, *E. coli*, *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.*, para todas as frações. **Conclusão:** A perda da atividade antibacteriana nas amostras desnaturadas mostra a natureza proteica dos compostos responsáveis pelo efeito. A diversidade da especificidade dos carboidratos em cada amostra sugere a presença de no mínimo duas lectinas nas sementes.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano; Mirtacea; Biotecnologia; Uvaia; Carboidratos.

### 1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam seletiva e reversivelmente a carboidratos e glicoproteínas sem alterar sua estrutura glicosídica (Lam e Ng 2011). Elas são altamente variáveis em suas sequências de aminoácidos e são encontradas em microrganismos, animais e principalmente em plantas, desempenhando funções como proteínas de reserva e defesa (Lanno e Van Damme, 2010). As lectinas vegetais têm aplicabilidade em áreas de saúde e biotecnologia devido à sua capacidade de ligação

específica a carboidratos, desempenhando um papel importante na interação celular dependente de carboidratos, incluindo processos relacionados a patologias humanas como infecções e metástase. Elas também exibem diversas atividades biológicas, como ação inseticida, antimetabólica, antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica e antibacteriana (Procopio et al. 2017; Van Holle e Van Damme, 2018).

As doenças infecciosas continuam sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo e o uso indiscriminado de antimicrobianos tem levado ao surgimento de microrganismos resistentes (Yim et al. 2013; Who 2014). As lectinas endógenas em plantas desempenham um papel na defesa contra microrganismos patogênicos, tornando-as alvos de pesquisa no desenvolvimento de terapias antimicrobianas (Lagarda-Diaz et al. 2017; Breitenbach et al. 2018). A biodiversidade da flora brasileira oferece um potencial farmacológico ainda pouco explorado, incluindo a *Eugenia pyriformis*, uma espécie nativa do sul do Brasil que demonstrou potencial antibiótico em seus frutos e sementes (Lorenzi 2002; Felipe 2015). No entanto, o potencial antimicrobiano das lectinas presentes nos extratos aquosos das sementes ainda não havia sido investigado.

O estudo concentrou-se na detecção, isolamento e caracterização da lectina das sementes da *Eugenia pyriformis*, incluindo suas especificidades de ligação a eritrócitos do sistema ABO humano e carboidratos. Além disso, o estudo avaliou a presença de compostos antibacterianos nos extratos e frações precipitadas das sementes da planta. A importância do estudo reside na carência de informações sobre essa espécie nativa e sua potencial contribuição para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento de Lectina

Os frutos de *E. pyriformis* foram coletados na região sudoeste do estado do Paraná. As sementes foram secadas e moídas para a obtenção da farinha que adicionada ao PBS (*phosphate buffer saline*), pH 7,4, na proporção 1/10 (m/v), sob agitação refrigerada. O conteúdo foi filtrado e rotacionado a 10 °C, por 30 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi precipitado fracionadamente com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0-40% e 40-80% de saturação. As frações foram dialisadas utilizando uma membrana filtrante YM 14 kDa para retirar o excesso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  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 Precipitadas Dialisadas).

### 2.2 Dosagem de proteínas e fenóis.

Para determinar a concentração de proteínas foi utilizado o método de Bradford, baseado na interação entre o corante comassie brilliant blue e as macromoléculas das proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (Sperotto 2014). A proteína albumina bovina sérica foi utilizada para a construção de uma curva padrão de dosagem (0,1 – 1,0 mg/mL). As leituras foram realizadas em espectrofotometria a uma absorbância de 595 nm.

Os fenóis presentes nas amostras foram quantificados utilizando o método de Folin-Ciocalteu (Alves e Kubota 2013). Para uma curva padrão foi utilizado o ácido gálico (100, 125, 250, 500 e 1000 µg/ml) e a leitura foi realizada a uma absorbância de 740 nm.

### 2.3 Ensaios de Atividades hemaglutinantes

A atividade hemaglutinante (AH) do EB e FPD foram realizadas (triplicata), 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. O mesmo procedimento foi realizado 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.

## 2.4 Teste de especificidade a carboidratos

A especificidade das lectinas a carboidratos é determinada pelo ensaio de inibição da hemaglutinação de células ou precipitação de glicoproteínas. 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.

A metodologia (Silva et al., 2012) é semelhante aos 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).

## 2.5 Ensaios Antimicrobianos

As cepas utilizadas foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexneri* NP 0122, *Escherichia coli* (NP 0022 e ATCC 25922), *Klebsiella sp.*, *Morganella sp.*, *Serratia sp.*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* (Np 0023, ATCC 25923 e B24), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*. Os ensaios de disco difusão/Kirby-Bauer (Bauer et al. 1966) fornecem 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).

O teste foi realizado em triplicata conforme a ANVISA (CLSI 2009), com 5 µL das amostras a serem testadas e discos de antibiograma: Amoxicilina 10 mcg (AMO 10), Ciprofloxacina 5 Mcg (CIP 5) e Penicilina G. 10 UI (PEN 10) como controle, pois os mesmos conferem o espectro de ação necessário as cepas testadas. As placas foram incubadas a

37°C/24h. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da média dos halos de inibição em milímetros (mm). Os resultados positivos foram repetidos após as amostras sofrerem desnaturação térmica.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção do Extrato Bruto (EB), FPD-0-40 e FPD-40-80

A farinha foi incubada com o PBS para 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. Depois, o EB foi fracionado com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em duas etapas: 0-40% e 40-80% de saturação. Este processo segrega as proteínas por solubilidade e polaridade, facilitando a purificação. Os sais têm afinidade com as moléculas de água, diminuindo a solubilidade das 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. Na purificação das proteínas, a diálise separou a fração precipitada das partículas menores que 14 kDa (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, em fase única. Após esse processo, obtiveram-se FPD 0-40 e FPD 40-80.

#### 3.2 Dosagem de Proteínas e Fenóis

Para as frações precipitadas dialisadas 0-40% e 40-80% obteve-se 55 e 66 mg após o processo de diálise,  $\cong 20\%$  das proteínas do EB nas frações FPD. Pereira Junior (2014), obteve 2,39 mg/mL (EB) da semente de *Dioclea reflexa*, mas Cruz (2015) conseguiu apenas 0,55 mg/mL no EB 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.

#### 3.3 Atividade hemaglutinante e Atividade Hemaglutinante Específica (AHE)

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. Observa-se que, a fração FPD 40-80 alcança AH de 1024, sendo oito vezes mais eficiente que nas hemácias tipo  $\text{AB}^+$  (128 AH) e dezesseis vezes comparadas às do tipo  $\text{O}^+$ . 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 > 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 fenóis). 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 (**Tabela 1**).

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

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

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

A AH residual das amostras desnaturadas sugere a presença de outros compostos com tal atividade. Uma possibilidade é a presença de mais de uma lectina (termorresistente) ou fenóis em baixos níveis de concentração. 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, 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, **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	FPD <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

<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.

### 3.4 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** demonstra 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 para AHE na FPD 40- 80 foram: galactose (130x) > galactosamina (60x) > lactose (16x).

**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

<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. Os demais carboidratos não apresentaram afinidade para as amostras.

As sementes da *E pyriformis* contém duas lectinas, ao menos uma pertencente à família galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc) que 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).

**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
-----------	-----	------

As especificidades aos carboidratos encontradas diferem 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 (Brusntein et al., 2012).

### 3.5 Ensaios Antimicrobianos

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- acetilglicosamina, ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e tetrapeptídeos ligados a MurNAc presentes na parede celular de bactérias gram-positivas ou de lipopolissacárideos presentes em paredes celulares em 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 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**, mostram um amplo espectro de ação não seletiva. As demais cepas testadas não demonstraram nenhuma atividade antibacteriana.

Para comprovação que a atividade antibacteriana tem origem proteica, os testes positivos foram repetidos após desnaturação térmica, resultando em uma total perda de atividade. Os extratos vegetais comumente possuem dois tipos de proteínas que apresentam atividade antimicrobiana, as lectinas e os inibidores de proteases, ambos envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas (Paiva et al. 2014). Em pesquisa realizada com o extrato aquoso de sementes de *E. pyriformis*, Stieven (2009), também encontrou atividade antibacteriana para as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Oliveira (2008), demonstrou um espectro de ação em lectinas de *Eugenia uniflora* (EuniL).

**Quadro 3** – Medidas das médias dos halos de inibição da atividade antibacteriana das sementes de *E. pyriformis*.

Halo de inibição (mm)						
	Microrganismo	EB	FPD 0-40	FPD 40-80	PEN 10	AMO10
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup> Np 0023	14±2	13,5±1,5	12,5±2,5	30	34	-
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup> ATCC 25923	13±1	12±2	9±1	24	32	26
<i>S. aureus</i> <sup>1</sup> B24	15,5±1,5	17	12	17	25	25
<i>Shigella flexneri</i> NP7 0122		11,5±1,5	10	12	19	-
<i>E. coli</i> <sup>2</sup> NP 0022	7	9±1	8	-	20	30
<i>E. coli</i> <sup>2</sup> ATCC 25922	7,5±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5	-	18	26

<i>Streptococcus uberis</i>	11±1	11,5±3,5	15,5±1,5	6	18	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	13,5±1,5	12	10	10	26	32
<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

<sup>1</sup>*Staphylococcus aureus*, <sup>2</sup>*Escherichia coli*.

A lectina (EmaL), isolada de *E. malaccensis* apresentou também um amplo espectro antibacteriano, tendo *S. aureus*, *Streptococcus sp.*, os melhores resultados com um MIC de 1,5 µg/ml e MBC de 15 µg/ml. A *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Klebsiella sp.* e *P. aeruginosa* tiveram um MIC de 15 µg/ml e MBC de 150 µg/ml (Brustein et al., 2012).

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., (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3), 367-373.

ALVES E, KUBOTA, E. 2013. 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.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>>. Acesso em: 10 Nov. 2018.

BAUER A W. et al. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, v. 45, n. 4<sub>ts</sub>, p. 493-496.

BREITENBACH BARROSO COELHO L. C. et al. 2018. Lectins as antimicrobial agents. *Journal of applied microbiology*, v. 125, n. 5, p. 1238-1252.

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

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S19. CLSI, Wayne.

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

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

KHURTSIDZE E et al. 2017. 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.

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

LAGARDA-DIAZ I, GUZMAN-PARTIDA A, VAZQUEZ-MORENO L. 2017. Legume lectins: proteins with diverse applications. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 6, p. 1242. LAM S K, NG T B. 2011. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 45-55.

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

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

OLIVEIRA M D L et al. 2008. 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.

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

PROCÓPIO T F et al. 2017. 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.

SILVA M C C et al. 2012. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process biochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1049-105

SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS R M. 1999. 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.

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

SUDAKEVITZ D, IMBERTY A, GILBOA-GARBER N. 2002. 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

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

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.

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