

Atividade antibacteriana de preparações de folhas de *Moringa oleifera* contendo inibidor de tripsina

Maiara Celine de Moura¹, Raissa arques Mendonça¹, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹

Resumo (Atividade antibacteriana de preparações de folhas de *Moringa oleifera* contendo inibidor de tripsina) As plantas usadas na medicina popular têm sido aceitas, atualmente, como uma fonte importante no descobrimento e desenvolvimento de drogas contra bactérias. A resistência de microorganismos aos antibióticos sintéticos tem se tornado um problema de saúde pública. Estudos têm demonstrado potenciais farmacológicos de *M. oleifera*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de preparações de folhas de *M. oleifera* sobre bactérias patogênicas (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*). A concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) foram determinadas. Em adição, a presença de lectinas e moléculas inibidoras de tripsina nas preparações também foram determinadas. Extrato de folhas (EF) foi obtido após homogeneização de pó das folhas (10 g) com NaCl 0,15 M (100 ml). Após tratamento com sulfato de amônio (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%) obteve-se as frações proteicas F₀₋₂₀, F₂₀₋₄₀, F₄₀₋₆₀ e F₆₀₋₈₀, respectivamente. EF, F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀ apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* contra *S. enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli*, e *E. faecalis*; enquanto que F₄₀₋₆₀ e F₆₀₋₈₀ não foram ativas contra as bactérias avaliadas. *K. pneumoniae* foi resistente a todas as preparações. Apresentaram atividade inibidora de tripsina preparações que demonstraram efeito frente às bactérias (EF, F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀) desde que a atividade inicial da tripsina (113 mU/ml) foi reduzida para 11, 34 e 71 mU/ml na presença de EF, F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀, respectivamente. Esses resultados indicam que preparações de folhas de *M. oleifera* apresentam atividade antibacteriana e que a atividade inibidora de tripsina presente nas preparações ativas pode estar envolvida no mecanismo da ação antibacteriano.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, lectinas, inibidor de tripsina

Abstract (Antibacterial activity of preparations from *Moringa oleifera* leaf containing trypsin inhibitor) Currently, plants used in folk medicine have been accepted as an important source in the discovery and development of drugs against bacteria. The resistance of microorganisms to synthetic antibiotics have become a public health problem. Pharmacological studies have demonstrated the potential of *M. oleifera*. The present study aimed to investigate the antibacterial activity of preparations of *M. oleifera* leaves against pathogenic bacteria (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella pneumoniae*). The minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations were determined. In addition, the presence of lectins and trypsin inhibitory molecules in these preparations were also evaluated. Leaf extract (LE) was obtained after homogenization of leaf powder (10 g) in 0.15 M NaCl (100 ml). After the treatment with ammonium sulphate (0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%) the protein fractions F₀₋₂₀, F₂₀₋₄₀, F₄₀₋₆₀ and F₆₀₋₈₀ were obtained. EF, F₀₋₂₀ and F₂₀₋₄₀ showed antibacterial activity *in vitro* against *S. enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli*, and *E. faecalis*; on the other hand, F₄₀₋₆₀ e F₆₀₋₈₀ were not active against the bacteria evaluated. *K. pneumoniae* was resistant to all samples. Preparations that demonstrated effect against bacteria (EF, F₀₋₂₀ and F₂₀₋₄₀) showed trypsin inhibitory activity; the initial trypsin activity (113 mU/ml) was reduced to 11, 34 and 71 mU/ml in the presence of EF, F₀₋₂₀ and F₂₀₋₄₀, respectively. These results indicated that preparations of *M. oleifera* leaves showed antibacterial activity and the trypsin inhibitory activity present in active preparations may be involved in the antibacterial mechanism of action.

Keywords: *Moringa oleifera*, lectins, trypsin inhibitor

Introdução

Bactérias, organismos procariotos simples, apresentam importância médica desde que causam infecções graves em humanos (Schaechter *et al.*, 2002; Trabulsi, 2005; Cantón *et al.*, 2007; Hennequin & Forestier, 2007). O uso de antimicrobianos sintéticos, tais como meticilina, oxacilina e penicilina, está associado ao

desenvolvimento de cepas resistentes, que aumentam os casos de mortes e doenças debilitantes (Wright, 2012; Gomes *et al.*, 2013); além disso, representam altos custos à saúde pública em todo o mundo (Choffnes *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana é um fenômeno genético em que os microorganismos adquirem genes que

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas (CCS), Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

mecanismos bioquímicos que impedem as ações de drogas (Davies & Davies, 2010). Dentre os mecanismos associados à resistência bacteriana têm-se a produção de enzimas hidrolíticas que desativam os compostos antimicrobianos, a adição de grupos químicos à molécula da droga, a remoção desses compostos por meio de bombas de efluxo e a redução da afinidade do antimicrobiano pela célula-alvo por meio de modificação genética (Davies & Davies, 2010; De Pascale & Wright, 2010; Coyne *et al.*, 2011). Dessa forma, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos antibióticos por fontes naturais têm aumentado (Ramos *et al.*, 2014); tornando-se uma alternativa ao uso de drogas sintéticas comerciais (Fischbach & Walsh, 2009).

Produtos vegetais, como extratos ou seus compostos isolados, apresentam atividade antibacteriana (Costa *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2013). Lectinas e inibidores de proteases, envolvidos no mecanismo de defesa das plantas, têm sido descritos como potenciais compostos envolvidos na ação antimicrobiana (Selitrennikoff, 2001). O mecanismo de ação de lectinas antibacterianas envolve ligação específica a ácidos teicóicos e teicurônicos, os peptidoglicanos e lipopolissacarídeos nas paredes das células bacterianas (Ratanapo *et al.*, 2001). Inibidores de proteases, são proteínas que regulam a atividade de enzimas proteolíticas (Liao *et al.*, 2007). De acordo com Li *et al.* (2007), a interação entre inibidores de tripsina e proteínas presentes na membrana celular de bactérias induz alterações na permeabilidade celular, levando o microorganismo à morte.

Moringa oleifera Lam. (família das Moringaceae), nativa do Nordeste da Índia, tem sido objeto de várias pesquisas, devido às suas propriedades industriais e medicinais (Ghebremichael *et al.*, 2005; Suarez *et al.*, 2005). Duas lectinas com atividade antibacteriana, cMoL e WSMoL, foram purificadas e caracterizadas das suas sementes (Santos *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2009; Luz *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011). Sashidhara *et al.* (2009) isolaram dois compostos a partir da sua raiz: acetato de aurantiamide e uréia 1,3-dibenzil que podem ser responsáveis por atividades antiinflamatória e analgésica. As flores são empregadas no tratamento de ascite, reumatismo, picadas venenosas e como estimulantes cardíacos (Anwar & Bhangar, 2003; Anwar *et al.*, 2007). Suas folhas são ricas em β -caroteno, proteínas, vitamina C, cálcio e potássio, apresentando atividade antioxidante, além de atividade hipotensiva, hipocolesterolêmica e contra o vírus herpes *simplex* tipo 1 (Faizi *et al.*, 1995; Dillard & German, 2000; Ghasi *et al.*, 2000; Lipipun *et al.*, 2003; Siddhuraju & Becker, 2003; Lako *et al.*, 2007). Adicionalmente, extrato de folhas apresentam atividade

hipoglicêmica, validando assim o seu uso para o tratamento de diabetes mellitus (Jaiswal *et al.*, 2009).

Este trabalho relata a avaliação de preparações de folhas de *M. oleifera* quanto à atividade antibacteriana sobre bactérias patogênicas (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*) através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB). Em adição, a presença de atividade hemaglutinante e inibidora de tripsina nas preparações também foram determinadas.

Materiais e métodos

Preparações de folhas de *M. oleifera*

Folhas de *M. oleifera* foram coletadas no *campus* da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, e desidratadas em temperatura ambiente. Após trituração em multiprocessador, o pó das folhas (10 g) foi homogeneizado com NaCl 0,15 M (100 mL) durante 16 h à 4 °C. O homogeneizado foi filtrado em algodão e, após centrifugação (15 min, 4 °C, 9000 g), o sobrenadante correspondeu ao extrato de folhas (EF). Proteínas presentes em EF foram precipitadas pela adição gradual de sulfato de amônio (0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80%), sob agitação constante (4 h, 4 °C), e posterior centrifugação (15 min, 4 °C, 9000 g) (Green & Hughes, 1955). Os precipitados foram solubilizados em água destilada e, após diálise, corresponderam a F₀₋₂₀, F₂₀₋₄₀, F₄₀₋₆₀ e F₆₀₋₈₀.

Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das preparações obtidas (EF, F₀₋₂₀, F₂₀₋₄₀, F₄₀₋₆₀ e F₆₀₋₈₀) foi avaliada segundo Lowry *et al.* (1951) com a utilização da curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) com valores compreendidos entre 0 e 500 g.

Atividade antibacteriana de preparações de folhas de *M. oleifera*

Linhagens de bactérias patogênicas *S. enteritidis* (UFPEDA 414), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 25922), *E. faecalis* (ATCC 6057) e *K. pneumoniae* (ATCC 29665) foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE. As culturas estacionárias foram mantidas em Ágar Nutriente (AN) e estocadas a 4 °C. Para a preparação do experimento, as bactérias foram cultivadas em meio Caldo Nutriente (CN) *overnight* à 37 °C sob agitação constante. Para a determinação da concentração

mínima inibitória (CMI), 100 µl de CN foi adicionado em cada poço da placa de microtitulação. Posteriormente, EF (3,95 mg/ml), F₀₋₂₀ (1,68 mg/ml), F₂₀₋₄₀ (2,32 mg/ml), F₄₀₋₆₀ (2,62 mg/ml) e F₆₀₋₈₀ (5,48 mg/ml) foram diluídos sucessivamente em CN a partir do terceiro poço da placa. Do segundo poço em diante foram adicionados 20 µl da cultura bacteriana, 10⁵-10⁶ unidade formadora de colônias (CFU)/ml. O primeiro poço continha apenas CN (controle negativo) e o segundo poço, CN e cultura bacteriana (controle do crescimento 100%). O experimento foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas durante 24 h à 37 °C. Após incubação, a densidade óptica a 490 nm (DO⁴⁹⁰) foi medida em espectrofotômetro. CMI foi determinada e correspondeu a menor concentração de cada amostra capaz de promover a redução ≥50 % da DO⁴⁹⁰ em relação ao controle do crescimento 100% (Amsterdam 1996).

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada a partir do ensaio do CMI. Alíquotas de cada poço onde houve inibição do crescimento foram transferidas para placa de petri contendo meio AN e incubadas por 24 h a 37 °C. CMB correspondeu a menor concentração de cada amostra que apresentou efeito bactericida, ou seja, onde não foi observado crescimento bacteriano a olho nu.

Avaliação da atividade hemaglutinante (AH)

A atividade hemaglutinante foi avaliada em placas de microtitulação, de acordo com Paiva & Coelho (1992) utilizando eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído.

Ensaio da inibição da tripsina bovina por preparações de folhas de *M. oleifera*

Ensaio de inibição da atividade hidrolítica da tripsina foi realizado utilizando 0,1 mg/ml de tripsina bovina (Sigma-Aldrich, USA) em 0,1 M de Tris-HCl pH 8.0 contendo CaCl₂ 0,02 M. Tripsina bovina (5 µl) foi incubada (5 min, 37 °C) com EF, F₀₋₂₀, F₂₀₋₄₀, F₄₀₋₆₀ ou F₆₀₋₈₀ (50 µl; 395, 168,5, 232, 262 e 549 µg de proteínas, respectivamente) em Tris-HCl pH 8.0 (140 µl). Em seguida, o substrato sintético N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BAPNA) dissolvido em dimetil sulfoxido foi adicionado (5 µl) e a mistura foi incubada (30 min, 37 °C). Foram realizados controles da amostra (ausência da enzima e substrato), do substrato (ausência da enzima e inibidor) e enzima 100% (ausência do inibidor). A hidrólise do substrato foi medida na absorbância a 405 nm e a atividade inibitória foi calculada pela atividade residual da enzima em presença da preparação inibidora, considerando 100% a atividade determinada na ausência do inibidor. Uma

unidade de atividade da tripsina foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de BAPNA por min sob condições estabelecidas.

Resultados e Discussão

Concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) foram determinadas para as preparações ativas de folhas de *M. oleifera* (Tabela 1). Os resultados indicam que EF, F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀ apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* contra as bactérias patogênicas humanas gram-negativas (*S. enteritidis* e *E. coli*) e gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*). F₄₀₋₆₀ e F₆₀₋₈₀ não foram ativas contra as bactérias avaliadas. EF foi capaz de inibir o crescimento de *S. enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis* e apresentou efeito bactericida apenas para *S. aureus* (CMB de 3,95 µg/ml). F₀₋₂₀ apresentou efeito bacteriostático para *S. enteritidis* e *S. aureus*, com maior eficiência para *S. aureus* (CMI de 1,68 µg/ml) sendo capaz de abolir o crescimento de *S. enteritidis* na CMB de 26,3 µg/ml. F₂₀₋₄₀ foi ativa apenas frente à *S. aureus* (CMI de 1,31 µg/ml) e não apresentou efeito bactericida contra nenhuma cepa testada. *K. pneumoniae* foi resistente a todas as preparações.

Tabela 1: Atividade antibacteriana de preparações de folhas de *M. oleifera*.

Bactérias	Extrato (EF)		Fração 0-20%		Fração 20-40%	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Salmonella enteritidis</i> (-)	1,97	ND	6,60	26,3	ND	---
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	1,97	3,95	1,68	ND	1,31	ND
<i>Escherichia coli</i> (-)	3,95	ND	ND	---	ND	---
<i>Enterococcus faecalis</i> (+)	3,95	ND	ND	---	ND	---
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	ND	---	ND	---	ND	---

(+) Bactéria Gram-positiva. (-) Bactéria Gram-negativa. ND: atividade não detectada (---) não avaliado. Os valores de CMI e CMB são expressos em µg/ml de proteínas.

Nas plantas, muitas proteínas antimicrobianas estão envolvidas no mecanismo de defesa e exibem potencial uso como antibióticos naturais (Ye & Ng, 2001; Doughari, 2006). Extrato de cascas do tronco e folhas de *Tamarindus indica* apresentaram atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; extrato da casca apresentou maior atividade inibitória frente *S. paratyphi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus* e *B. subtilis* (CMI de 8 mg/ml) e atividade bactericida diante de todas as cepas testadas (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *Streptococcus pyrogenes*). Valores de CMI e CMB para o extrato das folhas foram maiores para todas as bactérias (Doughari, 2006). Sá *et al.* (2009) detectaram atividade

antibacteriana em extrato bruto e fração protéica do cerne de *Myracrodruon urundeuva* contra as espécies *B. subtilis*, *Corynebacterium callunae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Extrato aquoso (MoE) e fração de proteínas precipitadas (MoPF) de flores de *M. oleifera* foram ativos contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella enteritidis*) e Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*). CMI de 0,023 e 0,018 mg/mL, e CMB de 0,366 e 0,297 mg/mL, obtidas respectivamente para MoE e MoPF, revelaram que ambas as preparações foram mais fortemente ativas contra *E. coli* (Moura *et al.*, 2010).

Os valores de CMI e CMB das preparações de folhas de *M. oleifera* obtidas indicam que as mesmas contêm diferentes agentes antibacterianos. Preparações antibacterianas com atividade não-específica constituem os mais eficientes antibacterianos por agirem em diferentes bactérias (De Souza *et al.*, 2003); ou seja, esses compostos são considerados de amplo espectro por serem ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Doughari, 2006).

Com o objetivo de identificar compostos que possam ser responsáveis pela atividade antibacteriana das preparações ativas de folhas de *M. oleifera* foram avaliadas a atividade hemaglutinante para detecção de lectinas e o efeito das preparações sobre a tripsina bovina a fim de investigar a presença de inibidores de tripsina. EF, F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀ não continham lectina, uma vez que não foi observada aglutinação dos eritrócitos de coelho em todas as preparações. Por outro lado, preparações de folhas de *M. oleifera* contêm inibidor de tripsina, uma vez que a atividade hidrolítica inicial da tripsina (113 mU/mL) foi reduzida para 11, 34 e 71 mU/ml na presença de 50 µg de proteína de EF, F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da atividade da tripsina bovina na presença das preparações de folhas de *M. oleifera* (EF, F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀)

Preparação inibidora	Atividade da tripsina(mU/ml)
-----	113
EF	11
Fração 0-20%	34
Fração 20-40%	71

Esses dados sugerem que EF contém diferentes moléculas capazes de inibir a tripsina, que não foram precipitados com o tratamento com sulfato de amônio em 0-20% e, principalmente em 20-40%, já que EF causou maior diminuição na atividade de tripsina em relação a F₀₋₂₀ e F₂₀₋₄₀. Em adição, esse resultado explica o diferente espectro de ação antibacteriano entre as preparações e sugere que a maior ação antibacteriana de EF frente às bactérias testadas,

se refere a maior quantidade de moléculas capazes de inibir a atividade da tripsina. A atividade antibacteriana de inibidores de proteases tem sido descrita (Ngai & Ng, 2004; Kim *et al.*, 2005) e ocorre devido a inibição de enzimas proteolíticas envolvidas em diversos processos fisiológicos das bactérias ou através da interação desses inibidores e proteínas de membrana das bactérias, levando a alterações da permeabilidade celular, induzindo a morte dos microorganismos (Kim *et al.*, 2009). De acordo com Moura *et al.* (2010), a atividade antibacteriana de MoE e MoPF pode estar relacionada com a presença de inibidores da atividade da tripsina bovina, uma vez que a atividade da tripsina (425 mU/ml) foi reduzida a 125 mU/ml e 212 mU/ml, respectivamente.

Concluimos que preparações de folhas de *M. oleifera* inibiram e mataram bactérias Gram-negativas e Gram-positivas; a diferente especificidade entre o extrato e as frações de proteínas precipitadas sobre bactérias sugere que esta planta contém diferentes agentes antibacterianos. Por fim, a atividade inibidora de tripsina presente nas preparações ativas pode estar envolvida no mecanismo da ação antibacteriano.

Referências Bibliográficas

- Amsterdam, D. 1996 . Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. *In* Lorian, V.(Ed.). Antibiotics in laboratory medicine. Williams & Wilkins, Baltimore. Pp. 52-111.
- Anwar, F.S.; Latif, S.; Ashraf, M.; Gilani, A.H. 2007. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple biochemical and medicinal uses, a review. *Phytotherapy Research* 21: 17-25.
- Anwar, F.; Bhangar, M.I.; Kazi, T.G. 2003. Relationships of rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80: 151-155.
- 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.
- Choffnes, E.R.; Relman, D.A.; Mack, A. 2010. Antibiotic resistance: Implications for global health and novel intervention strategies. Washington: National Academy of Sciences. Pp. 1-474.

- 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.
- 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.
- Coyne, S.; Courvalin, P.; Périchon, B. 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 55: 947-953.
- Davies, J.; Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 74: 417-433.
- De Pascale, G.; Wright, G.D. 2010. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *An European Journal of Chemical Biology* 11: 1325-1334.
- De Souza, M.M.; Bella Cruz, A.; Schuhmacher, M.B.; Kreuger, M.R.O.; Freitas, R.A.; Bella Cruz, R.C. 2003. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In Bresolin, T.M.B.; Cechinel Filho, V. (Eds). *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos* (1. ed.). Itajaí: Univali. Pp. 108-166.
- Dillard, C.J.; German, J.B. 2000. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1744-1756.
- Doughari, J.H. 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5: 597-603.
- Faizi, S.; Siddiqui B.S.; Saleem R.; Siddiqui, S.; Aftab, K.; Gilani, Anwar-Ul-Hassan. 1995. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry* 38: 957-963.
- Ferreira, R.S.; Napoleão, T.H.; Santos, A.F.S.; Sá, R.A.; Carneiro-da-Cunha, M.M.C.; Morais, M.M.C.; Morais, M.M.C.; Silva-Lucca, R.A.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G. 2011. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Letters in Applied Microbiology* 53: 186-192.
- Fischbach, M.A.; Walsh, C.T. 2009. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science* 325: 1089-1093.
- Ghasi, S.; Nwobodo, E.; Ofili, J. O. 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 69: 21-25.
- Ghebremichael, K.A.; Gunaratna, K.R.; Henriksson, H.; Brumer, H.; Dalhammar, G. 2005. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Research* 39: 2338-2344.
- Gomes, F.S.; Procópio, T.F.; Napoleão, T.H.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G. 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied and Microbiology* 114: 672-679.
- Green, A.A.; Hughes, W.L. 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In Colowick S.; Kaplan N. (Eds.). *Methods in Enzymology* (1. ed). New York: Academic Press. Pp. 67-90.
- Hennequin, C.; Forestier C. 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology* 158: 339-347.
- Jaiswal, D.; Rai, P.K.; Kumar, A.; Mehta, S.; Watal, G. 2009. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 392-396.
- Kim, J-Y.; Park, S-C.; Kim, M-H.; Lim, H-T.; Park, Y.; Hahm, K-S. 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330, 921-927.
- Kim, J-Y; Park, S-C; Hwang, I.; Cheong, H.; Nah, J-W; Hahm, K-S; Park, Y. 2009. Protease inhibitors from

- plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 2860-2872.
- Lako, J.; Trenerry, V. C.; Wahlqvist, M.; Wattanapenpaiboon, N.; Sotheeswaran, S.; Premier, R. 2007. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry* 101: 1727-1741.
- Li, J.; Zhang, C.; Xu, X.; Wang, J.; Yu, H.; Lai, R.; Gong, W. 2007. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *The FASEB Journal* 21: 2466-2473.
- Liao, H.; Ren, W.; Kang, Z.; Zhao, X. J.; Du, L. F. 2007. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* Seeds: Isolation, characterization and activity against *Pieris Rapae*. *Biotechnology Letters* 29: 653-658.
- Lipipun, V.; Kurokawa, M.; Suttisri, R.; Taweechotipatr, P.; Pramyothin, P.; Hattori, M.; Shiraki, K. 2003. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes *simplex* virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 60: 175-180.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.; Lewis, F.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Luz, L.A.; Fonseca, A.B.; Gomes, F.S.; Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B. 2010. Potencial Antibacteriano da lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL). In Encontro Nacional de Moringa, Aracaju, Sergipe.
- Moreillon, P.; Mermod, N. 2005. Structure-function characterization and optimization of a plant-derived antibacterial peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 3847-3857.
- Moura, M.C.; Pontual, E.V.; Gomes, F.S.; Napoleão, T.H.; Xavier, H.S.; Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B. 2011. Preparations of *Moringa oleifera* flowers to treat contaminated water. Daniels, J.A. (Ed.). *Advances in Environmental Research*. New York: Nova Science Publishers, Inc. Pp. 269-285.
- Ngai, P.H.K.; Ng, T.B. 2004. Anapin-like polypeptide from dwarf Chinese white cabbage seeds with translation-inhibitory, trypsin-inhibitory, and antibacterial activities. *Peptides* 25:171-176.
- 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 in Biochemistry and Biotechnology* 36: 113-118.
- Ramos, D.B.M.; Gomes, F.S.; Napoleão, T.H.; Paiva, P.M.G.; Silva, M.D.C.; Coelho, L.C.B.B. 2014. Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. *Chinese Journal of Biology* 2014: 1-7.
- Ratanapo, S.; Ngamjunyaporn, W.; Chulavatnatol, M. 2001. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv mori. 160: 739-744.
- Sá, R.A.; Gomes, F.S.; Napoleão, T.H.; Santos, N.D.L.; Melo, C.M.L.; Gusmão, N.B.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G.; Bieber, L.W. 2009. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science & Technology*, 43: 85-95.
- Santos, A.F.S.; Luz, L.A.; Argolo, A.C.C.; Teixeira, J.A.; Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B. 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochemistry* 44: 504-508.
- Schaechter, M.; Engleberg, N.C.; Eisenstein, B.I.; Medoff, G. 2002. *Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2883-2884.
- Siddhuraju, P.; Becker, K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 15: 2144-2155.
- Suarez, M.; Haenni, M.; Canarelli, S.; Fisch, F.; Chodanowski, P.; Servis, C.; Michielin, O.; Freitag, R.; Sashidhara, K.V.; Rosaiah, J.N.; Tyagi, E.; Shukla, R.; Raghubir, R.; Rajendran, S.M.

Rizvi, S.J.H.; Haque, H.; Singh, V.K.; Rizvi, V. 1992. A discipline called allelopathy. Allelopathy: basic and applied aspects. Allelopathy. 1-10. doi: 10.1007/978-94-011-2376-1_1

Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. 2005. Microbiologia. 4^a ed. São Paulo: Atheneu.

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

Wright, G. G. 2012. Antibiotics: A new hope. Chemistry & Biology Perspective. 19: 3-10.