



# Estudo da atividade antibacteriana do picolinato de sacarose em *Escherichia coli*.

Victor Zanardi Rodrigues dos Santos<sup>1</sup>; Crispin Humberto Garcia-Cruz<sup>1</sup>; Maurício Boscolo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus São José do Rio Preto.

## RESUMO

Os sucroésteres são empregados como surfactantes, tensoativos, substitutos de gordura e antibióticos. Este trabalho tem como objetivo sintetizar um novo sucroéster derivado do ácido picolínico (ácido 2-piridinocarboxílico), o picolinato de sacarose, e estudar sua atividade antibacteriana *in vitro* sobre a bactéria Gram-negativa patogênica *Escherichia coli*. A síntese do picolinato de sacarose foi processada a partir da transesterificação da sacarose com picolinato de metila em condição anidra à 80°C, utilizando dimetil sulfoxido (DMSO) como solvente e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como catalisador. A separação dos isômeros formados foi realizada por HPLC no modo semipreparativo e cinco frações cromatográficas foram coletadas e aplicadas em testes de atividade antibacteriana, por disco-difusão em meio sólido, nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 µg/mL. As frações 2, 4 e 6 foram ativas contra *E.coli*. e a fração 4 (900 µg/mL) foi a mais eficiente, sendo selecionada para testes em sinergia com EDTA nas concentrações de 250, 500 e 750 µg/mL, com melhor resultado quando empregado EDTA em 750 µg/mL. Neste caso, os discos apresentaram halos de inibição de crescimento igual ao da Tetraciclina (30 µg/mL) e superior aos produzidos pelos discos com Gentamicina (10 µg/mL). A fração 4 foi caracterizada por FTIR e espectrometria de massas (ESI-MS) e os resultados indicam que se trata sucroéster monossustituído.

**Palavras-chave:** Sucroquímica. Sucroéster. Sacarose. Picolinato de sacarose. *Escherichia coli*. Antibiograma por disco-difusão.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido observado um crescente interesse por derivados de sacarose e também por outros materiais de origem renovável que possam resultar em produtos de baixo impacto ambiental. A sacarose é um

dos compostos orgânicos mais abundantes e é utilizada em larga escala devido a sua alta disponibilidade, alto grau de pureza e baixo custo. A aplicação desse composto orgânico e de seus derivados ocorre, majoritariamente, na indústria alimentícia como ingrediente de bebidas e alimentos (Polat & Linhardt, 2001).

A sacarose ( $\alpha$ -D-glucopiranosídeo  $\beta$ -D-fructofuranosil) pode também ser aplicada na indústria química. Um exemplo bem conhecido é a conversão desse açúcar em etanol e etileno. Os ésteres de sacarose de cadeia alquílica longa são uma classe de derivados desse açúcar que são produzidos para diversas finalidades: tensoativos não iônicos, espessantes, substitutos de gordura, entre outras (Boscolo, 2003). Esses compostos foram aprovados no Japão como aditivos alimentares em 1959 (Polat & Linhardt, 2001).

O grande problema enfrentado em sucroquímica é o baixo controle obtido na regiosseletividade e no grau de substituição das reações que envolvem a sacarose. Os oito grupos hidroxilas reativos da molécula da sacarose proporcionam a possibilidade da formação de 255 diferentes compostos, considerando todas as combinações dos possíveis isômeros a serem formadas, desde os oito compostos monossustituídos ao produto com todas as oito hidroxilas substituídas (Moh et al., 2000).

Os ésteres alquílicos de sacarose e alguns ésteres de sacarose de cadeias não alquílicas apresentam capacidade de agirem como agentes bactericidas, fungicidas, (Marshall & Bullerman, 1994) inseticidas (Alves et al., 2008; Chortyk et al., 1997; Chortyk et al., 1996; Moser et al., 1999; Simonovska et al., 2006) e moluscicidas (Moser et al., 1999).

Neste trabalho são apresentados a síntese e o estudo de atividade antibacteriana do picolinato de sacarose, um sucroéster piridínico inédito, produzido por reação de transesterificação do picolinato de metila com a sacarose (Figura 1). A motivação para o estudo se baseia na busca por novos agentes de controle de contaminação bacteriana em alimentos e de baixa toxicidade, e ao fato do ácido picolínico (ácido 2-piridinocarboxílico) ser formado naturalmente a partir da degradação enzimática do triptofano (Tomioka et al., 2007).

Em animais o ácido picolínico é sintetizado no fígado nos rins e em outros órgãos, apresenta efeitos protetores e terapêuticos contra tumores e é um interruptor

*Autor correspondente:* Maurício Boscolo - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e-mail: boscolo@ibilce.unesp.br

eficiente do vírus HIV *in vitro* (Zhang et al., 2004), e apresenta ainda, atividade contra alguns fungos e bactérias (Tomioka et al., 2007) tendo sido usado em complexos metálicos para o tratamento da tuberculose (Pavan et al., 2011). Desta forma, seu éster com a sacarose pode resultar em compostos biologicamente ativos ainda não investigados.

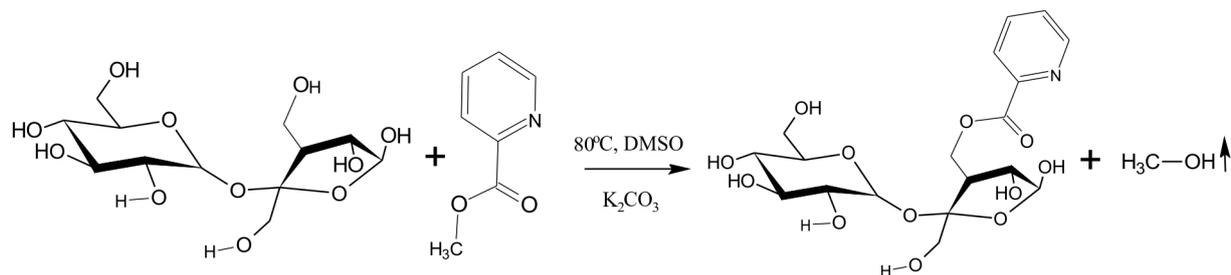


Figura 1. Reação de transesterificação entre a sacarose e o picolinato de metila, formando o 1'-O-picolinato de sacarose, possível regioisômero formado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Síntese e separação do picolinato de sacarose

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 6,0 g de sacarose (18 mmoles) (Vetec) e o correspondente molar em picolinato de metila (2,2 mL) (Sigma-Aldrich), em 11 mL de DMSO (Vetec), e 0,55 g de  $K_2CO_3$  (4 mmoles) (Vetec). As reações foram conduzidas a  $80^\circ C$  em pressão atmosférica durante 24 h com agitação mecânica devido à alta viscosidade do meio reacional.

A mistura reacional da síntese de picolinato de sacarose foi separada por HPLC no modo semipreparativo utilizando um sistema cromatográfico Dionex, o qual é composto de uma bomba binária P-680 e um detector de arranjo de diodos UVD-340U, com faixa de leitura espectral de 200 a 590 nm acoplado a uma coluna  $C_{18}$  Shimadzu (2,5 cm x 25 cm) com partículas de 10 micrômetros e alça de injeção de 800  $\mu L$ . O Fluxo do solvente (água/metanol) de 8,0 mL/min operando em gradiente água/metanol, variando de 0 a 60 %, com a seguinte programação: de 0 a 5 minutos (100%  $H_2O$ ) alcançando 60 % de metanol em 120 minutos e permanecendo assim por mais 10 minutos. As frações cromatográficas coletadas foram evaporadas a secura em pressão reduzida para a medição da massa e diluídas em água destilada.

### Avaliação da atividade antibacteriana do picolinato de sacarose por antibiograma de disco-difusão em meio sólido.

Os experimentos de atividade antibacteriana com picolinato de sacarose foram realizados pelo método de disco-difusão em meio sólido, de acordo com a norma M2-A8 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). A bactéria *E.coli* ATCC 8739 foi inoculada em caldo nutriente e incubada a  $37^\circ C$  por 24h e uma alíquota do inóculo foi adicionada a tubos de ensaio com NaCl 0,85% , esterilizado até atingir a escala de turbidez de McFarland 0,5, (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL para bactérias) e as placas de Petri contendo meio de cultura ágar de Mueller-Hinton previamente esterilizadas foram semeadas com haste swab. Os discos de difusão

(CECON-Produtos para Diagnósticos Ltda) permaneceram imersos por 24 h em soluções do picolinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900  $\mu g/mL$ , previamente esterilizados e aplicados nas placas com uma pinça esterilizada em chama. As placas foram incubadas em estufa a  $37^\circ C$  por 18 h.

Para os testes de efeito sinérgico, o EDTA foi empregado em concentrações de 250, 500 e 750  $\mu g/mL$  em combinação com a fração do picolinato de sacarose F4P na concentração 900  $\mu g/mL$ . Os controles foram preparados apenas com EDTA nas mesmas concentrações seguindo rigorosamente os mesmos procedimentos, e após o período de incubação, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição de crescimento em triplicata. Também foram realizados testes comparativos com antibióticos comerciais Tetraciclina (30  $\mu g$ ), Cloranfenicol (30 $\mu g$ ), Ampicilina (10  $\mu g$ ), Gentamicina (10  $\mu g$ ), Amicacina (30  $\mu g$ ) e Sulfazotrim (25  $\mu g$ ).

### Espectrometria de massas (ESI-MS) e espectrofotometria de infravermelho (FTIR)

As frações ativas do picolinato de sacarose foram caracterizadas por espectrometria de massas por eletronebulização (ESI-MS Bruker Esquire), no modo positivo com analisador tipo *ion trap* e injeção direta por bomba de infusão em pH 4,50 (tampão acetato de sódio/ácido acético 0,100 M). As condições do espectrômetro de massas foram: fluxo de injeção de 750  $\mu L/h$ , voltagem do *spray* 4 kV, vazão  $N_2$  5 L/min e temperatura do nebulizador  $300^\circ C$ . Os espectros de FTIR foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem MB102 com pastilhas de KBr prensadas.

## RESULTADOS

### Separação cromatográfica do picolinato de sacarose

Como a reação de transesterificação foi realizada na proporção molar 1:1 de sacarose:picolinato de metila, a probabilidade da formação de compostos com grau de substituição maior que dois é bem reduzida. No cromatograma semipreparativo (Figura 2) é possível

constatar a existência de um significativo número de isômeros formados a partir da reação da sacarose com o picolinato de metila.

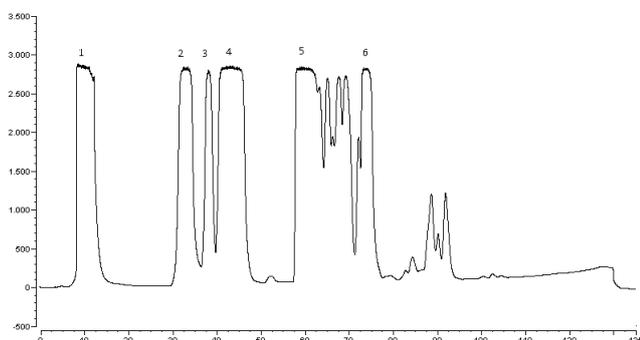


Figura 2. Separação cromatográfica da mistura reacional da síntese do picolinato de sacarose em coluna semi-preparativa  $C_{18}$  com detector de arranjo de diodos (225 nm). Os números dos picos identificam as frações utilizadas nos experimentos de atividade biológica.

De acordo com Moh et al., (2000), as frações cromatográficas dos sucroésteres podem apresentar co-eluições envolvendo isômeros de posição, pois apresentam geometria molecular e polaridades muito similares. A fração 1 corresponde ao solvente DMSO empregado na síntese e não foi submetida aos testes de atividade biológica.

### Atividade antibacteriana das frações cromatográficas isoladas

Os resultados da atividade antibacteriana por teste de disco de difusão em meio sólido estão apresentados na Tabela 1 e indicam que as frações cromatográficas 2, 4 e 6 proporcionaram as respostas contra *E. coli* em concentrações inibitórias mínimas, respectivamente iguais a 750, 150 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . O menor valor referente à média dos halos de inibição de crescimento medidos, desconsiderando o desvio padrão do experimento, foi 0,60 cm e o maior foi 0,95 cm. A bactéria não foi susceptível às frações três e cinco do picolinato de sacarose e, das frações que apresentaram atividade antibacteriana, a fração quatro foi a que apresentou o melhor resultado obtido.

Tabela 1. Halos de inibição de crescimento de *E. coli* (cm) com frações cromatográficas isoladas de picolinato de sacarose nas concentrações de 150; 300; 450; 600; 750 e 900 ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Frações	150	300	450	600	750	900
2	-	-	-	-	0,65 ± 0,07	0,65 ± 0,21
4	0,60 ± 0,14	0,70 ± 0,14	-	0,75 ± 0,21	0,75 ± 0,07	0,95 ± 0,07
6	-	0,70 ± 0,28	-	0,65 ± 0,21	-	0,60 ± 0,14

- sem atividade observada.

A fração quatro do picolinato de sacarose na concentração de 900  $\mu\text{g/mL}$  apresentou o maior halo de inibição de crescimento e foi selecionada para o experimento de efeito sinérgico com EDTA em concentrações de 250,

500 e 750  $\mu\text{g/mL}$ . Soluções contendo apenas o EDTA nestas mesmas concentrações foram empregadas como controle e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Halos de inibição do crescimento de *E. coli* (cm) pela fração cromatográfica 4 da síntese de picolinato de sacarose (900  $\mu\text{g/mL}$ ) com EDTA (250; 500 e 750  $\mu\text{g/mL}$ ), bem como com outros antibióticos comerciais.

Solução	250	500	750
EDTA (Controle)	0,60 ± 0,14	0,65 ± 0,07	0,60 ± 0,14
Fração 4 Picolinato de Sacarose (900 $\mu\text{g/mL}$ )	0,65 ± 0,21	0,95 ± 0,07	1,55 ± 0,21

Pode-se observar na Tabela 3 que os resultados obtidos com a combinação entre o EDTA e o picolinato de sacarose foram mais expressivos do que nos obtidos com alguns antibióticos tradicionais como Gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ), que apresentou halo de inibição do crescimento de 1,1 cm nas condições testadas, e no caso de Cloranfenicol (30 $\mu\text{g}$ ) e Amicacina (30  $\mu\text{g}$ ), não foi observada atividade.

Tabela 3. Testes com antibióticos convencionais em bactérias Gram-negativas. Resultados dos halos de inibição expressos em centímetros (cm)

Antibióticos	<i>E. coli</i>
Tetraciclina (30 $\mu\text{g}$ )	1,5
Cloranfenicol (30 $\mu\text{g}$ )	-
Ampicilina (10 $\mu\text{g}$ )	2,1
Gentamicina (10 $\mu\text{g}$ )	1,1
Amicacina (30 $\mu\text{g}$ )	-
Sulfazotrim (25 $\mu\text{g}$ )	2,3

- sem atividade observada.

Estes diferentes experimentos com difusão de disco mostram a potencialidade do picolinato de sacarose. Embora sua ação isolada não apresente altos níveis de atividade antibacteriana, sua ação com antibióticos tradicionais e com outras drogas deve ser investigada.

### Espectroscopia por Infravermelho e espectrometria de massas

O espectro no infravermelho da fração 4 do picolinato de sacarose (Figura 4) indica a  $\nu_{\text{OH}} = 3400 \text{ cm}^{-1}$ , dois sinais intensos  $\nu_{\text{C=O}} = 1750 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{\text{C=O}} = 1300 \text{ cm}^{-1}$  são referentes ao grupo éster e um pico de média intensidade  $\nu_{\text{C-C}} = 1500 \text{ cm}^{-1}$  do anel piridínico, em função da presença do anel aromático piridínico.

A Figura 4 mostra o espectro de massas obtido a partir da fração cromatográfica quatro da micela reacional da síntese do picolinato de sacarose.

A massa molecular do picolinato de sacarose monossustituído é de 447 Da e foram detectados no espectro de massas, íons com m/z iguais a 448  $[\text{M-H}]^+$ ; 470  $[\text{M-Na}]^+$ , provenientes da solução tampão de acetato

de sódio/ácido acético e 486 [M-K]<sup>+</sup> proveniente do K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> utilizado como catalisador da síntese.

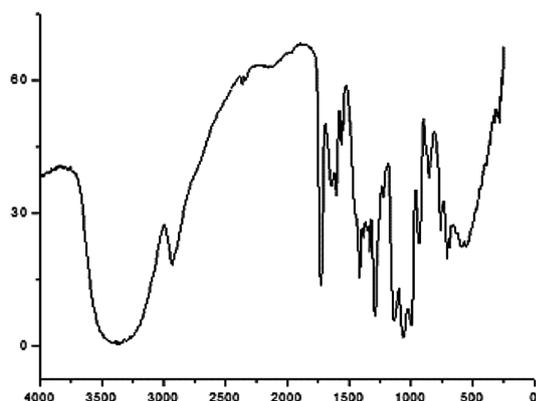


Figura 3. Espectro FTIR da fração 4 do picolinato de sacarose.

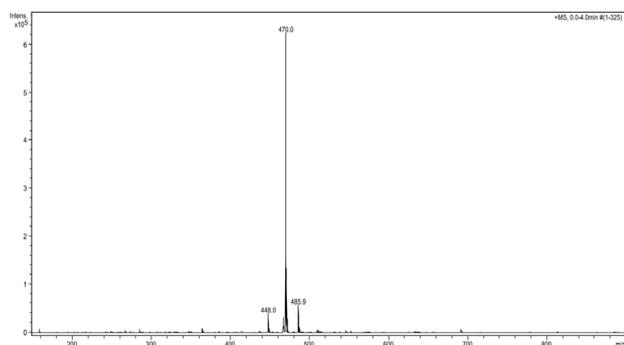


Figura 4. Espectro de massas obtido por ESI-MS da Fração 4 da síntese de picolinato de sacarose.

## DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, o efeito sinérgico é potencializado à medida que se aumenta a concentração do EDTA no meio. Embora o mecanismo de ação dos sucroésteres na inibição de bactérias não esteja totalmente elucidado, existem indícios de que, além de induzir autólise de células, esses compostos também podem causar mudanças na permeabilidade das membranas celulares bacterianas, além de provocar vazamentos de constituintes citoplasmáticos (Iwami et al., 1995).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas contém glicerosfolípeos (PL) em sua face interna, e em sua face externa, moléculas de lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são constituídos de uma parte lipídica e de um heteropolissacarídeo poliônico complexo com caráter parcialmente aniônico que se unem às porinas da parede celular, formando assim uma barreira para substâncias hidrofóbicas e macromoléculas. As cargas negativas, da parte hidrofóbica da membrana externa, são neutralizadas por cátions divalentes Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, e a presença de agentes quelantes altera a estrutura da membrana externa ao sequestrar íons metálicos divalentes a partir de sítios de ligação no LPS. Nesta condição, ocorre alteração da

permeabilidade da membrana tornando a célula bacteriana sensível a agentes antibacterianos (Hancock, 1997; Helander & Mattila-Sandholm, 2000).

A utilização de 750 µg/mL de EDTA juntamente com a fração 4 do picolinato de sacarose foi a mais eficiente com relação à inibição do crescimento e desenvolvimento de *E. coli* no meio. Essa concentração de EDTA é consideravelmente superior aos 300 µg/mL utilizados por Hathcox & Beuchat (1996) em combinação com monolaurato de sacarose (500 e 1000 µg/mL) sobre a bactéria *E. coli* O157:H7. Isso pode ser explicado pelo fato do picolinato de sacarose possuir menor afinidade com a camada hidrofóbica da membrana externa da *E. coli* em comparação com o monolaurato de sacarose.

O picolinato de sacarose, um sucroderivado inédito na literatura, de modo geral, apresentou atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa patogênica *Escherichia coli*. Além disso, o poder antimicrobiano de uma das frações testadas foi potencializado com a adição de concentrações de EDTA, já que esse composto tem a capacidade de sequestrar cátions Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> que estabilizam a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Comparativamente, discos impregnados em solução com picolinato de etila (900 µg/mL) e EDTA (750 µg/mL) apresentaram halos de inibição de crescimento igual ao da Tetraciclina (30 µg/mL) e superior aos produzidos pelos discos com Gentamicina (10 µg/mL), enquanto nestes experimentos o Cloranfenicol (30 µg) e a Amicacina (30 µg) não apresentaram atividade. Os espectros de ESI-MS e de FTIR indicam que houve majoritariamente a formação de monoésteres quando se trabalha na razão estequiométrica 1:1 entre os reagentes de partida.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

## ABSTRACT

*Study of antimicrobial activity of sucrose picolinate against Escherichia coli*

Sucrose esters are generally used as surfactants, fat substitutes and antibiotics. The aim of the present study was to synthesize new sucrose esters derived from picolinic acid (2-pyridine carboxylic acid) and study *in vitro* antimicrobial activity on the Gram-negative pathogenic bacterium *Escherichia coli*. The synthesis of sucrose picolinate was performed through the transesterification of sucrose with methyl picolinate under anhydrous conditions at 80 °C using dimethyl sulfoxide (DMSO) as the solvent and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> as the catalyst. The separation of the formed isomers was performed by HPLC in a semi-preparative chromatograph system. Five fractions were collected and applied to a disc-diffusion antibiogram in solid-medium tests at concentrations of 150, 300, 450, 600, 750 and 900 µg/mL. Fractions 2, 4 and 6 were active against *E. coli*. Fraction 4 (900 µg/mL) was the most efficient and was selected for the determination of antimicrobial activity in synergistic tests with EDTA at concentrations of 250, 500 and 750 µg/mL. The best result was obtained

with 750 µg/mL of EDTA. Fraction 4 was characterized as a monosubstituted sucrose ester by FTIR and mass spectrometry (ESI-MS).

**Keywords:** Sucrochemistry. Sucrose. Chromium picolinate sucrose. *Escherichia coli*. Susceptibility testing by disk diffusion.

## REFERÊNCIAS

- Alves M, Boscolo M, Fernandes OA, Nunes MA. Mortality of *Bemisia tabaci* Biotype B (Sternorrhyncha: Aleyrodidae) Adults by aliphatic and aromatic synthetic sucrose esters. *Braz Arch Biol Technol*. 2008;51(6):1115-9.
- Boscolo M. Sucroquímica: Síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose. *Quím Nova*. 2003;26(6):906-12.
- Chortyk OT, Kays SJ, Teng Q. Characterization of insecticidal sugar esters of *Petunia*. *J Agric Food Chem*. 1997; 45(1):270–275.
- Chortyk OT, Pomonis JG, Johnson AW. Syntheses and characterizations of insecticidal sucrose esters. *J Agric Food Chem*. 1996;44(6):1551-7.
- Hancock, REW. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J Med Microbiol*. 1997;6(1):1-3.
- Hathcox AK, Beuchat LR. Inhibitory effects of sucrose fatty acid esters, alone and in combination with ethylenediaminetetraacetic acid and other organic acids, on viability of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol*. 1996;13(3):213-25.
- Helander IM, Mattila-Sandholm T. Fluometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. *J Applied Microbiol*. 2000;88(2):213-19.
- Iwami Y, Schachtele CF, Yamada T. Effect of sucrose monolaurate on acid production, levels of glycolytic-intermediates, and enzyme-activities of *Streptococcus* mutants NCTC-10449. *J Dental Res*. 1995;74(9):1613-7.
- Marshall DL, Bullerman LB. Antimicrobial Properties of Sucrose Fatty Acid Esters In: Akoh CC, Swanson BG. Carbohydrate polyesters as fat substitutes. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 149-67.
- Moh MH, Tang TS, Tan GH. Improved separation of sucrose ester isomers using gradient high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Food Chem*. 2000;69(1):105-10.
- Moser D, Klaiber I, Vogler B, Kraus, W. Molluscicidal and antibacterial compounds from *Petunia hybrida*. *Pesticide Sci*. 1999;55(3):336-39.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. Document M2-A8. 8<sup>th</sup> ed. Wayne: NCCLS; 2003.
- Pavan FR, Poelhsitz GV, Barbosa MI, Leite SR, Batista AA, Ellena J, Sato LS, Franzblau SG, Moreno V, Gambino D, Leite CQ. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agents against tuberculosis. *Eur J Med Chem*. 2011;46(10):5099-5107.
- Polat T, Linhardt RJ. Syntheses and applications of sucrose-based esters. *J Surf Detergents*. 2001;4(4):415-21.
- Simonovska B, Srbinoska M, Vovk I. Analysis of sucrose esters – insecticides from the surface of tobacco plant leaves. *J Chromatography A*. 2006;1127(1-2):273-7.
- Tomioka H, Shimizu T, Tatano Y. Effects of picolinic acid on the antimicrobial functions of host macrophages against *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrobial Agents*. 2007;29(4):460-4.
- Zhang HK, Zhang X, Mao BZ, Li Q, He ZH. Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice. *Cell Res*. 2004;14(1):27-33.

Recebido em 13 de dezembro de 2011

Aceito para publicação em 07 de janeiro de 2013

