

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA LECTINA SOLÚVEL EM ÁGUA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (WSMoL): ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Rafael Bastos Gonçalves Pessoa¹; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CBB – UFPE; E-mail: rafael_bastos95@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica e Fisiologia – CCB – UFPE. E-mail: luanacassandra@terra.com.br

Sumário: A utilização de antimicrobianos sintéticos frente à bactérias patogênicas tem ocasionado aumento da incidência de infecções microbianas devido ao surgimento de linhagens resistentes. Lectinas, proteínas que ligam carboidratos, têm sido descritas como potenciais agentes antimicrobianos. Estudos têm demonstrado potenciais farmacológicos de *Moringa oleifera*. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ação antibacteriana da lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera*, WSMoL, sobre linhagens de bactérias patogênicas *Enterococcus faecalis* e *Micrococcus luteus*, bem como investigar o entendimento do seu mecanismo de ação através da análise por microscopia confocal. WSMoL foi isolada em colunas de cromatografia de acordo com protocolo previamente estabelecido. A concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) foi determinada. WSMoL inibiu o crescimento de *E. faecalis* e *M. luteus* com CMI de 15,625 e 41,75 µg/mL, respectivamente. Atividade bactericida foi observada apenas para *E. faecalis* (CMB de 125 µg/mL). As imagens de microscopia confocal a laser mostraram diminuição no número de células SYTO-9 (células intactas) com um aumento concomitante no número de células PI-positivos (morte celular) para ambas as bactérias testadas. Todas essas mudanças no perfil das células marcadas são indicativas de um aumento da permeabilidade da membrana e perda da integridade do envelope bacteriano, que conduz finalmente à morte celular. Os resultados revelam que WSMoL é um composto bioativo contra bactérias patogênicas humanas *E. faecalis* e *M. luteus*.

Palavras-chave: atividade antibacteriana; lectina; *Moringa oleifera*.

INTRODUÇÃO

Bactérias representam os organismos procariotos mais simples e podem ser encontradas na maioria dos ambientes naturais; possuem importância médica desde que causam infecções graves em humanos (Schaechter *et al.*, 2002; Cantón *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado que cerca de 60 % de todos os microrganismos apresentam resistência a pelo menos um antibiótico (Gil & Mathias, 2005). Produtos de origem vegetal possuem atividade antimicrobiana conhecida e podem ocorrer em todos os órgãos de uma planta (Albuquerque *et al.*, 2006; Abiola *et al.*, 2007). Lectinas são versáteis proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, ubiquamente distribuídas na natureza, as quais reconhecem e ligam-se reversivelmente a carboidratos (Lam *et al.*, 2010). O mecanismo antibacteriano de lectinas envolve interações com ácidos teicóicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos da parede celular (Correia *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011). *Moringa oleifera*, uma árvore nativa da Índia, é amplamente cultivada nos trópicos em todo o mundo; tem sido objeto de várias pesquisas, devido às suas propriedades industriais e medicinais (Santos *et al.*, 2005). WSMoL, lectina solúvel em água de sementes de *M. oleifera*, não apresenta genotoxicidade, foi ativa frente a *Staphylococcus*

aureus e *Escherichia coli* e causou redução de microrganismos da água do ambiente (Ferreira *et al.*, 2011; Rolim *et al.*, 2011).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a purificação de WSMoL sementes de *M. oleifera* foram trituradas e homogeneizadas com água destilada sob agitação constante (16 h a 4 °C) para a obtenção do extrato bruto a 10%, que foi tratado com sulfato de amônio (60% de saturação) (Green e Hughes, 1955). O precipitado (fração 0-60%), coletado após centrifugação (3.000 g a 4 °C), foi dialisado contra água destilada (4h) e NaCl 0,15 M (1h) e aplicado em coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com NaCl 0,15 M (fluxo 2 mL/ 6min). WSMoL foi eluída com ácido acético 1,0 M. A avaliação da concentração de proteínas foi realizada segundo Lowry *et al.* (1951) e a atividade hemaglutinante (AH) de acordo com Paiva & Coelho (1992). Para a avaliação da atividade antibacteriana, linhagens bacterianas de *E. faecalis* e *M. luteus* foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE. A lectina WSMoL (100 µL) foi diluída sucessivamente (1:2048) em meio Miller Hinton em dez diluições sucessivas. A todos os poços foram adicionados 20 µL da suspensão bacteriana (10^5 - 10^6 UFC/mL) e a placa foi incubada 37 °C por 24 h. O controle (sem tratamento) correspondeu ao crescimento bacteriano 100%. O ensaio foi realizado em triplicata. A densidade óptica a 490 nm (DO₄₉₀) foi medida em espectrofotômetro para a determinação do CMI, que correspondeu à menor concentração de WSMoL em que ocorreu a diminuição da DO₄₉₀ igual ou maior que 50% em relação à DO₄₉₀ no poço controle (Amsterdam, 1996). Para determinação da concentração mínima de WSMoL com efeito bactericida (CMB), uma alíquota de cada poço onde houve a inibição do crescimento foi semeada em placa de Petri contendo meio MH ágar e incubada por 24h a 37 °C. A menor concentração em que não for observado crescimento da bactéria correspondeu ao CMB. Para a microscopia confocal, as células bacterianas tratadas com WSMoL foram coradas com SYTO9 e PI do kit de viabilidade celular bacteriana BacLight Live/ Dead (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) por 15 min de acordo com as instruções do fabricante. Para o controle positivo a suspensão celular foi exposta ao álcool isopropílico (700 mL/ L) durante 1 h para a permeabilização das membranas celulares. Células não tratadas com a lectina corresponderam ao controle negativo. As amostras foram observadas através de uma Leica SPII AOBs utilizando o marcador SYTO9 (480/500 nm excitação/ emissão) e PI (490/635 nm excitação/ emissão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

WSMoL (7,18 mg de proteínas), isolada através de cromatografia em coluna de quitina, apresentou elevada atividade hemaglutinante específica (AHE, 1427), maior que a obtida pela fração de proteínas precipitadas (F 0-60%, 122,5) HA de WSMoL em eritrócitos de coelho foi inibida por D-(+) frutose. Estes dados corroboram com os obtidos por Coelho *et al.* (2009) e Rolim *et al.* (2011). Atividade antibacteriana de sementes de *M. oleifera* já foi anteriormente detectada (Oliveira *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011). De acordo com Ferreira *et al.* (2011), WSMoL promoveu a aglutinação e posterior inativação de células de *S. aureus* e *E. coli*, com CMI de 7,8 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente WSMoL inibiu o crescimento bacteriano de *E. faecalis* e *M. luteus*, com CMI de 15,625 e 41,75 µg/mL, respectivamente. Efeito bactericida foi observado apenas para *E. faecalis* (CMB de 125 µg/mL). A exposição à WSMoL resultou em alteração significativa sobre a viabilidade e integridade da membrana de ambas as bactérias testadas (Figura 1). Células de *E. faecalis* e *M. luteus* tratadas com WSMoL mostraram uma mudança gradual no sinal de fluorescência verde (células vivas) para vermelho (células mortas) em 1CMI. As células do controle negativo apresentaram fluorescência verde enquanto que as células do controle positivo foram marcadas pela fluorescência vermelha, como esperado. O mecanismo de ação antibacteriano de lectinas é variado; podendo estas se ligarem especificamente aos

carboidratos nas paredes celulares bacterianas, ocasionando a indução da aglutinação ou formando canais na membrana da célula, acarretando no extravazamento do conteúdo celular (Costa *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011). A lectina ligadora de *N*-acetil-D-glicosamina isolada a partir de sementes de *Araucaria angustifolia* foi ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a microscopia eletrônica revelou que essa lectina promoveu alterações morfológicas, incluindo poros na membrana de células bacterianas Gram-positivas e borbulhamento na parede celular de bactérias Gram-negativas (Santi-Gadelha *et al.*, 2006).

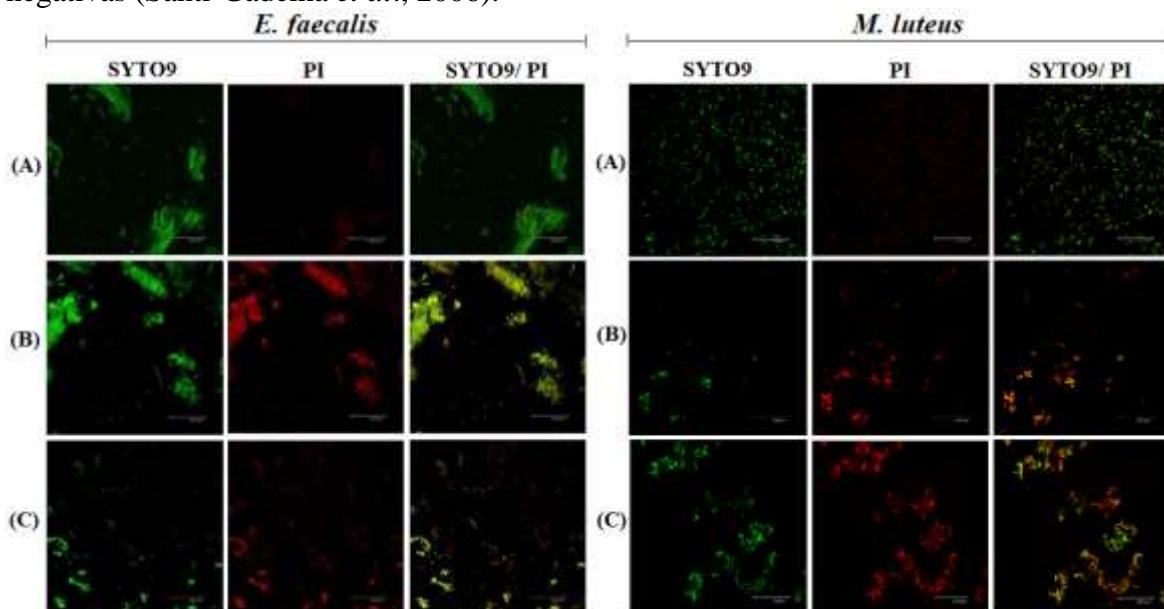


Figura 1: Imagens de microscopia confocal do efeito de WSMoL sobre a viabilidade celular e integridade da membrana de *E. faecalis* e *M. luteus*. (A) Células controle negativo (não tratadas); (B) Células controle positivo (álcool isopropílico); (C) Células tratadas com WSMoL (1CMI). As células viáveis são marcadas com SYTO 9 (fluorescência verde) e as células com membranas danificadas são marcadas com PI (fluorescência vermelha). A sobreposição das fluorescências verde e vermelha (SYTO9/ PI) aparece com o sinal amarelo e representa a permeabilização gradual da membrana da bactéria.

CONCLUSÕES

O estudo revelou que WSMoL foi um composto bioativo com ação significativa contra bactérias gram-positivas patogênicas *E. faecalis* e *M. luteus* por afetar sua permeabilidade celular, interferindo na integridade da membrana.

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC-UFPE e ao CNPq pelo suporte financeiro, à UFPE pelo incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Abiola, O. K., Oforika, N. C., Ebenso, E. E. & Nwinuka, N. M. 2007. Eco-friendly corrosion inhibitors: the inhibitive action of *Delonix regia* extract for the corrosion of aluminium in acidic media. *Anti-corrosion Methods and Materials* 54:219-224.
- Albuquerque, C. C., Camara, T. R., Mariano, R. L. R., Willadino, L., Júnior, C. M. & Ulisses, C. 2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49:527-535.
- Amsterdam, D. 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Lorian, V. ed.). Baltimore: Williams & Wilkins, p.52-111.

- Cantón, R., Unal, S., Farrell, D. J. 2007. Antibacterial resistance patterns in *Streptococcus pneumoniae* isolated from elderly patients: PROTEKT years 1–5 (1999–2004). *International Journal of Antimicrobial Agents* 30:546-550.
- Coelho, J. S., Santos, N. D. L., Napoleão, T. H., Gomes, F. S., Ferreira, R. S., Zingali, R. B., Coelho, L. C. B. B., Leite, S. P., Navarro, D. M. A. F. & Paiva, P. M. G. 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 77:934-938.
- Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B. & Paiva, P. M. G. 2008. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: *Recent Trends in Toxicology* (Siddique, Y. H. org.). Kerala: Transworld Research Network, p. 47-59.
- Costa, R. M. P. B.; Vaz, A. F. M.; Oliva, M. L. V.; Coelho, L. C. B. B.; Correia, M. T. S.; Carneiro-da-Cunha, M. G. 2010. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry*. 45:526-533.
- Ferreira, R. S., Napoleão, T. H., Santos, A. F. S., Sá, R. A., Carneiro-da-Cunha, M. G., Morais, M. M. C., Silva-Lucca, R. A., Oliva, M. L. V., Coelho, L. C. B. B. & Paiva, P. M. G. 2011. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Letters of Applied Microbiology* 53:186-192.
- Gil, E. S. & Mathias, R. O. 2005. Classificação e riscos associados aos resíduos químico-farmacêuticos. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2:87-93.
- Green, A. A. & Hughes, W. L. 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: *Methods in Enzymology* (Colowick, S. & Kaplan, N. eds.). New York: Academic Press, p. 67-90.
- Lam, S. K. & Ng, T. B. 2010. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:45-55.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Oliveira, V. C. S., Moura, D. M., Lopes, J. A., de Andrade, P. P., Da Silva, N. H. & Figueiredo, R. C. 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitology Research* 104:1053-1059.
- 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 of Biochemistry and Biotechnology* 36, 113-118.
- Rolim, L. A., Macêdo, M. F., Sisenando, H. A., Napoleão, T. H., Felzenszwalb, I., Aiub, C. A., Coelho, L. C., Medeiros, S. R. & Paiva, P. M. 2011. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. *Journal of Food Science* 76:53–58.
- Santi-Gadelha, T.; Gadelha, C. A. A.; Aragão, K. S.; Oliveira, C. C.; Mota, M. R. L.; Gomes, R. C.; Pires, A. F.; Toyama, M. H.; Toyama, D. O.; Alencar, N. M. N.; Criddle, D. N.; Assreuy, A. M. S.; Cavada, B. S. 2006. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350:1050-1055.
- Santos, A. F. S.; Argolo, A. C. C.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G. 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research* 39:975-980.
- Schaechter, M., Engleberg, N. C., Eisenstein, B. I. & Medoff, G. 2002. *Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas*, 3ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.

