



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TALYTA NALDESKA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DA LECTINA DE
FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi CONTRA *Staphylococcus aureus*

RECIFE

2019

TALYTA NALDESKA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DA LECTINA DE
FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia Raddi* CONTRA *Staphylococcus aureus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para o cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas pela Universidade
Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana
Pontual

Coorientadora: Dra. Pollyanna Michelle da
Silva

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586i

Silva, Talyta Naldeska da
INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DA LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia*
Raddi CONTRA *Staphylococcus aureus* / Talyta Naldeska da Silva. - 2019.
48 f. : il.

Orientador: Emmanuel Viana Pontual.
Coorientadora: Pollyanna Michelle da Silva.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

1. Antimicrobianos naturais. 2. biofilme. 3. lectina. 4. microrganismo resistente. 5. *Schinus terebinthifolia*. I. Pontual, Emmanuel Viana, orient. II. Silva, Pollyanna Michelle da, coorient. III. Título

CDD 574

TALYTA NALDESKA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DA LECTINA DE
FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi CONTRA *Staphylococcus aureus*

Área de concentração: Ciências Biológicas

Data de defesa: 20/12/2019

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Presidente)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Profa. Dra, Jeine Emanuele Santos da Silva (1° Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Msc. Welton Aaron de Almeida (2° Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Msc. Leydianne Leite de Siqueira Patriota Queiroz (3° Titular)

Departamento de Bioquímica da UFPE

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia a Deus, a minha família e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sua infinita misericórdia, cuidado e amor demonstrados a mim. Foram tantos livramentos e orações respondidas, que me faltam palavras para agradecer, só me resta oferecer ao Senhor a minha vida e com ela todas as minhas conquistas. Porque Dele, por Ele, e para Ele são todas as coisas (Romanos 11:36).

Agradeço aos meus pais, Fátima e José Antonio, por todo investimento e apoio, eles são a razão por eu ter chegado onde cheguei. Eu os amo incondicionalmente. Ao meu irmão Tallys, por ser tão companheiro e tornar os meus dias mais felizes. A minha tia Graça por todo cuidado desde a minha infância e a todos os meus familiares pela torcida, minha gratidão.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, a Ruralinda, por ser uma instituição tão acolhedora, que oferece estrutura e tantas oportunidades de acesso ao conhecimento, com profissionais extremamente competentes, e, claro, pelo melhor R.U. desse país.

Ao meu orientador Emmanuel Pontual, meus sinceros agradecimentos. Obrigada pela oportunidade de ingressar na Iniciação Científica. De maneira sempre gentil e paciente, compartilhou muitos ensinamentos comigo, que contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica.

A minha Coorientadora Pollyanna Silva, muito obrigada por toda a ajuda, sem você nada disso seria possível. Obrigada por ser tão prestativa, pela ajuda nos experimentos e por todo conhecimento compartilhado. A Gustavo que também não mediu esforços para me ajudar em todo os testes, meus agradecimentos.

Agradeço a melhor turma que a UFRPE já teve, minha querida “SBBB1”: Brenda, Emily, Ilana, Italo, João Vitor, Lucas, Milena, Rayssa, Rômulo, Ronald, por todos os momentos compartilhados. Nunca esquecerei das revisões pré-provas, aulas de campo divertidíssimas, festinhas, almoços no RU... Vocês fizeram a graduação muito mais leve. As minhas amigas que formam as GIMS/BDI : Alessandra, Camilla, Gabriella, Eridiana, Iviane, Joyce, Marcela, Maria Eduarda e Maria Vanessa, muito obrigada pela amizade

desde o primeiro período, são tantas lembranças boas que não caberiam nesse texto. Levarei vocês no meu coração por toda a vida.

Agradeço aos queridos do Intervalo Bíblico da UFRPE, que mesmo na minha curta participação, me acolheram tão bem, me sustentando em oração e dando palavras de incentivo. Que Deus continue abençoando cada um de vocês, os amo em Cristo Jesus.

A todos os meus amigos e irmãos da IEADPE em Nazaré da Mata que sempre tem orado por mim, muito obrigada por tudo, vocês são minha segunda família.

Agradeço ao professor Thiago Napoleão, por toda a ajuda e por disponibilizar o Laboratório BIOPROT, da Universidade Federal de Pernambuco, para realização dos experimentos.

A todos do LABTEC, em especial Welton e Isabella, por toda a ajuda e pela oportunidade de produzir com vocês.

Agradeço a FACEPE pela bolsa de Iniciação científica concedida nos últimos dois anos para o desenvolvimento das minhas pesquisas (Processos: BIC-1268-2.09/18 e BIC-1919.09/19).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

RESUMO

Biofilmes são comunidades microbianas complexas que têm sido associadas à incidência de infecções, inclusive no ambiente hospitalar. Sua formação é considerada um fator determinante da virulência em microrganismos e contribui fortemente para a resistência aos antimicrobianos convencionais. Nesse sentido tem crescido a busca por compostos de origem natural com atividade antimicrobiana que sejam mais efetivos e menos tóxicos para células do hospedeiro. As plantas constituem importantes fontes de compostos bioativos, entre os quais podemos citar as lectinas, uma classe de proteínas ligadoras de carboidratos cuja ação antimicrobiana tem sido reportada. SteLL é uma lectina isolada de folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae) com ação antimicrobiana previamente relatada. Neste trabalho foi avaliado o potencial antibacteriano e antibiofilme de SteLL contra isolados de *Staphylococcus aureus*, sensível (UFPEDA 02) e resistente a oxacilina (UFPEDA 670). SteLL foi agente bacteriostático e bactericida para os isolados UFPEDA 02 e UFPEDA 670 com CMI (Concentração Mínima Inibitória) de 12,5 e 25 µg/mL e CMB (Concentração Mínima Bactericida) de 50 e 100 µg/mL, respectivamente. A cinética de crescimento das células tratadas com SteLL revelou que houve inibição do crescimento de forma dose-dependente em relação ao controle. SteLL causou alterações morfométricas em células de *S. aureus* e inibiu a formação de biofilme de UFPEDA 02 nas concentrações entre 400 e 25 µg/mL e de UFPEDA 670 entre 400 e 100 µg/mL. Em conclusão, SteLL é um agente antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* por inibir o crescimento, promover morte celular e inibir a formação de biofilme bacteriano.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais, biofilme, lectina, microrganismo resistente, *Schinus terebinthifolia*.

ABSTRACT

Biofilms are complex microbial communities that have been associated with the incidence of infections, including in the hospital environment. Its formation is considered a determining factor for virulence in microorganisms and strongly contributes with the microbial resistance to conventional antimicrobials. In this sense, the search for natural compounds with antimicrobial activity that are more effective and less toxic to host cells. Plants are important sources of bioactive compounds, including lectins, a class of carbohydrate-binding proteins whose antimicrobial action has been reported. SteLL is a leaf lectin isolated from *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae) with antimicrobial action that was previously reported. In this work, the antibacterial and antibiofilm potential of SteLL against sensitive (UFPEDA 02) and oxacillin resistant (UFPEDA 670) isolates of *Staphylococcus aureus* was evaluated. SteLL was a bacteriostatic and bactericidal agent against UFPEDA 02 and UFPEDA 670 isolates with MIC₅₀ (Minimum Inhibitory Concentration) of 12.5 and 25.0 µg/mL and CMB (Minimum Bactericidal Concentration) of 50.0 and 100 µg/mL, respectively. The growth kinetics of the cells treated with SteLL revealed a dose-dependent growth inhibition regarding to control. SteLL caused morphometric alterations in *S. aureus* cells and inhibited biofilm formation of UFPEDA 02 at concentrations between 400 and 25.0 µg/mL and UFPEDA 670 between 400 and 100 µg/mL. In conclusion, SteLL is an antibacterial agent against *Staphylococcus aureus* by inhibiting the growth, promoting cell death and inhibiting bacterial biofilm formation.

Keywords: Natural antimicrobials, biofilm, lectin, resistant microorganism, *Schinus terebinthifolia*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Etapas de formação e desenvolvimento de biofilmes microbianos.....17
- Figura 2.** (A) Ensaio de atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais, empregado para detecção da presença de lectinas em determinada amostra. (B) Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante realizado em presença de carboidratos livres com o objetivo de confirmar a presença de lectinas em amostras contendo atividade hemaglutinante, ou de determinar a especificidade das lectinas detectadas.....22
- Figura 3.** *Schinus terebinthifolia* Raddi. (A) Hábito da planta. (B) Folhagens e frutos.....25
- Figura 4.** Curvas de crescimento (20 h de incubação) de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes a oxacilina (UFPEDA 670) na ausência (controle negativo) ou presença de SteLL em diferentes concentrações. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos.....35
- Figura 5:** Análise por citometria de fluxo da viabilidade de isolados de *Staphylococcus aureus* sensível (UFPEDA 02) ou resistente à oxacilina (UFPEDA 670) tratados com SteLL na sua concentração mínima inibitória (CMI). (A e B) Sobreposição dos histogramas de marcação de células de *S. aureus* UFPEDA-02 e UFPEDA-670 com iodeto de propídeo (canal FL3) CN ou tratadas com SteLL. Plotagens de pontos FSC vs. SSC para determinação de alterações morfométricas em relação ao tamanho, forma e complexidade das células de *S. aureus* UFPEDA 02 (C e D) e UFPEDA 670 (E e F). No controle negativo (CN), foi utilizada água destilada em substituição à lectina. Álcool isopropílico foi utilizado como controle positivo.....37
- Figura 6.** Atividade antibiofilme de SteLL contra os isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes à oxacilina (UFPEDA 670). As células foram tratadas por 24 h com a lectina e a formação do biofilme foi avaliada pelo método do cristal violeta e medição da densidade óptica em 570 nm. Células tratadas com água destilada

corresponderam ao controle negativo (CN). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student39

Figura 7: Efeito de SteLL sobre biofilmes pré-formados de isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis UFPEDA 02 ou (B) resistentes à oxacilina (UFPEDA 670). Os valores obtidos para o biofilme não tratado (controle não tratado) corresponderam a 100% da biomassa do biofilme. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do potencial de formação de biofilmes monoespécies e multi-isolados de diferentes combinações de isolados de <i>S. aureus</i>	38
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 BIOFILMES.....	16
2.1.1 Aspectos gerais.....	16
2.1.2 Formação e desenvolvimento dos biofilmes.....	16
2.1.3 Mecanismos de resistência dos biofilmes.....	17
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.3 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	20
2.3.1 Lectinas.....	21
2.4 <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivos Gerais.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. METODOLOGIA.....	28
4.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	28
4.2 Isolamento da lectina.....	28
4.3 Concentração de proteína e atividade hemaglutinante (AH).....	29
4.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB).....	29

4.5	Curvas de crescimento	30
4.6	Análise da viabilidade bacteriana por citometria de fluxo.....	30
4.7	Formação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies.....	31
4.8	Ensaio de biofilme estático.....	32
4.9	Ensaio de erradicação de biofilme.....	32
4.10	Análise estatística.....	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.	CONCLUSÃO.....	41
7.	REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo acreditou-se que as bactérias eram microrganismos que, em sua maioria, apresentavam apenas um crescimento planctônico, ou seja, de forma isolada numa suspensão de meio líquido. Contudo, estudos recentes revelaram que o crescimento bacteriano pode ocorrer também em comunidades estruturadas, fixadas a um substrato. A essa forma de vida comunitária, dá-se o nome de biofilme (OLIVEIRA;CARDOSO, 2015). Nesse sentido, biofilmes são comunidades de microrganismos que aderem a superfícies de natureza biótica ou abiótica, sendo formados por agregados celulares inseridos em uma matriz polimérica extracelular (HALL e MAH, 2017).

A formação de biofilme representa uma vantagem adaptativa pelo fato de conferir uma maior proteção às células microbianas, permitindo o seu crescimento e sobrevivência nos mais variados ambientes (SANTOS et al, 2018). No entanto, essa estrutura está associada a inúmeros problemas; um deles é a adesão bacteriana e a consequente formação de biofilme em equipamentos e implantes médicos, que representam um grande obstáculo para a erradicação de infecções hospitalares persistentes (ROY et al, 2017). Isso ocorre devido ao fato de que as células bacterianas dentro do biofilme desenvolvem uma grande variedade de mecanismos que conferem alto nível de resistência a agentes antimicrobianos (SINGH et al, 2017).

Entre as espécies patogênicas que formam biofilme, *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que possui representação significativa (GRAF et al, 2019). É um dos principais agentes etiológicos associados a infecções hospitalares, com elevado nível de resistência a resposta imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos disponíveis (DEMIR et al., 2020). Nesse sentido, tem aumentado a busca por novos agentes derivados de produtos naturais com atividade contra bactérias de interesse médico.

As plantas representam importantes fontes de compostos biologicamente ativos, dentre os quais é possível citar as lectinas, proteínas cujo potencial antimicrobiano foi amplamente relatado (PROCÓPIO et al, 2017; COELHO et al, 2018). As lectinas possuem origem não imune e têm a capacidade de se ligar a carboidratos de forma específica e

reversível e estão envolvidas em diversos processos biológicos (COELHO et al., 2017). Estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em uma diversidade de organismos, tais como animais vertebrados e invertebrados, plantas e até microrganismos (SANTOS et al, 2013). A ampla variedade de funções que as lectinas desempenham faz com que elas se tornem interessantes candidatas para uso biotecnológico em diversas áreas que incluem a saúde humana e animal (DIAS et al, 2015).

Há relatos na literatura que lectinas vegetais podem apresentar ação antibacteriana e antifúngica, devido à capacidade que estas proteínas têm de reconhecer pequenas diferenças na estrutura de carboidratos complexos presentes na superfície celular de bactérias e fungos (ARAÚJO, 2015; PROCÓPIO et al, 2017). Foi demonstrado também que estas moléculas podem interferir no processo de formação de biofilmes, através de mecanismos como inibição da interação entre polissacarídeos e superfícies, ligação das lectinas aos componentes da matriz polimérica na qual os biofilmes estão envolvidos, inibição de sua polimerização e impedimento da expressão de genes necessários para o desenvolvimento do biofilme (MOURA, 2016).

Schinus terebinthifolia (Anarcadiaceae) apresenta distribuição mundial e no Brasil é conhecida como aroeira-da-praia; está presente em comunidades de plantas como a Mata Atlântica e o Cerrado (LORENZI, 2008). Suas folhas são utilizadas na medicina popular para cicatrização e reparo tecidual de feridas, além de contribuírem para o tratamento de infecções no trato digestivo, urinário e respiratório como também no combate à candidíase (LINDENMAIER, 2008). Devido a sua ampla utilização na medicina popular, o extrato da casca, frutos e folhas da Aroeira tem servido como fonte de diversos estudos relacionados a ação antibacteriana e antifúngica (ESTEVÃO, 2013). Uma lectina - SteLL- foi isolada de folhas da planta *S. terebinthifolia* e apresentou atividade antimicrobiana contra espécies que causam doenças em humanos (GOMES et al, 2013).

Com base no reconhecido potencial antimicrobiano das lectinas e dos relatos prévios da utilização de *S. terebinthifolia* na medicina popular para diversos fins, esta monografia avaliou a hipótese de que SteLL pode ser um agente antibiofilme contra cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistente a Oxacilina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOFILMES

2.1.1 Aspectos gerais

Biofilme é uma comunidade bem organizada de microrganismos, capaz de se aderir a uma superfície, caracterizada por células que estão incorporadas a uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares autoproduzida (JAMAL et al, 2018). Podem ser constituídos por populações de uma mesma espécie ou por múltiplas espécies bacterianas (GOWDA et al, 2015). Os biofilmes formados por microrganismos patogênicos representam um problema médico importante, porque são difíceis de erradicar e, portanto, contribuem para muitas infecções crônicas (ALLEWEL, 2016).

A transição do crescimento planctônico para o biofilme ocorre em resposta a mudanças ambientais, e envolve várias redes reguladoras, que traduzem sinais em mudanças na expressão gênica, mediando assim a reorganização espacial e temporal da célula bacteriana. Essa reprogramação celular altera a expressão de moléculas de superfície, a utilização de nutrientes e fatores de virulência e equipa as bactérias com um arsenal de propriedades que permitem sua sobrevivência em condições desfavoráveis (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013).

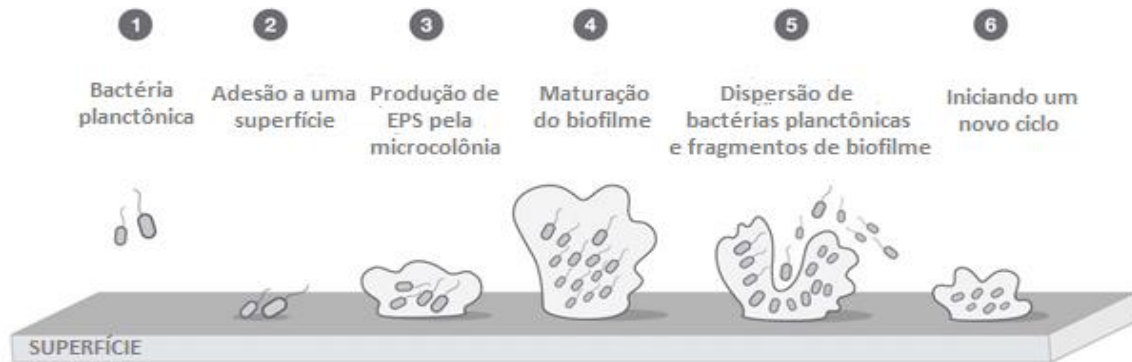
A matriz polimérica na qual os microrganismos que compõem o biofilme estão envolvidos, é formada principalmente por EPS (substâncias poliméricas extracelulares), sendo elas, polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular, lipídios e água. Estas substâncias fornecem aos biofilmes proteção do ambiente físico como também garantem a sobrevivência da bactéria em condições de desidratação. Além disso, as EPS também aprimoram a integridade física da estrutura do biofilme e atuam como locais de ligação para bactérias (DI MARTINO, 2018).

2.1.2 Formação e desenvolvimento dos biofilmes

As etapas que demonstram a formação e desenvolvimento dos biofilmes microbianos (Figura 1) incluem: Uma adesão inicial reversível das células planctônicas a

uma superfície que envolve forças atrativas e repulsivas entre elas, caracterizada por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças hidrodinâmicas e de Van der Waals, a uma temperatura apropriada (CAVALCANTE et al, 2014). Posteriormente à ligação inicial à superfície, os microrganismos iniciam uma fase de intenso crescimento e divisão celular para formar aglomerados densos de células que caracterizam os biofilmes, conhecidos como microcolônias. Esta fase está associada à produção de polissacarídeos pelos microrganismos que já estarão ligados à superfície de maneira irreversível (VASCONCELOS, 2013). O próximo passo compreende um processo de maturação, no qual ocorre um aumento de densidade populacional, produção de EPS e espessura do biofilme (MOURA, 2016). A etapa final envolve o desprendimento de subpopulação de células que estão presentes nas camadas mais exteriores do biofilme, elas voltam a viver de forma planctônica e podem colonizar outro local para formar novos biofilmes (VASCONCELOS, 2013).

Figura 1. Etapas da formação e desenvolvimento de biofilmes microbianos.



Fonte: Adaptado de CAVALCANTE et al, 2014.

2.1.3 Mecanismos de resistência dos biofilmes

Os biofilmes têm um impacto crucial na saúde humana, de diferentes maneiras, uma vez que podem ser formados em ambientes naturais, equipamentos industriais e dispositivos médicos (BERLANGA e GUERRERO, 2016). No que se refere à adesão bacteriana e a consequente formação de biofilme em equipamentos e implantes médicos,

este é um fenômeno que representa um grande obstáculo para a erradicação de infecções persistentes. Isso se deve ao fato de que uma das mais importantes características dos biofilmes é a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e a agentes antimicrobianos (ALLEWEL, 2016). Sabe-se que as células bacterianas em biofilmes podem tolerar concentrações até 1.000 vezes maiores dos antibióticos do que quando estão na forma planctônica (BUHMANN et al., 2016).

Alguns estudos têm demonstrado ao longo do tempo, os possíveis mecanismos envolvidos na resistência das células microbianas dentro dos biofilmes aos agentes antimicrobianos. Sun e colaboradores (2013) apontam o fato de muitos antibióticos serem menos eficazes contra células que apresentam um crescimento lento ou nenhum crescimento, quando comparadas a células que possuem um crescimento rápido, isso ocorre porque esses antibióticos agem diretamente em fatores específicos de crescimento. Como microrganismos associados a biofilmes reduzem significativamente sua taxa de crescimento, devido à escassez de oxigênio e de nutrientes, eles se tornam menos suscetíveis aos antibióticos.

Outros estudos indicam que a matriz polimérica extracelular produzida pelas células microbianas dentro do biofilme, retarda a penetração de antibióticos ao interior do biofilme através de limitações de difusão ou interações iônicas, levando a uma exposição reduzida e uma aparente diminuição na eficácia do medicamento; no entanto, ainda há divergências entre os pesquisadores se este fator contribui ou não para a resistência do biofilme (SINHG et al., 2016).

O aumento da produção da enzima β - lactamase por alguns microrganismos, em resposta a exposição a antibióticos, tem sido sugerido como outro fator envolvido na resistência, pois faz com que a enzima se acumule na matriz do biofilme como resultado da secreção ou lise celular, desativando antibióticos betalactâmicos nas camadas superficiais antes que atinjam os seus alvos celulares (HALL e MAH, 2017).

Outro mecanismo a ser considerado é a superprodução de bombas de efluxo que facilita a sobrevivência bacteriana sob condições extremas e exercem fenótipo de resistência a múltiplas drogas combinado com outros mecanismos de resistência, como modificação de alvo e inativação de antibióticos (SINGH et al, 2017).

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positiva, considerada a espécie mais importante do grupo dos estafilococos. Suas colônias apresentam pigmentação amarelada quando cultivadas no meio ágar manitol salgado (TORTORA, FUNK e CASE, 2012). É um microrganismo patogênico pertencente à microbiota normal do ser humano, colonizando principalmente a nasofaringe e a orofaringe, no entanto podem também ser encontrados em outros locais anatômicos, como pele, cavidade oral e trato gastrointestinal (ROBERT;CHAMBERS, 2005; PEREIRA e CUNHA, 2009).

A capacidade de crescer bem sob condições de pressão osmótica elevada e baixa umidade é uma das características que explicam a sua elevada patogenicidade. Além disso, esta bactéria produz uma diversidade de toxinas que contribuem para o aumento da sua capacidade de invadir o corpo e danificar os tecidos (TORTORA, FUNK e CASE, 2012). Cepas de *S. aureus* possuem mecanismos de defesa contra algumas drogas, o que as tornam as espécies de maior importância em infecções ocorridas em ambiente hospitalar, tendo como consequência problemas clínicos e epidemiológicos. Esta resistência múltipla limita as opções terapêuticas e prolonga o tempo de tratamento dessas infecções (PINTO et al., 2015).

A resistência a antimicrobianos desenvolvida por *S. aureus* ocorre através de diferentes mecanismos. Esses mecanismos incluem captação limitada da droga, modificação do seu alvo, inativação enzimática e efluxo ativo da droga. Dependendo do antimicrobiano envolvido, as bactérias podem usar um ou vários desses mecanismos de resistência. Em particular, a localização de genes de resistência em elementos genéticos transferíveis, como plasmídeos e transposons, facilita a transferência horizontal de resistência entre bactérias (YILMAZ; ASLANTAŞ, 2017).

O fato de *S. aureus* ser um dos principais agentes envolvidos em infecções nosocomiais, aumentando significativamente a taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes, também é resultado da sua capacidade de aderir a dispositivos médicos e formar biofilmes (KONG et al., 2018). As cepas de *S. aureus* podem se fixar e persistir em tecidos do hospedeiro, como válvulas ósseas e cardíacas, para causar doenças como osteomielite,

endocardite e rinosinusite crônica ou em materiais implantados, como cateteres, articulações protéticas e marcapassos, o que é crucial para sua patogenicidade (DEMIR et al, 2019; LADE et al, 2019)

2.3 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Durante milhares de anos os produtos naturais desempenharam um importante papel na prevenção e tratamento de doenças humanas. Baseado em seu valor na medicina tradicional, os produtos fornecidos pela natureza têm sido até os dias atuais a principal fonte de compostos empregados na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (DAR et al., 2017). A eficácia de tais produtos está relacionada à complexidade de suas estruturas químicas tridimensionais bem organizadas, que oferecem muitas vantagens em termos de eficiência e seletividade de alvos moleculares (YUAN et al., 2016).

As substâncias naturais mais utilizadas na formulação de remédios são oriundas de microrganismos - terrestres e marinhos -, invertebrados, vertebrados e plantas. (DAR et al., 2017). No que diz respeito às plantas, as suas propriedades medicinais são atribuídas a grande variedade de compostos biologicamente ativos que elas possuem e que são produzidos através de um processo natural de crescimento e desenvolvimento ou em resposta a ataque de patógenos ou estresse (TRETIN et al, 2013).

A pouca ou nenhuma sensibilidade dos microrganismos às drogas utilizadas nas terapias atuais tem sido considerada a principal causa de infecções persistentes no ambiente hospitalar. Diante do aumento da incidência de microrganismos com elevada resistência, estratégias em pesquisa com produtos naturais com ação antimicrobiana podem contribuir para acelerar e baratear a produção de novas substâncias com potencial farmacológico. Para que essas estratégias sejam efetivas no combate aos microrganismos resistentes, é indispensável que os novos agentes antimicrobianos possuam mecanismos de ação diferentes dos agentes terapêuticos hoje disponíveis (NADER et al, 2018).

As plantas expressam uma diversidade de produtos bioativos com ação antimicrobiana; os principais grupos destes produtos incluem os metabólitos secundários como os óleos essenciais e terpenóides, as substâncias fenólicas e polifenóis e os alcaloides,

bem como os metabólitos primários dentre os quais se destacam as proteínas, tais como as lectinas (GONÇALVES; FILHO; MENEZES, 2005). Estes compostos podem interferir no crescimento e sobrevivência de microrganismos patogênicos, bem como atuar na inibição da formação de biofilmes e erradicação de biofilmes já formados. Dentre os produtos naturais com atividade antimicrobiana, as proteínas têm merecido destaque e, dentre elas, as lectinas (MOURA, 2016; SILVA et al, 2018; FERREIRA et al, 2018; NADER et al, 2018).

2.3.1 Lectinas

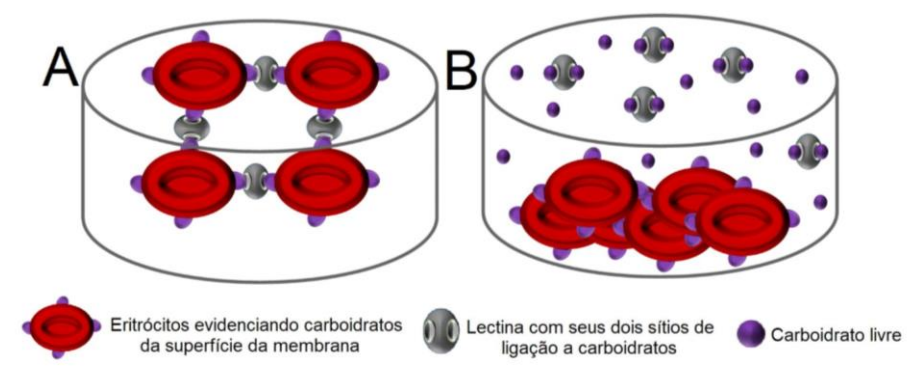
A primeira descrição das lectinas ocorreu em 1888, quando Stillmark observou que extratos brutos de mamona (*Ricinus communis*) continham uma substância tóxica chamada ricina que aglutinava glóbulos vermelhos de animais. No entanto, o estudo sobre estas proteínas tornou-se mais intenso a partir da década de 1960, quando as lectinas começaram a ser investigadas visando aplicações biotecnológicas (HAMID et al, 2013).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico e são capazes de se ligar de forma reversível a mono, oligo ou glicoconjugados de forma específica, sem alterar as suas propriedades (COELHO et al, 2018). A ligação entre lectinas e carboidratos ocorre através de pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (PAIVA et al., 2010). Estas proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microrganismos, animais e plantas (POMPEU et al., 2015).

Para detectar a presença da lectina em uma amostra comumente é realizado um ensaio de aglutinação, que consiste em promover a interação destas proteínas com carboidratos presentes em superfícies celulares. O ensaio mais utilizado é o de hemaglutinação devido à facilidade de visualização da propriedade de aglutinação em eritrócitos que podem ser de origem humana ou de outros animais. É realizada uma diluição seriada da amostra contendo lectina seguida posteriormente da incubação com eritrócitos. A formação de malha ou rede de aglutinação é mostrada na Figura 2A (SILVA, 2008; GOMES, 2013).

Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (Figura 2B) também são realizados para confirmar se o efeito de observado é ocasionado pela presença da lectina. O ensaio consiste em realizar uma diluição seriada da amostra contendo a lectina em uma solução de carboidratos antes dos eritrócitos serem adicionados. Os carboidratos livres passam a ocupar os sítios de ligação a carboidratos na molécula de lectina impedindo a aglutinação dos eritrócitos, os quais irão precipitar (PAIVA et al., 2012; LIMA et al, 2018).

Figura 2. (A) Ensaio de atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais, empregado para detecção da presença de lectinas em determinada amostra. (B) Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante realizado em presença de carboidratos livres com o objetivo de confirmar a presença de lectinas em amostras contendo atividade hemaglutinante, ou de determinar a especificidade das lectinas detectadas.



Fonte: LIMA et al, 2018

As lectinas tornaram-se foco de intenso interesse por pesquisadores e, em particular, para a pesquisa e aplicações em agricultura e medicina (MOVAFAGH et al., 2013). Essas proteínas de características únicas têm sido utilizadas em diversos campos da biologia e à medida que mais lectinas estão sendo isoladas e seu papel na natureza elucidado, as possibilidades de aplicação são ampliadas e abrangem as áreas agrícolas e terapêuticas de pesquisa (HAMID et al, 2013).

As lectinas produzidas por plantas estão distribuídas em vários tecidos vegetais como casca, fruto, folha, raiz, sementes, caule, flores, ovários, entre outros, sendo encontradas em diferentes localizações celulares e possuindo variadas propriedades

moleculares (DIAS et al.,2015). Elas desempenham importantes papéis na defesa da planta contra o ataque de microrganismos, por exemplo, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos e não patogênicos (DIAS et al.,2015). Quando estão presentes em bulbos, cascas e rizomas, as lectinas possuem a função fisiológica de reserva, fornecendo aminoácidos para o desenvolvimento da planta (OLIVEIRA, 2018).

Lectinas de plantas podem ser classificadas de acordo com a estrutura geral do domínio de ligação em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. As merolectinas apresentam apenas um domínio ligação a carboidratos. Por serem monovalentes não possuem a propriedade de aglutinar células ou precipitar carboidratos. As hololectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, os quais são idênticos ou muito homólogos, permitindo a aglutinação ou precipitação de glicoconjugados. A maior parte das lectinas vegetais são pertencentes a este grupo. As quimerolectinas são compostas de um ou mais domínios de ligação a carboidratos que estão fundidos a um domínio que realiza atividade biológica independente, por exemplo ação enzimática. Por fim as superlectinas consistem em um grupo de lectinas que, assim como as hololectinas, possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, no entanto reconhecem apenas açúcares não relacionados estruturalmente (VAN DAMME et al., 1998; VANDENBORRE et al, 2011).

Desde a década de 1960, as lectinas vegetais têm sido amplamente utilizadas como ferramentas valiosas na pesquisa biomédica, devido à sua capacidade de interagir com receptores de glicanos presentes nas superfícies celulares, o que pode desencadear a sinalização celular e respostas bioquímicas (SOUZA, 2013). Algumas atividades biológicas já descritas realizadas pelas lectinas vegetais, incluem atividade inseticida (PROCÓPIO et al, 2015; CAMAROTI et al, 2018), antitumoral (SINGH et al, 2016; RAMOS et al, 2018), imunomoduladora (SANTOS, 2018; CORIOLANO et al, 2018), antiinflamatória (ALVES et al, 2018; OLADOKUN et al, 2019), antifúngica (SILVA et al, 2019a; MOHSEN et al, 2019) e antibacteriana (SILVA et al, 2019b).

De acordo com Paiva e colaboradores (2010) a atividade antibacteriana das lectinas é geralmente resultado da interação destas proteínas com ácidos teicóicos e teicurônicos,

peptideoglicanos e lipopolissacarídeos presentes na parede celular da bactéria. Como resultado dessa interação, morte bacteriana pode ocorrer por extravasamento do conteúdo celular através de canais na parede celular formados pelas lectinas (CORREIA, 2008; PROCÓPIO et al., 2017a).

Na literatura, estudos revelam que diversas lectinas vegetais também foram capazes de interferir no processo de formação de biofilmes. ApuL, a lectina isolada da inflorescência de brácteas de *Alpinia purpurata*, demonstrou inibição na formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* entre as concentrações 1,56 e 50 µg / mL, e em *Candida albicans* entre as concentrações de 12,5 e 200 µg / mL (FERREIRA et al, 2018). Estudos conduzidos com a lectina PgTeL, isolada da sarcotesta de *Punica Granatum*, mostrou que a lectina possui atividade antibiofilme contra isolados de *Escherichia coli* produtoras de *b*- lactamases entre as concentrações de 6,25 a 200 µg / mL (SILVA et al, 2019).

A formação e manutenção de biofilmes microbianos estão diretamente ligados a resíduos de carboidratos. Estas moléculas podem mediar a adesão da bactéria à superfície do substrato para a formação do biofilme, agindo em conjunto na interação de microrganismos para formar agregados celulares. Como as lectinas são moléculas capazes de se ligar específica e seletivamente aos carboidratos, têm função crucial nos estudos de biofilmes, tornando-se uma ferramenta poderosa na análise de estruturas glicídicas de agregados de origem microbiana (CAVALCANTE et al, 2014).

2.4 *Schinus terebinthifolia* Raddi

Schinus terebinthifolia (Figura 3), pertencente à família Anarcadiaceae, é uma planta nativa das Américas Central e do Sul e encontrada no Brasil desde a região Nordeste até a região Sul (LORENZI, 2008). É conhecida popularmente como aroeira vermelha, aroeira-da-praia, aroeira pimenteira, entre outros, podendo ser encontrada na forma de arbusto ou árvore (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA, 2014).

Na cultura popular essa planta é amplamente utilizada para fins medicinais, atuando

no tratamento de doenças do trato urinário e respiratório, em forma de banhos de assento após o parto como anti-inflamatório e cicatrizante, e suas folhas e frutos são usados na limpeza de feridas e úlceras (LORENZI e MATOS, 2008). É relatada ainda sua atuação no tratamento de afecções, como diarreias, gastrites e dispepsias e sua expressão com propriedades antialérgicas (FALCÃO et al, 2015).

Figura 3. *Schinus terebinthifolia* Raddi. A. Hábito da planta. B. Folhagens e frutos.



Fonte: SANTOS, 2018

As aplicações biológicas de *S. terebinthifolia* têm sido estudadas a muitos anos e suas propriedades têm sido descritas desde a primeira edição da revista *Brazilian Pharmacopoeia*, publicada em 1926 (CARVALHO et al, 2013). Dentre os compostos produzidos por *S. terebinthifolia* com atividade biológica comprovada está o óleo essencial extraído de seus frutos, que apresentou atividade antioxidante e citotóxica contra tumores em mamas de humanos (BENDAOU et al., 2010). Cavalher-Machado e colaboradores (2008) demonstraram que compostos aromáticos isolados de *S. terebinthifolia* apresentam propriedades antialérgicas expressivas, representadas pelo impedimento da formação de edema, inibição da degranulação dos mastócitos e do influxo de eosinófilos como um resultado da diminuição da produção de mediadores eosinofílicos.

Extratos da casca e folhas de *S. terebinthifolia* contendo alcaloides, taninos,

flavonoides e saponinas foram ativos contra bactéria *S. aureus* (CARMINATE et al, 2017). Atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (principal vetor da dengue, Zica, febre amarela e Chikungunya) foi demonstrada para o extrato de folhas de *S. terebinthifolia*, que também interferiu no desenvolvimento de larva a pupa (PROCÓPIO et al, 2015).

Gomes e colaboradores (2013) isolaram e caracterizaram uma lectina ligadora de quitina (SteLL) a partir do extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* Raddi. Este estudo revelou que SteLL é um polipeptídeo glicosilado de 14 kDa, com afinidade por quitina, e sua estabilidade em diferentes pH e temperatura é uma característica físico-química que estimulam o seu uso potencial uso como antibiótico. Neste estudo, SteLL apresentou efeito antibacteriano contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*, bem como efeito antifúngico contra *Candida albicans*.

Estudos mais recentes relataram que SteLL, a uma concentração de 12,5 µg/ml, apresentou atividade imunomoduladora frente a esplenócitos de camundongos Balb/c, aumentando a liberação das citocinas IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-4 E IL-2 (SANTOS, 2018). Ramos e colaboradores (2019) demonstraram a ação antitumoral de SteLL (5 mg/kg) contra sarcoma 180, sem promover a perda de peso, alterações hematológicas ou efeitos genotóxicos em camundongos.

Efeito de SteLL em macrófagos de camundongos infectados por *S. aureus* também foi relatado. Os estudos revelaram que a lectina a 16µg / mL ($8 \times$ CIM) aumentou a massa celular e o conteúdo de DNA de *S. aureus* em relação a bactérias não tratadas, sugerindo que SteLL prejudica a divisão celular. Além disso, a lectina também apresentou efeito imunomodulador ao induzir a liberação de citocinas (IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α), óxido nítrico e ânion superóxido pelos macrófagos infectados (LIMA et al, 2019).

O reconhecido potencial etnofarmacológico de *S. terebinthifolia*, bem como a atividade previamente relatada de SteLL sobre *S. aureus* e a importância dessa bactéria na medicina estimularam a investigação do efeito dessa lectina sobre cepas de *S. aureus* resistentes a Oxacilina, bem como seu potencial antibiofilme, fator de virulência bacteriana importante.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antibiofilme da lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis ou resistentes à oxacilina.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar a lectina de folhas de *S. terebinthifolia* (SteLL) por procedimento previamente estabelecido.
- Monitorar a cinética de crescimento celular de *S. aureus* sensíveis ou resistentes à Oxacilina na presença ou na ausência de SteLL durante 24 horas
- Avaliar a viabilidade celular de *S. aureus* sensíveis ou resistentes à oxacilina usando o marcador iodeto de propídio (PI) combinado com laranja de tiazol (TO) e análise por citometria de fluxo.
- Estabelecer protocolo de formação do biofilme multiespécies *in vitro* por cepas de *S. aureus*.
- Avaliar o potencial *in vitro* de SteLL em inibir e erradicar a formação dos biofilmes bacterianos multiespécies.

4. METODOLOGIA

4.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

Neste estudo, foram utilizados isolados de *Staphylococcus aureus*, nomeado como UFPEDA-02 e *S. aureus*, nomeado como UFPEDA-670, cepa sensível e resistente a oxacilina, respectivamente. As cepas foram fornecidas pela Coleção de culturas da UFPEDA (WDCM 114) do Departamento de Antibióticos da UFPE. As culturas foram mantidas a -20° C em solução de glicerol 10% (v/v) em caldo Muller Hinton (MHB). As bactérias foram cultivadas em Ágar Mueller Hinton (MHA) a 37°C durante a noite (16 h). A densidade óptica das culturas foram ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) para 3×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL em solução salina estéril (NaCl 0,15 M).

4.2. Isolamento da lectina

Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). STeLL foi isolada de folhas de *S. terebinthifolia*, conforme descrito por Gomes et al. (2013). As folhas foram coletados na Universidade Federal Rural de Pernambuco município de Recife (Pernambuco, Brasil), com autorização (36.301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente. As folhas foram trituradas e, em seguida, misturada com NaCl 0,15M (na proporção de 9:1, p/v) durante 16 h, utilizando um agitador magnético. A mistura foi então submetida a filtração através de gaze, e o filtrado foi centrifugado (3000g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi denominado extrato salino (ES). O ES foi aplicado a coluna de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com NaCl 0,15 M e a lectina SteLL adsorvida foi recuperada por eluição com ácido acético 1,0 M e dialisada contra água destilada (6h, 4°C) para remoção do eluente.

4.3. Concentração de proteína e atividade hemaglutinante (AH)

A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando albumina sérica bovina (31,25-500 µg/mL) como padrão. A AH foi determinada como descrito por Silva et al. (2016) usando suspensão de eritrócitos de coelho (2,5% v/v) previamente tratados com glutaraldeído (Bing et al., 1967). A coleta de eritrócitos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo 23076.033782 / 2015-70). No ensaio de AH, STeLL (50 µL) foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M em uma linha de microplaca de 96 poços com fundo em V, e em seguida a suspensão de eritrócitos (50 µL) foi adicionada em cada poço; no controle negativo, os eritrócitos foram incubados com NaCl 0,15 M. Após incubação durante 45 min a 28°C, o número de unidades de AH (UAH) foi determinado como da maior diluição da amostra que promoveu a aglutinação total dos eritrócitos de coelho. A AH específica foi definida como a razão entre o UAH e a concentração de proteína (mg/mL).

4.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)

A atividade antibacteriana foi realizada de acordo com *Clinical and Laboratory Standards* (2015). As culturas em MHB tiveram sua DO₆₀₀ ajustada turbidimetricamente para 3×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Cada ensaio correspondeu a uma linha de uma microplaca de 96 poços de fundo chato (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça). Inicialmente, 80 µL de água destilada foram adicionados ao segundo e do quarto até o décimo segundo poço da fileira. Em seguida, SteLL (80 µL; 1 mg/mL) foi adicionada ao terceiro e quarto poço, e diluída serialmente até o décimo segundo poço. Então, foram adicionados 200 µL de MHB ao primeiro poço (esterilidade) e 40 µL de MHB do segundo até o décimo segundo poço da linha. Todos os poços (exceto o primeiro) foram inoculados com 80 µL da cultura bacteriana. O primeiro poço recebeu apenas o meio MHB e correspondeu ao controle de esterilidade. O segundo poço correspondeu ao controle de crescimento de 100% (controle negativo) e recebeu uma diluição de MHB em água destilada, bem como a cultura bacteriana. A densidade óptica a 600nm (DO₆₀₀) foi medida (tempo zero) e depois o ensaio foi incubado a 37° C durante 24 h. Após esse período, a

DO₆₀₀ foi registrada novamente. O aumento na DO₆₀₀ em comparação com o tempo zero foi considerado como crescimento bacteriano. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada como a menor concentração de SteLL capaz de promover uma redução de DO₆₀₀ maior ou igual a 50% em comparação com o controle de crescimento de 100%.

Para determinar a concentração mínima bactericida (CMB), inóculos (4 µL) dos poços contendo SteLL em concentrações maiores ou iguais ao CMI foram transferidas para placas contendo MHA, em seguida foram incubadas a 37°C por 24 h. A CMB correspondeu à menor concentração de SteLL capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em comparação com o inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

4.5. Curvas de crescimento de *S. aureus* sensíveis ou resistentes à oxacilina

Para monitorização do comportamento celular bacteriano na presença ou na ausência de SteLL foram estabelecidas curvas de crescimento durante 20 h. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços como descrito na seção 4.4. O primeiro poço correspondeu ao controle de esterilidade, o segundo poço correspondeu ao controle de crescimento de 100% e do terceiro ao quinto poço corresponderam a tratamentos com SteLL a 2×CMI, CMI e ½CMI, respectivamente. A microplaca foi incubada a 37 °C e a DO₆₀₀ foi determinada a cada hora. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.6. Análise da viabilidade bacteriana por citometria de fluxo

A viabilidade de células bacterianas tratadas com SteLL foi avaliada utilizando o Kit Cell Viability da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). As bactérias foram incubadas conforme descrito na seção 4.4 com SteLL na CMI. O controle negativo foi preparado adicionando água destilada em substituição de SteLL. Para o controle positivo, as células foram tratadas com álcool isopropílico a 70% (v/v) durante 1 h antes da análise. As amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 10 min, 25°C) e os *pellets* contendo as células foram lavados três vezes com PBS 0,1 M em pH 7,2. Em seguida, 42 µM de laranja de tiazol (OT, 5 µL) e iodeto de propídio 4,3 µM (PI, 5 µL) foram adicionados às amostras, as quais foram submetidas a vórtex e incubadas por 5 min a 25 °C. Os dados foram obtidos em

um citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences) com um limiar de SSC de 200 e interrompido após a propagação de 20.000 eventos para cada amostra. A análise foi realizada no software BD Accuri C6. Os resultados foram apresentados como gráficos de pontos FL1 vs. FL3 e a fluorescência da média FL3 (coloração PI).

4.7 Formação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies

A formação do biofilme de *S. aureus* foi avaliada utilizando-se o método do cristal violeta. Para biofilmes multiespécies das cepas estudadas foi estabelecido o protocolo de formação com a escolha do melhor meio de cultura, dentre os caldos Mueller Hinton (MH), Triptona de Soja (TSB) e Infusão Cérebro-Coração (BHI), suplementados ou não com 1% de glicose. Em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato cada poço foi adicionado 80 µl de água Milli-Q, 40 µl do meio de cultura líquido e 80 µl da suspensão bacteriana (10^8 UFC/ml; em solução salina estéril), de um ou mais inóculos bacterianos, para o desenvolvimento de biofilmes mono e multiespécie, respectivamente. A DO_{600} foi obtida no tempo zero, as placas foram incubadas a 37 °C por 24h e, após esse período, a DO_{600} foi obtida novamente a fim de se verificar o crescimento bacteriano. A etapa seguinte correspondeu à análise da formação do biofilme que ocorre após a remoção do conteúdo (células não aderidas) de cada poço da placa. Adicionalmente, os poços foram lavados com NaCl a 0,9 % estéril (três vezes) e os biofilmes (células aderidas à placa de poliestireno) foram incubados a 60°C por 60 min para fixação e, em seguida, marcados com cristal violeta 0,4% (p/v) por 15 min a 25°C. Os poços foram lavados com água para remoção do cristal violeta não aderido e, posteriormente, o corante aderido ao biofilme foi solubilizado em etanol absoluto (15 min) e a absorbância a 570 nm foi mensurada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Em cada caso, o melhor meio de cultura para crescimento do biofilme foi escolhido para os próximos experimentos.

Para classificação do nível de formação de biofilme (STEPANOVIC et al., 2007), foram determinados os valores de corte da densidade óptica (DOc) e o valor final da densidade óptica (DOf) para cada teste:

$$DOc = \text{média da DO do controle negativo} + (3 \times \text{desvio padrão do controle negativo})$$

$$DOf = \text{média da DO do teste} - DOc$$

Os microrganismos foram então classificados da seguinte forma: $DO_f \leq DO_c$ = não-produtor de biofilme; $DO_c < DO_f \leq 2 \times DO_c$ = fraco produtor de biofilme; $2 \times DO_c < DO_f \leq 4 \times DO_c$ = moderado produtor de biofilme; $4 \times DO_c < DO_f$ = forte produtor de biofilme.

4.8 Ensaio de biofilme estático

A formação de biofilme foi avaliada em microplacas de 96 poços de poliestireno estéreis pelo método do cristal violeta (Trentin et al., 2011). Em cada poço do teste foram adicionados, 80 μ L de suspensão microbiana (10^8 UFC/mL em NaCl 0,15 M), 80 μ L de SteLL (nas concentrações finais de 200-1,56 μ g/mL) em água Milli-Q e 40 μ L de MHB. Para o controle de células não tratadas (100% de crescimento do biofilme) SteLL foi substituída por água Milli-Q. O crescimento bacteriano foi avaliado pelo aumento da DO_{600} após 24h de incubação a 37° C. Em seguida, as células não aderentes foram removidas dos poços após três lavagens com NaCl 0,15 M. Os biofilmes foram pré-fixados com metanol absoluto durante 20 min e em seguida fixados pelo calor a 50° C durante 60 min. Então o biofilme foi corado com cristal violeta 0,4% (p/v) durante 25 min em 25° C. O cristal violeta não ligado foi removido com água destilada e o corante ligado ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto por 15 min, e a absorbância foi medida a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.9 Ensaio de erradicação de biofilme

Biofilmes das cepas de *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e UFPEDA 670 com 24 horas de formados foram obtidos como descrito acima e depois incubados com 80 μ l de água estéril, 40 μ l de MHB e 80 μ l de lectina a $4 \times CMI$, $2 \times CMI_{50}$, CMI_{50} ou $\frac{1}{2} CMI_{50}$, que correspondeu a concentrações variando de 6,25 a 50 μ g/mL para UFPEDA 02 e 25 a 200 μ g/mL para UFPEDA 670. Para o controle não tratado, os biofilmes foram incubados com água estéril, em vez de lectina, enquanto para o controle antibacteriano, os biofilmes foram tratados com oxacilina (8 μ g/mL). Após 24 h a 37° C, o conteúdo foi removido e os poços foram lavados três vezes com NaCl estéril a 0,9% (p/v). Os biofilmes restantes foram corados com violeta de cristal como descrito acima.

4.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ou porcentagem média \pm desvio padrão (DP) e as diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste T de Student; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

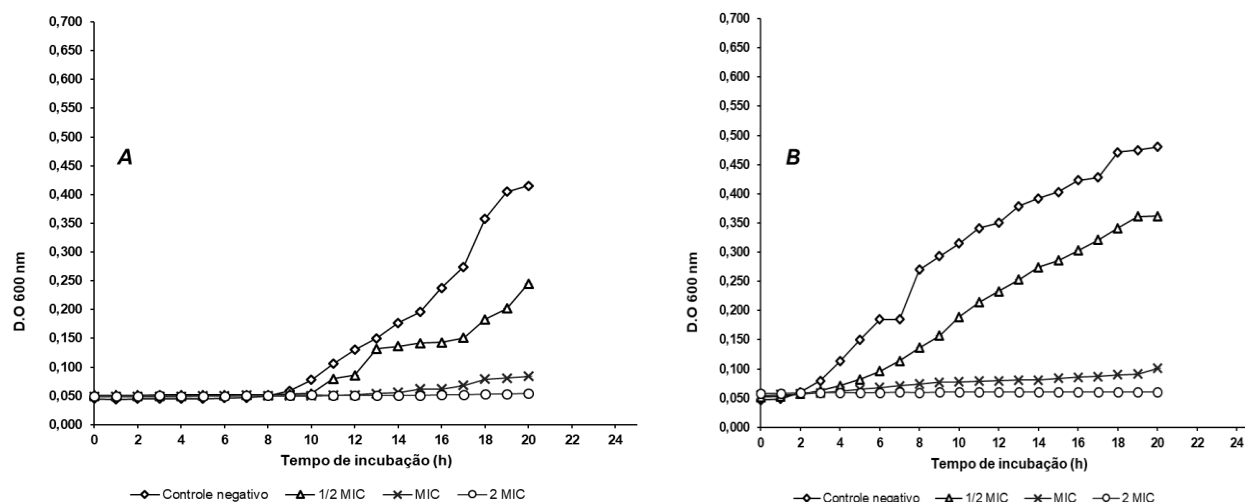
Devido à crescente necessidade de novos agentes antimicrobianos mais eficazes, menos tóxicos para células do hospedeiro e que sejam economicamente viáveis para o tratamento de infecções humanas, as plantas têm representado fontes de compostos com potencial farmacológico. As lectinas vegetais têm sido avaliadas quanto ao potencial antimicrobiano e, além disso, quanto aos mecanismos de ação envolvidos nessa atividade. SteLL, a lectina isolada das folhas de *S. terebinthifolia*, é um agente antimicrobiano cuja atividade contra bactérias e fungo de interesse médico foi previamente relatada (GOMES et al., 2013). Neste contexto, o presente trabalho ampliou o estudo da atividade antibacteriana de SteLL ao determinar também o seu efeito na formação de biofilmes de isolados de *S. aureus* sensível ou resistente a Oxacilina

SteLL (0,4 mg/mL) foi agente bacteriostático e bactericida para os isolados UFPEDA 02 e UFPEDA 670 com CMI de 12,5 e 25 µg/mL e CMB de 50 e 100 µg/mL, respectivamente. SteLL foi agente antibacteriano contra bactérias Gram positivas menos eficaz que as lectinas isolada de sementes de *Morina oleifera* (WSMoL) que apresentou CMI variando entre 10,4 a 41,7µg/mL e CMB entre 83,5 a 176 µg/mL, e à lectina da sarcotese de *Punica granatum* (PgTeL) que apresentou CMI e CMB variando entre 1,25–50 µg/mL e 18–100 µg/mL, respectivamente (MOURA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Por outro lado, SteLL foi mais eficiente contra as linhagens de *S. aureus* sensível ou resistente à oxacilina que a lectina isolada das folhas de *Calliandra surinamensis* (CasuL), a qual causou inibição menor que 30% em cepa resistente, e entre 38% e 49% em cepa padrão nas concentrações de 6,25 a 800 µg/mL. A lectina também foi mais eficaz contra UFPEDA 02 e UFPEDA 670 que a lectina isolada da inflorescência de *Alpinia purpurata* (ApuL), a qual mostrou CMI de 50 e >400 µg/mL para *S. aureus* padrão e resistente a oxacilina, respectivamente (PROCÓPIO et al., 2017; FERREIRA et al., 2018).

Para avaliar a cinética de crescimento, as culturas foram monitoradas durante 20 h na presença da lectina nas concentrações de 2×CMI, CMI e ½CMI. A figura 4 mostra as curvas de crescimento dos isolados UFPEDA 02 (Figura 4A) e UFPEDA 670 (Figura 4B) de *S. aureus* incubados com SteLL em diferentes concentrações.

Figura 4: Curvas de crescimento (20 h de incubação) de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes a oxacilina (UFPEDA 670) na ausência (controle negativo) ou presença de SteLL em diferentes concentrações. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão (SD) de três experimentos.



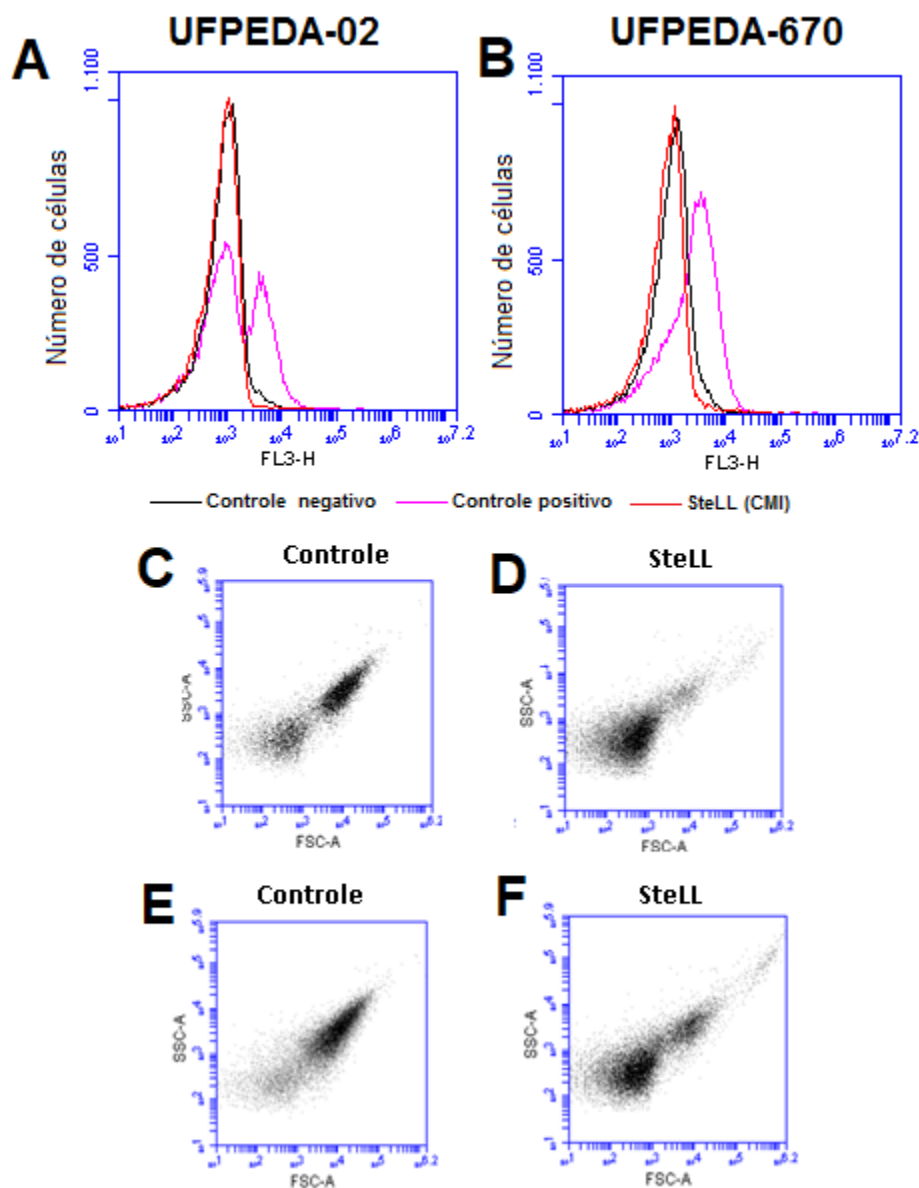
Na concentração correspondente a $\frac{1}{2}$ CMI, o crescimento bacteriano iniciou a partir da décima hora em UFPEDA 02 e a partir da quarta hora em UFPEDA 670, permanecendo até as últimas horas de incubação, contudo sempre menor que o crescimento detectado no controle negativo. Na concentração correspondente à CMI foi possível observar uma acentuada inibição do crescimento que se manteve durante todo o período de avaliação nas duas linhagens. Na concentração $2 \times$ CMI não foi detectado crescimento em ambas UFPEDA 02 e UFPEDA 670.

A cinética de crescimento revelou que SteLL interferiu no crescimento de *S. aureus* em todas as concentrações testadas, mostrando menores valores de densidade óptica que o controle. Outros estudos têm também utilizado a cinética de crescimento para mensurar o comportamento celular por um período determinado de tempo, como no estudo de *S. aureus* tratadas com nanopartículas de prata e com um composto natural, a baicalina (LIANG et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

A citometria de fluxo foi empregada para avaliar alterações na morfologia e viabilidade em células de *S. aureus* tratadas com SteLL na CMI. Conforme esperado, a quantidade de células nos tratamentos com a lectina foi muito menor do que aquela presente no tratamento controle, o que refletiu no maior volume necessário para atingir o número estabelecido de eventos, em comparação com o controle (dados não mostrados). A maioria das células remanescentes de UFPEDA 02 (Figura 5A) e UFPEDA 670 (Figura 5B) ainda permaneceram viáveis após o tratamento com SteLL na CMI, conforme indicado pela fluorescência FL3. Esses resultados indicam a predominância de um efeito bacteriostático nessa concentração. Por outro lado, as plotagens de pontos FSC vs. SSC mostram que nos tratamentos com SteLL houve deslocamentos das células em direção a menores valores de ambos FSC e SSC (Figura 5). Esse dado indica alterações morfométricas em relação ao tamanho, forma e complexidade das células de *S. aureus*.

Estudos em *S. aureus* tratadas com as lectinas ApuL e PgTeL também utilizaram a citometria de fluxo para mensurar viabilidade celular. O tratamento com ApuL no CMI 50 contra isolados não resistentes (UFPEDA 02) resultou em valores maiores de coloração de células não viáveis quando comparadas ao controle negativo. Esses resultados indicam que a inibição do crescimento foi associada ao comprometimento da viabilidade celular. A lectina PgTeL, por sua vez, apresentou na CMI 50 resultados semelhantes à SteLL, pois, após o tratamento maioria das células bacterianas ainda eram viáveis, resultado que indica a predominância de um efeito bacteriostático e sugere que as alterações superficiais observadas não foram suficientes para prejudicar a permeabilidade da maioria das células (FERREIRA et al., 2018; SILVA et al., 2019).

Figura 5: Análise por citometria de fluxo da viabilidade de isolados de *Staphylococcus aureus* sensível (UFPEDA 02) ou resistente à oxacilina (UFPEDA 670) tratados com SteLL na sua concentração mínima inibitória (CMI). (A e B) Sobreposição dos histogramas de marcação de células de *S. aureus* UFPEDA-02 e UFPEDA-670 com iodeto de propídeo (canal FL3) CN ou tratadas com SteLL. Plotagens de pontos FSC vs. SSC para determinação de alterações morfológicas em relação ao tamanho, forma e complexidade das células de *S. aureus* UFPEDA 02 (C e D) e UFPEDA 670 (E e F). No controle negativo (CN), foi utilizada água destilada em substituição à lectina. Álcool isopropílico foi utilizado como controle positivo.



Um dos grandes problemas no tratamento de infecções causadas por bactérias é a capacidade de sobrevivência frente a vários fatores, dentre os quais está a pressão seletiva dos agentes antimicrobianos que estimula o surgimento de resistência. Vários mecanismos podem ser utilizados para facilitar o surgimento e a transferência dos genes ligados a resistência, destacando-se a formação de biofilmes (RAJKOWSKA et al., 2018; MEENA et al., 2019)

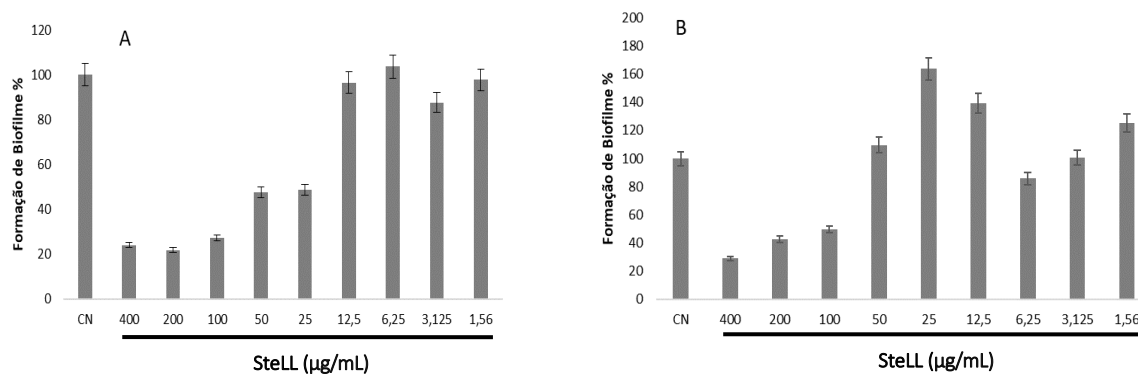
No ensaio para avaliação da capacidade de formação de biofilmes foram utilizadas as linhagens UFPEDA 02 e UFPEDA 670 isoladas ou associadas, em diferentes meios de cultura. Os melhores nutrientes para formação de biofilme foram encontrados no caldo Mueller Hinton (MH). Ambas as cepas, isoladas ou associadas apresentaram forte capacidade formadora de biofilme, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Potencial de formação de biofilmes em cepas de *S. aureus* sensíveis (UFPEDA 02) ou resistentes à oxacilina (UFPEDA 670) isolados ou em associação (UFPEDA-02 + UFPEDA-670).

Cepas de <i>S. aureus</i>	Capacidade de formação de biofilme
UFPEDA-02	Forte
UFPEDA-670	Forte
UFPEDA-02 + UFPEDA-670	Forte

A avaliação do efeito de SteLL na formação de biofilmes em *S. aureus* demonstrou que a lectina possui significativa ação antibiofilme contra as linhagens sensíveis e resistente a oxacilina. SteLL inibiu significativamente a formação de biofilme de UFPEDA 02 (Figura 6A) nas concentrações entre 400 e 25 µg/mL e de UFPEDA 670 (Figura 6B) entre 400 e 100 µg/mL.

Figura 6: Atividade antibiofilme de SteLL contra os isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes à oxacilina (UFPEDA 670). As células foram tratadas por 24 h com a lectina e a formação do biofilme foi avaliada pelo método do cristal violeta e medição da densidade óptica em 570 nm. Células tratadas com água destilada corresponderam ao controle negativo (CN). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.



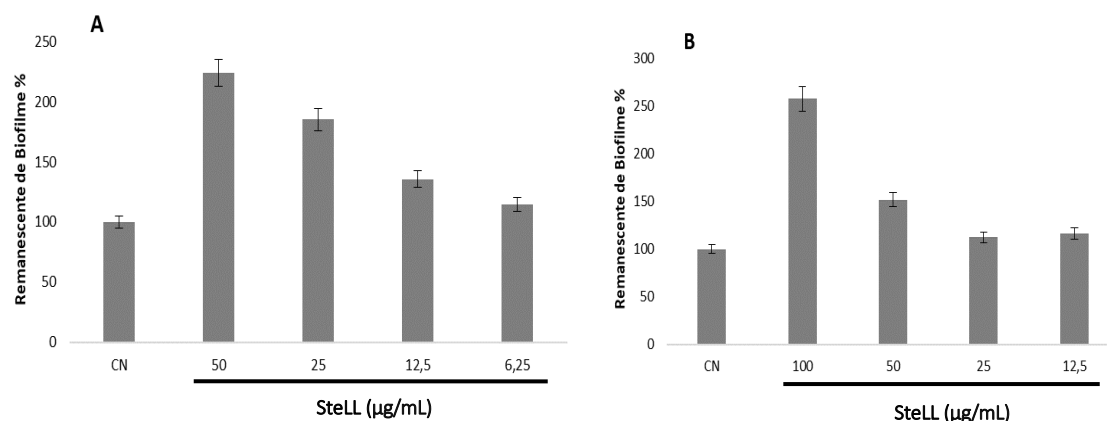
Lectinas com ação antibiofilme contra bactérias Gram-positivas têm sido descritas. Estudos com a lectina extraída da *M. oleifera* WsMoL revelaram que, na concentração de 20,8 µg/ml, a lectina foi capaz de impedir a formação de biofilmes de *Bacillus* sp. (MOURA, 2016). A lectina CasuL também apresentou efeito antibiofilme contra *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (não resistente e resistentes a isolados de oxacilina) (PROCÓPIO et al, 2017). Estudos conduzidos com a lectina VML, isolada de *Vaitarea macrocarpa*, e a lectina CFL, isolada de *Cratylia floribunda*, demonstraram que essas lectinas foram capazes de inibir a formação de biomassa de *S. aureus* em biofilmes (VASCONCELOS et al, 2014).

A estratégias de combate de biofilmes através da utilização de compostos provenientes de plantas envolvem dois mecanismos principais: a inibição da formação de biofilmes e a erradicação de biofilmes já formados (MOURA, 2016). A inibição da formação de biofilmes também chamada de atividade de antiformação, ocorre através do uso de compostos bacteriostáticos e/ou bactericidas, ou por meio da utilização de moléculas que impedem a adesão bacteriana a superfícies ou que atuem no bloqueio da sinalização QS (MARTIN et al., 2008). A erradicação de biofilmes já formados está relacionada à atuação

de moléculas capazes de desintegrar a EPS, destruindo a estrutura tridimensional do biofilme e liberando células livres (BOLES & HORSWILL, 2011).

No ensaio para erradicação de biofilme, os biofilmes de *S. aureus* não foram afetados após tratamento com a lectina nas concentrações variando de 6,25 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para UFPEDA 02 (Figura 7A) e 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ para UFPEDA 670 (Figura 7B) em comparação com o controle. Foi observado uma maior absorvância do cristal violeta na maior concentração em ambas linhagens, o que pode representar um mecanismo de defesa da bactéria como resposta à alta concentração da lectina.

Figura 7: Efeito de SteLL sobre biofilmes pré-formados de isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis UFPEDA 02 ou (B) resistentes à oxacilina (UFPEDA 670). Os valores obtidos para o biofilme não tratado (controle não tratado) corresponderam a 100% da biomassa do biofilme. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.



Estudos tem demonstrado que compostos de plantas podem atuar utilizando a erradicação de biofilmes. SteLL nas concentrações utilizadas não foi capaz de erradicar biofilmes pré-formados de *S. aureus*. Diferentemente, outros compostos de origem vegetal, tais como: o extrato etanólico de *Rhodomyrtus tomentosa* e rodomirtona isolada a partir dele diminuíram a viabilidade das células cultivadas de biofilmes já formados de *S. aureus* e *S. epidermidis* com 24h e 5 dias, e o extrato de *Croton urucurana* (5mg/mL), erradicou 50,03% da matriz de *S. aureus*, com atividade superior ao antibiótico gentamicina (30 mg/mL), que eliminou 13,94% da biomassa bacteriana (SAISING et al, 2011; NADER et

al, 2018). Estudos conduzidos por Oliveira e colaboradores (2010) demonstraram que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* foram capazes de reduzir significativamente o número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável após 60 minutos de contato, às 240 h de formação de biofilme.

6. CONCLUSÃO

- SteLL apresentou atividade bacteriostática e bactericida contra linhagens de *S. aureus* sensível e resistente à Oxacilina.
- SteLL interferiu na cinética de crescimento celular de *S.aureus*, inibindo o crescimento, mesmo em concentrações menores que a CMI.
- A lectina causou alterações morfométricas relacionadas ao tamanho, forma e complexidade celular nas linhagens de *S. aureus* sensível e resistente à Oxacilina.
- A lectina também demonstrou potencial para inibir a formação de biofilme por *S. aureus* sensível e resistente à Oxacilina.
- Os resultados estimulam a realização de estudos *in vivo* para determinar se os promissores efeitos antimicrobianos da SteLL são reprodutíveis em modelos de infecção.

7. REFERÊNCIAS

- ALLEWELL, N. M. Introduction to Biofilms Thematic Minireview Series. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 24, p. 12527–12528, jun. 2016.
- ALVES, S. M. et al. The efficacy of a lectin from *Abelmoschus esculentus* depends on central opioid receptor activation to reduce temporomandibular joint hypernociception in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 478–484, maio 2018.
- ANVISA. Ministério da Saúde. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Schinus terebinthifolius* RADDI (AROEIRA-DA-PRAIA). Brasília, 2014
- ARAÚJO, C. S. F. de. **Avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de Bauhinia monandra (BmoLL)**. 2015. 114 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle L.* and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food and Science**. v. 75, p. 466-72, 2010.
- BERLANGA, M.; GUERRERO, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 165, dez. 2016.
- BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 4, p. 1166-1170, 1967.
- BOLES, B.R.; HORSWILL, A.R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 449-455, 2011.
- BUHMANN, M. T. et al. In Vitro Biofilm Models for Device-Related Infections. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 945–948, dez. 2016.
- CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 81–89, jun. 2018.
- CARMINATE, B. et al. Atividade antibiótica dos extratos de *Schinus terebinthifolia* Raddi. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 485, 7 fev. 2017.
- CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 158–169, 2013.
- CAVALCANTE, T. T. A. . et al. Plant lectins as alternative tools against bacterial biofilms. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 27, p. 2555–2564, jul. 2014.

CAVALHER-MACHADO, S. C. et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 11, p. 1552-1560, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/ Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–22, 2017.

COELHO, L. C. et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, nov. 2018.

CORIOLOANO, M. C. et al. Immunomodulatory effects of the Water-soluble lectin from *Moringa oleifera* Seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Protein and Peptide Letters**. v. 25, p 295-301, 2018.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Lectins carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? In: Siddique, Y.H. (ed.). **Recent Trends in Toxicology**, v. 37, p.47-59, 2008.

DAR, R. A. et al. Natural product medicines: A literature update. **The Journal of Phytopharmacology**, v.6, n 6, p. 340-342, 2017

DEMIR, C. et al. Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* strains taken from chronic wound infections and their genotypic and phenotypic antimicrobial sensitivity patterns. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101584, mar. 2020.

DI MARTINO, P.; Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 274–288, 2018.

DIAS, R. et al. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519–541, 5 jan. 2015.

ESTEVIÃO, L. R. M. et al. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 202–209, mar. 2013.

FALCÃO, M. P. M. M. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 23, 9 dez. 2015.

FERREIRA, G. R. S. et al. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 152-162, 2018.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672–679, mar. 2013.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOWDA, T. K. G. M. et al. Isolation and Seroprevalence of *Aeromonas* spp. Among Common Food Animals Slaughtered in Nagpur, Central India. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 7, p. 626–630, jul. 2015.

GRAF, A. C. et al. Virulence Factors Produced by *Staphylococcus aureus* Biofilms Have a Moonlighting Function Contributing to Biofilm Integrity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 6, p. 1036–1053, jun. 2019.

HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, 1 maio 2017

HAMID, R. et al. Lectins: Proteins with Diverse Applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 11, 2013

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, jan. 2018.

KONG, C. et al. Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2758, dez. 2018.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306–a010306, abr. 2013

LADE, H. et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1853, nov. 2019.

LIANG, Z. et al. Effect of AgWPA nanoparticles on the inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in biofilms. **Food Control**, v. 100, p. 240–246, jun. 2019.

LIMA, J. L., et al. LECTINAS VEGETAIS COMO FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS: UMA REVISÃO In: Fabrício Loreni da Silva Cerutti, Cristiane Rickli Barbosa, Lais Daiene Cosmoski. (ORG). **Biomedicina e Farmácia: Aproximações**. 1 ed. Ponta Grossa (PR) : Atena, v.1, p. 63-78, 2018.

LIMA, I. M. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18159, dez. 2019.

LINDENMAIER, D.S. **Etnobotânica em comunidades indígenas Guaranis no Rio Grande do Sul**. Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul., 2008

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, n 193, p 265–275. 1951
- MARTIN, C.A.; HOVEN, A.D.; COOK, A.M. Therapeutic frontiers: Preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 635-642, 2008.
- MEENA, M. et al. Virulence Factors and Their Associated Genes in Microbes. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. p. 181-208, 2019.
- MOHSEN, S. F. E. et al. Isolation and Antifungal Activity of Plant Lectins against some Plant Pathogenic Fungi. **Alexandria Science Exchange Journal: An International Quarterly Journal of Science Agricultural Environments**, v. 39, n. January-March, p. 161–167, 30 mar. 2018.
- MOURA, M. C. de. **Avaliação de lectina solúvel em água de sementes de Moringa oleifera (WSMoL) no controle da biocorrosão**. 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- MOURA, M. C. et al. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666–676, set. 2015.
- MOVAFAGH, A. et al. The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 4, n. 4fev. 2013.
- NADER, T. T. et al. Atividade antibiofilme de substâncias de Croton urucurana em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1713–1719, set. 2018.
- OLADOKUN, B. O. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Tetracarpidium conophorum* seed lectin. **Scientific African**, v. 3, p. e00073, maio 2019.
- OLIVEIRA, D.K.; CARDOSO, A. M. **Biofilmes microbianos: Um desafio para a saúde**. 2015. 25f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Microbiologia Clínica e Medicina Laboratorial). Pontifícia Universidade de Goiás, Goiás.
- OLIVEIRA, J.F. C. de. **Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas**. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.
- OLIVEIRA, M. M. M. DE et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 549–553, abr. 2010.
- PAIVA, P. M. G, et al. Effects of Plant Lectins and Trypsin Inhibitors on Development, Morphology and Biochemistry of Insect Larvae. In: Kia Pourali; **Vafa Niroomand Raad. Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle**. v. 5, p. 37-55, 2012.

PAIVA, P.M.G, et al. **Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants**. In: MÉNDEZ-VILLAS, A. (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Editora: Formatex Research Center, Badajoz. 2010.

PEREIRA, E. P. L.; CUNHA, M. DE L. R. DE S. D. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina em alunos de enfermagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, p. 361–369, out. 2009

PINTO, M. F. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, .21, n 1, p. 8, 2015.

POMPEU, D. G. et al. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium* Quinoa seeds. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 696–703, 24 nov. 2015.

PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. Antibacterials: synthesis, properties and biological activities. Nova Science Publishers Inc., New York, p. 69-89, 2017.

PROCÓPIO, T. F. et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 14 maio 2015

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Typing and virulence factors of food-borne *Candida* spp. isolates. **International journal of food microbiology**, v. 279, p. 57-63, 2018.

RAMOS, D. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 148–157, abr. 2019

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infection of the skin and soft tissue. **Intern Med J**, v. 35, p. 97S-105S, 2005

ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 522–554, 31 dez. 2018.

SAISING, J.; ONGSAKUL, M.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 1793–1800, 1 dez. 2011.

SANTOS, A. J. C. A. dos. **Avaliação da atividade imunomoduladora da lectina de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi e do efeito da formação de vasos do saco vitelínico e morfologia de embriões de *Coturnix japonica***. 2018. 99 f. Tese (Doutorado em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SANTOS, A. L. S. DOS et al. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 9, 26 jul. 2018.

SANTOS, A.F.S et al. Strategies to obtain lectins from distinct sources. In *Advances in Medicine and Biology* ed. Berhardt, L.V. 1st edn, New York: **Nova Science Publishers, Inc.**, vol. 63, p. 33–60, 2013.

SILVA, M.D.C. **Aplicações biotecnológicas das lectinas ClaveLL (*Cladonia verticillaris* Lichen Lectin) e BmoLL (*Bauhinia monandra* Leaf Letin)**. 2008. 211fls. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, J. D. F. et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 291–297, abr. 2019a

SILVA, P. M. et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, mar. 2018.

SILVA, P. M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 931–939, ago. 2019b.

SILVA, P. M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695–702, dez. 2016.

SINGH, R. et al. Two chitotriose-specific lectins show anti angiogenesis, induces caspase-9-mediated apoptosis and early arrest of pancreatic tumor cell cycle. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1–18, 2016.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 28 abr. 2017.

SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 30, n. 7, p. 641–657, out. 2013.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–899, ago. 2007.

SUN, F. et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 877–886, jul. 2013.

TORTORA G.J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Tradução: Silva AM, Quinan BR, Rosa CA... [et al.]. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.

TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66257, 11 jun. 2013.

TRENTIN, D. S., et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n 1, p. 327-335, 2011.

VANDAMME, E. J. M. et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, nov. 1998.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538–1550, set. 2011.

VASCONCELOS, M. A. de. **Atividade de lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico**. 2013. 265 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

YILMAZ, E. Ş.; ASLANTAŞ, Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1059–1064, nov. 2017.

YUAN, H. et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 29 abr. 2016.

ZHANG, S. et al. Baicalin suppress growth and virulence-related factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and vivo. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103899, fev. 2020.