



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MAYRON ALVES DE VASCONCELOS

ATIVIDADE DE LECTINAS E METABÓLITOS BIOATIVOS DE PLANTAS
SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS DE INTERESSE CLÍNICO

FORTALEZA

2013

MAYRON ALVES DE VASCONCELOS

ATIVIDADE DE LECTINAS E METABÓLITOS BIOATIVOS DE PLANTAS
SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS DE INTERESSE CLÍNICO

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa
Cavada.

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Holanda
Teixeira

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- V451a Vasconcelos, Mayron Alves de.
Atividade de lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico / Mayron Alves de Vasconcelos. – 2013.
265 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese(doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Orientação: Prof. Ph. D. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
1. Biofilme. 2. Lectinas. 3. Biomoléculas. I. Título.

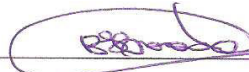
MAYRON ALVES DE VASCONCELOS

ATIVIDADE DE LECTINAS E METABÓLITOS BIOATIVOS DE PLANTAS
SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS DE INTERESSE CLÍNICO

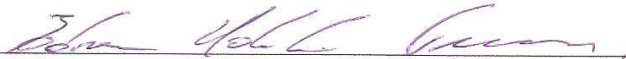
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Bioquímica.

Aprovado em: 05/11/2013

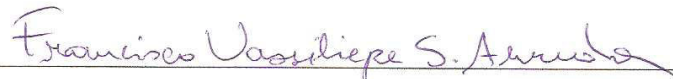
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



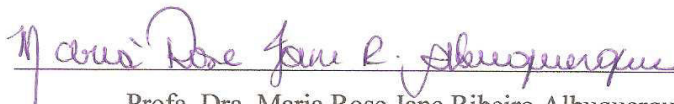
Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Jorge Luiz Martins
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)



Prof. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A Deus, por sempre estar comigo e
conduzir meu caminho todas as horas.
Aos meus amados pais Maria Artemiza e
Cristovão Markam.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter concedido o dom da vida e por todas as obras realizadas na minha vida;

Aos meus pais, Maria Artemiza Alves de Vasconcelos e Cristovão Markam Oliveira de Vasconcelos, por seus valorosos ensinamentos, por minha formação como pessoa, sem eles nada seria possível; e a minha irmã Samara por tornar a vida familiar sempre agradável;

A minha namorada Marília Maciel, pessoa que conheci do outro lado do oceano e por quem guardo muito amor e carinho, gostaria de agradecer-lá pela companhia, paciência, ajuda incondicional em qualquer ocasião e pelo simples fato de está presente em minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, por me receber e me fazer integrante do BioMol-Lab, por ter acreditado no meu potencial e no meu trabalho e, principalmente, pelos ensinamentos fundamentais para o meu trabalho e para minha vida pessoal;

Ao meu co-orientador, e grande amigo, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira por me conduzir à pesquisa desde a graduação, por confiar e acreditar no meu trabalho e no meu potencial, e por ser um exemplo a ser seguido;

As professoras Maria Olivia Pereira e Mariana Henriques do grupo de Biofilmes da Universidade do Minho, onde realizei grande parte dos trabalhos apresentados aqui, pessoas inigualáveis a quem devo muito do que aprendi na área dos biofilmes microbianos;

Ao amigo grande amigo Vassiliepi Arruda, pelo companheismo e amizade dedicada a mim; pelos dias, noites e madrugadas em que estivemos estudando, escrevendo artigos e projetos;

Aos grandes amigos que fiz no BioMol-Lab, Rafael, Rômulo, Claudener, Ito, Bruno, Raquel, Júnior, Eduardo, Alysson, Sâmia, Camila e a todos os colegas que compõe o BioMol-Lab que contribuíram durante esta caminhada e a quem aprendi a ter um grande carinho;

Aos alunos de Iniciação Científica, Ana Cecília e Artur Hermano, que sempre deram suporte de maneira irrestrita aos meus trabalhos no BioMol-Lab;

A todos os amigos e colegas que compõem o Laboratório Integrado de Biomoléculas – LIBS;

A todos os grandes e verdadeiros amigos brasileiros que fiz durante meu doutorado sanduíche em Portugal: Marília, Magno, Virgínia, Mônica, Matheus, Francisco, Manuel, Mariângela, Douglas, Alessandra, Iris e Marina. Além dos meus amigos Ricardo (*el cabrón*) e Piku.

Aos amigos e colegas portugueses que fiz no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, pela companhia, jantares, finos, conferências, grandes torneios de voleibol, enfim, por tornarem Portugal um segundo lar para mim;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro durante o meu período de doutoramento;

Por fim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

*Só é útil o conhecimento que nos torna
melhores.*

Sócrates

RESUMO

Biofilmes são comunidades microbianas que encontram-se irreversivelmente associadas a uma superfície e estão inseridas em uma matriz polimérica produzida por elas mesmas. Os biofilmes estão comumente relacionados a infecções nosocomiais que apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos quando comparadas com células planctônicas, dificultando assim seus tratamentos e limitando as opções terapêuticas. Nesse sentido a busca por novas moléculas com ação antimicrobiana e antibiofilme tornou-se uma área ativa na pesquisa científica. Os vegetais são fontes de uma variedade de moléculas com propriedades antimicrobianas, dentre estas podemos citar as lectinas e os metabólitos secundários. Diversos estudos têm relatado a ação antimicrobiana e antibiofilme dessas classes de moléculas como forma alternativa ao uso de antibióticos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme de diversas lectinas isoladas de leguminosas e algas, bem como de dois metabólitos secundários isolados de plantas, derriobtusona A (isolado de *Lonchocarpus obtusus*) e diterpeno casbano (isolado de *Croton nepetaefolius*). Os resultados demonstraram que algumas das lectinas testadas foram capazes de inibir o crescimento planctônico e/ou a formação de biofilme de determinados micro-organismos. A lectina isolada de *Vaitarea macrocarpa* (VML) mostrou ser a lectina mais promissora, mostrando forte ação sobre o crescimento planctônico e formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Derriobtusona A mostrou uma potencial ação antibacteriana e antibiofilme sobre *S. aureus*, enquanto que, *Escherichia coli* apresentou menor sensibilidade ao composto. Em adição, derriobtusona A demonstrou uma potencial ação antioxidante. Em relação ao diterpeno casbano, em geral o composto foi capaz de inibir o crescimento planctônico, formação de biofilmes e causar danos nos biofilmes pré-formados de *S.aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*, e mostrou ainda ser efetivo contra biofilmes formados pela associação entre estas bactérias e leveduras. Em conclusão, os resultados mostraram que algumas lectinas, assim como os metabólitos secundários utilizados nesse estudo, podem ser consideradas potenciais agentes antimicrobianos e antibiofilmes, sugerindo assim o uso dessas moléculas no tratamento de infecções associadas a diferentes micro-organismos.

Palavras-chave: Biofilmes, infecções, lectinas, diterpeno casbano, derriobtusona A

ABSTRACT

Biofilms are microbial communities that are irreversibly attached to a surface and are embedded in a polymeric matrix produced by them. Biofilms are commonly related to nosocomial infections that showing an enhanced resistance to antimicrobial agents compared to planktonic cells, thus hindering their treatments and limiting therapeutic options. In this context, the search for new molecules with antimicrobial and antibiofilm action has become an active area of research. The plants are sources of a variety of molecules with antimicrobial properties, among them we can mention the lectins and secondary metabolites. Several studies have reported the antimicrobial and antibiofilm action of these molecules classes as an alternative to antibiotics. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm of various lectins isolated from leguminous and algae, as well as two secondary metabolites isolated from plants , derriotusone A (isolated from *Lonchocarpus obtusus*) and casbane diterpene (isolated from *Croton nepetaefolius*). The results showed that some lectins tested were able to inhibit the planktonic growth and/or the biofilm formation of certain microorganisms. The lectin isolated from *Vaitarea macrocarpa* (VML) showed to be the most promising lectin, showing strong action on the planktonic growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The derriobtusone A showed potential antibacterial and antibiofilm activite on *S. aureus*, whereas *Escherichia coli* showed lower sensitivity to the compound. In addition, derriotusone showed a potential antioxidant activity. Regarding to casbane diterpene, in general the compound was able to inhibit planktonic growth, formation of biofilms and disrupt the preformed biofilms of the *S.aures*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*, and also showed to be effective against biofilms formed by the association between these bacteria and yeasts. In conclusion, the results showed that some lectins, as the secondary metabolites used in this study, may be considered as potential antimicrobial and antibiofilm agents, thus suggesting the use of these molecules in the treatment of infections associated with different microorganisms.

Keywords: Biofilms, infections, lectins, casbane diterpene, derriobtusone A

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da estrutura e composição da matriz extracelular do biofilme	25
Figura 2 – Formação de canais de água em biofilmes formados por <i>Bacillus subtilis</i>	26
Figura 3 – Mecanismo de adesão bacteriana a superfícies abióticas	27
Figura 4 – Mecanismo de adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Figura 5 – Estágios da formação dos biofilmes microbianos	32
Figura 6 – Estrutura química do farnesol (A) e tirosol (B) produzido por <i>C. albicans</i>	
Figura 7 – Esquema representando a penetração restrita de drogas em biofilmes	34
Figura 8 – Esquema demonstrando a atividade metabólica das células em biofilmes	35
Figura 9 – Esquema demonstrando três possíveis locais de formação de biofilmes causadores de infecções: cateteres, implantes médicos e doença periodontal	37
Figura 10 – Classificação estrutural de lectinas de plantas	44
Figura 11 – Estrutura química do ácido chiquímico	55
Figura 12 – Estrutura química básica dos flavonoides	57
Figura 13 – Estrutura química do isopreno	58
Figura 14 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre formação de biomassa em biofilmes de bactérias Gram-positivas	105
Figura 15 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre formação de biomassa em biofilmes de bactérias Gram-negativas	106
Figura 16 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre formação de biomassa em biofilmes de leveduras	107
Figura 17 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre o número células viáveis dos biofilmes de bactérias Gram-positivas	108
Figura 18 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre o número células viáveis dos biofilmes de bactérias Gram-negativas	109
Figura 19 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre o número células viáveis dos biofilmes de leveduras	110
Figura 20 – Estrutura química de derriobtusona A isolado das raízes de <i>Lonchocarpus obtusus</i>	123
Figura 21 – Efeito de derriobtusona A sobre o crescimento planctônico de (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	129
Figura 22 – Efeito de derriobtusona A sob a formação de biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> . (a) Biomassa dos biofilmes (b) número de células viáveis em $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$	130

Figura 23 – Atividade antioxidante de derriobtusona A por diferentes métodos. (a) Sequestro do radical DPPH (%); (b) Capacidade quelante de íons ferrosos (%); (c) Capacidade de redução dos íons ferro; (d) Inibição de oxidação do β -caroteno (%)	132
Figura 24 – Estrutura química do diterpeno casbano isolado da casca do tronco de <i>Croton nepetaefolius</i>	144
Figura 25 – Formação de biofilme monoespécie na presença de diterpeno casbano. (A) Quantificação da biomassa dos biofilmes e (B) número de células viáveis presentes nos biofilmes	151
Figura 26 – Formação de biofilmes mistos da associação entre <i>S. aureus</i> e duas espécies de <i>Candida</i> na presença de diterpeno casbano. (A) e (C) Quantificação da biomassa dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes	153
Figura 27 – Formação de biofilmes mistos da associação entre <i>P. aeruginosa</i> e duas espécies de <i>Candida</i> na presença de diterpeno casbano (A) e (C) Biomassas dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes	154
Figura 28 – Ação do diterpeno casbano sobre os biofilmes pré-formados monoespécie. (A) Quantificação da biomassa dos biofilmes e (B) número de células viáveis presentes nos biofilmes	155
Figura 29 – Ação de diterpeno casbano sobre os biofilmes pré-formados da associação entre <i>S. aureus</i> e duas espécies de <i>Candida</i> . (A) e (C) Quantificação da biomassa dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes	157
Figura 30 – Ação de diterpeno casbano sobre os biofilmes pré-formados da associação entre <i>P. aeruginosa</i> e duas espécies de <i>Candida</i> . (A) e (C) Quantificação da biomassa dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes	159
Figura 31 – Imagens obtidas através de MEV da formação de biofilmes mistos formados na presença e ausência de diterpeno casbano (250 μ g/mL)	160
Figura 32 – Imagens obtidas através de MEV dos biofilmes pré-formados mistos tratados ou não tratados com diterpeno casbano (250 μ g/mL)	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades biológicas relacionadas à lectinas de vegetais	48
Tabela 2 – Atividades biológicas de lectinas de algas marinhas	52
Tabela 3 – Lectinas de plantas com atividade antimicrobiana	60
Tabela 4 – Metabólitos secundários de plantas com atividade antimicrobiana	62
Tabela 5 – Inibição do crescimento planctônico de bactérias e leveduras por lectinas isoladas de leguminosas e algas	101
Tabela 6 – Concentração inibitória mínima (CIM) de diterpeno casbano contra micro-organismos monoespécie e associações entre bactérias e leveduras	145

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO	18
CAPÍTULO II	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 BIOFILMES MICROBIANOS	21
2.1.1 Considerações históricas	21
2.1.2 Conceito e aspectos gerais	22
2.1.3 Processo de adesão dos micro-organismos	25
2.1.4 Formação e desenvolvimento dos biofilmes	27
2.1.5 Comunicação celular (<i>Quorum sensing</i>) e biofilmes	30
2.1.6 Mecanismos de resistência dos biofilmes	31
2.1.6.1 <i>Penetração restrita de agentes antimicrobianos</i>	32
2.1.6.2 <i>Diminuição do crescimento em células presentes nos biofilmes</i>	33
2.1.6.3 <i>Alterações fisiológicas das células em biofilmes</i>	34
2.1.7 Biofilmes relacionados a infecções	35
2.2 PRODUTOS NATURAIS	38
2.3 LECTINAS	40
2.3.1 Considerações iniciais	40
2.3.2 Lectinas vegetais	42
2.3.2.1 <i>Classificação</i>	42
2.3.2.2 <i>Funções das lectinas em plantas</i>	43
2.3.2.3 <i>Lectinas de leguminosas</i>	45
2.3.2.4 <i>Atividades biológicas das lectinas de leguminosas</i>	46
2.3.3 Lectinas de algas marinhas	49
2.3.2.1 <i>Funções das lectinas em algas</i>	50

<i>2.3.2.2 Atividades biológicas das lectinas de algas marinhas</i>	51
2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	53
2.4.1 Flavonoides	54
2.4.2 Terpenos	56
2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LECTINAS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	59
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO III	94
3.1 INTRODUÇÃO	95
3.2 OBJETIVOS	96
3.2.1 Objetivo geral	96
3.2.2 Objetivos específicos	96
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	97
3.3.1 Micro-organismos	97
3.3.3 Condições de cultivo	97
3.3.4 Atividade das lectinas sobre o crescimento planctônico dos micro-organismos	98
3.3.5 Ação das lectinas sob a formação dos biofilmes	98
3.3.6 Análise estatística	99
3.4 RESULTADOS	99
3.4.1 Efeito das lectinas sobre o crescimento planctônico	99
3.4.2 Efeito das lectinas sob a biomassa dos biofilmes e no número de UFC's	101
3.5 DISCUSSÃO	109
3.6 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS	113
CAPÍTULO IV	118
4.1 INTRODUÇÃO	119
4.2 OBJETIVOS	121
4.2.1 Objetivo geral	121
4.2.2 Objetivos específicos	121
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	122
4.3.1 Material vegetal	122
4.3.2 Isolamento da derriobtusona A	122

4.3.3 Micro-organismos	122
4.3.4 Condições de cultivo	122
4.3.5 Concentração inibitória mínima (CIM)	122
4.3.6 Ensaio de inibição da formação de biofilme	123
4.3.6.1 <i>Quantificação da biomassa</i>	123
4.2.3.2 <i>Enumeração do número de células viáveis</i>	123
4.3.7 Atividade antioxidante	124
4.3.7.1 <i>Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</i>	124
4.3.7.2 <i>Atividade quelante de íons ferrosos (FIC)</i>	124
4.3.7.3 <i>Método de redução do ferro (FRAP)</i>	125
4.3.7.4 <i>Método de inibição da oxidação do β-caroteno (BCB)</i>	125
4.3.8 Ensaio de toxicidade com <i>Artemia</i> sp.	125
4.3.9 Análise estatística	126
4.4 RESULTADOS	126
4.4.1 Efeito de derriobtusona A sobre o crescimento planctônico	126
4.4.2 Efeito de derriobtusona A sobre a formação de biofilmes	127
4.4.3 Atividade antioxidante de derriobtusona A	128
4.4.4 Toxicidade de derriobtusona A sobre náuplios de <i>Artemia</i> sp.	129
4.5 DISCUSSÃO	130
4.6 CONCLUSÕES	134
REFERÊNCIAS	135
CAPÍTULO V	140
5.1 INTRODUÇÃO	141
5.2 OBJETIVOS	143
5.2.1 Objetivo geral	143
5.2.2 Objetivos específicos	143
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	144
5.3.2 Isolamento do diterpeno casbano	144
5.3.3 Micro-organismos	144
5.3.4 Condições de Cultivo	144

5.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	145
5.3.6 Efeito do diterpeno sob a formação de biofilmes e biofilme pré-formado	145
5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes mistos	147
5.3.8 Análise estatística	147
5.4 RESULTADOS	147
5.4.1 Concentração inibitória mínima	147
5.4.2 Efeito de DC sobre a formação de biofilmes monoespécies	148
5.4.3 Efeito do diterpeno sobre a formação de biofilmes mistos	149
5.4.4 Efeito do diterpeno sobre biofilmes pré-formados monoespécie	152
5.4.5 Efeito do diterpeno em biofilmes pré-formados mistos	154
5.4.6 Análise dos biofilmes mistos através de Microscopia Eletrônica de Varredura	156
5.5 DISCUSSÃO	160
5.6 CONCLUSÕES	163
REFERÊNCIAS	164
ANEXOS	168

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fármacos antimicrobianos constitui um dos mais notáveis avanços da medicina moderna, promovendo hoje o tratamento e cura de doenças que no passado eram consideradas letais. Os antimicrobianos são um grupo de medicamentos utilizados no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias ou fungos, cujo uso adequado têm sido uma das principais preocupações mundiais. Essa preocupação é atribuída ao aparecimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos encontrados atualmente no mercado, como a meticilina, oxacilina e penicilina, dentre outros. Conseqüentemente, a busca por plantas medicinais com atividade antimicrobiana tem sido um dos principais objetivos da indústria farmacêutica (GOMES *et al.*, 2012a).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as infecções causadas por micro-organismos resistentes são consideradas um grande problema de saúde pública e frequentemente os pacientes não respondem bem ao tratamento convencional, resultando no prolongamento da doença e, conseqüentemente, aumentando o risco de morte do paciente. Além disso, os custos associados ao tratamento aumentam substancialmente quando micro-organismos multirresistentes são os causadores da infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). O problema da resistência aos antimicrobianos torna-se mais preocupante nos países em desenvolvimento, onde o número de doenças infecciosas é maior e os recursos orçamentários destinados ao tratamento são restritos. Desta forma, a aplicação de novos agentes antimicrobianos torna-se difícil por ser mais onerosa.

Segundo Okeke e colaboradores (2005) os organismos multirresistentes são encontrados principalmente em hospitais, devido à utilização de medicamentos desnecessários ou inapropriados. No entanto, micro-organismos, que antes eram sensíveis aos antimicrobianos comuns, e que se restringiam a causar infecções dentro do ambiente hospitalar, mas recentemente estão se espalhando para comunidade e causando doenças severas na população anteriormente saudável (RODRIGUES; BERTOLDI, 2010).

Infecções nosocomiais continuam aterrorizando os ambientes hospitalares em todo o mundo, dificultando a execução do papel primordial dos hospitais, o de prevenir mortes. Nos últimos 25 anos, a transmissão nosocomial de organismos multirresistentes tem sido igualmente relatada nos países em desenvolvimento (OKEKE *et al.*, 2005). A infecção por patógenos nosocomiais resistentes dificulta o prognóstico

do paciente, aumentando os custos de manutenção, principalmente, através do prolongamento de sua estadia no ambiente hospitalar (VALAPERTA *et al.*, 2010).

Uma das formas de resistência microbiana dar-se através da formação de biofilmes, através da interação entre os micro-organismos e o substrato no qual se adere. Biofilmes são consórcios microbianos estruturados que produzem polímeros extracelulares e possuem propriedade de se aderir a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Os micro-organismos que compõem esse sistema são estrutural e fisiologicamente diferentes das formas planctônicas, por apresentar um padrão de expressão gênica distinta e maior resistência aos antimicrobianos (XU; MCFETERS; STEWART, 2000). Segundo dados do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) estima-se que mais de 65% das infecções bacterianas em humanos envolvam biofilmes (POTERA, 1999). Dentre as patologias relacionadas com a presença de biofilmes podemos destacar: endocardites bacterianas, otite média, prostatite crônica bacteriana, fibrose cística, periodontite e cárie (DONLAN; COSTERTON, 2002).

No século passado, os produtos naturais atuaram como fontes de diversidade química, sendo utilizados como matérias-primas na descoberta de novos fármacos. (MISHRA; TIWARI, 2011). A utilização de lectinas, como ferramentas biotecnológicas, tem sido amplamente difundida. Muitos trabalhos têm descrito a relevância das atividades biológicas para essas proteínas (SMART, 2004; SAYYAH *et al.*, 2004; CAVADA *et al.*, 2001). Dentre as várias atividades biológicas das lectinas já relatadas, algumas demonstram ser antibacterianas (HOLANDA *et al.*, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2011) enquanto outras, demonstram claramente a possibilidade de interferência no processo de formação de biofilmes (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Os metabólitos secundários, extraídos de plantas, também são considerados potenciais agentes antimicrobianos, destacando os diterpenos, flavonoides e alcaloides (SAVOIA, 2012; RADULOVIC *et al.*, 2013). As propriedades antimicrobianas dos metabólitos secundários de plantas contra fungos e bactérias são conhecidas desde a década de 70 (CHAURASIA; VYAS, 1977), e até hoje continuam alvo de pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos contra biofilmes microbianos e bactérias resistentes a antibióticos (McNEIL *et al.*, 2010; SMYRNIOTOPOULOS *et al.*, 2010).

Capítulo II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOFILMES MICROBIANOS

2.1.1 Considerações históricas

Inicialmente, as observações de biofilmes foram realizadas por Antoine van Leuwenhoek (1674) que, ao estudar amostras de dentes ao microscópio, visualizou um maior número de células agregadas do que planctônicas. Contudo, desde Robert Koch que se estudava a capacidade das bactérias de viver preferencialmente em agregados e de formar comunidades complexas. Quase 100 anos depois (1943), surgiu a primeira publicação que descrevia comunidades microbianas por Claude Zobell, que determinou a existência de adesão de bactérias marinhas em cascos de navios e em diferentes tipos de superfícies, como o vidro, metal e plásticos que estavam submersas (COSTERTON *et al.*, 1999; COSTERTON; WILSON, 2004). Entre as décadas de 40 e 70, microbiologistas no Centro Odontológico de Forsyth, Ron Gibbons e van Houte, examinaram os biofilmes microbianos que constituem a placa dentária e formam acréscimos macroscópicos sobre a superfície dos dentes. Em 1964, os pesquisadores Ralph Mitchell e Kevin Marshall examinaram as primeiras etapas de formação dos biofilmes em culturas puras de bactérias, onde distinguiram entre a interação inicial reversível e uma posterior interação irreversível das bactérias sobre uma superfície (COSTERTON *et al.*, 1999).

Apesar dos estudos documentados sobre biofilmes terem começado na década de 40, a análise físico-química dos biofilmes microbianos teve início no final da década de 1960 e início de 1970, quando alguns pesquisadores reconheceram a prevalência de biofilmes (JONES *et al.*, 1969; CHARACKLIS, 1973; COSTERTON; GEESSEY; CHENG, 1978). Jones e colaboradores (1969) usaram microscopia eletrônica de transmissão e de varredura para analisar biofilmes em filtros biológicos em uma estação de tratamento de águas residuais. A partir deste trabalho verificou-se que os biofilmes eram formados por uma variedade de micro-organismos e que a matriz extracelular era composta principalmente por polissacarídeos. A investigação de biofilmes, em torno deste tempo, foi facilitada pela utilização da microscopia eletrônica, que fornecia informação, não só sobre a estrutura dos biofilmes, mas também da presença da matriz extracelular.

Costerton, Geesey e Cheng em 1978, também utilizando técnicas de microscopia mais sofisticadas, verificaram que a maioria dos micro-organismos encontravam-se fixos em suportes, e pela primeira vez foi utilizado o termo biofilmes,

para caracterizar tais organismos. Neste trabalho os pesquisadores levantaram hipóteses sobre os mecanismos pelos quais as bactérias aderiam a superfícies vivas ou não vivas e os benefícios gerados por este nicho ecológico (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; PERCIVAL; KNOTTENBELT; COCHRANE, 2011). A partir de então, a “teoria dos biofilmes” postulada por Costerton abriu duas novas linhas de pesquisas na área da microbiologia, a primeira diz respeito ao estudo bioquímico e genético da formação e função dos biofilmes, e uma segunda linha de pesquisa que consiste na busca de novos métodos de diagnóstico e tratamento de infecções causadas por essas comunidades microbianas (EHRlich; ARCIOLA, 2012).

A ideia de que micro-organismos vivem preferencialmente como comunidades embebidas em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície tem emergido gradualmente através de observações científicas durante um longo período, porém apenas nas últimas décadas esse conceito para a vida microbiana emergiu abruptamente (COSTERTON; WILSON, 2004; WOLCOTT *et al.*, 2013).

Parsek e Greenberg (2005) introduziram um novo termo na área da microbiologia, a “sociomicrobiologia”, onde se estuda o comportamento social dos micro-organismos que compõem os biofilmes, focando principalmente nos mecanismos de comunicação celular e sua importância para o desenvolvimento e manutenção dos biofilmes.

2.1.2 Conceito e aspectos gerais

Desde a descoberta de que micro-organismos eram capazes de viver em associações, formando comunidades (biofilmes), muitos pesquisadores conceituaram essa nova forma de vida microbiana. Segundo McFeters (1984) um biofilme pode caracterizar-se como um conjunto de micro-organismos e outros materiais extracelulares associados a um substrato. Em 1989, Characklis e Wilderer definiram biofilme como um conjunto de células imóveis em um substrato, podendo estar embutidas numa matriz orgânica produzida pelos micro-organismos. Atualmente, os biofilmes microbianos são conceituados como comunidades microbianas complexas, estabelecidas em uma ampla variedade de superfícies que estão associadas a uma matriz extracelular composta por vários tipos de biopolímeros derivados do metabolismo bacteriano (ABEE *et al.*, 2011). Vale ressaltar, entretanto, que os biofilmes não são apenas um grupo de micro-organismos embebidos em uma matriz polimérica, mas sim complexas estruturas (WATNICK; KOLTER, 2000; POST *et al.*, 2007)

As células que encontram-se aderidas formando o biofilme são designadas de sésseis, enquanto as livres e dispersas na fase aquosa são denominadas de planctônicas. A transição dos micro-organismos da sua forma planctônica para biofilme ocorre em resposta a diversas alterações ambientais, e envolve múltiplas vias reguladoras, as quais traduzem os sinais em alterações da expressão de genes, levando a uma reorganização espacial e temporal das células microbianas (PARSEK; SINGH 2003; LENZ *et al.*, 2008; MONDS; O'TOOLE, 2009). Esta “reprogramação celular” altera a expressão, por exemplo, de moléculas de superfície, utilização de nutrientes e fatores de virulência, além de equipar os micro-organismos com um arsenal de propriedades que permitem a sua sobrevivência mesmo em condições desfavoráveis (LENZ *et al.*, 2008; ZHANG; MAH, 2008). Assim, os biofilmes correspondem a uma comunidade dinâmica, dependendo dos micro-organismos que o compõem, com distintas características físicas, químicas e biológicas, fazendo com que cada biofilme seja único, de acordo com os micro-organismos presentes (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

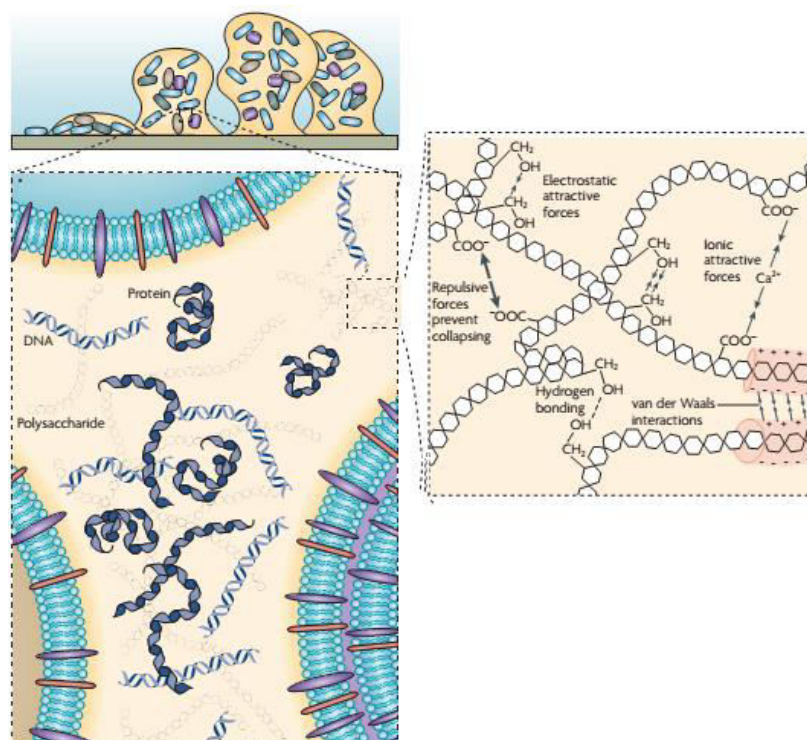
Biofilmes geralmente são compostos por diferentes espécies microbianas, que funcionam como consórcio funcional de células e estabelecem uma associação mutualista (RICKARD *et al.*, 2006). Pode ser formado por uma ou por mais de uma espécie em sua comunidade microbiana, sendo denominado de monoespécie e multiespécie, respectivamente (BUTANY *et al.*, 2002; RICKARD *et al.*, 2006).

Uma característica importante dos biofilmes é que os micro-organismos que vivem nessa associação são envolvidos por uma matriz polimérica extracelular, formada principalmente por polissacarídeos, mas também em sua constituição são encontradas proteínas, DNA extracelular, lipídeos e água (Figura 1) (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Essa matriz que reveste as células microbianas pode ser responsável por até 90% da massa do biofilme (FLEMMING; WINGENDER; MAYER, 2000; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Segundo Flemming e Wingender (2010) a matriz extracelular desempenha importantes funções para o biofilme microbiano, por exemplo, servindo como uma barreira protetora, adesão e agregação de células microbianas, retenção de água no interior do biofilme, adsorção de nutrientes e íons inorgânicos, facilita a transferência de genes entre os micro-organismos que compõem o biofilme, além de manter a atividade de enzimas capazes de degradar compostos a serem utilizados como nutrientes ou ainda compostos tóxicos que destroem a integridade celular.

Como dito anteriormente, a matriz é formada principalmente por polissacarídeos. Alguns desses polissacarídeos têm como características serem neutros

ou ainda polianiônicos, como é o caso dos polissacarídeos presentes na matriz extracelular de bactérias Gram-negativas, devido à presença de ácidos urônicos, D-glucurônico, D-galacturônico, dentre outros (SUTHERLAND, 2001). Algumas bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus*, podem ter a composição química dos polissacarídeos da matriz bastante distinta, mas geralmente apresentam características catiônicas (MAYER *et al.*, 1999). Entretanto, é importante destacar que a quantidade e a composição da matriz extracelular pode variar dependendo das espécies que compõem o biofilme, a idade do biofilme e das diferentes condições ambientais em que os biofilmes são formados, incluindo diferentes níveis de oxigênio e nitrogênio, variações de pH e temperatura e disponibilidade de nutrientes (MAYER *et al.*, 1999; AHIMOU *et al.*, 2007).

Figura 1 – Esquema da estrutura e composição da matriz extracelular do biofilme (adaptado de FLEMMING; WINGENDER, 2010).

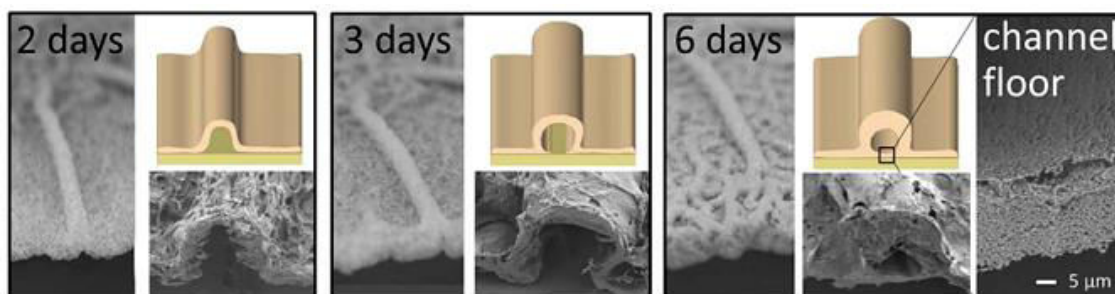


Em culturas de células livres (plancônicas), o transporte de moléculas se dá através de meio líquido para as células, ou vice-versa, é um processo relativamente rápido e não constitui um passo limitante dos bioprocessos celulares. Entretanto, o crescimento dos biofilmes e a manutenção fisiológica dos micro-organismos que

compõem essa associação são dependentes do transporte de nutrientes, resíduos e moléculas de sinalização, as quais geralmente são dissolvidas em água (STEWART, 2003, 2012; HOURY *et al.*, 2012).

Os biofilmes possuem áreas intersticiais com a presença de vários canais que podem ser comparados a um sistema circulatório primitivo, denominados de canais de água (Figura 2) (STEWART, 2012; HOURY *et al.*, 2012; WILKING *et al.*, 2013). Nos canais de água, os nutrientes são transportados a partir de regiões de alta concentração de moléculas para regiões de baixa concentração. Assim, a difusão é o principal mecanismo de transporte molecular dentro dos biofilmes, um processo lento, que é agravado devido a limitações difusionais ocasionadas pela matriz do biofilme (STEWART, 2003; WILKING *et al.*, 2013). Devido à limitação no transporte de solutos, os gradientes de concentração formados dentro dos biofilmes constituem condições favoráveis para a formação de micronichos (MAH; O'TOOLE, 2001).

Figura 2 – Formação de canais de água em biofilmes formados por *Bacillus subtilis* (WILKING *et al.*, 2013)



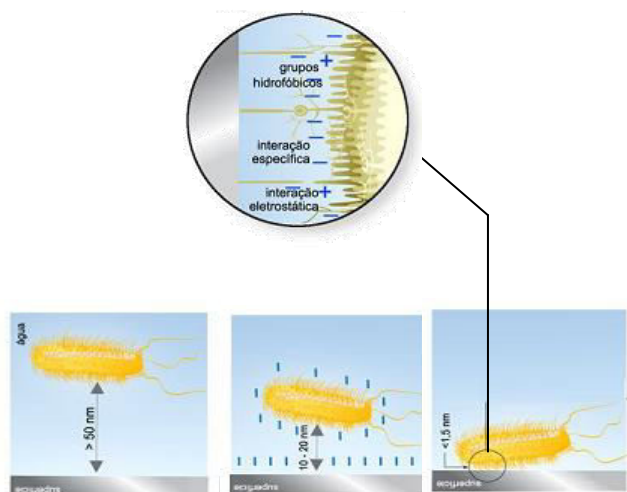
2.1.3 Processo de adesão dos micro-organismos

A interação de micro-organismos com superfícies bióticas ou abióticas é um passo crucial para a colonização e estabelecimento de biofilmes (AKIYAMA *et al.*, 2000). Os micro-organismos capazes de aderir a uma superfície podem formar biofilmes e conseqüentemente causar infecções, sendo o processo de adesão um dos principais fatores de virulência (CERCA *et al.*, 2005).

Segundo Dunne (2002) o processo de adesão é essencial para a formação do biofilme e pode ser dividido em dois estágios, adesão primária e secundária. A adesão primária entre micro-organismos e superfícies abióticas, geralmente, é mediada por

interações inespecíficas, e entre micro-organismo e superfícies bióticas é mediada através de mecanismos moleculares específicos, normalmente mediados por adesinas. A interação entre micro-organismos e superfícies abióticas depende inicialmente da proximidade que o organismo atinge da superfície (geralmente uma proximidade <1 nm). Em um segundo estágio, a adesão depende da soma das forças atrativas e repulsivas existentes entre o micro-organismo e a superfície, tais como interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, impedimento estérico, forças de Van der Waals, forças hidrodinâmicas, entre outras (DUNNE, 2002). Interações eletrostáticas são geralmente as forças repulsivas, uma vez que a maioria dos micro-organismos e as superfícies inertes são carregadas negativamente (Figura 3). Interações hidrofóbicas são frequentemente as mais fortes interações de todas as forças não covalentes, desempenhando um papel importante na adesão e, conseqüentemente, em infecções microbianas (DUNNE, 2002; CERCA *et al.*, 2005; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Figura 3 – Mecanismo de adesão bacteriana a superfícies abióticas (Adaptado de Notermans *et al.*, 1991).

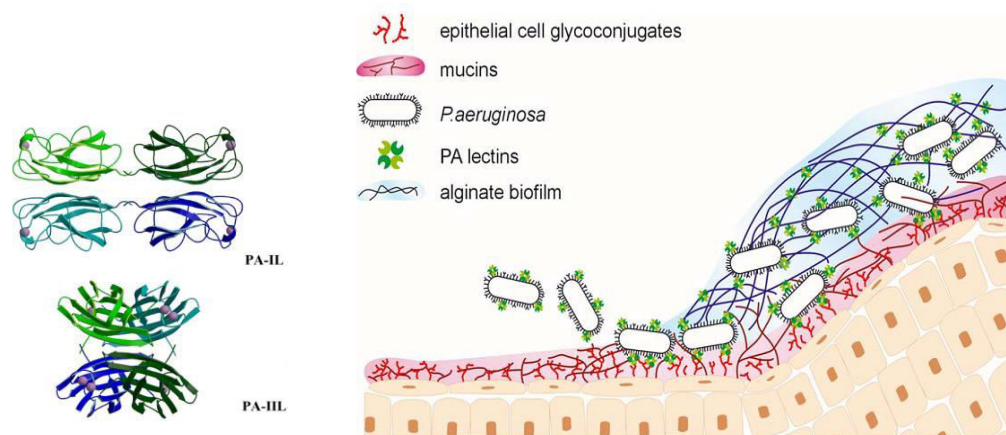


Por outro lado, a adesão de micro-organismos e superfícies bióticas ocorre através de interações moleculares específicas, mediadas por adesinas presentes em apêndices filamentosos extracelulares, como o pili ou fímbrias (CERCA *et al.*, 2005; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). As adesinas existentes na pili das bactérias tornam mais eficiente a adesão dos micro-organismos com as células hospedeiras, assim, células com estes apêndices filamentosos podem aderir fortemente a outras células,

sendo capazes de superar possíveis barreiras de repulsão iniciais (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Um exemplo clássico são duas lectinas presentes em *Pseudomonas aeruginosa*, PA-IL (galactose específica) e PA-IIL (fucose específica) que medeiam a adesão da bactéria às células hospedeiras (IMBERTY *et al.*, 2004) (Figura 4).

Além de adesinas presentes na pili ou fímbrias das células bacterianas, outros componentes celulares podem facilitar a adesão e fixação das células na superfície a ser colonizada (GIBIANSKY *et al.*, 2010; PIDHATIKA *et al.*, 2010). Outro componente que parece desempenhar um importante papel na adesão microbiana são os flagelos, principalmente nos estágios iniciais da fixação das bactérias, superando forças repulsivas associadas à superfície (GIBIANSKY *et al.*, 2010; KOUIDHI *et al.*, 2010). Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas podem conferir propriedades hidrofóbicas, facilitando sua interação com um maior número de materiais hidrofóbicos (LAU *et al.*, 2009). Após o processo de adesão ser consolidado os micro-organismos produzem substâncias poliméricas extracelulares que tornam a adesão irreversível (DONLAN, 2001, 2002).

Figura 4 – Mecanismo de adesão de *Pseudomonas aeruginosa* (IMBERTY *et al.*, 2004).



2.1.4 Formação e desenvolvimento dos biofilmes

A teoria de formação dos biofilmes tem evoluído ao longo de vários anos de pesquisa. Uma das primeiras teorias foi descrita em 1971 por Marshall, Stout e Mitchell, sugerindo que o processo de adesão ocorreria em duas etapas distintas. Na primeira fase, o processo é ainda reversível e a adesão de micro-organismos às superfícies ocorre devido às forças de Van der Waals e à atração eletrostática. Na

segunda etapa do processo ocorre uma interação da célula com a superfície por meio de material extracelular produzido pela bactéria.

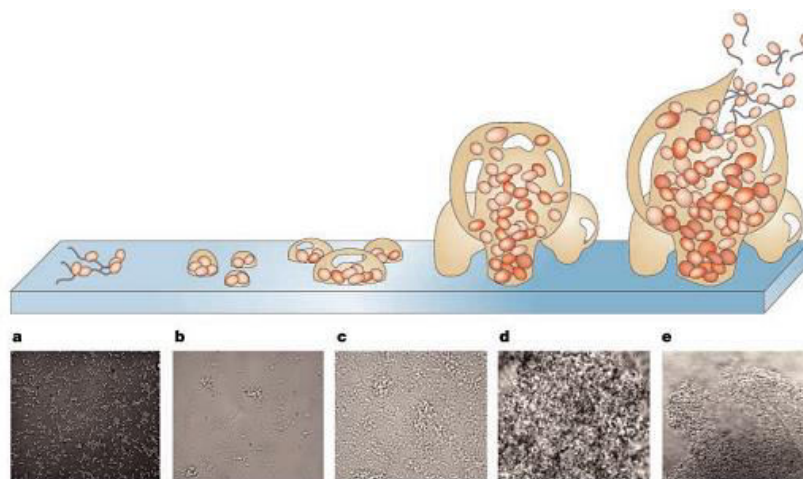
Alguns anos depois, surgiu outra teoria sugerindo que a comunidade de células aderidas encontrava-se envolvida em uma matriz, que revelou ser constituída de polissacarídeos e que funcionava como mediadora da adesão das células às diferentes superfícies (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978). Em meados dos anos 80 a teoria de formação de biofilmes foi significativamente alterada e foi sugerido um processo que ocorreria em 5 fases: (I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico, (II) transporte de células e nutrientes para o local de adesão, (III) início do processo de adesão bacteriana, ainda reversível, devido à atração eletrostática, (IV) crescimento celular, colonização e adesão irreversível e (V) desenvolvimento do biofilme, apresentando uma elevada atividade metabólica (CHARACKLIS; COOKSEY, 1983; DUDDRIDGE; PRITCHARD, 1983).

Em 1991, Notermans e colaboradores propuseram a teoria pela qual a formação de biofilmes seria conseguida em três etapas: (I) fixação da bactéria, (II) consolidação da bactéria na superfície e (III) colonização e crescimento da bactéria. Na segunda etapa desta teoria ocorre a produção de material extracelular que facilita a fixação dos micro-organismos e impossibilita a remoção das bactérias aderidas.

A Figura 5 demonstra as etapas de desenvolvimento dos biofilmes microbianos segundo Davies (2003). De acordo com este autor a formação de um biofilme ocorre por uma série de passos bem definidos que incluem: (I) translocação para a superfície e adesão inicial das células, (II) adesão irreversível a superfície, (III) formação de microcolônias, (IV) maturação e diferenciação do biofilme e (V) dispersão das células ou microcolônias a partir do biofilme maduro. Após a fase de adesão inicial dos micro-organismos, estes estarão ligados à superfície de maneira irreversível e produzindo substância polimérica extracelular. A adesão irreversível é acompanhada pela intensa divisão e proliferação celular, formando as microcolônias (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). Esta etapa é crucial para o desenvolvimento do biofilme, sendo o alicerce sobre o qual o biofilme maduro será estabelecido (DUNNE, 2002). A quarta etapa da formação dos biofilmes é o processo de maturação, onde após a formação das microcolônias a densidade celular e complexidade dos biofilmes aumentam exponencialmente (AN; DONG; ZHANG, 2009). Nessa etapa os micro-organismos que compõem a superfície dos biofilmes se replicam ativamente e componentes extracelulares são gerados por meio da interação entre as células presentes

nos biofilmes ou ainda através da troca de sinais moleculares entre estas (DUNNE, 2002).

Figura 5 – Estágios da formação dos biofilmes microbianos (DAVIES, 2003).



Dependendo das condições ambientais, os biofilmes maduros podem assumir estruturas planas ou formas que lembram a cogumelos, como ocorre com os biofilmes formados por *P. aeruginosa* (MONDS; O'TOOLE, 2009). Biofilmes com estrutura plana são formados devido à motilidade dos micro-organismos, que se espalham sobre a superfície formando um “tapete” de células distribuídas sobre a superfície. Por outro lado, a migração de subpopulações de micro-organismos móveis para subpopulações não móveis presentes na superfície contribuem para a formação de uma estrutura em forma de cogumelo (AN; DONG; ZHANG, 2009). O formato das estruturas dos biofilmes, seja ele plano ou em forma de cogumelo, também depende da disponibilidade de nutrientes, da perfusão dos nutrientes para as células no interior dos biofilmes, da remoção dos resíduos do interior dos biofilmes, o pH interno, a perfusão de oxigênio, da osmolaridade e das fontes de carbono utilizados pelos micro-organismos que o compõem (DUNNE, 2002; MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). Estudos com a estirpe PAO1 de *P. aeruginosa* revelaram que, quando a glicose é utilizada como uma fonte de carbono os biofilmes formados por esta bactéria assumem uma estrutura em forma de cogumelo, mas quando utilizam como fontes de carbono moléculas com características ácidas, como o citrato, os biofilmes formados assumem uma forma plana (KLAUSEN *et al.*, 2003).

A última fase do desenvolvimento de um biofilme microbiano é a dispersão, que ocorre quando um biofilme atinge o seu clímax, alcançando um equilíbrio dinâmico, causando o desprendimento de subpopulações de células que estão presentes nas camadas mais exteriores dos biofilmes. Estas células quando desprendidas voltam a viver de maneira planctônica e podem colonizar outras superfícies formando assim novos biofilmes (DUNNE, 2002; AN; DONG; ZHANG, 2009).

2.1.5 Comunicação celular (*Quorum sensing*) e biofilmes

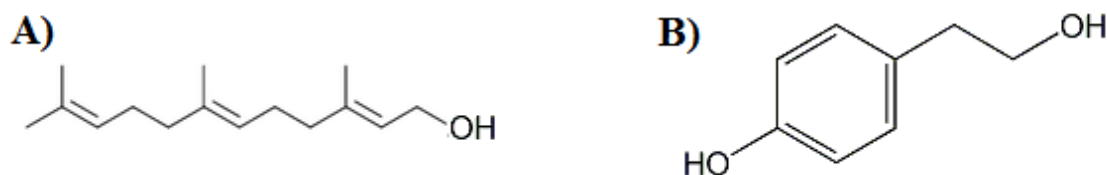
Anteriormente, os micro-organismos eram estudados como populações de células que agiam de maneira independente, entretanto atualmente sabe-se que existem diversas comunicações intra e intercelulares entre estas populações, conhecidas como *quorum sensing* (KELLER; SURETTE, 2006). Sendo assim, o *quorum sensing* é um sistema de comunicação entre célula-célula de micro-organismos, sendo diretamente dependente da densidade celular. Os micro-organismos, nesse sistema, sintetizam moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular, conhecidos como autoindutores, que são excretados no ambiente. Os autoindutores em concentrações elevadas tendem a ser detectados por moléculas receptoras presentes na superfície, ou no interior das células, desencadeando a ativação ou repressão de genes específicos (RUMJANEK *et al.*, 2004; PAIVA, 2011).

Os autoindutores envolvidos no mecanismo *quorum sensing* em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem ser agrupadas em quatro categorias: os autoindutores-1 (AI-1) que são moléculas derivadas de ácidos graxos, utilizadas por bactérias Gram-negativas nas comunicações intraespécies. Neste grupo, as moléculas utilizadas possuem estrutura conhecida como N-acil-L-homoserinas-lactonas (AHLs), onde a cadeia N-acil varia de acordo com a espécie (MILLER; BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al.*, 2001); o segundo grupo utiliza a molécula de furanosil borato diéster (autoindutor-2 (AI-2) para a comunicação intra e interespecies. Estas moléculas sinalizadoras são produzidas por um grande número de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e parecem ser uma linguagem universal de comunicação entre bactérias (SCHAUDER; BASSLER, 2001; CHEN *et al.*, 2002); o terceiro grupo, autoindutor-3 (AI-3), possui estrutura desconhecida até o momento, mas sua ação já foi descrita na comunicação interespecies em algumas estirpes de *Escherichia coli* (SPERANDIO *et al.*, 2003; PAIVA, 2011); e o quarto grupo é utilizado apenas por bactérias Gram-positivas na comunicação intraespécies e as moléculas utilizadas são uma série de

aminoácidos ou oligopeptídeos (MILLER; BASSLER, 2001; FEDERLE; BASSLER, 2003).

Em fungos, o mecanismo de *quorum sensing*, em sua maioria, está relacionado com a transição morfológica desses organismos. Para *Candida albicans* foram descritas duas moléculas sinalizadoras, o farnesol e o tirosol (HORNBY *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2004) (Figura 6). Ambas as moléculas afetam a morfologia, o crescimento e a formação de biofilme em *C. albicans*, sendo o farnesol a molécula mais bem estudada. (HORNBY *et al.*, 2001; RAMAGE *et al.*, 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado que o farnesol produzido por *C. albicans*, em determinadas concentrações, inibi a formação de hifas além de regular negativamente a formação de biofilmes (RAMAGE *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2008).

Figura 6 – Estrutura química do farnesol (A) e tirosol (B) produzido por *C. albicans* (SHCHEPIN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004).



O *quorum sensing* também desempenha um importante papel no desenvolvimento e manutenção dos biofilmes, influenciando na adesão celular, maturação e ainda no desprendimento de células presentes nos biofilmes (DONLAN, 2002; KOKARE *et al.*, 2009; DICKSCHAT, 2010). Segundo Davies e colaboradores (1998) o *quorum sensing* atua na regulação da arquitetura do biofilme de *P. aeruginosa*. De acordo com esses autores, mutações no gene de síntese de AHLs de *P. aeruginosa* afeta significativamente o desenvolvimento do biofilme, fazendo com que os biofilmes formados por esta bactéria se apresentem mais finos e planos, e com pouca aderência à superfície em relação à estirpe selvagem.

2.1.6 Mecanismos de resistência dos biofilmes

Vários estudos demonstram que as células microbianas em biofilme podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que os micro-organismos em

sua forma planctônica (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). Entretanto, os mecanismos responsáveis pela resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos não estão totalmente compreendidos (DOUGLAS, 2003).

Segundo alguns estudiosos na área de biofilmes microbianos, a estrutura do biofilme e as características fisiológicas das células conferem a essa comunidade maior resistência a biocidas, dificultando a sua erradicação (DONLAN; COSTERTON, 2002; DAVIES, 2003). Certos mecanismos tais como: a penetração limitada dos agentes antimicrobianos na estrutura do biofilme; as diferentes taxas de crescimento dos organismos e alterações fisiológicas inerentes ao modo de crescimento do biofilme têm sido descritos como fatores que podem ser responsáveis pela resistência dos biofilmes aos biocidas (DAVIES, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003; DONLAN; COSTERTON, 2002).

2.1.6.1 Penetração restrita de agentes antimicrobianos

Nos biofilmes os micro-organismos estão situados dentro de uma matriz extracelular, formada principalmente por polissacarídeos. Essa característica dos biofilmes parece ser de grande importância para a resistência das células que residem nesse nicho devido à incapacidade dos agentes antimicrobianos de penetrarem em todas as áreas dos biofilmes (Figura 7) (DAVIES, 2003).

Campanac e colaboradores (2002) deram suporte à ideia de que a matriz extracelular formava uma barreira protetora contra a ação dos antibióticos, mostrando que a susceptibilidade de *S. aureus* a antibióticos é aumentada quando as bactérias estão incorporadas em uma matriz extracelular com características hidrofóbicas. No entanto, quando a matriz foi removida as células residentes tiveram a sua susceptibilidade retomada em aproximadamente 90% (CAMPANAC *et al.*, 2002).

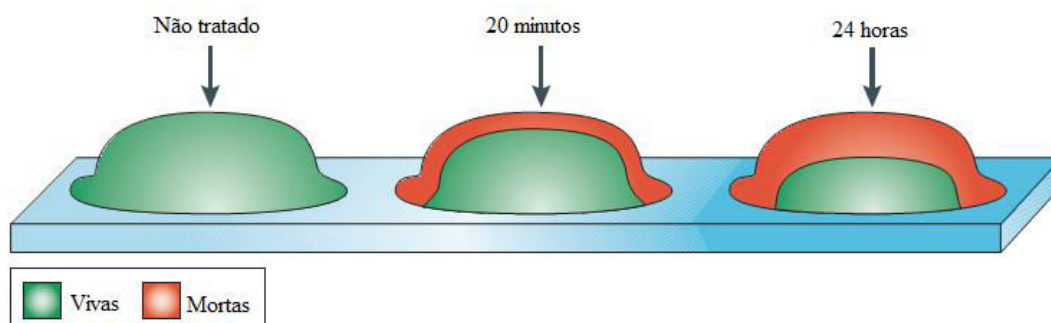
Nesse contexto, Hatch e Schiller (1998) demonstraram que uma suspensão de 2% de alginato, isolado a partir de biofilmes formados por *P. aeruginosa*, inibiu com sucesso a difusão de gentamicina e tobramicina, e a barreira de difusão formada pelo alginato foi revertida pelo uso da enzima alginato liase. Entretanto, nem todas as drogas foram afetadas da mesma forma, os glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina tiveram sua ação significativamente afetada, entretanto rifampicina, clindamicina e alguns macrolídeos tiveram suas ações minimamente afetadas ou não foram afetadas pela presença do alginato (HATCH; SCHILLER, 1998).

Singh e colaboradores (2010) mostraram que a penetração de drogas como oxacillina, cefotaxima (β -lactâmicos) e vancomicina (um glicopeptídeo) foi

significativamente reduzida em biofilmes formados por *S. aureus* e *S. epidermidis*, enquanto que amicacina (um aminoglicosídeo) e ciprofloxacina (uma fluoroquinolona) não tiveram suas ações afetadas. Os resultados encontrados por estes autores sugerem que a formação de biofilme é um importante mecanismo na redução da penetração de agentes antimicrobianos, contudo esta resistência pode variar dependendo da droga administrada (SINGH *et al.*, 2010).

Desta maneira fica claro que em muitos casos a ação de agentes antimicrobianos é diminuída devido a uma menor taxa de penetração e uma difusão mais lenta destas drogas no interior dos biofilmes. Assim, maiores concentrações de drogas ou ainda a utilização de outros agentes antimicrobianos são necessários para erradicar as células presentes nos biofilmes (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006; AN; DONG; ZHANG, 2009).

Figura 7 – Esquema representando a penetração restrita de drogas em biofilmes (Adaptado de DAVIES, 2003).



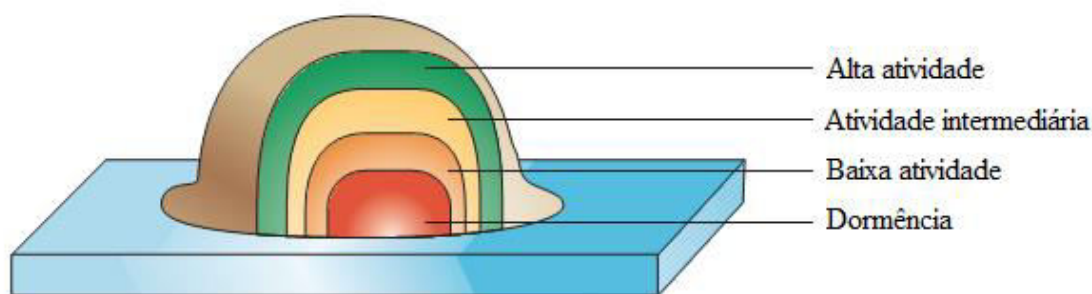
2.1.6.2 Diminuição do crescimento em células presentes nos biofilmes

Muitos pesquisadores acreditam que os micro-organismos em biofilmes têm sua taxa de crescimento reduzida, e que este é um dos fatores que contribuem para uma maior resistência destas células contra o tratamento com agentes antimicrobianos (DUNNE, 2002; DAVIES, 2003; DOUGLAS, 2003; AN; DONG; ZHANG, 2009). As células microbianas presentes em biofilmes crescem lentamente, principalmente na base do biofilme, isso ocorre devido à limitação da disponibilidade de nutrientes e as condições anaeróbicas nas partes mais profundas dos biofilmes (DUNNE, 2002; DOUGLAS, 2003; AN; DONG; ZHANG, 2009). A Figura 8 demonstra um esquema da atividade metabólica das células em biofilmes.

As limitações de oxigênio retarda o crescimento microbiano uma vez que restringe a atividade metabólica das células. Um crescimento mais lento é frequentemente acompanhado por modificações na composição da superfície das células, que por sua vez pode afetar a sensibilidade das células aos agentes antimicrobianos (DUNNE, 2002; DOUGLAS, 2003; AN; DONG; ZHANG, 2009). De Beer e colaboradores (1994) mediram as concentrações de oxigênio em várias profundidades dos biofilmes e demonstraram que os níveis desse gás diminuía em 30 vezes no centro dos biofilmes quando comparado com a superfície. Este trabalho sugeriu ainda que outros nutrientes, tais como o carbono orgânico, irá igualmente ter sua concentração diminuída no centro dos biofilmes.

A redução da atividade metabólica pode contribuir para uma maior resistência dos biofilmes ao tratamento com antibióticos que são ativos contra micro-organismos na sua forma planctônica. No entanto, biofilmes tratados com antibióticos podem apresentar mortalidade nas células que residem na sua superfície, enquanto os organismos presentes no seu interior tornam-se resistentes à ação do antimicrobiano, podendo formar uma nova geração de células resistentes (HUANG *et al.*, 1995; DAVIES, 2003).

Figura 8 – Esquema demonstrando a atividade metabólica das células em biofilmes (Adaptado de DAVIES, 2003).



2.1.6.3 Alterações fisiológicas das células em biofilmes

Diversos autores sugerem que micro-organismos associados em forma de biofilmes expressam um fenótipo diferenciado quando comparados com sua forma planctônica (DAVIES, 2003; MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006; AN; DONG; ZHANG, 2009). Alguns destes identificaram genes que podem ser reprimidos ou ativados após a passagem da forma planctônica para biofilmes e entre

esses genes alguns estavam diretamente relacionados à resistência antimicrobiana (BROOUN; LIU; LEWIS, 2000; MAIRA-LITRÁN; ALLISON; GILBERT, 2000).

Segundo Marsh (2005) no momento em que micro-organismos se aderem a uma superfície inicia-se a expressão de genes “biofilme-específicos”, culminando em alterações fisiológicas nas células. Por exemplo, em *P. aeruginosa* os genes responsáveis pela síntese de alginato são ativados 15 minutos após o contato da célula com a superfície (DAVIES; GEESEY, 1995). Sauer e colaboradores (2002) demonstraram ainda que células de *P. aeruginosa* em biofilmes maduros apresentaram perfis de expressão gênica diferenciada. Os autores identificaram aproximadamente 800 proteínas, destas, 300 foram expressas em biofilmes maduros, mas não nas células planctônicas. As proteínas diferencialmente expressas estavam envolvidas no metabolismo bacteriano, na secreção e transporte e em mecanismos de adaptação e proteção (SAUER *et al.*, 2002).

Brooun, Liu e Lewis (2000) observaram que a maioria das células de *P. aeruginosa*, em biofilmes, foram destruídas quando expostas a baixa concentração de ciprofloxacina. No entanto, uma subpopulação de células presentes no biofilme sobreviveu mesmo depois de um tratamento adicional com o mesmo antibiótico em concentrações mais elevadas. Estas células foram chamadas de "células persistentes" e acredita-se que as alterações fisiológicas adaptativas nestas células foram responsáveis pela capacidade de sobrevivência no biofilme (BROOUN; LIU; LEWIS, 2000). Ramage e colaboradores (2002) demonstraram ainda que genes que codificam dois tipos de bomba de efluxo em *C. albicans* são regulados durante a formação e desenvolvimento do seu biofilme, fazendo com que esta levedura seja mais resistente quanto à ação do fluconazol em comparação com células planctônicas.

2.1.7 Biofilmes relacionados a infecções

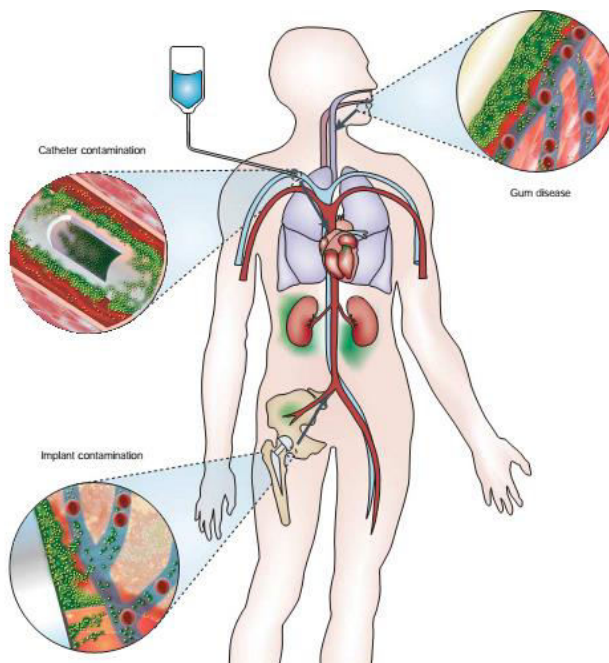
Aos biofilmes estão associados um grande número de problemas de saúde, tais como as endocardites microbianas, otite média, prostatite crônica bacteriana, fibrose cística, periodontite entre outros (DONLAN; COSTERTON, 2002). As infecções de implantes artificiais permanentes ou temporários representam um segundo grupo de infecções onde o papel dos biofilmes microbianos na infecção é notório (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Os biofilmes presentes em dispositivos médicos são geralmente uma fonte de infecções crônicas e recorrentes, que são notoriamente mais difíceis de erradicar

(Figura 9) (DOUGLAS, 2003; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Dependendo do dispositivo e seu tempo de permanência no paciente, os biofilmes podem ser formados por uma única ou ainda por várias espécies de micro-organismos (DONLAN, 2001; KOKARE *et al.*, 2009). Estes biofilmes em dispositivos médicos podem ser colonizados tanto por leveduras como por bactérias, ou ainda pela associação entre elas (DONLAN, 2001). Assim, devido à dificuldade no tratamento de infecções associadas aos biofilmes, estes representam altas taxas de mortalidade (GUALTIERI *et al.*, 2006; QUAVE *et al.*, 2008).

São inúmeras as infecções crônicas humanas que envolvem biofilmes. Segundo Mah e O’toole (2001) estima-se que os biofilmes estejam associados a 65% das infecções nosocomiais e crônicas, e que o tratamento destas infecções ultrapasse o custo anual de um bilhão de dólares. The National Institutes of Health (NIH) sugere que 80% das doenças infecciosas sejam causadas por biofilmes (WIDGEROW, 2008). De acordo com Wolcott e colaboradores (2010), o número de infecções por biofilmes nos Estados Unidos da América (EUA) é semelhante à taxa de mortalidade pelo câncer, onde, por ano, cerca de 14 milhões de infecções são causadas por biofilmes, resultando em mais de 350.000 mortes.

Figura 9 – Esquema demonstrando três possíveis locais de formação de biofilmes causadores de infecções: cateteres, implantes médicos e doença periodontal (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).



A formação de biofilmes por micro-organismos patogênicos, tais como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, acarreta graves implicações clínicas, uma vez que os micro-organismos organizados em biofilmes apresentam, de um modo geral, maior resistência aos antibióticos e proteção contra o sistema de defesa do hospedeiro.

Algumas espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, estão frequentemente associadas a infecções hospitalares e especialmente em pacientes imunocomprometidos (CHAFFIN *et al.*, 1998). *Candida albicans* é a principal levedura patogênica encontrada em seres humanos, sendo responsável por infecções nos tecidos, mucosas profundas, pele, cavidade oral, trato gastrointestinal, sistema vascular dos seres humanos e associada a infecções vaginais (CALDERONE; FONZI, 2001; SOBEL, 2006). *Candida tropicalis* também está associada a infecções, sendo a principal causa de infecções no trato urinário e corrente sanguínea, especialmente em pacientes hospitalizados (NEGRI *et al.*, 2010). É considerada uma espécie altamente virulenta e uma importante causa de infecções em pacientes com câncer, especialmente leucemia (PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006; SOBEL 2006; NEGRI *et al.*, 2010). Alguns estudos consideravam *Candida glabrata* como uma espécie saprófita, presente na flora normal de pessoas saudáveis, não apresentando patogenicidade e não sendo associada a sérias infecções como é o caso de *C. albicans* e *C. tropicalis*. No entanto, segundo Da Silva e colaboradores (2011) esta espécie pode ser a causa de infecções que se disseminam rapidamente por todo o corpo dos pacientes acometidos por esta espécie. As infecções causadas por esta levedura estão associadas a uma alta taxa de mortalidade (DA SILVA *et al.*, 2011).

Com relação às bactérias, *E. coli* normalmente coloniza o trato gastrointestinal dos seres humanos, compondo a microbiota normal do local, estabelecendo uma relação mutuamente benéfica com o hospedeiro, no entanto, existem algumas estirpes virulentas e capazes de causar doenças graves (NASCIMENTO; STAMFORD, 2000). Segundo Johnson (1991) algumas estirpes de *E. coli* estão diretamente envolvidas em infecções do trato gastrintestinal e urinário de humanos. Outras bactérias clinicamente importantes são as pertencentes ao gênero *Klebsiella*. Infecções por *Klebsiella* são, essencialmente, associadas a unidades de terapia intensiva (UTIs). *Klebsiella oxytoca* é considerada um patógeno oportunista, sendo a causa frequente de doenças graves, tais como infecções do trato urinário e pneumonias. (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; SARDAN *et al.*, 2004).

Pseudomonas aeruginosa destaca-se por ser um micro-organismo altamente adaptável, o qual pode crescer em uma ampla gama de substratos, além de alterar suas propriedades em resposta a mudanças no ambiente onde encontra-se inserida (LAMBERT, 2002). Dados do Sistema de Vigilância de Infecções Nosocomiais mostram que, de 1992 a 1997, *P. aeruginosa* foi responsável por 21% das pneumonias, 10% das infecções do trato gênito-urinário, 3% das infecções generalizadas e 13% das infecções nos olhos, ouvidos, nariz e garganta de pacientes internados em UTIs nos EUA (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Essa bactéria encontra-se envolvida no desenvolvimento de biofilme em infecções crônicas nos pulmões de pacientes que sofrem de fibrose cística (BJARNSHOLT *et al.*, 2009). Devido à associação desta bactéria na forma de biofilme, a fibrose cística se torna uma infecção crônica, sem cura e eventualmente resulta na morte dos pacientes (KOCH; HOIBY, 1993).

Staphylococcus aureus é o principal agente etiológico de numerosas infecções da pele e tecidos moles, também sendo considerado como um dos principais patógenos causador de infecções nosocomiais, que normalmente estão associadas à alta taxa de mortalidade (SAGINUR; SUTH, 2008). É uma espécie resistente a meticilina (MRSA), que apresenta uma ameaça significativa para a saúde pública (AKIYAMA *et al.*, 2000; GADEPALLI *et al.*, 2009). *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria comensal da pele e um agente patogênico oportunista, sendo frequentemente isolada a partir de dispositivos médicos infectados por micro-organismos, tais como cateteres (GOTZ, 2002; MACKINTOSH *et al.*, 2006). A disseminação dessa bactéria a partir de biofilmes formados em cateteres apresenta a fonte mais comum de infecções graves, como sepses (ROGERS; FEY; RUPP, 2009). Especialmente em neonatos, infecções generalizadas causadas por *S. epidermidis* são uma causa comum de morte hospitalar, principalmente em crianças de baixo peso (STOLL *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2011).

2.2 PRODUTOS NATURAIS

Ao longo dos tempos os seres humanos têm contado com a natureza para satisfazer suas necessidades básicas, como alimentação e vestimenta, bem como a utilização de substâncias como fontes de medicamentos para o tratamento de uma grande quantidade de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2013). A utilização de produtos naturais teve início há milhares de anos por várias populações com o intuito de tratar diversas patologias. As civilizações mesopotâmicas, egípcia, greco-romana e chinesa são exemplos na utilização de recursos naturais na medicina e no controle de pragas

(HUANG, 1999; KAPOOR, 1990; BORCHARDT, 2002; CRAGG; NEWMAN, 2013). As plantas medicinais eram utilizadas, inicialmente, de forma empírica e suas potencialidades transmitidas oralmente de geração a geração (ALONSO, 1998).

No Brasil, a cultura indígena foi a responsável pela disseminação da medicina natural e até hoje, tanto em regiões mais carentes quanto nos grandes centros urbanos, remédios à base de plantas medicinais são utilizados (MACIEL *et al.*, 2002). Vários são os exemplos relacionados ao papel dos produtos naturais de plantas na descoberta de fármacos, no entanto, uma das mais importantes descobertas foi obtida a partir das cascas da planta *Salix alba* em 1757, pelo reverendo Edward Stone, que observou as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato do vegetal (VIEGAS JR *et al.*, 2006). Outro marco ocorreu entre 1967 e 1971, quando um novo agente antineoplásico, denominado de taxol, foi identificado e isolado das cascas de *Taxus brevifolia*. No entanto, devido à complexidade de sua estrutura e à relativa escassez da fonte natural, o taxol teve sua viabilidade questionada. Sendo assim, novas fontes naturais, como alternativas para o taxol foram surgindo. Em 1981, outros taxanos, como a bacatina III e a 10-desacetil-bacatina III, foram encontrados em outras espécies de *Taxus*, em concentrações superiores àquela do taxol (VIEGAS Jr. *et al.*, 2006; CRAGG; NEWMAN, 2013). Em relação aos produtos naturais com ação antimicrobiana, o grande marco ocorreu com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928 (PROJAN; SHLAES 2004). Entretanto, os primeiros estudos científicos que relatam a ação antimicrobiana a partir de produtos provenientes de plantas datam de 1880, quando óleos extraídos da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) foram utilizados contra esporos do bacilo Antrax (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Os vegetais são responsáveis pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura (VIEGAS Jr. *et al.*, 2006). Segundo Carvalho e colaboradores (2007) aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem como uma importante fonte para obtenção de medicamentos. A maior biodiversidade genética vegetal do mundo encontra-se no Brasil, com mais de 56.000 espécies catalogadas, quase 19% da flora mundial (GIULIETTI *et al.*, 2005). Estimasse que existam entre 350.000 a 550.000 espécies de plantas (SIMÕES, 2003), sendo assim uma grande variedade de substâncias ainda não foram descobertas dessas fontes naturais.

As plantas produzem uma grande variedade de biomoléculas e compostos químicos, como lectinas e metabólitos secundários, que exibem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas: ação anticarcinogênica, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, hipolipidêmica e antimicrobiana (AHERNE; O'BRIEN, 1999; DJURIC *et al.*, 2001; BELTRÃO *et al.*, 2003; JOHANN *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2010; OOI *et al.*, 2010; CAVALCANTE *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2013).

Em relação à utilização de produtos provenientes de vegetais na clínica microbiológica, Sher (2009) destaca duas razões principais para os microbiologistas se interessarem por este tema. A primeira deve-se o fato de que a vida útil de qualquer agente antimicrobiano é limitada, uma vez que os micro-organismos encontram rapidamente mecanismos de resistência contra agentes antimicrobianos, assim novas fontes, especialmente vegetais devem ser investigadas. A segunda razão é o fato de que a população está se tornando cada vez mais conscientes dos problemas causados pelo uso irracional e irrestrito de antibióticos tradicionais. Além disso, um grande número de produtos derivados de plantas está prontamente disponível em farmácias e lojas de alimentos fazendo com que a automedicação com estas substâncias seja uma prática relativamente comum.

Desta maneira fica claro que existe um grande apelo não somente da comunidade científica, mas da sociedade como um todo para a descoberta de novas moléculas com potencial antimicrobiano que possuam um maior espectro de atuação. Nesse contexto, lectinas e metabólitos secundários isolados de plantas têm se destacado, uma vez que várias dessas moléculas vêm apresentando potencialidades no controle de micro-organismos patogênicos (PAIVA *et al.*, 2010).

2.3 LECTINAS

2.3.1 Considerações iniciais

As lectinas representam uma classe de proteínas com habilidade de reconhecer carboidratos sem apresentar atividade catalítica (SHARON; LIS, 2004). Essa classe de proteínas foi descrita pela primeira vez em 1853 quando Charcot e Robin observaram estruturas cristalinas sobre tecidos patológicos (KILPATRICK, 2002). Estas estruturas posteriormente ficaram conhecidas como cristais de Charcot-Leyden e atualmente, sabe-se que estes cristais são a forma pura de uma única proteína, uma lectina ligante a galactose conhecida como galectina-10 (ACKERMAN *et al.*, 1993).

No entanto, a primeira atividade lectínica (atividade hemaglutinante) apenas foi observada em 1860, quando Silas Weir Mitchell descobriu que o veneno da serpente *Crotalus durissus* era capaz de aglutinar eritrócitos de pombo (MITCHELL, 1860). Após 18 anos (1888), em sua tese de doutorado na Universidade de Dorpat (Estônia), Peter Hermann Stillmark descreveu pela primeira vez a presença de atividade lectínica em vegetais quando obteve uma fração aglutinante e tóxica a partir do extrato da mamona (*Ricinus communis*), denominando essa fração de ricina (STILLMARK, 1888). Embora hoje seja evidente que a “ricina” estudada por Stillmark era na verdade uma complexa mistura de moléculas, seu trabalho foi o pioneiro e um marco na história da biologia por ser o primeiro a demonstrar a toxicidade em sementes de mamona e fatores hemaglutinantes de natureza protéica.

A partir do século XX a presença de lectinas foi relatada em diferentes organismos. No entanto, as lectinas eram vistas apenas como curiosidade científica e não como objeto de estudo relevante. Entretanto, duas constatações mudaram a perspectiva em torno do estudo de lectinas. A primeira foi quando Petter C. Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* apresentava atividade mitogênica sobre linfócitos. Essa descoberta teve um impacto revolucionário sobre a imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de se dividir (SHARON; LIS, 2004). A segunda importante constatação foi descoberta por Joseph Aub que mostrou que a lectina isolada do germe do trigo aglutinava, preferencialmente, células cancerígenas (AUB *et al.*, 1965). Este trabalho foi pioneiro nos estudos relacionados ao câncer, uma vez que seus resultados evidenciavam modificações nos padrões de glicosilação da superfície destas células (glicosilações aberrantes) (SHARON; LIS, 2004).

Devido à habilidade de algumas aglutininas de plantas distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos, Boyd e Shapleigh (1954) propuseram o termo “lectinas” (do latim, *legere* - capaz de escolher, selecionar). Este termo foi generalizado por englobar todas as aglutininas açúcar-específico de origem não imune, independente de sua origem ou especificidade por tipo sanguíneo (SHARON; LIS, 1972).

Em 1936, Summer e Howell observaram que o açúcar da cana inibia a atividade hemaglutinante da concanavalina A (ConA), mas apenas em 1952, Watkins e Morgan demonstraram que a atividade aglutinante das lectinas baseava-se na atividade específica de ligação a açúcar. Desta maneira as lectinas passaram a ser reconhecidas como proteínas de ligação a carboidratos, distinguindo-se de outras proteínas com base

em um critério funcional bem definido (VAN DAMME *et al.*, 1998). Com base nesse critério, Peumans e Van Damme (1995) propuseram a definição mais aceita até hoje. Segundo estes autores lectinas são proteínas, ou glicoproteínas, de origem não-imune com no mínimo um domínio não catalítico que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos de maneira específica.

Tais proteínas são ubiquamente distribuídas na natureza tendo sido isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos (algas, vertebrados, invertebrados e micro-organismos, incluindo fungos e bactérias) e em vírus (LIENER; SHARON; GOLDSTEIN, 1986). Lectinas apresentam grande variedade de formas e tamanhos e desempenham papéis biológicos em muitos processos celulares, tais como: comunicação celular, defesa de hospedeiros, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária e metástase tumoral (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005). As lectinas têm sido estudadas há muito tempo, principalmente pelo potencial de discernir estruturas de carboidratos, os quais traduzem-se como moléculas importantes em todos os mecanismos de relação entre células.

2.3.2 Lectinas vegetais

2.3.2.1 Classificação

A capacidade das lectinas reconhecer carboidratos de maneira específica e reversível distingue essa classe de proteínas de qualquer outra encontrada em plantas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Lectinas vegetais são consideradas um grupo heterogêneo de proteínas por serem diferentes entre si no que diz respeito às propriedades bioquímicas, físico-químicas, relação evolucionária, estrutura molecular, especificidade e atividades biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998). Sendo assim, torna-se laboriosa a tarefa de classificá-las considerando todos os aspectos que as descrevem simultaneamente.

Van Damme e colaboradores (1998) subdividiam as lectinas vegetais em quatro classes de acordo com os tipos estruturais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 10). As merolectinas são lectinas que consistem de apenas um sítio de ligação à carboidrato e, conseqüentemente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Exemplos dessa classe é a lectina heveína, proteína com ligação específica a quitina extraída do látex da seringueira

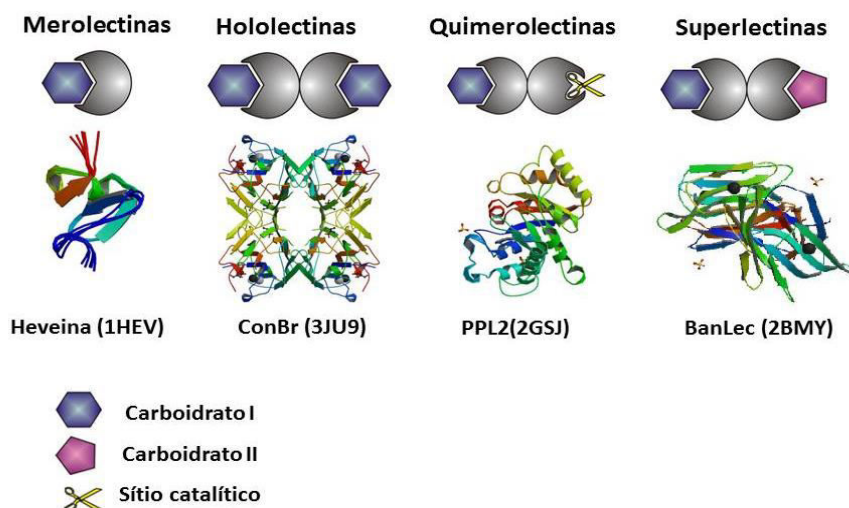
(*Hevea brasiliensis*) e as proteínas monoméricas com especificidade por manose, como as lectinas de espécies de orquídeas (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As hololectinas compreendem lectinas que possuem dois ou mais sítios idênticos ou muito similares de ligação a um mesmo carboidrato, ou a carboidratos estruturalmente similares. Por definição essa classe de lectinas são multivalentes, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. São exemplos clássicos de hololectinas as lectinas encontradas em sementes de plantas pertencentes à subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2001).

As quimerolectinas englobam as lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, e apresentam atividade catalítica associada a outro domínio molecular, portanto, diferente do sítio de ligação à carboidrato. Como representantes dessa classe podem ser citadas as RIP's tipo 2 (proteínas inativadoras de ribossomos) (VAN DAMME *et al.*, 1998) e a lectina quitina-ligante isolada de sementes de *Parkia platycephala* (PPL-2), uma proteína que possui além do sítio ligante a carboidrato, um sítio catalítico com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).

As superlectinas consistem de dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares não relacionados. Podemos citar como exemplo a lectina isolada do bulbo de tulipa (TxLCI) que é formada por dois domínios de ligação à carboidrato, que reconhecem manose e *N*-acetil galactosamina; e a lectina isolada da banana (BanLec), que possui dois sítios distintos de reconhecimento de laminaribiose e Xil- β 1,3-Man- α -O-Metil (MEAGHER *et al.*, 2005).

Figura 10 - Classificação estrutural de lectinas de plantas (Adaptado de VAN DAMME *et al.*, 1998).



2.3.2.2 Funções das lectinas em plantas

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas vegetais, tais como proteção contra patógenos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular, proteínas de reserva, entre outras (PUSZTAI, 1991). No entanto, mesmo lectinas com alta homologia podem apresentar variações em relação à especificidade, localização intracelular e período de síntese, o que torna difícil atribuir a estas proteínas uma função em comum (RUDIGER; GABIUS, 2001).

Nas plantas, a função mais aceita para as lectinas é o papel na defesa contra patógenos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; BLEULER-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Essa ideia é sustentada pelo fato de que muitas lectinas apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, ação contra insetos e nematicida, dentre outras (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2010; BLEULER-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; BRUSTEIN *et al.*, 2012a). Além disso, lectinas caracterizam-se pela resistência a proteólise e a variações de temperatura e pH, o que corrobora com a ideia da sua possível função de defesa (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

As lectinas também são responsáveis por proteger os vegetais contra herbívoros através da capacidade de algumas destas proteínas interagirem com glicanos presentes na superfície celular do trato digestivo dos animais causando efeitos antinutricionais ou ainda tóxico (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Um exemplo desta função das lectinas é apresentado por Oliveira e colaboradores (2004), onde os autores demonstraram que ratos submetidos a uma dieta contendo a lectina de *Cratylia argentea* apresentaram hipertrofia no intestino delgado, rins e pâncreas, além de apresentaram uma redução significativa no crescimento e baixos valores de digestibilidade. Diversos outros estudos demonstram os efeitos tóxicos e/ou antinutricionais causados por lectinas em insetos (MACEDO *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2007; LAGARDA-DIAZ *et al.*, 2009).

Além do papel de defesa das lectinas, alguns autores sugerem a sua participação na simbiose entre planta e bactérias fixadoras de nitrogênio (VAN RHIJN; GOLDBERG; HIRSCH, 1998; ETZLER *et al.*, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2012, VASCONCELOS *et al.*, 2013). Várias plantas, leguminosas em sua maioria, são conhecidas pela sua habilidade em estabelecer simbiose com bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, conhecidas coletivamente como rizóbios, tornando-as independentes da adição de fertilizantes nitrogenados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2000).

Essa relação pode ocorrer mediante interação entre as lectinas presentes no pêlos radiculares das raízes e receptores presentes na superfície bacteriana (VAN EIJSDEN *et al.*, 1995; ANTONYUK; IGNATOV, 2001; SHARON; LIS, 2004; SYTNIKOV, 2013). Além disso, alguns autores sugerem que os receptores dos fatores de nodulação em leguminosas são lectinas, que direcionam as plantas a formarem nódulos radiculares (VAN RHIJN; GOLDBERG; HIRSCH, 1998; ETZLER *et al.*, 1999; GEURTS; BISSELING, 2002).

Segundo Peumans e Van Damme (1995) as lectinas também possuem funções indispensáveis no controle da homeostase vegetal. Nesse contexto, podemos citar o papel das lectinas como reservas de nitrogênio no passo final da germinação das sementes (DA SILVA *et al.*, 2000). Já em 1984, Moreira e Cavada demonstravam que ao longo da germinação de sementes de *C. brasiliensis* as lectinas eram preservadas até a exaustão das suas reservas protéicas, e só então eram hidrolisadas para abastecer a plântula com seus aminoácidos.

2.3.2.2 Lectinas de leguminosas

As lectinas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, abrangendo diversas famílias, como a Euphorbiaceae, Gramineae, Leguminosae, entre outras. As lectinas de Leguminosae correspondem ao grupo de lectinas mais bem estudado até o momento, logo dezenas de lectinas isoladas de membros desse táxon já foram caracterizadas quanto as suas propriedades químicas, físicas, estruturais, bem como quanto as suas propriedades biológicas. Muito do conhecimento adquirido até o presente momento sobre as lectinas de um modo em geral, provêm de estudos realizados com membros dessa família (SHARON; LIS, 1990).

As lectinas, em sua maioria, são prospectadas a partir de sementes (CAVADA *et al.*, 1998; PEREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2012; BARI *et al.*, 2013), embora lectinas também sejam encontradas em outras partes do vegetal, como folhas (RATANAPO *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2010), frutos (SAMPIETRO *et al.*, 2001), raízes (WONG; WONG; NG, 2006; SOUZA *et al.*, 2011) e tubérculos (SUSEELAN *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2006).

Lectinas pertencentes à família Leguminosae, normalmente, apresentam-se como dímeros ou tetrâmeros, compostos por monômeros iguais ou diferentes com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Cada uma destas subunidades apresenta um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Frequentemente,

estas subunidades são compostas por uma única cadeia polipeptídica e sua união é estabelecida por forças não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas formando dímeros canônicos e estabilizando o tetrâmero pela união destes dímeros. Entretanto, existem algumas lectinas que possuem subunidades formadas por duas cadeias polipeptídicas, como as lectinas da tribo Viciae, gêneros *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum* e *Vicia*, que possuem cadeias polipeptídicas leves denominadas de α (5 a 7 kDa) e cadeias pesadas denominadas β (15 a 19 kDa). Essas lectinas são dímeros, formados por duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída de uma cadeia α e uma cadeia β , mantidas por ligações não covalentes (SHARON; LIS, 1989).

Já as lectinas de espécies pertencentes à subtribo Diocleinae são tetrâmeros, compostos por uma mistura de subunidades intactas formadas por uma cadeia polipeptídica com 237 resíduos de aminoácidos e de subunidades fragmentadas. A cadeia polipeptídica (cadeia α) encontra-se dividida em dois fragmentos (cadeias β e γ) devido a não formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CAVADA *et al.*, 2001). Apesar de não estarem unidos covalentemente, os fragmentos são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é a mesma da subunidade formada pela cadeia inteira (cadeia α), sem descontinuidade da estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975; SHARON; LIS, 1989). O sítio de ligação a carboidratos está localizado no lado côncavo do β -sanduíche, próximo ao sítio de ligação a metais. O sítio de reconhecimento a carboidratos consiste de diversos “*loops*” com diferentes graus de variabilidade (SHARMA; SUROLIA, 1997). As conformações destes *loops* são determinadas pela presença de íons metálicos de transição na estrutura, como o cálcio e o manganês (LORIS *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 2000). A ausência desses metais resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).

Além de um sítio de ligação a carboidratos e do sítio de ligação a metais, estudos recentes mostraram a capacidade dessas proteínas em interagir com compostos hidrofóbicos. Algumas lectinas de leguminosas podem interagir com outros tipos de moléculas, que não carboidratos, tais como adenina e ácido aminobutírico (ABU) (HAMELRYCK *et al.*, 1999; DELATORRE *et al.*, 2007). A ligação das lectinas a essas moléculas se dá através de uma região estrutural hidrofóbica, altamente conservada em muitas lectinas de leguminosas e que, devido a esse alto grau de conservação, pode estar envolvida em algum papel biológico importante (DELATORRE *et al.*, 2007).

2.3.2.4 Atividades biológicas das lectinas de leguminosas

Desde que Nowell (1960) demonstrou que a lectina isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris* era capaz de induzir a mitogenicidade de linfócitos humanos, uma nova abordagem científica surgia para a aplicabilidade dessas moléculas em sistemas biológicos. Ao longo dos anos, vários estudos têm demonstrado que lectinas de origem vegetal podem reconhecer glicoconjugados nas superfícies celulares e assim desencadear diversas atividades biológicas.

As possibilidades do uso de lectinas vegetais como ferramentas biotecnológicas são consideradas devido ao grande número de trabalhos científicos exibindo atividades biológicas relevantes para essas moléculas (KITADA; KURODA; DEZAWA, 2011; KIMBLE *et al.*, 2010). Devido à multivalência de reconhecimento a carboidratos, muitas lectinas vegetais fazem ligações cruzadas entre células e seus receptores, desencadeando alguma atividade biológica (DUBOIS *et al.*, 1998). Alguns exemplos de atividades biológicas induzidas pela interação de lectinas vegetais estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Atividades biológicas relacionadas a lectinas de vegetais.

Atividade biológica	Referência
Atividade anti-inflamatória	
<i>Canavalia brasiliensis</i> , <i>Canavalia gladiata</i> e <i>Canavalia marítima</i>	PINTO <i>et al.</i> (2013)
<i>Cymbosema roseum</i>	ROCHA <i>et al.</i> (2011)
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	ALENCAR <i>et al.</i> (2005a)
Atividade antinociceptiva	
<i>C. brasiliensis</i>	PIRES <i>et al.</i> (2013)
Lectinas dos gêneros <i>Canavalia</i> e <i>Dioclea</i>	HOLANDA <i>et al.</i> (2009)
Indução do processo cicatricial	
<i>Bauhinia variegata</i>	NETO <i>et al.</i> (2011)
Atividade neuroprotetora	
<i>C. brasiliensis</i>	JACQUES <i>et al.</i> (2013)
Efeito vasodilatador	
<i>Dioclea lasiocarpa</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> (2012)
<i>Vatairea guianensis</i>	SILVA <i>et al.</i> (2012)
Indução e migração de neutrófilos em ratos	
<i>L. sericeus</i>	NAPIMOGA <i>et al.</i> (2007)
<i>Pisum arvense</i>	ALENCAR <i>et al.</i> (2005b)
Efeito antidepressivo	
<i>C. brasiliensis</i>	BARAUNA <i>et al.</i> (2006)
Reconhecimento de células neoplásicas e ação anti-neoplásica	
<i>Erythrina velutina</i>	CONRADO <i>et al.</i> (2012)
Lectinas dos gêneros <i>Canavalia</i> e <i>Dioclea</i>	PINTO <i>et al.</i> (2010)
<i>Parkia pendula</i>	BELTRÃO <i>et al.</i> (2003)
Antiviral	
<i>Narcissus tazetta</i>	OOI <i>et al.</i> (2010)
<i>P. pendula</i>	FAVACHO; CINTRA; COELHO LINHARES (2007)
Liberação de óxido nítrico	
<i>C. brasiliensis</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> e <i>C. marítima</i>	BEZERRA <i>et al.</i> (2011)
<i>Dioclea virgata</i>	NÓBREGA <i>et al.</i> (2012)
Atividade antibacteriana	
<i>Acacia farnesiana</i>	SANTI-GADELHA <i>et al.</i> (2012)
<i>C. marítima</i>	CAVALCANTE <i>et al.</i> (2011)
<i>Eugenia malaccensis</i>	BRUSTEIN <i>et al.</i> (2012b)
Inibição da adesão bacteriana	
<i>C. brasiliensis</i> , <i>C. ensiformis</i> , <i>Cratylia floribunda</i> , <i>Dioclea violacea</i> , <i>Dioclea grandiflora</i>	TEIXEIRA <i>et al.</i> (2006)
<i>B. variegata</i>	KLAFKE <i>et al.</i> (2013)
Atividade fungicida	

<i>C. brasiliensis</i> , <i>D. violacea</i> , <i>Dioclea rostrata</i>	GOMES <i>et al.</i> (2012b)
<i>Bauhinia monandra</i>	SOUZA <i>et al.</i> (2011)
<i>Luetzelburgia auriculata</i>	MELO <i>et al.</i> (2005)
Atividade inseticida	
<i>Crataeva tapia</i>	ARAÚJO <i>et al.</i> (2012)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	NAPOLEÃO <i>et al.</i> (2011)

2.3.3 Lectinas de algas marinhas

Segundo Teixeira e colaboradores (2012) até o momento, existem menos de 100 publicações que descrevem a presença de lectinas em algas marinhas vermelhas, verdes ou pardas. Ao contrário das lectinas de plantas, poucas lectinas de algas têm sido isoladas e caracterizadas desde a primeira detecção de atividade hemaglutinante em extratos de algas à quase 50 anos (BOYD; ALMODOVAR; BOYD, 1966). Desde a descoberta que extratos de algas apresentavam atividades hemaglutinantes, diversos grupos de pesquisa vêm descrevendo a presença e/ou purificação de lectinas de algas marinhas, dentre estes podemos destacar grupos da Inglaterra, Japão, Espanha, Estados Unidos e Brasil (BLUNDEN; ROGERS; FARNHAM, 1975; KAMIYA; OGATA; HORI, 1982; FÁBREGAS *et al.*, 1984; CHILES; BIRD, 1989). Atualmente, a presença de lectinas em algas foi analisada em cerca de 800 espécies, entretanto, este número ainda é pequeno quando consideramos o grande número de espécies de algas marinhas (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Dentre os trabalhos realizados de isolamento de lectinas de algas marinhas, a maior parte se concentra em espécies de algas vermelhas e verdes (classes Rhodophyceae e Chlorophyceae), havendo até o momento apenas um trabalho que relata a purificação de uma lectina em algas pardas (classe Phaeophyceae) (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Isso se deve principalmente a grande ocorrência de compostos fenólicos nas espécies de algas pardas. Compostos polifenólicos são liberados durante o processo de extração e que os produtos derivados da sua oxidação se ligam fortemente a proteínas provocando falsos positivos na detecção da atividade hemaglutinante (ROGERS; LOVELESS, 1991).

Apesar de lectinas de algas marinhas apresentarem um conteúdo protéico semelhante a lectinas de plantas, eles diferem em alguns aspectos. De maneira geral, muitos autores descrevem as lectinas de algas marinhas como proteínas de baixo peso molecular, que se apresentam normalmente como monômeros mesmo em altas concentrações, e geralmente sua atividade não é dependente de cátions divalentes. Além disso, lectinas de algas possuem geralmente uma maior afinidade por carboidratos

complexos e/ou glicoproteínas e apresentam ponto isoelétrico na faixa ácida devido à presença de aminoácidos ácidos em sua composição (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990; ROGERS; HORI, 1993; AINOUS *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2012). Entretanto, alguns autores relatam que algumas lectinas isoladas de algas podem ser inibidas por açúcares simples e são dependentes de cátions, como as lectinas de algas verdes do gênero *Codium* e algas marinhas vermelhas do gênero *Ptilota* (ROGERS *et al.*, 1994; SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998; SAMPAIO *et al.*, 1999, 2002).

2.3.3.1 Funções das lectinas em algas

Diversas funções têm sido atribuídas às lectinas de algas, tais como eventos de reconhecimento célula-célula, no processo de fertilização, simbiose, defesa contra patógenos, dentre outras (WOOD-CHARLSON *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006; YOON *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm relatado a importância da interação lectina-carboidrato no reconhecimento de gameta de algas marinhas ao longo do tempo (KIM; FRITZ, 1993; KIM; LEE; FRITZ, 1996). No entanto, a maioria dos estudos utilizou evidências indiretas de experiências de inibição, usando carboidratos ou lectinas de outros organismos (principalmente a partir de plantas terrestres) como agentes de bloqueio ligados aos gametas (HAN *et al.*, 2012). Recentemente, Han e colaboradores (2012) relataram os mecanismos de reconhecimento célula-célula da lectina da alga *A. oosumiense*, que possivelmente estaria envolvida no processo de fertilização.

Além dos estudos relacionados à fertilização, Wood-Charlson e colaboradores (2006) forneceram evidências para um mecanismo de simbiose entre larvas do coral *Fungia scutaria* e algas dinoflageladas unicelulares endossimbióticas, mediado pela interação entre glicanos presentes na parede celular das algas e a lectina das larvas do coral.

De acordo com dados de Kim e colaboradores (2006) a lectina da alga marinha verde *Bryopsis plumosa* apresenta a capacidade de agregar organelas no processo de injúria do tecido, sugerindo uma função protetora desta lectina. Em estudos posteriores Yonn e colaboradores (2008) verificaram que esta lectina poderia executar duas funções: agregação de organelas celulares da alga e também uma função de defesa contra contaminações bacterianas durante sua regeneração.

Outra possível função para as lectinas de algas foi sugerida por Medina-Ramírez e colaboradores (2007). Segundo estes autores a lectina de algas marinha de

alguma forma estariam envolvidas no processo de colonização, onde as algas poderiam expor suas lectinas no ambiente circundante e que a presença destas lectinas prejudicaria o crescimento de outros organismos marinhos, competindo assim pelo mesmo espaço e nutrientes.

2.3.3.2 Atividades biológicas das lectinas de algas marinhas

Em comparação com lectinas de plantas, poucos estudos sobre a aplicabilidade biotecnológica de lectinas de algas marinhas são encontrados na literatura, possivelmente, devido à baixa rentabilidade das lectinas obtidas através dos processos de purificação. Entretanto, alguns autores sugerem que as aplicações biológicas de lectinas de algas possuem algumas vantagens sobre as demais, pelo fato de possuírem, geralmente, baixo peso molecular e serem menos antigênicas quando utilizadas em modelos biológicos (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Algumas atividades biológicas referentes a lectinas isoladas de algas estão descritas na tabela 2, evidenciando as possíveis aplicações dessas moléculas na área da biotecnologia.

Tabela 2 – Atividades biológicas de lectinas de algas marinhas.

Atividade biológica	Referência
Atividade anti-inflamatória	
<i>Caulerpa cupressoides</i>	VANDERLEI <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea cervicornis</i>	BITENCOURT <i>et al.</i> (2008)
<i>Pterocladia capillacea</i>	SILVA <i>et al.</i> (2010)
Atividade antinociceptiva	
<i>Amansia multifida</i>	NEVES <i>et al.</i> (2007)
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	VIEIRA <i>et al.</i> (2004)
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	VIANA <i>et al.</i> (2002)
<i>Caulerpa cupressoides</i>	VANDERLEI <i>et al.</i> (2010)
Inibidor de crescimento de dinoflagelado	
<i>Gracilaria verrucosa</i>	TANABE; KAMISHIMA; KOBAYASHI (1993)
Indução do processo cicatricial	
<i>B. seaforthii</i>	NASCIMENTO-NETO <i>et al.</i> (2012)
Inibição e agregação de plaquetas	
<i>Boodlea coacta</i> , <i>Carpopellis flabellata</i> , <i>Hypnea japonica</i> e <i>Solieria robusta</i>	MATSUBARA; SUMI; HORI (1996)
Indução e inibição de linfócito humano	
<i>Amansia multifida</i>	LIMA <i>et al.</i> (1998)
Indução e migração de neutrófilos em ratos	
<i>B. seaforthii</i> , <i>B. triquetrum</i> e <i>Gracilaria caudata</i>	NEVES <i>et al.</i> (2001)
Indução da produção de citocinas	
<i>C. cupressoides</i> , <i>P. capilacea</i> e <i>Solieria filiformis</i>	ABREU <i>et al.</i> (2012)
Reconhecimento de células neoplásicas e ação anti-neoplásica	
<i>B. triquetrum</i> , <i>B. seaforthii</i>	PINTO <i>et al.</i> (2009)
<i>Eucheuma serra</i>	SUGAHARA <i>et al.</i> (2001); FUKUDA <i>et al.</i> (2006); OMOKAWA <i>et al.</i> (2010)
Antiviral	
<i>Griffithsia</i> sp.	MORI <i>et al.</i> (2005)
<i>Griffithsia</i> sp., <i>Scytonema varium</i>	TAKEBE <i>et al.</i> (2013)
Liberação de óxido nítrico	
<i>B. seaforthii</i>	LIMA <i>et al.</i> (2010)
<i>H. cervicornis</i>	FIGUEIREDO <i>et al.</i> (2010)
Anti-micobacteria combinado com antibiótico	
<i>Gelidium amansii</i>	AHMAD; MASSI (2012)
Atividade antibacteriana	
<i>Eucheuma serra</i> , <i>Galaxaura marginata</i>	LIAO <i>et al.</i> (2003)
Aglutinar micro-organismos	
<i>Fucus vesiculosus</i>	CRIADO; FERREIROS (1983)
Inibição da adesão bacteriana a película adquirida	

<i>B. triquetrum</i>	TEIXEIRA <i>et al.</i> (2007)
Atividade fungicida	
<i>Hypnea musciformis</i>	MELO <i>et al.</i> (1997)
Atividade inseticida	
<i>Gracilaria córnea</i>	LIMA <i>et al.</i> (2005)
<i>Gracilaria ornata</i>	LEITE <i>et al.</i> (2005)

2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

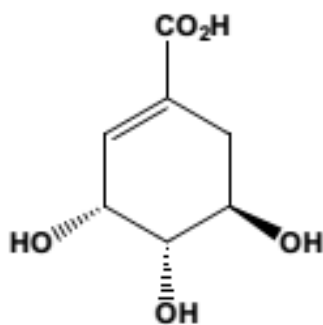
Metabolismo é definido como o conjunto de reações que estão ocorrendo continuamente dentro da célula de um organismo. Estas reações visam, primeiramente, o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula: como produção de energia e biossíntese das substâncias essenciais a sua sobrevivência (MARZZOCO; TORRES, 2007). Os compostos químicos formados, degradados ou transformados são denominados de metabólitos. Metabólitos primários são aqueles considerados imprescindíveis à vida, exercendo papéis fundamentais associadas à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento, dentre estes podemos destacar as proteínas, carboidratos e lipídeos.

Os metabólitos secundários geralmente não são essenciais para o desenvolvimento e/ou reprodução de um organismo, sendo considerados no passado como produtos de excreção do vegetal. Os compostos originados do metabolismo secundário possuem complexa estrutura, baixo peso molecular, atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e muitos deles distribuídos entre um número limitado de espécies dentro do reino vegetal (ALVES, 2001; SANTOS, 2002; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; BERG; LUBERT, 2008; PATRA *et al.*, 2013; STANIEK *et al.*, 2013). Esses compostos estão envolvidos com a defesa contra herbívoros e patógenos, atrativos para polinizadores, controle da germinação de sementes e inibição das espécies de plantas concorrentes (alelopatia), sendo, portanto, parte integrante das interações de espécies em comunidades vegetais e animais (BOURGAUD *et al.*, 2001; SANTOS, 2002; MAKKAR *et al.*, 2007; PATRA *et al.*, 2013).

Os metabólitos secundários apresentam diversidade química estrutural, alta variação intraespecífica e são produzidos conforme as condições ambientais, nutricionais e físicas do habitat (HARTMANN, 1996; BOURGAUD *et al.*, 2001; WAHID *et al.*, 2007; HARTMANN, 2007). Esses compostos são sintetizados por diversos caminhos biossintéticos os quais produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais (DEWICK, 2002). A origem de

todas essas moléculas pode ser resumida a partir de vias metabólicas fundamentais para os organismos, como a fotossíntese, glicose e ciclo de Krebs (DEWICK 2002; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). A biossíntese dos metabólitos secundários ocorre via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (SIMÕES *et al.*, 2007) (Figura 11). O primeiro da origem a aminoácidos aromáticos que tem como sucessores a maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Já os derivados do acetato, podem ser classificados segundo a via metabólica a partir do ciclo do ácido cítrico, derivados do acetato via mevalonato e produtos da condensação do acetato (SANTOS, 2002). Segundo Santos (2002) alguns metabólitos secundários como flavonoides e taninos condensados são resultantes da mescla de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou de seus derivados. Entretanto, a biossíntese de metabólitos secundários é um processo complexo e está sujeito a influência de diferentes variáveis. Fatores bióticos e abióticos podem interferir com a qualidade e a quantidade de produtos secundários resultantes do metabolismo de uma planta em determinado momento (SANGWAN *et al.*, 2001; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PATRA *et al.*, 2013).

Figura 11 – Estrutura química do ácido chiquímico (CZELUSNIAK *et al.*, 2012).



Os metabólitos secundários são separados em dois grupos distintos, os compostos nitrogenados como os alcaloides, aminoácidos não protéicos, aminas, alcanídes, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos; e compostos não nitrogenados como os flavonoides, terpenos, saponinas, esteróides e cumarinas (PAIVA *et al.*, 2010). Neste trabalho daremos enfoque principal em duas classes de compostos que serão utilizadas nos ensaios biológicos, os flavonoides e os terpenos.

2.4.1 Flavonoides

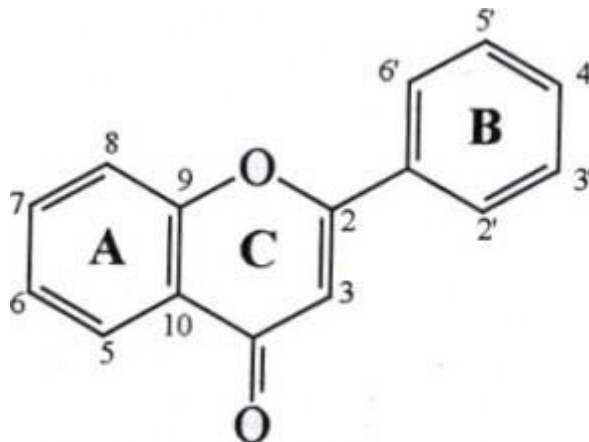
Os flavonoides são compostos que ocorrem amplamente no reino vegetal, onde são encontrados em frutas, legumes, sementes, caules e flores, bem como se fazem presentes em chás, vinhos, própolis, mel, dentre outros produtos, representando um componente comum da dieta humana (MIDDLETON; CHITHAN, 1993; HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; CUSHNIE; LAMB, 2005; CHEN *et al.*, 2013). De acordo com Skibola e Smith (2000) apenas nos Estados Unidos a ingestão dietética de flavonoides é cerca de 500-1000 mg/diárias, mas estes valores podem ser maiores para pessoas que completam sua alimentação diária à base de preparações contendo flavonoides.

Esses compostos podem desempenhar diversas funções em diferentes componentes dos vegetais (CHEN *et al.*, 2013). Em flores os flavonoides têm a função de fornecer cores atraentes para os polinizadores da planta (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Em folhas, acredita-se que estes compostos são utilizados para promover a sobrevivência fisiológica da planta, protegendo-a, por exemplo, contra fungos e radiação ultravioleta (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Além disso, os flavonoides estão envolvidos em fotossensibilização, transferência de energia, atividades como hormônios de crescimento e reguladores do crescimento vegetal, controle da respiração e da fotossíntese e morfogênese (MIDDLETON; CHITHAN, 1993; HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999, CHEN *et al.*, 2013).

Em relação à estrutura dos flavonoides, eles são compostos polifenólicos de baixo peso molecular e têm uma estrutura química constituída de dois anéis aromáticos que são ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, que formam um heterociclo oxigenado (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002; NOLVACHAI; MARRIOTT, 2013). A estrutura básica dos flavonoides consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos, A e B (Figura 12) interligados via carbono heterocíclico do pirano. Conforme o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano, têm-se diferentes classes de flavonoides como as flavonas, flavonois, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (BRAVO, 1998; CHEYNIER, 2005; NOLVACHAI; MARRIOTT, 2013). Segundo Beecher (2003) até 2003 foram identificados mais de 8000 componentes da família dos flavonoides. Esse grande número de compostos surge da

ampla variação de combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica dos flavonoides (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002).

Figura 12 – Estrutura química básica dos flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2003).



Devido a esta grande diversidade, pesquisadores vêm mostrando, nos últimos anos, bastante interesse no estudo de tais estruturas e suas funções, uma vez que esses compostos têm apresentado diversos efeitos biológicos, tais como, atividade anti-inflamatória, antialérgica, citotóxica, antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, inibição enzimática, dentre outras (FORMICA; REGELSON, 1995; HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; CUSHNIE; LAMB, 2005, 2011). De acordo com Araújo (2008) a ingestão de flavonoides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares. Dessa maneira fica clara a possibilidade da utilização dessa classe de compostos nas mais diversas áreas da biotecnologia.

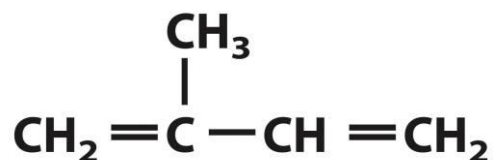
2.4.2 Terpenos

Os terpenos, também conhecidos como isoprenoides, constituem uma classe de metabólitos secundários de plantas com a maior variedade estrutural e funcional (PHILLIPS *et al.*, 2008; MARCHEV *et al.*, 2013). O nome terpeno está relacionado ao fato de que os primeiros membros da classe foram isolados da terebentina (terpentin em alemão). Alguns destes compostos participam ainda que indiretamente de processos como respiração celular e desenvolvimento do vegetal, portanto importantes no metabolismo primário, entretanto, a maior parte desses compostos são produtos do

metabolismo secundário, tendo como função intermediar a relação entre o vegetal e o ambiente (PHILLIPS *et al.*, 2008).

Nos vegetais existem duas vias distintas capazes de sintetizar os precursores universais dos isoprenoides, a via do isopentenil difosfato e a via do seu isômero dimetilalil difosfato, sintetizados através da via do acetato-mevalonato (CLAUDOT *et al.*, 1997). No entanto, algumas contradições foram observadas por alguns pesquisadores levando à descoberta de novas vias biossintéticas que são independentes da via acetato-mevalonato (ROHMER, 1999; EISENREICH; ROHDICH; BACHER, 2001).

Figura 13 – Estrutura química do isopreno (LEHNINGER, 2008)



A estrutura química dos terpenos é representada pela união entre duas, quatro, seis, oito ou mais unidades de isopreno (DEY; HARBORNE, 1997). Esta particularidade representa a característica comum de todos os terpenos, que, portanto, apresentam a fórmula geral $(\text{C}_5\text{H}_{10})_n$. Esses compostos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno presentes no seu esqueleto de carbono da seguinte forma: hemiterpenos ($n = 1$), monoterpênicos ($n = 2$), sesquiterpenos ($n = 3$), diterpenos ($n = 4$), triterpenos ($n = 6$), tetraterpenos ($n = 8$) e politerpenos ($n > 8$) (BUCHANAN *et al.*, 2000). Os terpenos são representados pela família dos hidrocarbonetos sem a presença de grupos funcionais na molécula, enquanto que os terpenoides são caracterizados por ciclizações, rearranjos, perdas ou adição de átomos de carbono e principalmente pela presença de grupos funcionais como álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas ou epóxidos terpênicos (BUCHANAN *et al.*, 2000) Segundo Zwenger e Basu (2008) existem mais de trinta mil, entre terpenos e terpenoides, identificados e esses compostos apresentam funções variadas nos vegetais.

Os hemiterpenos constituem o menor grupo dos terpenos, sendo que o seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Os monoterpenos fazem parte da classe mais simples dos terpenoides, sendo constituídos por 10 átomos de carbono, ou seja, duas unidades de isopreno. São componentes majoritários dos óleos essenciais chegando a constituir mais de 90% das moléculas. Os monoterpenos são altamente hidrofóbicos e seus efeitos biológicos estão relacionados à função de defesa contra patógenos como fungos e bactérias (TURINA *et al.*, 2006). No entanto, segundo Dey e Harborne (1997) o maior interesse nestes compostos é o seu uso como perfumes e flavorizantes em alimentos. Dentre os monoterpenos mais comumente encontrados nos óleos essenciais encontram-se o linalol, geraniol, tujona, cânfora, limoneno e outros (SIMÕES, 2003).

Os sesquiterpenos são bastante encontrados em plantas, fungos e algas. Centenas desses compostos já foram identificados sendo encontrados principalmente junto com monoterpenos de óleos essenciais (COSTA, 1994). Sua estrutura compreende 15 átomos de carbono (3 unidades de isopreno) e são comumente utilizados como componentes de fragrâncias, cosméticos, produtos de limpeza, desinfetantes, aditivos de alimentos devido aos aromas (AMARAL *et al.*, 1998; SEO *et al.*, 2008). A maioria dos sesquiterpenos apresenta propriedades biológicas contra bactérias e insetos, e devido a essas propriedades muitos desses compostos são utilizados como agentes antimicrobianos (DEY; HARBONE, 1997). Entre os sesquiterpenos mais comuns encontram-se o farnesol, nerolidol, bisaboleno e outros (SIMÕES, 2003).

Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (ROBBERS *et al.*, 1997; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; OLIVEIRA; GODOY; COSTA, 2003). Peres (2004) descreve que possivelmente o principal papel desempenhado pelos diterpenos seja o das giberelinas, que são importantes hormônios vegetais responsáveis pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais. Entretanto, esses compostos também têm apresentando atividade contra bactérias e fungos, levando a acreditar em uma possível função de defesa dessas moléculas (LIANG *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2010).

Os triterpenos são compostos presentes nas resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Uma importante classe importante dentro dos triterpenos são as saponinas. Essas substâncias apresentam comportamento anfipático, ou seja, possuem uma parte hidrossolúvel (glicose) e outra lipossolúvel (triterpeno). Nas plantas, as saponinas

desempenham um importante papel na defesa contra insetos e micro-organismos (PERES, 2004).

Os tetraterpenos, conhecidos como carotenoides, são pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, apresentando função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Os politerpenos por sua vez são uma classe de terpenos com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (ROBBERS *et al.*, 1997; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; OLIVEIRA; GODOY; COSTA *et al.*, 2003).

Além das atividades relacionadas à atividade antimicrobiana, já relatada para muitos desses compostos, os terpenos e seus derivados têm apresentado diversas atividades biológicas na área farmacológica sendo utilizadas como substâncias sedativas, tranquilizantes, analgésica, anticonvulsivantes e até mesmo antidepressivas (SOUSA *et al.*, 2007; PERAZZO *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2008). Assim, devido ao grande número de possíveis aplicações biotecnológicas os terpenoides têm chamando a atenção de diversos pesquisadores (ZWENGER; BASU, 2008).

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LECTINAS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Diversas moléculas produzidas pelos vegetais estão associadas a mecanismos de defesa da planta contra patógenos como bactérias e fungos, dentre estas moléculas podemos destacar as lectinas e os metabólitos secundários (PAIVA *et al.*, 2010).

Segundo Karnchanatat (2012) as lectinas de plantas desempenham seu papel de defesa contra bactérias e fungos por meio de um mecanismo que baseia-se em interações entre estas proteínas e carboidratos presentes na parede celular e/ou glicanos extracelulares dos micro-organismos. Já em 1936, Summer e Howel descreveram que a lectina isolada de *Canavalia ensiformis* (concanavalina A) era capaz de aglutinar várias espécies de bactérias do gênero *Mycobacterium*, desde então diversos trabalhos têm reportado a utilização de lectinas vegetais na identificação de bactérias e fungos, bem como a caracterização de componentes celulares e detecção de receptores glicídicos (KARNCHANATAT, 2012).

Além de reconhecer especificamente glicanos nas superfícies celulares de micro-organismos, lectinas extraídas de plantas mesmo com diferentes especificidades

têm apresentado a capacidade de inibir o crescimento, ou ainda causar morte, de bactérias e fungos (PAIVA *et al.*, 2010). Algumas lectinas com potencial atividade contra bactérias e fungos, além da sua especificidade por carboidratos estão descritos na tabela 3.

A atividade antimicrobiana das lectinas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ocorre através da interação dessas proteínas com componentes da parede celular bacteriana, incluindo ácidos teicoicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos. Resultados encontrados por Bourne e colaboradores (1994) através de cristalografia de raios-X mostraram que a lectina isolada de sementes de *Lathyrus ochrus* interagem com ácido murâmico e muramil dipeptídeo. Mais ainda, segundo Ajouba e colaboradores (1994) demonstram que lectinas de plantas com diferentes especificidades por carboidratos interagem com o peptidoglicano de bactérias Gram-positivas indicando que estas proteínas podem interagir com diferentes componentes da parede celular bacteriana como ácido murâmico, N-acetilglucosamina, N-acetilmuramico e muramil dipeptídeo. Em bactérias Gram-negativas as lectinas podem interagir com lipopolissacarídeos (LPS) (AGRAWAL *et al.*, 2001). Já em 1968, Doyle e colaboradores demonstraram que lectinas de plantas eram capazes de ligar e precipitar uma preparação de LPSs derivados de varias estirpes de *E. coli*, *Shigella flexneri* e *Salmonella abortivoequina*.

Tabela 3 – Lectinas de plantas com atividade antimicrobiana (adaptado de PAIVA *et al.*, 2010).

Planta (lectina isolada)	Afinidade da lectina	Bactéria ou fungo afetado	Referência
<i>Araucaria angustifolia</i>	GlcNAc	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i>	SANTI-GADELHA <i>et al.</i> (2006)
<i>Eugenia uniflora</i>	Carboidratos complexos	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2008)
<i>Phaseolus coccineus</i>	Ácido siálico	<i>Helminthosporium maydis</i> , <i>Gibberella sanbinetti</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	CHEN <i>et al.</i> (2009)
<i>Opuntia ficus indica</i>	Glicose/Manose	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i>	SANTANA <i>et al.</i> (2009)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	GlcNAc	<i>B. subtilis</i> , <i>Corynebacterium callunae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium decemcellulare</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Fusarium fusarioides</i> , <i>Fusarium verticilloides</i>	SÁ <i>et al.</i> (2009)
<i>Phthirusa pyrifolia</i>	Frutose	<i>B. subtilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>F. lateritium</i> , <i>R.solani</i>	COSTA <i>et al.</i> (2010)

Com relação à ação antimicrobiana de lectinas sobre fungos, a inibição do crescimento desses micro-organismos pode ocorrer através da interação destas proteínas a esporos ou hifas, diminuindo a absorção de nutrientes (LIS; SHARON, 1981; PAIVA *et al.*, 2010). Ainda de acordo com Wong e colaboradores (2010), as lectinas não têm a capacidade de inibir diretamente o crescimento dos fungos, mas sim de maneira indireta através de efeitos indiretos produzidos devido à ligação das lectinas a carboidratos na superfície da parede celular do fungo.

Além da ação direta das lectinas sobre bactérias e fungos, pesquisadores têm demonstrado a capacidade dessas proteínas em inibir a adesão e formação de biofilmes desses micro-organismos (TEIXEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; CARNEIRO, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2011; COELHO, 2011).

Além das lectinas, diferentes tipos de metabólitos secundários têm sido identificados como os princípios ativos de extratos e óleos essenciais com atividade antimicrobiana (PAIVA *et al.*, 2010). Taninos isolados de *Galla rhois* mostraram ação antibacteriana contra diversas bactérias relacionadas com cárie dental (KANG *et al.*, 2008). Flavonoides isolados a partir das plantas medicinais asiáticas *Broussonetia papyrifera*, *Echinosophora koreensis*, *Morus alba*, *Morus mongólica* e *Sophora flavescens* contra *C. albicans* (SOHN *et al.*, 2004). O diterpenoide isolado de *Haplopappus uncinatus* apresentou atividade antimicrobiana contra várias estirpes de bactérias Gram-positivas (URZÚA *et al.*, 2006). Alguns outros exemplos de metabólitos secundários de plantas com atividade antimicrobiana estão descritos na tabela 4.

Os mecanismos pelo qual os metabólitos secundários de plantas exercem sua atividade antimicrobiana não são completamente compreendidos, mas vários estudos têm sido realizados neste sentido. De acordo com Cushnie e Lamb (2011) dentre os possíveis mecanismos de ação destas moléculas estão: danos na membrana citoplasmática, inibição de enzimas importantes no metabolismo celular e agregação microbiana. Para os terpenos têm sido sugerido que esses compostos podem promover a ruptura da membrana citoplasmática dos micro-organismos assim como os taninos que podem interagir com polissacarídeos, inativando enzimas (YA *et al.*, 1988; CHUNG; LU; CHOU, 1998; URZÚA *et al.*, 2008).

Os metabólitos secundários, por serem moléculas possuem uma pequena massa molecular, podem ser efetivos, penetrar dentro da matriz dos biofilmes e causar sua desestruturação. Alguns desses compostos além de se mostrarem efetivos contra o crescimento de bactérias e fungos na forma planctônica também possuem um efeito sobre biofilmes (KUZMA *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008). Como por exemplo, o diterpeno isolado de *Salvia sclarea* foi eficaz em inibir a formação de biofilmes formados por *Staphylococcus* sp. (KUZMA *et al.*, 2007). Kang e colaboradores (2008) mostraram que os taninos isolados de *Galla rhois* além de apresentarem atividade antibacteriana contra bactérias relacionadas a cáries, ainda foram capazes de inibir a formação de biofilmes dessas bactérias. Já na classe dos flavonoides, Lee e colaboradores (2011) mostraram que a floretina (um flavonoide isolado da maçã) foi capaz de inibir significativamente a formação de biofilme da bactéria *E. coli*.

Tabela 4 – Metabólitos secundários de plantas com atividade antimicrobiana (adaptado de PAIVA *et al.*, 2010).

Planta	Composto	Bactéria ou fungo afetado	Referência
<i>Helichrysum aureonitens</i>	Galangina (flavona)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus kristinae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	AFOYALAN; MEYER (1997)
<i>Gunnera perpensa</i>	Benzoquinona	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	DREWES <i>et al.</i> (2005)
<i>Warburgia salutaris</i>	Sesquiterpenoide	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	RABE; VAN STADEN (1997)
<i>Combretum erythrophyllum</i>	Flavonoides	<i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	MARTINI; KATERERE; ELOFF (2004)
<i>Erythrina burttii</i>	Flavonoides	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	YENESEW <i>et al.</i> (2005)
<i>Spirostachys african</i>	Terpenoides	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	RABE; VAN STADEN (1997)
<i>Aniba panurensis</i>	Alcaloides	<i>C. albicans</i>	KLAUSMEYER <i>et al.</i> (2004)
<i>Canscora decussata</i>	Xantonas	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GHOSAL; CHAUDHARY (1975)

REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KOVACS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, n. 2, p. 172-179, abr. 2011.
- ABREU, T. M.; SILVA, L. M. C. M.; VANDERLEI, E. S. O.; MELO, C. M. L.; PEREIRA, V. R. A.; BENEVIDES, N. M. B. Cytokine production induced by marine algae lectins in BALB/c mice splenocytes. **Protein Pept. Lett.**, v. 19, n. 9, p. 975-981, set. 2012.
- ACKERMAN S. J.; CORRETTE S. E.; ROSENBERG, H. F.; BENNETT, J. C.; MASTRIANNI, D. M.; NICHOLSON-WELLER, A.; WELLER, P. F.; CHIN, D. T.; TENEN D. G. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. **J. Immunol.**, v.150, n. 2, p. 456-468, jan. 1993.
- AFOYALAN, A. J.; MEYER, J. J. M. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 57, n. 3, p. 177-181, ago. 1997.
- AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; JAISWAL, Y. K.; DAS, H. R.; DAS, R. H. A *Mesorhizobium* lipopolysaccharide (LPS) specific lectin (CRL) from the roots of nodulating host plant, *Cicer arietinum*. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 440-449, mar. 2001.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol - induced toxicity in chinese hamster ovary cells in vitro. **Nutr. Res.**, v. 19, n. 5, p. 749-760, maio 1999.
- AHIMOU, F.; SEMMENS, M. J.; NOVAK, P. J.; HAUGSTAD, G. Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 9, p. 2897-2904, maio 2007.
- AHMAD, A.; MASSI, M. N. Cloning and *in vitro* Anti-mycobacterial Activity of Lectin Protein in Combination with Streptomycin to Increase Sensitivity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 8, n. 2, p. 101-117, 2012.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red marine algae *Bryothamnion triquetrum* and *B. Seaforthii*. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal.**, v. 7, n. 1, p. 15-19, abr. 1995.
- AJOUBA, A.; CAUSSE, H.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; CABBILLAU, C.; ROUGE, P. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 22, n. 2, p.153-159, mar. 1994.

AKIYAMA, H.; YAMASAKI, O.; TADA, J.; ARATA, J. Adherence characteristics and susceptibility to antimicrobial agents of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin infections and atopic dermatitis. **J. Dermatol. Sci.**, v. 23, n. 3, p. 155-160, ago. 2000.

ALENCAR, N. M.; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P.; LEITE, K. B.; ARAGÃO, K. S.; ASSREUY, A. M.; NOGUEIRA, N. A.; CAVADA, B. S.; VALE, M. R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n. 7, p. 919-22, jul. 2005a.

ALENCAR, V. B. M.; ASSREUY, A. M.; ALENCAR, N. M. N.; MEIRELES, A. V. P.; MOTA, M. R. L.; ARAGÃO, K. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; NAGANO, C. S.; BRITO, G. A. C.; SILVA, L. I. M. M.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H.; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R. A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in vivo and in vitro neutrophil migration. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n.3, p. 375-381, mar. 2005b.

ALONSO, R. J. **Tratado de fitomedicina-bases clínicas e farmacologicas**. Buenos Aires: Isis, 1998.

ALVES, H. M. **Plantas como Fonte de Fitofármacos**. São Paulo: Química Nova na Escola, Sociedade Brasileira de Química, 2001.

AMARAL, J. A.; EKINS, A.; RICHARDS, S. R.; KNOWLES, R. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 2, p. 520-525, fev. 1998.

AN, S. W; DONG, Y. H; ZHANG, L. H. **The Impact and molecular genetics of bacterial biofilms**. United Kingdom: Environmental Molecular Microbiology, Caister Academic Press, 2009. 211-226 p.

ANTONYUK, L. P.; IGNATOV, V. V. The role of wheat germ agglutinin in plant - bacteria interactions: a hypothesis and the evidence in its support, **Russ. J. Plant Physiol.**, v. 48, n. 3, p. 364-369, maio 2001.

ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2008. 477 p.

ARAÚJO, R. M. S.; FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CARNEIRO-DACUNHA, M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. V. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Sci.**, v. 183, p. 20-26, fev. 2012.

ARAÚJO-FILHO, J. H.; VASCONCELOS, I. M.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; GONDIM, D. M.; OLIVEIRA, J. T. A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and ConA. **J. Agric. Food Chem.**, p. 58, n. 7, p. 4090-4096, abr. 2010.

AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cell to a wheat germ agglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 54, n. 2, p. 396-399, ago. 1965.

BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; NASCIMENTO, K. S.; ROSSI, F. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; RODRIGUES, A. L.; LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 85, n. 1, p. 160-169, set. 2006.

BARI, A. U.; SILVA, H. C.; SILVA, M. T. L.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; CAJAZEIRAS, J. B.; SAMPAIO, A. H.; LEAL, R. B.; TEIXEIRA, E. H.; ROCHA, B. A. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect. **J. Mol. Recognit.**, v. 26, n. 8, p. 351-356, ago. 2013.

BECKER, J. W.; REEKE, G. N. Jr.; WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J. Biol. Chem.**, v. 250, n. 4, p. 1513-1524, 1975.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **J. Nutr.**, v. 133, n. 10, p. 3248S-3254S, out. 2003.

BELTRÃO, E. I.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, O. G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M. M.; COELHO, L. C.; CARVALHO, L. B. Jr. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. **Eur. J. Histochem.**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.

BERG, J. M. T; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6, ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 545p.

BEZERRA, E. H.; ROCHA, B. A.; NAGANO, C. S.; BEZERRA, G. D.; MOURA, T. R.; BEZERRA, M. J.; BENEVIDES, R. G.; SAMPAIO, A. H.; ASSREUY, A. M.; DELATORRE, P.; CAVADA, B. S. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and nitric oxide release from endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 408, n. 4, p. 566-570, maio 2011.

BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, J. G.; MOTA, M. R.; BEZERRA, C. C.; SILVESTRE, P. P.; VALE, M. R.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M.; DE ALENCAR, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 377, n. 2, p. 139-148, abr. 2008.

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. Ø.; FIANDACA, M. J.; PEDERSEN, J.; HANSEN, C. R.; ANDERSEN, C. B.; PRESSLER, T.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 44, n. 6, p. 547-58, jun. 2009.

BLEULER-MARTÍNEZ, S.; BUTSCHI, A.; GARBANI M.; WÄLTI, M. A.; WOHLSCHLAGER, T.; POTTHOFF, E.; SABOTIĆ, J.; POHLEVEN, J.; LÜTHY, P.; HENGARTNER, M. O.; AEBI, M.; KÜNZLER, M. A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. **Mol. Ecol.**, v. 20, n. 14, p. 3056-3070, jul. 2011.

BLUNDEN, G.; ROGERS, D. J.; FARNHAM, W. F. Survey of British seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia**, v. 38, n. 2, p. 162-168, mar-abr. 1975.

BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect.**, v. 15, n. 3, p. 187-192, abr. 2002.

BOUCKAERT, J.; DEWALLEF, Y.; POORTMANS, F.; WYNS, L.; LORIS, R. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 26, p. 19778-19787, jun. 2000.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Sci.**, v. 161, n. 5, p. 839-851, out. 2001.

BOURNE, Y.; AYOUBA, A.; ROUGÉ, P.; CAMBILLAU, C. Interaction of a legume lectin with two components of the bacterial cell wall. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 13, p. 9429-9435, abr. 1994.

BOYD, W. C.; ALMODOVAR, L. R.; BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion**, v. 6, n. 1, p. 82-83, jan-fev. 1966.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, mar. 1954.

BRAVO, L. B. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 11, p. 317- 333, nov. 1998.

BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 3, p. 640-646, mar. 2000.

BRUSTEIN, V. P.; CAVALCANTI, C. L.; DE MELO-JUNIOR, M. R.; CORREIA, M. T.; BELTRÃO, E. I.; CARVALHO, L. B. Jr. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, n. 2, p. 268-275, jan. 2012a.

BRUSTEIN, V. P.; SOUZA-ARAÚJO, F. V.; VAZ, A. F.; ARAÚJO, R. V.; PAIVA, P. M.; COELHO, L. C.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 315-322, dez. 2012b.

BUCHANAN, B. B; GRUISSEN, W; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1251-1268 p.

BUTANY, J.; SCULLY, H. E.; VAN ARSDELL, G.; LEASK, R. Prosthetic heart valves with silver-coated sewing cuff fabric: early morphological features in two patients. **Can. J. Cardiol.**, v. 18, n. 7, p. 733-738, jun. 2002.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 7, p. 327-335, jul. 2001.

CAMPANAC, C.; PINEAU, L.; PAYARD, A.; BAZIARD-MOUYSSET, G.; ROQUES, C. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms, **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 5, p. 1469-1474, maio 2002.

CARNEIRO, V. A. Atividade antimicrobiana e inibição da formação do biofilme bacteriano através de lectinas vegetais. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CARNEIRO, V. A.; SANTOS, H. S.; ARRUDA, F.V.S.; BANDEIRA, P. N.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PEREIRA, M. O.; HENRIQUES, M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E. H. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. **Molecules**, v. 16, n. 1 p. 190-201, dez. 2010.

CARVALHO, A. C. B; NUNES, D. S. G; BARATELLI, T. G; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q; NETTO, E. M. N. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos**. T&C Amazônia, 2007. 26-32 p.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the subtribe lectins. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 2, n. 2, p. 123-135, jun. 2001.

CAVADA, B. S.; MORENO, F. B. B.; DA ROCHA, B. A. M.; DE AZEVEDO, W. F. Jr.; CASTELLÓN, R. E.; GOERSCH, G. V.; NAGANO, C. S.; DE SOUZA, E. P.; NASCIMENTO, K. S.; RADIS-BAPTISTA, G.; DELATORRE, P.; LEROY, Y.; TOYAMA, M. H.; PINTO, V. P.; SAMPAIO, A. H.; BARENTTINO, D.; DEBRAY, H.; CALVETE, J. J.; SANZ, L. cDNA cloning and 1.75Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and Nacetylglucosamine binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS J.**, v. 273, n. 17, p. 3962-3974, set. 2006.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, B. T.; RAMOS, R. L.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675-680, out. 1998.

CAVALCANTE, T. T.; ROCHA, A. M. B.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, V. S.; FERNANDES, A. S. N.; SÁ, N. C.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, abr. 2011.

CERCA, N.; PIER, G. B.; VILANOVA, M.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Res. Microbiol.**, v. 156, n. 4, p. 506-514, maio 2005.

CHAFFIN, W. L.; LOPEZ-RIBOT, I. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTINEZ, I. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 1, p. 130-180, mar. 1998.

CHARACKLIS, W. G. Attached microbial growths. I. Attachment and growth. **Water Res.**, v. 7, p. 1113-1127, 1973.

CHARACKLIS, W. G; COOKSEY, K. E. **Biofilms and microbial fouling**. New York: Laskin AI (ed) Applied microbiology, Academic Press, 1983. 93-138 p.

CHARACKLIS, W. G; WILDERER, P. A. **Structure and Function of Biofilms**. Chichester: Life sciences research reports, 1989. 387 p.

CHAURASIA, S. C.; VYAS, K. K. J. Antibacterial activity os essential oils of four medical plants. **J. Res. Educ. Indian Med.**, v. 6, p. 24-26, mar. 1977.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 14, p. 5048-5052, abr. 2004.

CHEN, J.; LIU, B.; JI, N.; ZHOU, J.; BIAN, H.; LI, C.; CHEN, F.; BAO, J. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 352-360, abr. 2009.

CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 545-549, jan. 2002.

CHEN, X.; MUKWAYA, E.; WONG, M. S.; ZHANG, Y. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. **Pharm Biol.**, nov. 2013

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, n. 1, p. 223S-229S, jan. 2005.

CHILES, T. C.; BIRD, K. T. A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 94, n. 1, p. 107-111, 1989.

CHUNG, K. T.; LU, Z.; CHOU, M. W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food Chem. Toxicol.**, v. 36, n. 12, p. 1053-1060, dez. 1998.

CLAUDOT, A. C.; DIETER, E.; SANDERMANN, H.; DROUET, A. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. **Planta**, v. 203, n. 3, p. 275-282, out. 1997.

COELHO, F. A. B. L. Effect of Diocleinae lectins on bacteria and fungi planktonic and sessile cells. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Clínica). Universidade do Minho, Braga, 2011.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 146, n. 3, p. 406-414, set. 2007.

CONRADO, F. M.; FURTADO, L. E. T. A.; TEIXEIRA, A. H.; COUTINHO, N. L. P.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; BARBOSA, F. C. B.; CHAVES, H. V.; FILHO, G. C.; PINTO, V. P. T. *Erythrina velutina* and *Bryothamnion seaforthii* lectins binding to proteins of primary central nervous system tumors. **J. Cancer Res. Exp. Oncol.**, v. 4, n. 1, p. 21-26, nov. 2012.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2, ed. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian, 1994. 135 p.

COSTA, R. M. P. B.; VAZ, A. F. M.; OLIVA, M. L. V.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochem.**, v. 45, n. 4, p. 526-533, abr. 2010.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5428, p. 1318-1322, maio 1999.

COSTERTON, J. W.; GEESSEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Sci. Am.**, v. 238, n. 1, p. 86-95, jan. 1978.

COSTERTON, J. W.; WILSON, M. **Introducing Biofilms**. United Kingdom: Biofilms, 2004. 1-4 p.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, jun. 2013.

CRIADO, M. T.; FERREIROS, C. M. Selective interaction of a *Fucus vesiculosus* lectin-like mucopolysaccharide with several *Candida* species. **Ann. Microbiol. (Paris)**, v. 134A, n. 2, p. 149-154, mar-abr.1983.

CROTEAU, R; KUTCHAN, T. M; LEWIS, N. G. **Natural products (secondary metabolites)**. Rockville: Biochemistry and molecular biology of plants, American Society of Plant Physiologists, 2000. 1250 - 1318 p.

CROZIER, A; CLIFFORD, M. N; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. 1, 2006. 372 p.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, ago. 2011.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Rev. bras. plantas med.** vol.14 n. 2. 2012.

DA SILVA, L. I. M. M.; RAMOS, M. V.; CAJAZEIRAS, J. B.; FERREIRA, P. R.; CARVALHO, C. A. V.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, B. T.; DA SILVEIRA, J. A. G.; CAVADA, B. S. Lectins from *Pisum arvense* seeds behave differently from storage proteins during germination in the darkness. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 12, n. 13, p. 255-262, ago. 2000.

DA SILVA, P. M. B.; ACOSTA, E. J. T. R.; DE REZENDE PINTO, L.; GRAEFF, M.; SPOLIDORIO, D. M. P.; ALMEIDA, R. S.; PORTO, V. C. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e712-e717, nov. 2011.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 847-867, dez. 2000.

DAVIES, D. G.; GEESEY, G. G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 860-867, mar. 1995.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-298, abr. 1998.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 114-122, fev. 2003.

DE BEER, D.; STOODLEY, P.; ROE, F.; LEWANDOWSKI, Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, n. 11, p. 1131-1138, maio 1994.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SOUZA, E. P.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; MORENO, F. B.; FREITAS, B. T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A. H.;

AZEVEDO W. F. Jr.; CAVADA, B. S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct. Biol.**, v. 7, p. 52, 2007.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach**. 2, ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

DEY, P. M; HARBONE, J. B. **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. 529 p.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v.2, n. 2, p. 303-336, abr. 2012.

DICKSCHAT, J. S. Quorum sensing and bacterial biofilms. **Nat. Prod. Rep.**, v. 27, n. 3, p. 343-369, mar. 2010.

DJURIC, Z.; CHEN, G.; DOERGE, D. R.; HEILBRUN, L. K.; KUCUK, O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. **Canc. Lett.**, v. 172, n. 1, p. 1-6, out. 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 2, p. 277-281, mar-abr. 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881-890, set. 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, abr. 2002.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 30-36, jan. 2003.

DOYLE, R. J.; WOODSIDE, E. E.; FISHEL, W. C. Protein-polyelectrolyte interactions. The Concanavalin A precipitin reaction with polyelectrolytes and polysaccharide derivatives. **Biochem. J.**, v. 106, n. 1, p. 35-40, jan. 1968.

DREWES, S. E.; KHAN, F.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Simple 1,4-benzoquinones with antibacterial activity from stems and leaves of *Gunnera perpensa*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 15, p. 1812-1816, ago. 2005.

DUBOIS, B.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKERA, G. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. **FEBS Lett.**, v. 427, n. 2, p. 275-278, maio 1998.

DUDDRIDGE, J. E.; PRITCHARD, A. M. **Microbial corrosion**. United Kingdom: The Metals Society, 1983. 28-35 p.

DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 155-166, abr. 2002.

EHRlich, G.D.; ARCIOLA, C.R. From Koch's postulates to biofilm theory. The lesson of Bill Costerton. **Int J Artif Organs.**, v. 35, n. 10, p. 695-699, out. 2012.

- EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER A. Deoxyxylulose Phosphate Pathway to Terpenoids. **Trends Plant Sci.**, v. 6, n. 2, p. 78-84, fev. 2001.
- ETZLER, M. E.; KALSI, G.; EWING, N. N.; ROBERTS, N. J.; DAY, R. B.; MURPHY, J. B. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 10, p. 5856-5861, maio 1999.
- FÁBREGAS, J.; MUNOZ, A.; LLOVO, J.; ABALDE, J. Agglutinins in marine red algae. **IRCS Med. Sci.**, v. 12, p. 298-299, 1984.
- FAVACHO, A. R.; CINTRA, E. A.; COELHO L. C.; LINHARES, M. I. *In vitro* activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. **Biologicals**, v. 35, n. 3, p. 189-194, jun. 2007.
- FEDERLE, M. J.; BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 9, p. 1291-1299, nov. 2003.
- FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; CUNHA, T. M.; LUZ, P. B.; NASCIMENTO, K. S.; MOTA, M. R. L.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; CUNHA, F. Q.; ALENCAR, N. M. N. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 96, n. 4, p. 371-377, out. 2010.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 623-633, set. 2010.
- FLEMMING, H-C; WINGENDER, J; MAYER, C. **Physico-chemical properties of biofilms**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. 19-34 p.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. São Paulo: **Agentes antimicrobianos químicos e naturais**, n. 15, 2010.
- FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, dez. 1995.
- FUKUDA, Y.; SUGAHARA, T.; UENO, M.; FUKUTA, Y.; OCHI, Y.; AKIYAMA, K.; MIYAZAKI, T.; MASUDA, S.; KAWAKUBO, A.; KATO, K. The anti-tumor effect of *Euchema serra* agglutinin on colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Anticancer Drugs**, v. 17, n. 8, p. 943-947, set. 2006.
- GADEPALLI, R.; DHAWAN, B.; KAPIL, A.; SREENIVAS, V.; JAIS, M.; GAIND, R.; CHAUDHRY, R.; SAMANTARAY, J. C.; UDO, E. E. Clinical and molecular characteristics of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue isolates from three Indian hospitals. **J. Hosp. Infect.**, v. 73, n. 3, p. 253-263, nov. 2009.
- GALLEGO DEL SOL, F.; GÓMEZ, J.; HOOS, S.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; ENGLAND, P.; CALVETE, J. J. Energetics of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-mannose binding to the *Parkia platycephala* seed lectin and its use for MAD phasing. **Acta Cryst.**, v. F61, p. 326-331, fev. 2005.

GEURTS, R.; BISSELING, T. *Rhizobium* nod factor perception and signalling. **Plant Cell**, v. 14, n. 1, p. S239-S249, 2002.

GHOSAL, S.; CHAUDHARY, R. K. Chemical constituents of Gentianaceae XVI: antitubercular activity of *Canscora decussata* Schult. **J. Pharm. Sci.**, v. 64, n. 5, p. 888-889, maio 1975.

GIBIANSKY, M. L.; CONRAD, J. C.; JIN, F.; GORDON, V. D.; MOTTO, D. A.; MATHEWSON, M. A.; STOPKA, W. G.; ZELASKO, D. C.; SHROUT, J. D.; WONG, G. C. Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 197, out. 2010.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conserv. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 632-639, jun. 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, n. 3, p. 672-679, mar. 2012a.

GOMES, B. S.; SIQUEIRA, A. B. S.; MAIA, R. C. C.; GIAMPAOLI, V.; TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V. S.; NASCIMENTO, K. S.; LIMA, A. N.; SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVADA, B. S.; PORTO, A. L. F. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. *Braz. J. Microbiol.*, v. 43, p. 770-778, jun. 2012b.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, mar. 2002.

GUALTIERI, M.; BASTIDE, L.; VILLAIN-GUILLOT, P.; MICHAUX-CHARACHON, S.; LATOUCHE, J.; LEONETTI, J. P. In vitro activity of a new antibacterial rhodamine derivative against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Antimicrob Chemother.**, v. 58, n. 4, p. 778-783, out. 2006.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 95-108, fev. 2004.

HAMELRYCK, T. W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; DAO-THI, M. H.; STRECKER, G.; IMBERTY, A.; FERNANDEZ, E.; WYNS, L.; ETZLER, M. E. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **J. Mol. Biol.**, v. 286, n. 4, p. 1161-1177, mar. 1999.

HAN, J. W.; KLOCHKOVA, T. A.; SHIM, J. B.; YOON, K.; KIM, G. H. Isolation and characterization of a sex-specific lectin in a marine red alga, *Aglaothamnion oosumiense* Itono. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 20, p. 7283-7289, out. 2012.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, nov. 2000.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2, ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, nov-dez. 2007.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims **Ent. Exp. Appl.**, v. 80, p. 177-179, 1996.

HATCH, R. A.; SCHILLER, N. L. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 4, p. 974-977, abr. 1998.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem. Biol. Interact.**, v. 139, n. 1, p. 1-21, jan. 2002.

HOLANDA, F. R.; COELHO-DE-SOUSA, A. M.; ASSREUY, A. M. S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; PIRES, A. F.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, C. S.; CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F. Antinociceptive activity of lectins from diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, n. 9, p. 1088-1092, 2009.

HOLANDA, M. L.; MELO, V. M.; SILVA, L. M.; AMORIM, R. C.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 12, p. 1769-1773, dez. 2005.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 205, n. 1, p. 561-566, set. 1990.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 7, p. 2982-2992, jul. 2001.

HOURY, A.; GOHAR, M.; DESCHAMPS, J.; TISCHENKO, E.; AYMERICH, S.; GRUSS, A.; BRIANDET, R. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, n. 32, p. 13088-13093, ago. 2012.

HUANG, C. T.; YU, F. P.; MCFETERS, G. A.; STEWART, P. S. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 6, p. 2252-2256, jun. 1995.

HUANG, K. C. **The pharmacology of chinese herbs**. 2, ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1999.

- IMBERTY, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 2, p. 221-228, fev. 2004.
- JACQUES, A. V.; RIEGER, D. K.; MAESTRI, M.; LOPES, M. W.; PERES, T. V.; GONÇALVES, F. M.; PEDRO, D. Z.; TASCIA, C. I.; LÓPEZ, M. G.; EGEA, J.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochem. Int.**, v. 62, n. 6, p. 836-842, maio 2013.
- JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 632-637, out-dez. 2007.
- JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 80-128, jan. 1991.
- JONES, H. C.; ROTH, I. L.; SANDERS, W. M. Electron microscopic study of a slime layer. **J. Bacteriol.**, v. 99, n. 1, p. 316-325, jul. 1969.
- KAMIYA, H.; OGATA, K.; HORI, K. Isolation and characterization of a new agglutinin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. **Bot. Marina**, v. 15, n. 11, p. 537-540, 1982.
- KANG, M.; OH, J.; KANG, I.; HONG, S.; CHOI, C. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **J. Microbiol.**, v. 46, n. 6, p. 744-750, dez. 2008.
- KAPOOR, L. D. **CRC handbook of ayurvedic medicinal plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990.
- KARNCHANATAT, Aphichart. **Antimicrobial activity of lectins from antimicrobial activity of lectins from plants**. InTech, Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, 2012.
- KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 249-258, abr. 2006.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, set. 2002.
- KIM, G. H.; FRITZ, L. Gamete recognition during fertilization in a red alga, *Antithamnion nipponicum*. **Protoplasma**, v. 174, n. 1-2, p. 69-73, abr. 1993.
- KIM, G. H.; KLOCHKOVA, T. A.; YOON, K-S.; SONG, Y-S.; LEE, K. P. Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **J. Phycol.**, v. 42, n. 1, p. 86-95, fev. 2006.

KIM, G. H.; LEE, I. K.; FRITZ, L. Cell-Cell Recognition during fertilization in a red alga, *Antithamnion sparsum* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Plant Cell Physiol.**, v. 37, n. 5, p. 621-628, 1996.

KIMBLE, B.; RAMIREZ NIETO, G.; PEREZ, D. R. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. **Virolog. J.**, v. 7, p. 365, dez. 2010.

KITADA, M.; KURODA, Y.; DEZAWA, M. Lectins as a tool for detecting neural stem/progenitor cells in the adult mouse brain. **Anat. Rec. (Hoboken)**, v. 294, n. 2, p. 305-321, fev. 2011.

KLAFKE, G. B.; BORSUK, S.; GONÇALES, R. A.; ARRUDA, F. V.; CARNEIRO, V. A.; TEIXEIRA, E. H.; COELHO DA SILVA, A. L.; CAVADA, B. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; PINTO, L. S. Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from *Bauhinia variegata* L. var. *variegata* expressed in *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 115, n. 5, p. 1222-1230, nov. 2013.

KLAUSEN, M.; HEYDORN, A.; RAGAS, P.; LAMBERTSEN, L.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Mol. Microbiol.**, v. 48, n. 6, p. 1511-1524, jun. 2003.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; MCCLOUD, T. G.; TUCKER, K. D.; SHOEMAKER, R. H. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 10, p. 1732-1735, out. 2004.

KOCH, C.; HOIBY, N. Pathogenesis of cystic fibrosis. **Lancet**, v. 341, n. 8852, p. 1065-1069, abr. 1993.

KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm importance and applications. **Indian J. Biotechnol.**, v. 8, p. 159-168, abr. 2009.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; HENTATI, H.; BAKHROUF, A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microb. Pathog.**, v. 49, n. 1-2, p. 14-22, jul-ago. 2010.

KUZMA, L.; RÓZALSKI, M.; WALENCKA, E.; RÓZALSKA, B.; WYSOKINSKA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salviposione as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 31-35, jan. 2007.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; URBANO-HERNANDEZ, G.; ORTEGA-NIEBLAS, M. M.; ROBLES-BURGUEÑO, M. R.; WINZERLING, J.; VAZQUEZ-MORENO, L. Insecticidal action of PF2 lectin from *Olnya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 2, p. 689-694, jan. 2009.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. R. Soc. Med.**, v. 95, n. 41, p. 22-26, 2002.

LAU, P. C.; LINDHOUT, T.; BEVERIDGE, T. J.; DUTCHER, J. R.; LAM, J. S. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 21, p. 6618-6631, abr. 2009.

LEE, J. H.; REGMI, S. C.; KIM, J. A.; CHO, M. H.; YUN, H.; LEE, C. S.; LEE, J. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 12, p. 4819-4827, dez. 2011.

LEE, L. Y.; SHIM, J. S.; RUKAYADI, Y.; HWANG, J. K. Antibacterial activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. against foodborne pathogens. **J. Food Prot.**, v. 71, n. 9, p. 1926-1930, out. 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5, ed. New York: W.H. Freeman, 2008.

LEITE, M. P.; FASSIN Jr., J.; BAZILONI, E. M. F.; ALMEIDA, R. N.; MATTEI, R.; LEITE, J. R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 661-666, dez. 2008.

LEITE, Y. F.; SILVA, L. M.; AMORIM, R. C.; FREIRE, E. A.; DE MELO JORGE, D. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1724, n. 1-2, p. 137-145, jun. 2005.

LENZ, A. P.; WILLIAMSON, K. S.; PITTS, B.; STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 14, p. 4463-4471, jul. 2008.

LIANG, Q. L.; DAI, C. C.; JIANG, J. H.; TANG, Y. P.; DUAN, J. A. A new cytotoxic casbane diterpene from *Euphorbia pekinensis*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 514-516, dez. 2009.

LIAO, W. R.; LIN, J. Y.; SHIEH, W. Y.; JENG, W. L.; HUANG, R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, n. 7, p. 433-439, jul. 2003.

LIENER, Irvin; SHARON, Nathan; GOLDSTEIN, Irwin. **The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine**. 1st ed. Orlando, Florida: Academic Press, 1996. 600 p.

LIMA, H. C.; COSTA, F. H. F.; SAMPAIO, A. H.; NEVES, S. A.; BENEVIDES, N. M. B.; TEIXEIRA, D. I. A.; ROGERS, D. J.; FREITAS, A. L. P. Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **J. Appl. Phycol.**, v. 10, n. 8, p. 153-162, 1998.

LIMA, M. E.; CARNEIRO, M. E.; NASCIMENTO, A. E.; GRANGEIRO, T. B.; HOLANDA, M. L.; AMORIM, R. C.; BENEVIDES, N. M. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 16, p. 6414-6419, ago. 2005.

LIMA, R. F.; CRIDDLED, N.; SOARES, P. M. G.; RIBEIRO, S. P.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; ASSREUY, A. M. S. *Bryothamnion seaforthii* lectin relaxes vascular smooth muscle: involvement of endothelium and NO synthase. **Protein Pept. Lett.**, v. 17, n. 3, p. 305-310, mar. 2010.

LIS, H.; SHARON, N. **Lectins in higher plants**. New York: The Biochemistry of Plants, 1981. 371-447 p.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, n. 4, p. 582-610, out. 2009.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9-36, mar. 1998.

LORIS, R.; VAN WALLE, I.; DE GREVE, H.; BEECKMANS, S.; DEBOECK, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **J. Mol. Biol.**, v. 335, n. 5, p. 1227-1240, jan. 2004.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; CASTRO, M. M. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 56, n. 2, p. 84-96, jun. 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, maio 2002.

MACKINTOSH, E. E.; PATEL, J. D.; MARCHANT, R. E.; ANDERSON, J. M. Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 78, n. 4, p. 836-842, set. 2006.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 34-39, jan. 2001.

MAIRA-LITRÁN, T.; ALLISON, D. G.; GILBERT, P. Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, n. 2, p. 243-247, fev. 2000.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1371-1391, out. 2007.

MARCHEV, A.; HAAS, C.; SCHULZ, S.; GEORGIEV, V.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Sage in vitro cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances. **Biotechnol Lett.**, out. 2013.

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 7-15, out. 2005.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 337-348, nov. 1971.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, n. 2-3, p. 207-212, ago. 2004.

MARZZOCO, A; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3, ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATSUBARA, K.; SUMI, H.; HORI, K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. **Experientia**, v. 52, n. 6, p. 540-543, jun. 1996.

MAYER, C.; MORITZ, R.; KIRSCHNER, C.; BORCHARD, W.; MAIBAUM, R.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 26, n. 1, p. 3-16, out. 1999.

McFETERS, G. A. **Biofilm development and its consequences**. Berlin: Microbial adhesion and aggregation, 1984. 109-124 p.

McNEIL, M. J.; PORTER, R. B.; WILLIAMS, L. A.; RAINFORD, L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. **Nat. Prod. Commun.**, v. 5, n. 8, p. 1301-1306, ago. 2010.

MEAGHER, J. L.; WINTER, H. C.; EZELL, P.; GOLDSTEIN, I. J.; STUCKEY, J. A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**, v. 15, n. 10, p. 1033-1042, set. 2005.

MEDINA-RAMIREZ, G.; GIBBS, R. V.; CALVETE, J. J.; CARPENTER, B. G. Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B-triquetrum* from the Caribbean Sea. **Eur. J. Phycol.**, v. 42, n. 1, p. 105-112, jul. 2007.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **Vet. J.**, v. 171, n. 3, p. 398-407, maio 2006.

MELO, V. M. M.; MEDEIROS, D. A.; RIOS, F. J. B.; CASTELAR, L. I. M.; CARVALHO, A. F. F. U. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Bot. Mar.**, v. 40, p. 281-284, 1997.

MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Sci.**, v. 169, n. 3, p. 629-639, set. 2005.

MIDDLETON Jr, Elliott; CHITHAN, Kandaswami. **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer**. In: Harborne Jeffrey, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall, 1993.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, 165-199, out. 2001.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, n. 10, p. 4769-807, out. 2011.

MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithson Contrib.**, Knowl XII, p. 89-90, 1860.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol.**, v. 17, n. 2, p. 73-87, fev. 2009.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J.O. **Fixação Biológica do Nitrogênio**. Lavras: Microbiologia e Bioquímica do Solo, Editora UFLA, 2000. 729 p.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biol. Plant**, v. 26, p. 113-120, 1984.

MORI, T.; O'KEEFE, B. R.; SOWDER, R. C.; BRINGANS, S.; GARDELLA, R.; BERG, S.; COCHRAN, P.; TURPIN, J. A.; BUCKHEIT, R. W. Jr.; MACMAHON, J. B.; BOYD, M. R. Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 10, p. 9345-9353, mar. 2005.

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, n. 6, p. 824-835, jun. 2007.

NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 65, n. 1, p. 52-59, jan. 2011.

NASCIMENTO, A. S.; GONDIM, A. C.; CAJAZEIRAS, J. B.; CORREIA, J. L.; PIRES, A. D. E. F.; NASCIMENTO, K. S.; DA SILVA, A. L.; NAGANO, C. S.;

ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **J. Mol. Recognit.**, v. 25, n. 12, p. 657-664, dez. 2012.

NASCIMENTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M. Incidence of *Escherichia coli* O157: H7 in foods. **Hig. Aliment**, v. 14, n. 70, p. 32-35, mar. 2000.

NASCIMENTO-NETO, L. G.; CARNEIRO, R. F.; SILVA, S. R.; SILVA, B. R.; ARRUDA, F. V. S.; CARNEIRO, V. A.; NASCIMENTO, K. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; SILVA JR., V. A.; PORTO, A. L. F.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S. Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Mar Drugs.**, v. 10, n. 9, p. 1936-1954, set. 2012.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T.I.; AZEVEDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potencial virulence factors of *Candida tropicalis* isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v. 169, n.3, p.175-182, mar. 2010.

NETO, L. G.; PINTO, L. S.; BASTOS, R. M.; EVARISTO, F. F.; VASCONCELOS, M. A.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V.; PORTO, A. L.; LEAL, R. B.; JÚNIOR, V. A.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of the Lectin of *Bauhinia variegata* and its recombinant isoform on surgically induced skin wounds in a murine model. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9298-9315, nov. 2011.

NEVES, S. A.; DIAS-BARUFF, M.; FREITAS, A. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflamm. Res.**, v. 50, n. 10, p. 486-90, out. 2001.

NEVES, S. A.; FREITAS, A. L.; SOUSA, B. W.; ROCHA, M. L.; CORREIA, M. V.; SAMPAIO, D. A.; VIANA, G. S. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, n. 1, p. 127-134, jan. 2007.

NÓBREGA, R. B.; ROCHA, B. M.; GADELHA, C. A.; SANTI-GADELHA, T.; PIRES, A. F.; ASSREUY, A. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; DELATORRE, P. Structure of *Dioclea virgata* lectin: relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 900-906, mar. 2012.

NOLVACHAI, Y.; MARRIOTT, P. J. GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends. **J Sep Sci.**, v. 36, v. 1, p. 20-36, jan. 2013.

NOTERMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: A review. **Biofouling**, v. 5, n. 1-2, p. 21-36, 1991.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, v. 20, p. 462-466, maio 1960.

OKEKE, I. N.; LAXMINARAYAN, R.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JENKINS, P.; O'BRIEN, T. F.; PABLOS-MENDEZ, A.; KLUGMAN, K. P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. **Lancet Infect. Dis.**, v. 5, n. 8, p. 481-493, ago. 2005.

OLIVEIRA, J. T. A.; RIOS, F. J. B.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, F. V. A.; NOJOSA, G. B. A.; MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, n. 11, p. 1737-1747, nov. 2004.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXIERA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 371-376, mar. 2008.

OLIVEIRA, M. R.; NAPIMOGA, M. H.; COGO, K.; GONÇALVES, R. B.; MACEDO, M. L.; FREIRE, M. G.; GROppo, F. C. Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. **J. Oral Sci.**, v. 49, n. 2, p. 141-145, jun. 2007.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2003. 64 p.

OMOKAWA, Y.; MIYAZAKI, T.; WALDE, P.; AKIYAMA, K.; SUGAHARA, T.; MASUDA, S.; INADA, A.; OHNISHI, Y.; SAEKI, T.; KATO, K. In vitro and in vivo anti-tumor effects of novel Span 80 vesicles containing immobilized *Eucheuma serra* agglutinin. **Int. J. Pharm.**, v. 389, n. 1-2, p. 157-167, abr. 2010.

OOI, L. S. M.; HO, W. S.; NGAI, K. L. K.; TIAN, L.; CHAN, P. K. S.; SUN, S. S. M.; OOI, V. E. C. *Narcissus tazetta* lectin shows strong inhibitory effects against respiratory syncytial virus, influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) and B viruses. **J. Biosci.**, v. 35, n. 1, p. 95-103, mar. 2010.

PAIVA, F. P. T. **Quorum sensing em *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. **Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants**. Badajoz: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2010. 396-406 p.

PATRA, B.; SCHLUTTENHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1829, n. 11, p. 1236-1247, nov. 2013.

PARSEK, M. R., SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 677-701, jun. 2003.

PARSEK, M. R., Greenberg, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 13, n.1, p. 27-33, jan. 2005.

PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; RODRIGUES, M.; MORAIS, E. K. L.; MACIEL, M. A. M. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 4, p. 521-528, out-dez. 2007.

PERCIVAL, Steven; KNOTTENBELT, Derek; COCHRANE, Christine. **Biofilms and veterinary medicine**. Eds. Hardcover: Springer, 2011. 257 p.

PEREIRA-JÚNIOR, F. N.; SILVA, H. C.; FREITAS, B. T.; ROCHA, B. A. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; LEAL, R. B.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Purification and characterization of a mannose/*N*-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **J. Mol. Recognit.**, v. 25, n. 8, p. 443-449, ago. 2012.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, 2004. 1-10 p.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant. Physiol.**, v. 109, n. 2, p. 347-352, out. 1995.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 1, p. S3-S14, 2006.

PHILLIPS, M. A.; LEÓN, P.; BORONAT, A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends Plant Sci.**, v.13, n.12, p. 619-23, dez. 2008.

PIDHATIKA, B.; MÖLLER, J.; BENETTI, E. M.; KONRADI, R.; RAKHMATULLINA, E.; MÜHLEBACH, A.; ZIMMERMANN, R.; WERNER, C.; VOGEL, V.; TEXTOR, M. The role of the interplay between polymer architecture and bacterial surface properties on the microbial adhesion to polyoxazoline-based ultrathin films. **Biomaterials**, v. 31, n. 36, p. 9462-9472, dez. 2010.

PINTO, N. V.; CAVADA, B. S.; BRITO, L. F.; PEREIRA, R. I.; DA SILVA, M. T.; CASTRO, R. R.; DE FREITAS PIRES, A.; ASSREUY, A. M. Effects of *Canavalia* lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 713-22, jun. 2013

PINTO, V. P. T.; TEIXEIRA, E. H.; TEIXEIRA, A. H.; CARNEIRO, V. A.; CRISTINO-FILHO, G.; DUS, D.; DEBRAY, H.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Lectins isolated from Brazilian beans as markers of membrane glycoconjugates of human colon cancer cells. **J. Cancer Res. Exp. Oncol.**, v. 2, n. 5, p. 54-59, dez. 2010.

PINTO, V. P. T.; DEBRAY, H.; DUS, D.; TEIXEIRA, E. H.; DE OLIVEIRA, T. M.; CARNEIRO, V. A.; TEIXEIRA, A. H.; FILHO, G. C.; NAGANO, C. S.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as tools to

differentiate human colon carcinoma cells. **Adv. Pharmacol. Sci.**, v. 2009, p. 1-6, set. 2009.

PIRES, A. F.; ASSREUY, A. M. S.; Lopes, E. A. B.; Celedônio, N. R.; SOARES, C. E. A.; RODRIGUES, N. V. F.; SOUSA, P. L.; BENEVIDES, R. G.; Nagano, C. S.; CAVADA, B. S.; Leal-Cardoso, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 27, p. 201-209, abr. 2013.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, out. 1998.

POST, J. C.; HILLER, N. L.; NISTICO, L.; STOODLEY, P.; EHRLECH, G. D. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 15, n. 5, p. 347-351, out. 2007.

POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. **Science**, v. 283, n. 5409, p. 1837-1839, mar. 1999.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here?. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 4, p. 18-22, nov. 2004.

PUSTZAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge: *Cambridge University Press*, 1991.

QUAVE, C. L.; PLANO, L. W. R.; PANTUSO, T.; BENNETT, B. C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilme formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, n. 3, p. 418-428, ago. 2008.

RABE, T.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 56, n. 1, p. 81-87, mar. 1997.

RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIC, P. D.; STOJANOVIC-RADIC, Z. Z.; STOJANOVIC, N. M. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, n. 7, p. 932-952, 2013.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 11, p. 5459-5463, nov. 2002.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL. M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant. Sci.**, v. 160, n. 4, p. 739-744, mar. 2001.

RICKARD, A. H.; PALMER, R. J. Jr.; BLEHERT, D. S.; CAMPAGNA, S. R.; SEMMELHACK, M. F.; EGLAND, P. G.; BASSLER B. L.; KOLENBRANDER P. E. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Mol. Microbiol.**, v. 60, n. 6, p. 1446-1456, jun. 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327 p.

ROCHA, B. A.; DELATORRE, P.; OLIVEIRA, T. M.; BENEVIDES, R. G.; PIRES, A. F.; SOUSA, A. A.; SOUZA, L. A.; ASSREUY, A. M.; DEBRAY, H.; DE AZEVEDO, W. F. JR.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 806-816, maio 2011.

RODRIGUES, F. A.; BERTOLDI, A. D. The profile of antimicrobial utilization in a private hospital. **Cien. Saúde Colet.**, v. 15, n. 1, p. 1239-1247, jun. 2010.

ROGERS, D. J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, v. 260/261, n. 1, p. 589-593, jun. 1993.

ROGERS, D. J.; LOVELESS, R. W. Electron microscopy of human erythrocytes agglutinated by lectin from *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* and pseudo-haemagglutinin from *Ascophyllum nodosum*. **J. Appl. Phycol.**, v. 3, n. 1, p. 83-86, mar. 1991.

ROGERS, D. J.; SWAIN, L.; CARPENTER, B. G.; CRITCHLEY, A. T. Binding of N-acetyl-D-galactosamine by lectins from species of green marine algae genus, *Codium*. **Clin. Biochem.**, v. 10, p. 162-165, 1994.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 23, n. 1, p. 73-98, mar. 2009.

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Nat. Prod. Rep.**, v. 16, n. 5, p. 565-574, out. 1999.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and application. **Glycoconj. J.**, v. 18, n. 8, p. 589-613, ago. 2001.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 34-49, jul-dez. 2004.

SÁ, R. A.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; BIEBER, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Sci. Technol.**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, fev. 2009.

SAGINUR, R.; SUTH, K. N. *Staphylococcus aureus* bacteraemia of unknown primary source: Where do we stand?. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, n. 1, p. 21-25, nov. 2008.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, jul. 1998.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; COSTA, F. H. F.; RAMOS, M. V. A new isolation procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **J. Appl. Phycol.**, v. 10, p. 539-546, set. 1999.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; FARIAS, W. R. L. New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **J. Appl. Phycol.**, v. 14, n. 6, p. 489-496, dez. 2002.

SAMPIETRO, A. R.; ISLA, M. A.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An n-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. fruits. **Plant Sci.**, v. 160, n. 4, p. 659-67, mar. 2001.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.**, v.34, n.1, p. 3-21, maio 2001.

SANTANA, G. M. S.; ALBUQUERQUE, L. P.; SIMÕES, D. A.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Isolation of a lectin from *Opuntia ficus indica* cladodes. **Acta Hort.**, v. 811, p. 281-286, 2009.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 350, n. 4, p. 1050-1055, dez. 2006.

SANTI-GADELHA, T.; ROCHA, B. A. M.; GADELHA, C. A. A.; SILVA, H. C.; CASTELLON, R. E. R.; GONÇALVES, F. J. T.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H.; DE SOUZA, A. J. F.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, J. L.; JOAZEIRO, P. P.; CAVADA, B. S. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 103, n. 1, p. 15-22, maio 2012.

SANTOS, R.I. **Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários**. Porto Alegre/Florianópolis: Farmacognosia – da planta ao medicamento, 2002. 333-365 p.

SARDAN, Y. C.; ZARAKOLU, P.; ALTUN, B.; YILDIRIM, A.; YILDIRIM, G.; HASCELİK, G.; UZUN, O. A cluster of nosocomial *Klebsiella oxytoca* bloodstream infections in a University Hospital. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 25, n. 10, p. 878-882, out. 2004.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 4, p. 1140-1154, fev. 2002.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiol.**, v.7, n. 8, p. 979-990, ago. 2012.

SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 92, n. 2-3, p. 325-329, jun. 2004.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Dev.**, v.15, n. 12, p.1468-1480, jun. 2001.

SEO, K. A.; KIM, H.; KU, H. Y.; AHN, H. J.; PARK, S. J.; BAE, S. K.; SHIN, J. G.; LIU, K. H. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. **Chem. Biol. Interact.**, v. 174, p. 141-146, ago. 2008.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J. Mol. Biol.**, n. 2, v. 267, p. 433-445, mar. 1997.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, jun. 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 46, n. 4927, p. 227-234, out. 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, n. 4053, p. 949-959, set. 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, v. 14, n. 4, p. 3198-3208, nov. 1990.

SHCHEPIN, R.; HORNBY, J. M.; BURGER, E.; NIESSEN, T.; DUSSAULT, P. Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. **Chem Biol**, v. 10, n. 8, p. 743-750, ago. 2003.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 72-78, jan-jun. 2009.

SILVA, H. C.; NAGANO, C. S.; SOUZA, L. A. G.; NASCIMENTO, K. S.; ISÍDRO, R.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SAMPAIO, A. H.; ASSREUY, A. M. S.; PIRES, A. F.; DAMASCENO, L. E. A.; MARQUES-DOMINGOS, G. F.O.; CAVADA, B. S. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochem.**, v. 47, n. 12, p. 2347-2355, dez. 2012.

SILVA, L. M.; LIMA, V.; HOLANDA, M. L.; PINHEIRO, P. G.; RODRIGUES, J. A.; LIMA, M. E.; BENEVIDES, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 33, n. 5, p. 830-835, maio 2010.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia, da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/UFSC, 2003. 920 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/UFSC, 2007. 1102 p.

SIMÕES, M.; CARVALHO, H.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Studies on the behaviour of *Pseudomonas fluorescens* biofilms after ortho-phthaldehyde treatment. **Biofouling**, v. 19, n. 3, p. 151-157, jun. 2003.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 43, n. 4, p. 573-583, maio 2010.

SINGH, R.; RAY, P.; DAS, A.; SHARMA, M. Enhanced production of exopolysaccharide matrix and biofilm by a menadione-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, n. 5, p. 521-527, maio 2010.

SINGH, T.; WU, J. H.; PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. M.; ALVAREZ, R. A.; BLIXT, O.; WU, A. M. Carbohydrate specificity of an insecticidal lectin isolated from the leaves of *Glechoma hederacea* (ground ivy) towards mammalian glycoconjugates. **Biochem. J.**, v. 393, n. 1, p. 331-341, jan. 2006.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potencial Health Impacts of Excessive Flavonoid Intake. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, ago. 2000.

SMART, J. D. Lectin-mediated drug delivery in the oral cavity. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, n. 4, p. 481-489, mar. 2004.

SMYRNIOTOPOULOS, V.; VAGIAS, C.; RAHMAN, M. M.; GIBBONS, S.; ROUSSIS, V. Structure and antibacterial activity of brominated diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. **Chem. Biodivers.**, v. 7, n. 1, p. 186-195, jan. 2010.

SOBEL, J. D. The emergence of non-albicans *Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 8, n. 6, p. 427-433, nov. 2006.

SOHN, H. Y.; SON, K. H.; KWON, C. S.; KWON, G. S.; KANG, S. S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora favescescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**, v. 11, n. 7-8, p. 666-672, nov. 2004.

SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, R. N.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene, α , β -epoxy-carvone in mice. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, p. 170-175, abr-jun. 2007.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 65, n. 5, p. 696-702, ago. 2011.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Bacteria - host communication: the language of hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 15, p. 8951-8956, jul. 2003.

STANIEK, A.; BOUWMEESTER, H.; FRASER, P. D.; KAYSER, O.; MARTENS, S.; TISSIER, A.; VAN DER KROL, S.; WESSJOHANN, L.; WARZECHA, H. Natural products - modifying metabolite pathways in plants. **Biotechnol J.** v. 8, n. 10, p. 1159-1171, out. 2013.

STEWART, P. Diffusion in biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 5, p. 1485-1491, mar. 2003.

STEWART, P. S. Mini-review: convection around biofilms. **Biofouling**, v. 28, n. 2, p. 187-198, fev. 2012.

STILLMARK, H. P. Ueber ricin, ein giftiges ferment aus dem samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. **Arbeiten des Pharmakologischen Institutes zu Dorpat**, v. 3, p. 59-151, 1888.

STOLL, B. J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A. A.; WRIGHT, L. L.; CARLO, W. A.; EHRENKRANZ, R. A.; LEMONS, J. A.; DONOVAN, E. F.; STARK, A. R.; TYSON, J. E.; OH, W.; BAUER, C. R.; KORONES, S. B.; SHANKARAN, S.; LAPTOOK, A. R.; STEVENSON, D. K.; PAPILE, L.; POOLE, W. K. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v. 110, n. 2, p. 285-291, ago. 2002.

SUGAHARA, T.; OHAMA, Y.; FUKUDA, A.; HAYASHI, M.; KAWAKUBO, A.; KATO, K. The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology**, v. 36, n. 1-3, p. 93-99, jul. 2001.

SUMMER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with Concanavalin A. **J. Bacteriol.**, v. 32, n. 2, p. 227-237, ago. 1936.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 407, n. 2, p. 241-247, nov. 2002.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3-9, jan. 2001.

SYTNIKOV, D.M. **How to Increase the Productivity of the Soybean-Rhizobial Symbiosis**. Croatia: A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships, 2013. 51-82 p.

TAKEBE, Y.; SAUCEDO, C. J.; LUND, G.; UENISHI, R.; HASE, S.; TSUCHIURA, T.; KNETEMAN, N.; RAMESSAR, K.; TYRRELL, D. L.; SHIRAKURA, M.; WAKITA, T.; MCMAHON, J. B.; O'KEEFE, B. R. Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent in vitro and in vivo activity against hepatitis C virus. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64449, maio 2013.

TANABE, H.; KAMISHIMA, H.; KOBAYASHI, Y. Inhibitor effect of red alga lectin and skipjack fat on the growth of the red tide plankton *Chattonella antiqua*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 75, n. 5, p.387-388, 1993.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; DE OLIVEIRA, T. M.; CUNHA, R. M.; HAVT, A.; MARTINS, J. L.; PINTO, V. P.; GONÇALVES, R. B.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of Streptococci binding to enamelacquired pellicle by plant lectins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, n. 1, p. 111-116, jul. 2006.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; DE OLIVEIRA, T. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SOUZA, J. B.; HAVT, A.; PINTO, V. P.; GONÇALVES, R. B.; FARIAS, W. R.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. *In vitro* inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, n. 4, p. 1001-1006, out. 2007.

TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V. S.; NASCIMENTO, K. S.; CARNEIRO, V.A.; NAGANO, C. S.; SILVA, B. R.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. **Biological Applications of Plants and Algae Lectins An Overview**. InTech, Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, 2012.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophys. Chem.**, v. 122, n. 2, p. 101-113, jul. 2006.

URZÚA, A.; JARA, F.; TOJO, E.; WILKENS, M.; MENDOZA, L.; REZENDE, M. C. A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudates of *Haplopappus uncinatus*. **J. Ethnopharm.**, v. 103, n. 2, p. 297-301, jan. 2006.

URZÚA, A.; REZENDE, M. C.; MASCAYANO, C.; VÁSQUEZ, L. A structure activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 882-891, abr. 2008.

VALAPERTA, R.; TEJADA, M. R.; FRIGERIO, M.; MORONI, A.; CIULLA, E.; CIOFFI, S.; CAPELLI, P.; COSTA, E. *Staphylococcus aureus* nosocomial infections: the role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system. **New Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 223-232, jul. 2010.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Plan. Sci.**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN EIJSDEN, R.; DÍAZ, C. L.; DE PATER, B. S.; KIJNE, J. W. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. **Plant. Mol. Biol.**, v. 29, n. 3, p. 431-439, nov. 1995.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-262, jan. 1991.

VAN RHIJN, P.; GOLDBERG, R. B.; HIRSCH, A. M. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. **Plant Cell**, v. 10, n. 8, p. 1233-1250, ago. 1998.

VANDERLEI, E. S.; PATOILLO, K. K.; LIMA, N. A.; LIMA, A. P.; RODRIGUES, J. A.; SILVA, L. M.; LIMA, M. E.; LIMA, V.; BENEVIDES, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 10, n. 9, p. 1113-1118, set. 2010.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 385-403, set. 2004.

VASCONCELOS, M. A.; CUNHA, C. O.; ARRUDA, F. V. S.; CARNEIRO, V. A.; MERCANTE, F. M.; NETO, L. G. N.; SOUSA, G. S.; ROCHA, B. A. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; DOS SANTOS, R. P. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds (ConBr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici in vitro*. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5244-5254, maio 2012.

VASCONCELOS, M. A.; CUNHA, C. O.; ARRUDA, F. V. S.; CARNEIRO, V. A.; BASTOS, R. M.; MERCANTE, F. M.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; DOS SANTOS, R. P.; TEIXEIRA, E. H. Effect of Leguminous Lectins on the Growth of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5792-5803, maio 2013.

VIANA, G. S. B.; FREITAS, A. L. P.; LIMA, M. M. L.; VIEIRA, L. A.; ANDRADE, M. C.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 6, p. 713-722, jun. 2002.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar-abr. 2006.

VIEIRA, L. A. P.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; SILVA, D. C.; VIANA, G. S. B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 7, p. 1071-1079, jul. 2004.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R.; Heat tolerance in plants: An overview. **Environ. Exp. Bot.**, v. 61, n. 3, p. 199-233, dez. 2007.

WANG, R.; KHAN, B. A.; CHEUNG, G. Y.; BACH, T. H.; JAMESON-LEE, M.; KONG, K. F.; QUECK, S. Y.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 1, p. 238-248, jan. 2011.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825-826, maio 1952.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **J. Bacteriol.**, v.182, n. 10, p. 2675-2679, maio 2000.

WEBER, K.; SOHR, R.; SCHULZ, B.; FLEISCHHACKER, M.; RUHNKE, M. Secretion of E,E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 5, p. 1859-1861, maio 2008.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 4, p. 365-404, ago. 2001.

WIDGEROW, S. Persistence of the chronic wound – implicating biofilm. **Wound Healing Southern Africa**, v. 1, n. 2, p. 5-7, 2008.

WILKING, J. N.; ZABURDAEV, V.; VOLDER, M.; LOSICK, R.; BRENNER, M. P.; WEITZ, D. A. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 3, p. 848-852, jan. 2013.

WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; BENNETT, M. E.; WOLCOTT, B. M.; GOGOKHIA, L.; COSTERTON, J. W.; DOWD, S. E. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. **J. Wound Care**, v. 19, n. 2, p. 45-52, fev. 2010.

WOLCOTT, R. D.; COSTERTON, J. W.; RAOULT, D.; CUTLER, S. J. The polymicrobial nature of biofilm infection. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, n. 2, p. 107-112, fev. 2013.

WONG, J. H.; NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; YE, X. J.; WANG, H. X.; LAM, S. K.; LIN, P.; CHAN, Y. S.; FANG, E. F.; NGAI, P. H. K.; XIA, L. X.; YE, X. Y.; JIANG, Y.; LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 4, p. 1221-1235, jul. 2010.

WONG, J. H.; WONG, C. C.; NG, T. B. Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, n. 5, p. 808-813, mar. 2006.

WOOD-CHARLSON, E. M.; HOLLINGSWORTH, L. L.; KRUPP, D. A.; WEIS, V. M. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. **Cell. Microbiol.**, v. 8, n. 12, p. 1985-1993, dez. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Wound Healing Managements. Disponível em: http://www.who.int/hac/techguidance/tools/guidelines_prevention_and_management_wound_infection.pdf. Acesso em: 20 set. 2013.

XU, K. D.; MCFETERS, G. A.; STEWART, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 547-549, mar. 2000.

YA, C; GAFFNEY, S. H; LILLEY, T. H; HASLAM, E. **Carbohydrate-polyphenol complexation**. New York: Chemistry and significance of condensed tannins, Plenum Press, 1988. 553 p.

YENESEW, A.; DERESE, S.; MIDIWO, J. O.; BII, C. C.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burttii*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 469-472, jul. 2005.

YOON, K. S.; LEE, K. P.; KLOCHKOVA, T. A.; KIM, G. H. Molecular characterization of the lectin, Bryohealin, involved in protoplast regeneration of the marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **J. Phycol.**, v. 44, n. 1, p. 103-112, fev. 2008.

ZHANG, L.; MAH, T. F. The involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 13, p. 4447-4452, jul. 2008.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev.**, v. 3, n. 1, p. 1-7, fev. 2008.

Capítulo III

EFEITO DE LECTINAS ISOLADAS DE LEGUMINOSAS E ALGAS SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS RELACIONADAS A INFECÇÕES¹

3.1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos são capazes de crescer e aderir a diversas superfícies formando comunidades complexas conhecidas como biofilmes. Sob a forma de biofilmes as células crescem em agregados multicelulares sendo incorporados em uma matriz extracelular produzida por elas mesmas (HALL-STOODLEY; STOODLEY 2009). Além disso, sabe-se que estas comunidades exibem um fenótipo distinto relacionado diretamente à transcrição de genes, diferenciação no crescimento celular e resistência a agentes antimicrobianos (KAJIYAMA *et al.*, 2009).

A associação de micro-organismos em biofilmes é responsável por grandes impactos na área da saúde, estando associados diretamente a diversas doenças como otites crônicas, amigdalite, fibrose cística, doenças periodontais e infecções urinárias (CONNELL *et al.*, 1997; OPPERMANN *et al.*, 2010; HØIBY, 2011). Além disso, os micro-organismos podem aderir e desenvolver biofilmes utilizando como superfície de adesão implantes médicos, tais como cateteres, articulações artificiais, válvulas cardíacas, lentes de contato. Em muitos casos, devido à sua maior resistência aos agentes antimicrobianos, a única opção de tratamento é a remoção dos implantes (MAH; O'TOOLE 2001; DOLAN 2002).

Os micro-organismos em biofilmes são menos sensíveis aos biocidas e antibióticos quando comparados com as células planctônicas, dificultando o tratamento das infecções e limitando as opções terapêuticas (STEWART, 2002). Assim, existe um apelo da sociedade pela busca de novos compostos capazes de prevenir ou ainda erradicar os biofilmes. Nos últimos anos moléculas como as lectinas têm sido apontadas como compostos ativos contra bactérias e fungos tanto na forma planctônica como em biofilmes (PAIVA *et al.*, 2010, TEIXEIRA *et al.*, 2007).

¹ Trabalho recentemente submetido para publicação como: Mayron A. Vasconcelos, Francisco V. S. Arruda, Victor A. Carneiro, Helton C. Silva, Kyria S. Nascimento, Alexandre H. Sampaio, Benildo S. Cavada, Edson H. Teixeira, Mariana Henriques, Maria Olivia Pereira. Effect of algae and plant lectins on biofilm-associated infections. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.

Lectinas são proteínas, ou glicoproteínas, de origem não imune que se ligam reversivelmente e especificamente a carboidratos (VAN DAMME *et al.*, 1995). Embora as lectinas tenham sido primeiramente encontradas em plantas, estas podem ocorrer em todas as classes e famílias de organismos, desde vírus, bactérias até organismos mais complexos como mamíferos (AGRAWAL *et al.*, 2001; STRATHMANN *et al.*, 2002; BISWAS *et al.*, 2009). Esta classe de proteínas é capaz de decifrar o glicocódigo através de interações complexas nas superfícies celulares, desempenhando importantes papéis em vários processos biológicos, tais como infecções, comunicação e crescimento celular (PUSZTAI *et al.*, 2008). Devido à sua capacidade de se ligar e reconhecer carboidratos de maneira específica, as lectinas são capazes de desempenhar diversas atividades biológicas (SINGH *et al.*, 2007; KIMBLE *et al.*, 2010; KITADA *et al.*, 2011).

Além disso, lectinas podem reconhecer carboidratos na superfície celular e interagir com os polissacarídeos da parede celular e/ou glicoconjugados na membrana das células (SHARON; LIS, 1995). Em micro-organismos também podem interagir com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) ou com sua matriz extracelular (AGRAWAL *et al.*, 2001; STRATHMANN *et al.*, 2002; BISWAS *et al.*, 2009). Algumas lectinas isoladas de plantas e algas possuem atividade antimicrobiana e são capazes de interferir na formação dos biofilmes (TEIXEIRA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2006; ISLAM *et al.*, 2009; LAKHTIN *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2010).

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade *in vitro* de um conjunto de lectinas, isoladas de sementes de leguminosas e de algas vermelhas, contra micro-organismos de relevância clínica (bactérias e leveduras) pela avaliação da sua capacidade de interferir sobre o crescimento microbiano e sob a formação do biofilme.

3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade das lectinas isoladas de sementes *Dioclea megacarpa*, *Dioclea rostrata*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea violacea*, *Cratylia floribunda*, *Vatairea macrocarpa*, *Bauhinia bauhinioides*, *Luetzelburgia auriculata* e das algas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* e *Hypnea musciformis* de inibir ou interferir no crescimento planctônico das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus*

epidermidis CECT231 e *Staphylococcus aureus* JKD 6008; Gram-negativas *Klebsiella oxytoca* ATCC13182 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; e leveduras *Candida albicans* ATCC90028 e *Candida tropicalis* ATCC750;

- Avaliar a inibição da formação de biomassa dos biofilmes formados pelas bactérias e leveduras utilizando as lectinas isoladas de leguminosas e algas vermelhas;
- Avaliar o potencial das lectinas de leguminosas e algas vermelhas em reduzir o número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos biofilmes formados pelas bactérias e leveduras.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram: *Staphylococcus epidermidis* CECT231 e *Staphylococcus aureus* JKD 6008, *Klebsiella oxytoca* ATCC13182, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145, *Candida albicans* ATCC90028 e *Candida tropicalis* ATCC750, obtidos da Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e American Type Culture Collection (ATCC). *Staphylococcus aureus* JKD 6008 é um isolado clínico que possui resistência à vancomicina (Howden *et al.*, 2008).

3.3.2 Purificação das lectinas

As lectinas de leguminosas *Dioclea megacarpa* (DML), *Dioclea rostrata* (DRL), *Dioclea guianensis* (DGL), *Dioclea violacea* (DVL), *Cratylia floribunda* (CFL), *Vatairea macrocarpa* (VML), *Bauhinia bauhinioides* (BBL), *Luetzelburgia auriculata* (LAA) e de algas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Hypnea musciformis* (HML) foram isoladas através de técnicas cromatográficas diversas (OLIVEIRA *et al.*, 1991; VASCONCELOS *et al.*, 1991; AINOUS *et al.*, 1995; CAVADA *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1997; CAVADA *et al.*, 1998; NAGANO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2010).

3.3.3 Condições de cultivo

As bactérias foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA; Liofilchem, Itália) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento, uma colônia isolada foi removida e inoculada em 10 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália) e incubada durante 18 h a 37 °C sob agitação constante de 120 rpm.

Posteriormente ao crescimento, a concentração de células para de cada inóculo foi ajustada para 2×10^6 células/mL, através de turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria. Para as leveduras, as condições de cultivo foram as mesmas mencionadas anteriormente, no entanto os meios de cultura utilizados foram Sabouraud Dextrose Agar e meio líquido Sabouraud Dextrose (SDA e SDB; Liofilchem, Itália, respectivamente). As concentrações de cada inóculo foram ajustadas para 2×10^6 células/mL utilizando câmara de Neubauer.

3.3.4 Atividade das lectinas sobre o crescimento planctônico dos micro-organismos

O efeito das lectinas sobre o crescimento planctônico foi realizada segundo o teste de microtitulação em placas de poliestireno de 96 poços de fundo em “U”. Cada lectina foi diluída em meio de cultura (TSB e SDB para as bactérias e leveduras, respectivamente) nas concentrações de 500 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, cada poço da microplaca foi preenchido com 100 μL de meio de cultura contendo as diferentes concentrações das lectinas. Por fim foram adicionados 100 μL de células (previamente ajustadas a 2×10^6 células/mL) obtendo um volume final em cada poço de 200 μL . As placas foram então incubadas a 37 °C, durante 24 horas a 120 rpm e posteriormente a densidade óptica de cada poço foi registrada a 640 nm utilizando um leitor de ELISA automático (Synergy TM HT Multi-Detection Microtiter Reader) para avaliar o crescimento microbiano.

3.3.5 Ação das lectinas sob a formação dos biofilmes

A metodologia utilizada para o crescimento dos biofilmes baseou-se no teste em placas de microtitulação desenvolvido por Stepanovic e colaboradores (2000), com algumas modificações. As placas de polipropileno de 96 poços estéreis foram preparadas utilizando um procedimento semelhante ao utilizado no ensaio de crescimento planctônico (concentração inicial de células e de lectina). Todas as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas a 120 rpm para o desenvolvimento do biofilme. Após o crescimento do biofilme, na presença e ausência de lectinas, o conteúdo de cada poço foi removido e os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 μL /poço de água estéril com o objetivo de remover células fracamente aderidas.

Após a lavagem foram adicionados, aos biofilmes bacterianos, 200 μL de água estéril em cada poço e as placas foram colocadas em banho ultrassônico (Sonicor

SC-52, Sonicor Instruments, Copaique, NY, USA, operando a 50 kHz, durante 6 minutos). Para os biofilmes de levedura, cada poço foi raspado vigorosamente com uma pipeta (ambos os procedimentos já são bem estabelecidos em laboratório). Diluições seriadas de maneiras decimais foram feitas a partir da suspensão obtida e em seguida inoculadas em SDA ou TSA, dependendo do micro-organismo. As placas contendo foram incubadas durante 24 horas a 37 °C, e o número total de unidades formadoras de colônias por unidade de área ($\log\text{UFC}/\text{cm}^2$) da placa de microtitulação foi enumerado.

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi determinada por coloração utilizando cristal de violeta. Para a fixação do biofilme, 200 μL de metanol a 99% (Romil, Reino Unido) foram adicionados a cada poço por 15 minutos, passado este tempo o metanol foi removido e as placas secas a 25°C. Em seguida, 200 μL de cristal de violeta (Merck, Alemanha) foram adicionados a cada poço e após 5 minutos o excesso do corante foi removido e as placas lavadas com água estéril. Finalmente, 200 μL de ácido acético (33%, v/v) (Pronalab, Portugal) foram adicionados aos poços para dissolver o cristal de violeta e a densidade óptica foi medida a 570 nm.

3.3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), com o teste *Bonferroni* post-hoc. $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Efeito das lectinas sobre o crescimento planctônico

Os resultados da ação das lectinas sobre o crescimento planctônico dos micro-organismos serão apresentados como: fraca inibição do crescimento – inibição de até 40% do crescimento; média inibição do crescimento – inibição entre 40 e 80%; ou forte inibição do crescimento – inibição de 80 a 100%.

De todas as lectinas testadas apenas cinco (CFL, VML, BBL, HML e BSL) apresentaram efeito contra algum dos micro-organismos testados (Tabela 5). Apesar destas cinco lectinas não serem eficazes contra todas as bactérias e leveduras testadas elas foram selecionadas para os posteriores ensaios de formação de biofilmes.

A presença de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CFL durante o crescimento de *S. aureus* reduziu cerca de 40% em relação ao controle. Uma fraca inibição foi observada nas

concentrações de 250 e 125 µg/mL de CFL para o crescimento de *S. epidermidis*. No entanto, CFL não foi capaz de reduzir o crescimento das bactérias Gram-negativas testadas. Com relação às leveduras, CFL mostrou uma inibição moderada do crescimento de *C. albicans* em todas as concentrações, mas nenhum efeito foi observado com *C. tropicalis*.

Ambas lectinas específicas por D-galactose (VML e BBL) mostram redução no crescimento dos micro-organismos planctônicos. VML na concentração de 250 µg/mL apresentou uma significativa redução no crescimento planctônico de *S. aureus* e *S. epidermidis*, inibindo totalmente seu crescimento. Esta proteína foi capaz de inibir fracamente o crescimento de *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Por outro lado, BBL não apresentou os mesmos resultados sobre *S. aureus* e *S. epidermidis* evidenciados para VML. BBL mostrou fraca inibição do crescimento microbiano para todas as espécies testadas, com exceção de *S. epidermidis* que não demonstrou sensibilidade à presença da proteína.

Em relação às lectinas de algas, HML e BSL, ambas inibiram fracamente o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* em pelo menos uma das concentrações testadas. Apenas a HML foi capaz de reduzir o crescimento de *K. oxytoca*. Ambas as lectinas de algas não apresentaram qualquer inibição do crescimento das leveduras.

Tabela 5 – Inibição do crescimento planctônico de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras por lectinas isoladas de *Cratylia floribunda* (CFL), *Vatairea macrocarpa* (VML), *Bauhinia bauhinioides* (BBL), *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Hypnea musciformis* (HML).

Concentração (µg/mL)	Planta												Alga							
	CFL				VML				BBL				HML				BSL			
	250	125	62,5	31,25	250	125	62,5	31,25	250	125	62,5	31,25	250	125	62,5	31,25	250	125	62,5	31,25
<i>S. aureus</i> (+)	++	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND
<i>S. epidermidis</i> (+)	+	+	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> (-)	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. oxytoca</i> (-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. albicans</i> (l)	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. tropicalis</i> (l)	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Gram-positiva (+), Gram-negativa (-) bactéria e levedura (l)

ND, ação não detectada.

+ Fraca inibição do crescimento

++ Média inibição do crescimento

+++ Forte inibição do crescimento

3.4.2 Efeito das lectinas sob a biomassa dos biofilmes e no número de UFC's

Nas figuras 15 a 19 encontram-se os resultados em termos de redução de biomassa e de células viáveis dos biofilmes causados pelas lectinas.

As lectinas CFL e VML foram capazes de inibir significativamente a formação da biomassa do biofilme de *S. aureus* (Figura 14a e b), mas apenas VML foi capaz de inibir a formação da biomassa do biofilme de *S. epidermidis* a uma concentração de 250 µg/mL (Figura 14g). A lectina BSL foi capaz de diminuir a biomassa do biofilme de *S. aureus* em todas as concentrações (Figura 14d), no entanto, a HML apresentou uma fraca inibição nas concentrações mais elevadas (Figura 14e). Com relação às bactérias Gram-negativas, apenas CFL e HML, na concentração de 250 µg/mL, foram capazes de inibir a formação de biomassa do biofilme de *P. aeruginosa* (Figura 15a e d). Em relação a *K. oxytoca* CFL foi capaz de reduzir a formação de biomassa em todas as concentrações (Figura 15f), enquanto que BBL mostrou atividade apenas na maior concentração testada (Figura 15h). As duas lectinas de algas foram capazes de reduzir a biomassa da bactéria em diferentes concentrações e proporções (Figura 15i e j). Embora algumas lectinas tenham inibido o crescimento planctônico das leveduras, estas não foram capazes de reduzir a biomassa dos biofilmes (Figura 16).

Após o contato dos micro-organismos com as lectinas, durante 24 horas o número de células foi avaliado e expresso como logUFC/cm² (Figuras 17 – 19). Os resultados mostram que as lectinas mostraram efeito sobre bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*. Foi observada uma significativa redução no número de células viáveis do biofilme das duas espécies de *Staphylococcus* na presença de VML, porém apenas nas concentrações mais elevadas da proteína (Figura 17a e f). Além disso, HML e BSL apresentaram uma pequena redução no número de células viáveis de *S. aureus* (Figura 17d e 17e), assim como CFL e BBL para *S. epidermidis* (Figuras 17f e h). Por outro lado, nenhuma das lectinas testadas foi capaz de diminuir o número de células viáveis de bactérias Gram-negativas (Figura 18). Com relação às leveduras, apenas CFL foi capaz de diminuir o número de células viáveis do biofilme de *C. albicans* (Figura 19a).

Figura 14 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre formação de biomassa em biofilmes de bactérias Gram-positivas. * $p < 0,01$ com relação ao controle.

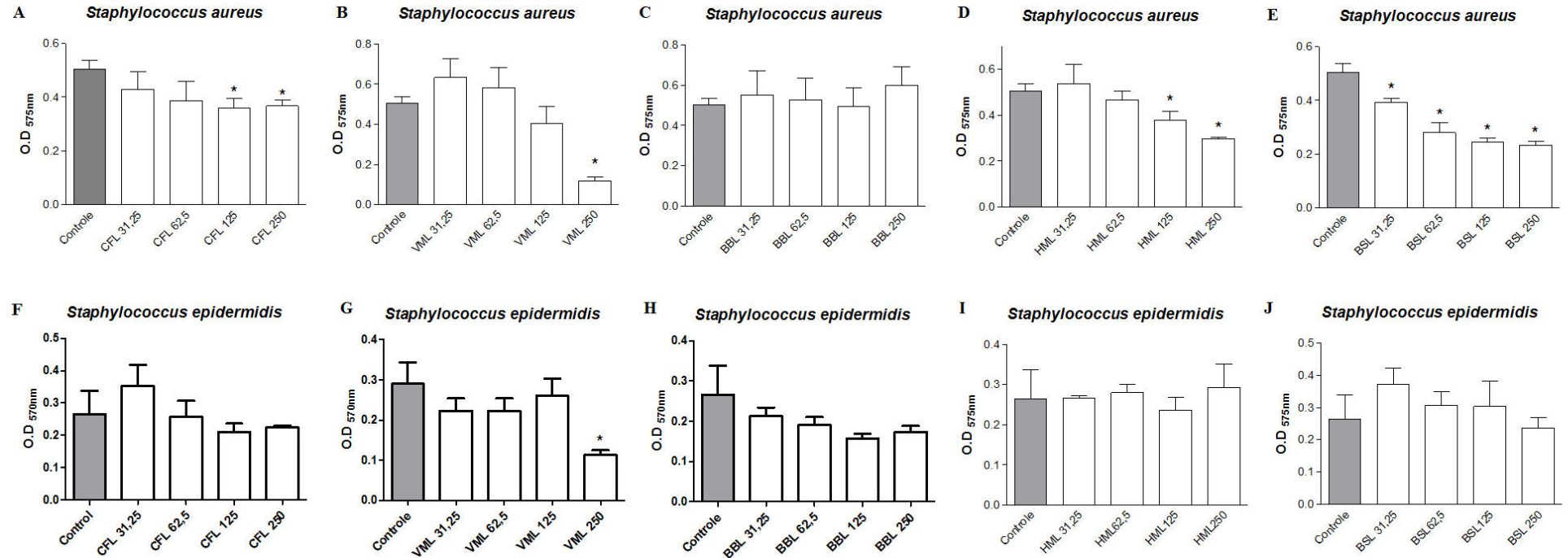


Figura 15 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre formação de biomassa em biofilmes de bactérias Gram-negativas. * $p < 0,01$ com relação ao controle.

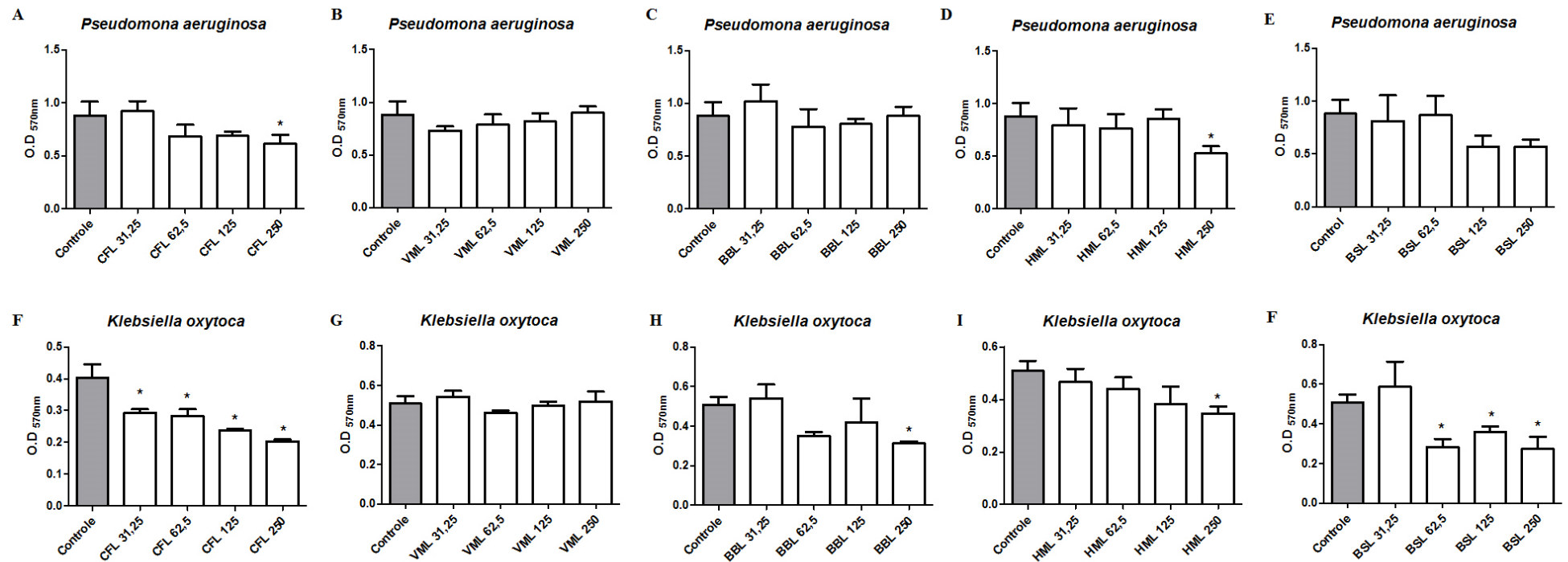


Figura 16 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre formação de biomassa em biofilmes de leveduras. * $p < 0,01$ com relação ao controle.

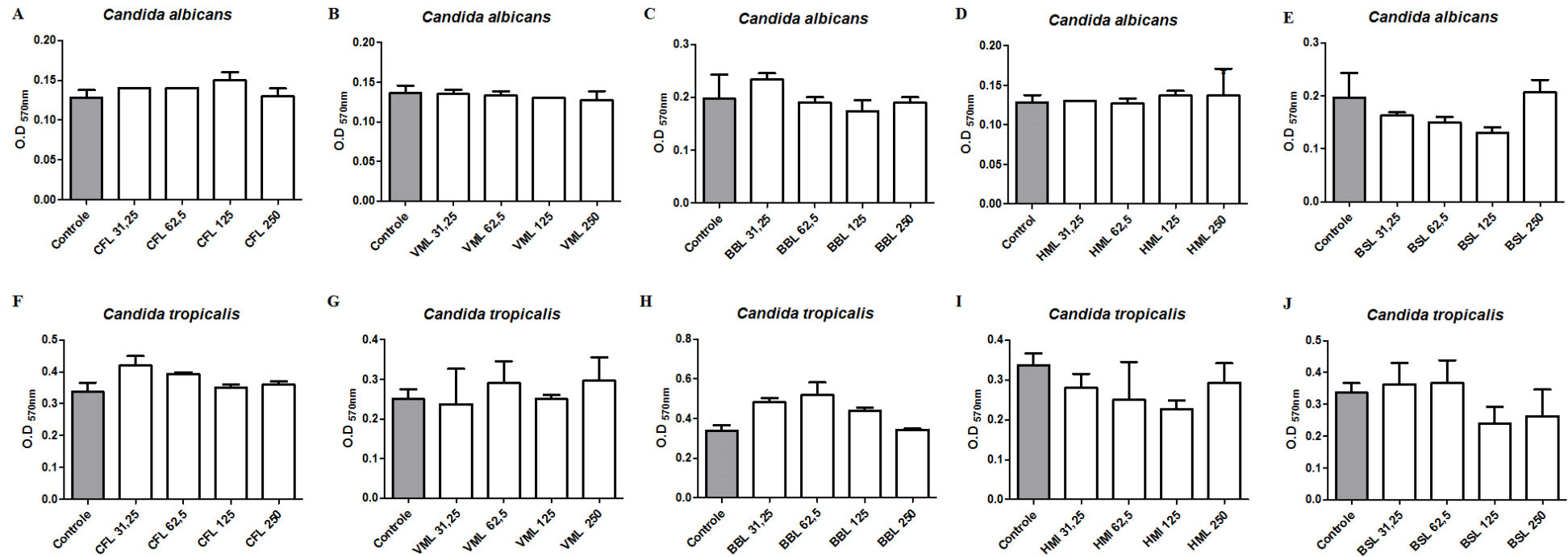


Figura 17 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre o número células viáveis dos biofilmes de bactérias Gram-positivas. * $p < 0,01$ com relação ao controle.

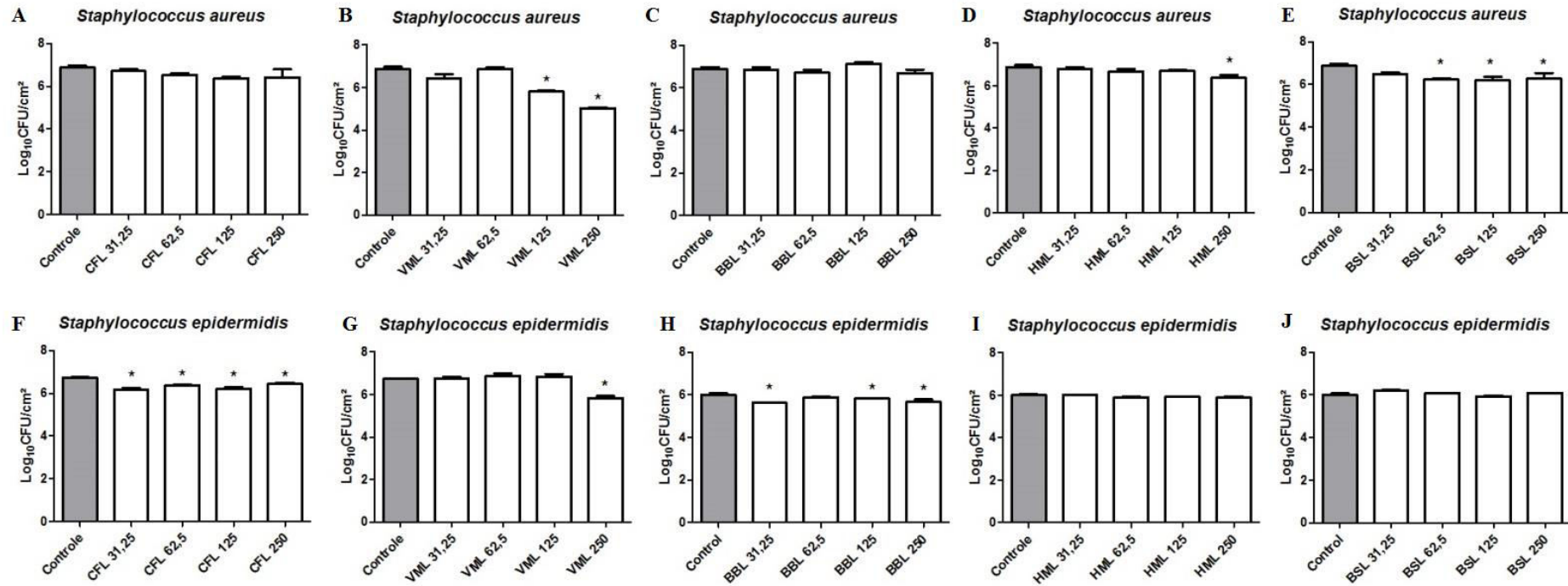


Figura 18 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre o número células viáveis dos biofilmes de bactérias Gram-negativas. * $p < 0,01$ com relação ao controle.

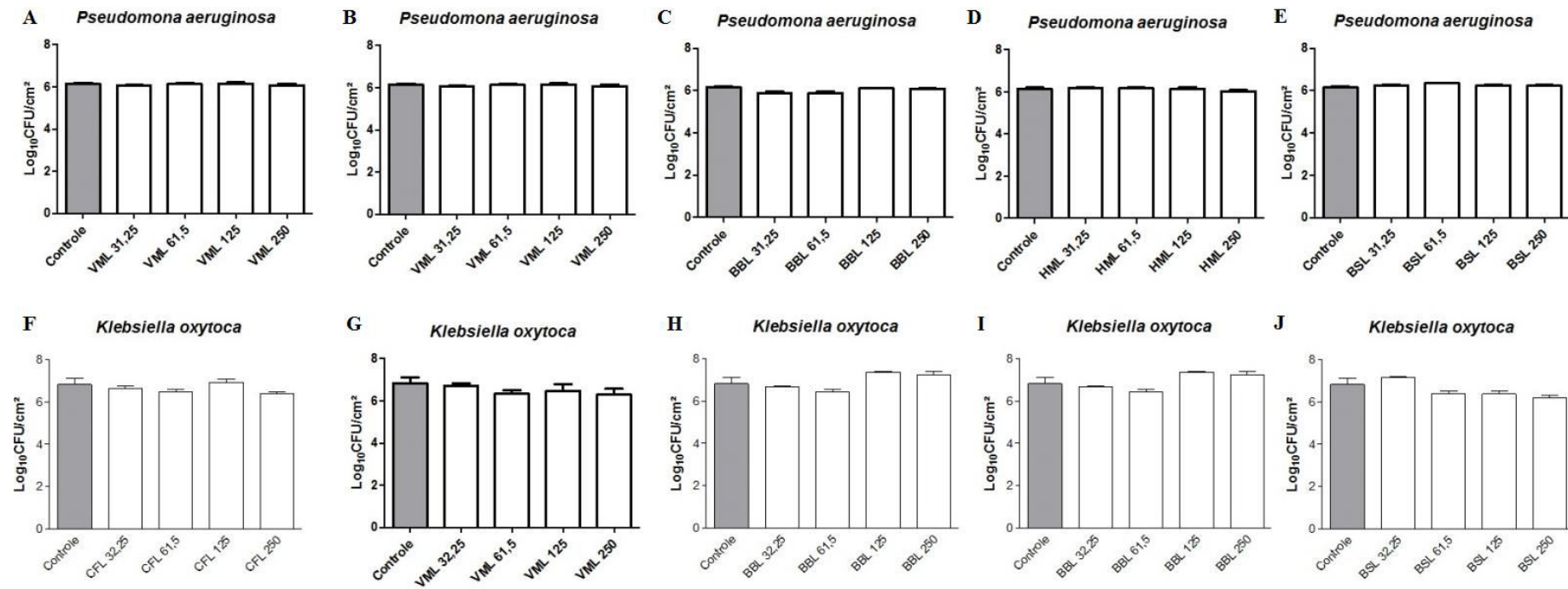
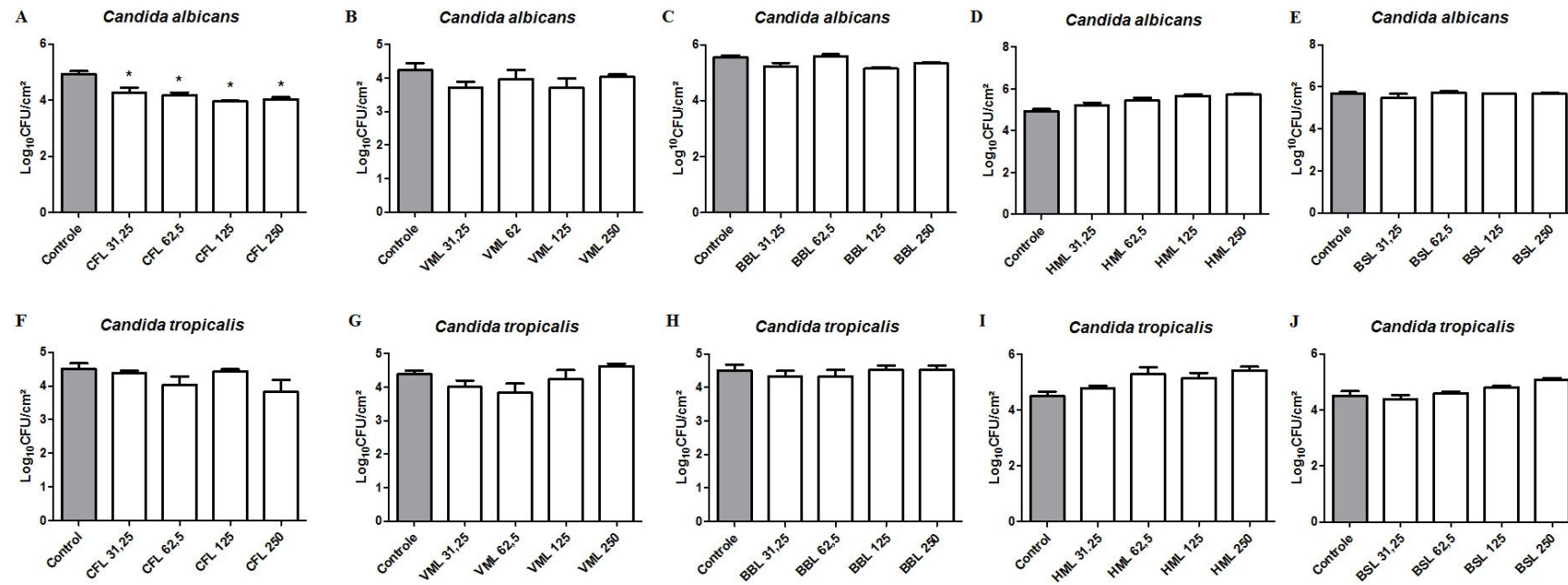


Figura 19 – Efeito de lectinas de leguminosas e algas sobre o número células viáveis dos biofilmes de leveduras. * $p < 0,01$ com relação ao controle.



3.5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito das lectinas isoladas de leguminosas e algas contra o crescimento planctônico e a formação de biofilmes de bactérias e leveduras. Esta avaliação foi realizada analisando o crescimento microbiano a partir da medição da densidade ótica, quantificação da biomassa (método de cristal de violeta) e do número de células viáveis presentes nos biofilmes (número de UFC's).

Nos ensaios de crescimento planctônico, das dez lectinas testadas apenas cinco foram capazes de reduzir o crescimento dos micro-organismos, sendo estas as lectinas CFL, VML, BBL, HML e BSL (Tabela 5).

VML a 250 µg/mL reduziu totalmente o crescimento planctônico das bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Estes resultados corroboram com outros estudos que relataram que lectinas isoladas de sementes de *Eugenia uniflora* (EuniSL) e do cerne de *Myracrodruon urundeuva* apresentaram atividade contra *S. aureus*, no entanto em concentrações menores que VML (5 e 0,58 µg/mL, respectivamente) (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009). Por outro lado, Costa e colaboradores (2010) mostraram em seu trabalho que a lectina isolada da folha de *Phthirusa pyrifolia* (PpyLL) inibi o crescimento de *S. epidermidis* a 250 µg/mL. No que diz respeito às bactérias Gram-negativas, as lectinas testadas mostram fraca ou nenhuma redução do crescimento planctônico. As lectinas EuniSL e a de *M. urundeuva* apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 1 e 4,68 µg/mL para *P. aeruginosa*, respectivamente, enquanto PpyLL não mostrou qualquer atividade sobre a mesma bactéria (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010). Além disso, a lectina de alga, *Solieria filiformis*, mostrou ser capaz de reduzir o crescimento planctônico de *P. aeruginosa* em torno de 25% e também de outras espécies de bactérias Gram-negativas, mas em concentrações 1 mg/mL (HOLANDA *et al.*, 2005). Estas diferenças de concentração efetivas de lectinas na redução do crescimento bacteriano provavelmente resultam de diferenças entre as linhagens testadas assim como na especificidade das lectinas por carboidratos.

O mecanismo pelo qual as lectinas exibem sua atividade antimicrobiana ainda não está bem descrito, acredita-se que a atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ocorre através da interação das lectinas com componentes da parede celular bacteriana, incluindo ácidos teicóico e teicurônico, peptideoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS) (PAIVA *et al.*, 2010; BOURNE *et al.*, 1994).

Curiosamente, as lectinas DML, DRL, DGL, DVL e CFL são proteínas homólogas, mas apenas CFL foi capaz de reduzir o crescimento dos micro-organismos em sua forma planctônica. Os gêneros *Dioclea* e *Cratylia* possuem lectinas com um elevado grau de semelhança e especificidade por D-glucose e D-manose (tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae) (CAVADA *et al.*, 2001). No entanto, apesar da alta similaridade entre essas lectinas diferentes respostas são obtidas em ensaios biológicos (ANDRADE *et al.*, 2009; CAVALCANTE *et al.*, 2011). Segundo Cavada e colaboradores (2001) diferenças na atividade biológica entre lectinas da subtribo Diocleinae pode ser devido a pequenas mudanças na orientação relativa do domínio de ligação a carboidratos, a especificidade fina de ligação à glicanos ou ainda o estado de oligomerização dependente de pH. Assim estes fatores podem explicar o fato de apenas a CFL reduzir o crescimento dos micro-organismos, ao passo que DML, DRL, DGL e DVL não apresentaram atividade semelhante.

As lectinas VML e BBL, apesar da mesma especificidade por açúcar (D-galactose), também mostram diferentes atividades sobre o crescimento dos micro-organismos. Essas lectinas também mostram características diferentes que podem estar relacionadas com as suas diferentes atividades. Por exemplo, a VML apresenta um processamento pós-traducional distinto de BBL. VML apresenta-se com um padrão de quatro cadeias, duas cadeias principais denominadas de cadeias α (34 e 32 kDa) e duas menores conhecidas como cadeias β e γ (22 e 13 kDa, respectivamente), além disso a VML apresentam sítio glicosilados em sua estrutura (CALVETE *et al.*, 1998). Por outro lado, Silva e colaboradores (2011), através de espectrometria de massas, revelou uma massa única de aproximadamente 29 kDa para a BBL e através de outras caracterizações, mostrou que essa lectina não apresenta glicosilações.

De acordo com a literatura, algumas proteínas apresentam atividade contra fungos, por exemplo, quitinases, proteínas ligantes a quitina, inibidores de proteases, lectinas, entre outras (SELITRENNIKOFF *et al.*, 2001; WONG *et al.*, 2010). Este estudo mostra que as lectinas VML e BBL (lectinas D-galactose específico) são capazes de reduzir, mesmo que fracamente, o crescimento de *C. albicans* e que CFL reduziu o crescimento planctônico de *C. albicans* em cerca de 50%. Santana e colaboradores (2009) mostram que a lectina isolada de *Opuntia ficus* é capaz de afetar o crescimento de *C. albicans*, reduzindo o crescimento da levedura em aproximadamente 60%. De acordo com Wong e colaboradores (2010), lectinas não inibem diretamente o crescimento dos fungos, alterando a estrutura e/ou a permeabilidade da membrana, mas

podem causar efeitos indiretos produzidos pela ligação de lectinas em carboidratos na superfície da parede celular. Em contrapartida, Melo e colaboradores (2005) mostraram que a lectina isolada de *Luetzelburgia auriculata* (LAA), inibiu o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, e por microscopia eletrônica de transmissão revelou que a lectina estava presente tanto na parte externa da superfície quanto nas partes internas da parede celular da levedura, e ainda presente sobre a membrana celular. Além disso, os resultados obtidos por estes autores sugerem que a lectina pode interferir no transporte intracelular de prótons para o ambiente externo, causando assim sua ação antifúngica (MELO *et al.*, 2005).

Quanto aos resultados obtidos para a redução da biomassa microbiana, em geral, diferentes lectinas foram capazes de reduzir a biomassa de algumas bactérias, de uma maneira dependente da concentração. Assim como para o crescimento planctônico, VML a 250 µg/mL foi capaz de reduzir a biomassa de *S. aureus* e *S. epidermidis*, CFL também mostrou uma redução na biomassa de *K. oxytoca* e *P. aeruginosa*, e BBL e VML apenas para *K. oxytoca*. Estas lectinas foram mais eficazes na concentração de 250 µg/mL. Cavalcante e colaboradores (2011) também demonstraram que a lectina isolada a partir das sementes de *Canavalia maritima* (ConM) foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme de *S. mutans* a 200 µg/mL, concentração semelhante à utilizada nesse trabalho.

Algumas lectinas isoladas de algas também mostraram atividade contra biofilme bacteriano, por exemplo, lectinas isoladas de *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii* (algas vermelhas) foram capazes de aderir à película formada em pérolas de hidroxiapatita e reduzir a aderência de alguns estreptococos a 100 µg/mL (TEIXEIRA *et al.*, 1997). Neste estudo, as lectinas de algas também foram capazes de reduzir a biomassa de *S. aureus* e *K. oxytoca*, mas apenas a HML reduziu a biomassa de *P. aeruginosa*. Assim como as outras lectinas, HML também foi mais eficaz na concentração de 250 µg/mL.

Alguns autores têm demonstrado em seus estudos que lectinas são capazes de aglutinar células bacterianas causando assim sua agregação (COSTA *et al.*, 2010; RATANAPO *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2007). Liljemark e colaboradores (1981) sugerem que a formação de agregados bacterianos provoca uma diminuição do número de bactérias aderentes, o que pode explicar o fato de algumas lectinas testados neste estudo não reduzirem o crescimento bacteriano, mas inibir a formação de biofilme. Além disso, alguns estudos indicam que a formação de biofilme está diretamente relacionada com o

tipo de LPS produzida pelas bactérias Gram-negativas (ROCCHETTA *et al.*, 1999). Alguns trabalhos mostram que lectinas são capazes de interagir com LPS bacteriano (AGRAWAL *et al.*, 2001; BISWAS *et al.*, 2009). Assim, o efeito de algumas lectinas na inibição da formação de biofilme de algumas bactérias Gram-negativas pode ser devido a uma interação entre a lectina e LPS, afetando a aderência destas bactérias, influenciando assim a formação de biofilme.

Curiosamente, as lectinas utilizadas neste estudo reduziram o número de células viáveis apenas em biofilmes de bactérias Gram-positivas e apenas uma lectina (CFL) foi capaz de diminuir o número de células viáveis de *C. albicans*. Provavelmente a redução do número de células viáveis do biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* por VML e de *C. albicans* por CFL seja reflexo da inibição do crescimento desses micro-organismos em sua forma planctônica. No entanto, Lakhtin e colaboradores (2009) mostraram que as lectinas de bifidobactérias e lactobacilos revelaram propriedades destrutivas em relação aos biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus*. Segundo estes autores, na presença das lectinas a degradação dos biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* ocorre em etapas sequenciais, incluindo aparecimento de poros na estrutura dos biofilmes até a lise dos micro-organismos que os compõem (LAKHTIN *et al.*, 2010).

3.6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, as lectinas isoladas de algas e plantas foram testadas contra bactérias e leveduras comumente envolvidas em infecções nosocomiais. Os resultados demonstraram que algumas das lectinas testadas foram capazes de inibir o crescimento planctônico e/ou a formação de biofilme de alguns micro-organismos. Além disso, as lectinas mais promissoras mostraram diferenças em suas atividades, o que pode ser explicado pelas diferentes características entre estas proteínas. A lectina isolada de *V. macrocarpa* mostrou ser uma promissora biomolécula contra bactérias Gram-positivas. Contudo, outros estudos são necessários para investigar os prováveis mecanismos de ação dessas lectinas contra bactérias e leveduras, bem como a busca de novas lectinas com ação antimicrobiana e capazes de inibir a formação de biofilmes de micro-organismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; JAISWAL, Y. K.; DAS, H. R.; DAS, R.H. A *Mesorhizobium* lipopolysaccharide (LPS) specific lectin (CRL) from the roots of nodulating host plant, *Cicer arietinum*. **Biochimie.**, v. 93, n. 3, p. 440-449, mar. 2001.
- AINONZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 7, n. 1, p. 15-19, abr. 1995.
- ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S. Lectin induced nitric oxide production. **Cell. Immunol.**, v. 194, n. 1, p. 98-102, maio 2009.
- BISWAS, S.; SAROHA, A.; DAS, H. R. A lectin from *Sesbania aculeata* (Dhaincha) roots and its possible function. **Biochemistry (Mosc)**, v. 74, n. 3, p. 329-335, mar. 2009.
- BOURNE, Y.; AYOUBA, A.; ROUGÉ, P.; CAMBILLAU, C. Interaction of a legume lectin with two components of the bacterial cell wall. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 13, p. 9429-9435, abr. 1994.
- CALVETE, J. J.; SANTOS, C. F.; MANN, K.; GRANGEIRO, T. B.; NIMTZ, M.; URBANKE, C.; CAVADA, B. S. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Lett.**, v. 425, n. 2, p. 286-292, mar. 1998.
- CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, F. A.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675-680, out. 1998.
- CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; CORDEIRO, E. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. V. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* benth seeds. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, n. 1, p. 31-36, nov. 1996.
- CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRALNETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 2, n. 2, p. 123-135, jun. 2001.
- CAVALCANTE, T. T.; ROCHA, B. A. M.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; NASCIMENTO, A. S. F.; SÁ, N. C.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, abr. 2011.
- CONNELL, H.; HEDLUND, M.; AGACE, W.; SVANBORG, C. Bacterial attachment to uro-epithelial cells: mechanisms and consequences. **Adv. Dent. Res.**, v. 11, n. 1, p. 50-58, abr. 1997.

COSTA, R. M. P. B.; VAZ, A. F. M.; OLIVA, M. L. V.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochem.**, v. 45, n. 4, p. 525-533, abr. 2010.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, abr. 2002.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 7, p. 1034-1043, jul. 2009.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 11, p. 1663-1674, nov. 2010.

HOLANDA, M. L.; MELO, V. M.; SILVA, L. M.; AMORIM, R. C.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 12, p. 1769-1773, dez. 2005.

HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P.; ALLEN, D. L.; JOHNSON, P. D. R.; WARD, P. B.; DAVIES, J. K. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *gras* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 10, p. 3755-3762, out. 2008.

ISLAM, B.; KHAN, S. N.; NAEEM, A.; SHARMA, V.; KHAN, A. U. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. **J. Appl. Microbiol.**, v. 106, n. 5, p. 1682-1689, maio 2009.

KAJIYAMA, S.; TSURUMOTO, T.; OSAKI, M.; YANAGIHARA, K.; SHINDO, H. Quantitative analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on the surface of biomaterial. **J. Orthop. Sci.**, v. 14, n. 6, p. 769-775, nov. 2009.

KIMBLE, B.; RAMIREZ NIETO, G.; PEREZ, D. R. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. **Viol. J.**, v. 7, p. 365, 2010.

KITADA, M.; KURODA, Y.; DEZAWA, M. Lectins as a tool for detecting neural stem/progenitor cells in the adult mouse brain. **Anat. Rec. (Hoboken)**, v. 294, n. 2, p. 305-321, fev. 2011.

LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V.; LAKHTIN, V.; AFANASYEV, S.; POZHALOSTINA, L.; POSPELOVA, V. Probiotic lactobacillus and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* clinical strains: New class of the pathogen biofilm destructors. **Probiotics Antimicrob. Proteins**, v. 2, n. 3, p. 186-196, out. 2010.

LIENER, Irvin; SHARON, Nathan; GOLDSTEIN, Irwin. **The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine**. 1st ed. Orlando, Florida: Academic Press, 1996. 600 p.

LILJEMARK, W. F.; BLOOMQUIST, C. G.; GERMAINE, G. R. Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to hydroxyapatite. **Infect. Immun.**, v. 31, n. 3, p. 935-941, mar. 1981.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 34-39, jan. 2001.

MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Sci.**, v. 169, n. 3, p. 629-639, set. 2005.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O.; HORTA, A. C. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *megacarpa* seed lectin. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 139-144, set. 1997.

MOREIRA, R. V.; CORDEIRO, E. F.; RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, n. 1, p. 23-29, dez. 1996.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B., Jr. BLOCH, C.; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein Pept. Lett.**, v. 9, n. 2, p. 159-166, abr. 2002.

OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. **Rev. Bras. Bot.**, v. 14, p. 63-68, 1991.

OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CAMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINE, M. N.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 3, p. 301-310, out. 2002.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 371-376, mar. 2008.

OPPERMANN, R. V.; HAAS, A. N.; VILLORIA, G. E.; PRIMO, L. G.; SERRA-NEGRA, J. M.; FERREIRA, E. F.; PANNUTI, C. M. Proposal for the teaching of the chemical control of supragingival biofilm. **Braz. Oral Res.**, v. 24, n. 1, p. 33-36, jul. 2010.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 396-406, 2010.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S.; EWEN, S.W. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. **Front. Biosci.**, v. 13, n. 1, p. 1130-1140, jan. 2008.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Sci.**, v. 139, n. 2, p. 141-148, dez. 1998.

ROCCHETTA, H. L.; BURROWS, L. L.; LAM, J. S. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, n. 3, p. 523-553, set. 1999.

SÁ, R. A.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; BIEBER, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Sci. Technol.**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, fev. 2009.

SANTANA, G. M. S., ALBUQUERQUE, L. P., SIMÕES, D. A., GUSMÃO, N. B., COELHO, L. C. B. B., and PAIVA, P. M. G. Isolation of a lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. **Acta Hortic.**, v. 811, p. 281-286, fev. 2009.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, jul. 2001.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem.**, v. 30, n. , p. 59-75, 1995.

SILVA, H. C.; BARI, A. U.; PEREIRA-JÚNIOR, F. N.; SIMÕES, R. C.; BARROSO-NETO, I. L.; NOBRE, C. B.; PEREIRA, M. G.; NASCIMENTO, K. S.; ROCHA, B. A.; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; ASSREUY, A. M; CAVADA, B. S. Purification and partial characterization of a new pro-inflammatory lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) seeds. **Protein Pept. Lett.**, v. 18, n. 4, p. 396-402, abr. 2011.

SINGH, T.; WU, J. H.; PEUMANS, W. J.; ROUGE, P.; VAN DAMME, E. J. M.; WU, A. M. Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent epitopes. **Mol. Immunol.**, v. 44, n. 4, p. 451-462, jan. 2007.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods.**, v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000.

STEWART, O. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, n. 2, p. 107-113, jul. 2002.

STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Application of fluorescently labeled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Microbiol. Methods**, v. 20, n. 3, p. 237-248, ago. 2002.

SUN, J.; WANG, L.; WANG, B.; GUO, Z.; LIU, M.; JIANG, K.; LUO, Z. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 292-299, ago. 2007.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; OLIVEIRA, T. M.; CUNHA, R. M.; HAVT, A.; MARTINS, J. L.; PINTO, V. P.; GONÇALVES, R. B.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, n. 1, p. 111-116, jul. 2006.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; OLIVEIRA, T. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SOUZA, J. B.; HAVT, A.; PINTO, V. P.; GONÇALVES, R. B.; FARIAS, W. R.; SAKER- SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, n. 4, p. 1000-1006, out. 2007.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **J. Food Biochem.**, v. 15, n. 2, p. 137-154, jun. 1991.

WONG, J. H., NG, T. B., CHEUNG, R. C. F., YE, X. J., WANG, H. X., LAM, S. K., LIN, P., CHAN, Y. S., FANG, E. F., NGAI, P. H. K., XIA, L. X., YE, X. Y., JIANG, Y. and LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 4, p. 1221-1235, jul. 2010.

Capítulo IV

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIBIOFILME E ANTIOXIDANTE DE
DERRIOBTUSONA A, UM FLAVONOIDE ISOLADO DE *Lonchocarpus
obtusus*²**

4.1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades complexas de micro-organismos aderidas a uma superfície e inseridas em uma matriz polimérica extracelular produzida por elas mesmas (DUNNE 2002). Além da capacidade de produzir matriz polimérica extracelular, células presentes nesse tipo de comunidade apresentam um padrão de crescimento reduzido e genes *up* e *down* regulados (BEECH *et al.*, 2005). Esta adaptação fisiológica e fenotípica dos biofilmes confere uma maior tolerância contra agentes antimicrobianos (MC CAY *et al.*, 2010). Os biofilmes estão diretamente relacionados com várias doenças infecciosas através da colonização de aparatos médicos, e no setor industrial são encontrados como contaminantes biológicos (MURPHY; CLEGG, 2012; GANESH; ANAND, 1998). Diversas bactérias patogênicas são capazes de formar biofilmes, entre elas podemos citar *S. aureus* e *E. coli* (BROOKS; JEFFERSON, 2012; MIKA; HENGGE, 2013).

Os vegetais são fontes de uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas, como por exemplo, os metabólitos secundários (SHER, 2009). Nesse contexto, diversos estudos têm relatado a ação antimicrobiana e antibiofilme de compostos isolados de plantas como forma alternativa ao uso de antibióticos (SAVOIA 2012; KUETE, 2010; ARTINI *et al.*, 2012; COBRADO *et al.*, 2012).

Metabólitos secundários isolados de plantas, principalmente compostos fenólicos, além de apresentar ação antimicrobiana também têm demonstrado uma potencial atividade antioxidante sobre espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002). A produção e o acúmulo de ROS geralmente estão associados às adversidades ambientais (ASADA 2006). Sob determinadas condições são produzidas moléculas como ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxil (OH^\cdot), oxigênio singlete (1O_2), entre outros (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008). A acumulação de ROS pode levar ao estresse oxidativo, causando danos aos componentes celulares, como DNA, lipídeos, proteínas e

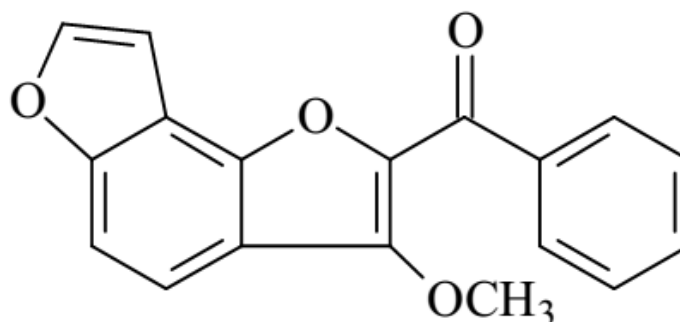
² Trabalho a ser submetido para publicação como: Mayron A. Vasconcelos, *et al.* Antibacterial, antibiofilm and antioxidant activity of derriobtusone A, a compound isolated from *Lonchocarpus obtusus*.

carboidratos (ASADA, 2006; VAN BREU SEGEM; DAT, 2006). Além disso, os ROS estão associados a diversos efeitos tóxicos e patologias como, por exemplo, o câncer, doenças cardiovasculares e neurológicas, infecções, entre outras (BRIEGER *et al.*, 2012). Nesse contexto, o uso de compostos antioxidantes com o objetivo de aumentar a degradação de ROS, reduzindo assim doenças associadas a estas moléculas, tem sido alvo de diversas pesquisas científicas (STANNER *et al.*, 2004).

Alguns estudos relatam que plantas do gênero *Lonchocarpus* são capazes de produzir diversos metabólitos secundários, incluindo alcaloides, flavonoides, terpenoides, derivados do ácido benzóico, entre outros (MAGALHÃES *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 1976; SANTOS *et al.*, 2009; CAVALCANTE *et al.*, 2012). O gênero *Lonchocarpus* pertence à família Leguminosae e subfamília Papilionoideae, sendo prevalente em regiões tropicais e subtropicais, incluindo países da América latina como o Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 1976; CAVALCANTE *et al.*, 2012).

Flavonoides são compostos fenólicos produzidos pelas plantas, que consistem em dois anéis benzeno ligados através de um anel pirano heterocíclico (BROWN *et al.*, 1980). Estes compostos estão presentes em frutas, legumes, sementes, caules, flores, raízes e desempenham diversas funções fisiológicas nas plantas (MIDDLETON *et al.*, 1993; HARBORNE *et al.*, 1999; HARBORNE *et al.*, 2000). Além disso, esses compostos têm sido alvo de muitos estudos demonstrarem diversas atividades biológicas, com atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral, antimicrobiana e propriedades antioxidantes (PAN *et al.*, 2010; KAWAI *et al.*, 2007; MASUOKA *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2003; CUSHNIE; LAMB, 2005; CUSHNIE; LAMB, 2011). Derriobtusona A (3-metoxi-[α,β :6,7]-furanoauronol) é um flavonoide derivado de aurona, isolado e identificado da casca da raiz de *Lonchocarpus obtusus* por Nascimento e colaboradores (1976) (Figura 20). Entretanto, poucos estudos têm relatado atividades biológicas relevantes para esta molécula.

Figura 20 – Estrutura química de derriobtusona A isolado das raízes de *Lonchocarpus obtusus*. (Imagem elaborada pelo autor)



4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antibacteriano, antibiofilme, antioxidante de derriobtusona A e verificar sua toxicidade sobre náuplios de *Artemia* sp.

4.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de derriobtusona A em inibir ou interferir no crescimento planctônico das bactérias *Staphylococcus aureus* JKD 6008 e *Escherichia coli* K12 MG 1655;
- Avaliar a inibição na formação de biomassa dos biofilmes de *S. aureus* JKD 6008 e *E. coli* K12 MG 1655 na presença de derriobtusona A;
- Avaliar a atividade de derriobtusona A sob o número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos biofilmes formados por *S. aureus* JKD 6008 e *E. coli* K12 MG 1655;
- Verificar a possível ação antioxidante de derriobtusona A utilizando os ensaios de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), atividade quelante do íon ferro (FIC), método de redução do ferro (FRAP) e inibição da oxidação do β -caroteno (BCB);
- Avaliar a toxicidade de derriobtusona A sobre náuplios de *Artemia* sp.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Material vegetal

As raízes de *L. obtusus* foram coletadas na cidade de Meruoca (Estado do Ceará, Brasil). A identificação da planta foi realizada pelo Prof. Afrânio Gomes Fernandes e a exsicata da espécie (No.39550) foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra (EAC) no Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Ceará.

4.3.2 Isolamento da derriobtusona A

Cerca de 720 gramas de cascas secas das raízes de *L. obtusus* foram triturados até a obtenção um pó fino e a partir desta farinha foi realizada uma extração em n-hexano a 25 °C (3 vezes utilizando 2 litros de n-hexano). O extrato foi destilado e durante o processo foram formados precipitados amarelados. Estes precipitados foram filtrados e o composto derriobtusona A foi purificado através de cristalização com acetona.

4.3.3 Micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas duas bactérias comumente associadas a infecções: *S. aureus* JKD 6008 (bactéria Gram-positiva) e *E. coli* K12 MG 1655 (bactéria Gram-negativa).

4.3.4 Condições de cultivo

As bactérias foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA; Liofilchem, Itália) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento uma colônia isolada foi removida e inoculada em 10 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália) e incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 120 rpm. Em seguida, a concentração de células de cada inóculo foi ajustada para 2×10^6 células/mL, através de turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

4.3.5 Concentração inibitória mínima (CIM)

O efeito de derriobtusona A sobre o crescimento planctônico das bactérias foi determinado pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de poliestireno de 96 poços. Anteriormente ao ensaio, o composto foi diluído em TSB (contendo 4% de DMSO) em concentrações que variavam de 1mg/mL a 7,8 µg/mL. Em

cada poço da microplaca foi adicionado 100 µL de meio contendo as várias concentrações de derriobtusona A e em seguida adicionado 100 µL e cada uma das bactérias separadamente (2×10^6 células/mL). As placas foram então incubadas a 37 °C durante 24 horas em agitação constante. O crescimento bacteriano foi mensurado através da densidade óptica do conteúdo de cada poço, a um comprimento de onda de 620 nm, usando um leitor de ELISA (Synergy TM HT Multi-Detection Microtiter Reader). A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor diluição do composto que não apresentou crescimento visível dos micro-organismos.

4.3.6 Ensaio de inibição da formação de biofilme

A metodologia utilizada para o desenvolvimento dos biofilmes foi baseada na metodologia desenvolvida por Stepanovic e colaboradores (2000) com algumas modificações. Placas de 96 poços de polipropileno foram preparadas usando um procedimento similar ao ensaio de CIM, utilizando as mesmas concentrações de bactérias e de derriobtusona A, assim como os mesmos padrões de incubação. Após o crescimento dos biofilmes na presença e ausência do composto, o conteúdo de cada poço foi removido e o biofilme aderido à placa foi lavado três vezes usando 200 µL de água estéril por poço. Posteriormente os biofilmes foram avaliados por quantificação da biomassa e enumeração do número de células viáveis.

4.3.6.1 Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi determinada pelo método de coloração com cristal de violeta. Após a lavagem dos biofilmes contidos em cada poço, os mesmos foram fixados pela adição de 200 µL de metanol absoluto (Ramil, UK) em cada poço por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e a placa foi deixada secar a 25 °C. Após a secagem das placas, foram então adicionados 200 µL de cristal de violeta (Merck, Germany) em cada poço e após 5 minutos o excesso de cristal de violeta foi removido e as placas lavadas utilizando água estéril. Para dissolver o cristal de violeta remanescente nos poços foram adicionados 200 µL de ácido acético (33%, v/v- Pronalab, Portugal) e a densidade óptica foi mensurada a 570 nm.

4.2.3.2 Enumeração do número de células viáveis

Após a formação dos biofilmes, 200 µL de água estéril foi adicionado a cada poço e as placas foram levadas em banho sônico SC-52 (Sonicor Instruments,

Copaique, NY, USA) operando a 50 kHz durante 6 minutos. O conteúdo dos poços foi retirado e diluições seriadas de cada suspensão obtida foram plaqueadas em TSA. As placas foram então incubadas por 24 horas a 37 °C e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por unidade de área dos poços da placa de microtitulação foram enumerados (logUFC/cm²).

4.3.7 Atividade antioxidante

4.3.7.1 Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A habilidade de derriobtusona A sequestrar os radicais DPPH foi realizada através do método descrito por Duan e colaboradores (2006). Uma solução metanólica contendo 0,16 mM de DPPH foi adicionado a derriobtusona A, em diferentes concentrações (de 500 a 7,8 µg/mL). Os resultados foram comparados com o branco (apenas derriobtusona A) e o controle do ensaio (apenas a solução 0,16 mM de DPPH). As amostras foram incubadas na ausência de luz a 25 °C durante 30 minutos e a densidade óptica foi mensurada a 517 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. A porcentagem do efeito do sequestro do radical DPPH foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Sequestro de DPPH (\%)} = \left[1 - \frac{(O.D_{amostra} - O.D_{branco})}{O.D_{controle}} \right] \times 100\%$$

4.3.7.2 Atividade quelante de íons ferrosos (FIC)

O ensaio de atividade quelante de íons ferrosos foi realizado de acordo com Wang e colaboradores (2009). A solução de derriobtusona A foi preparada utilizando água deionizada de modo a obter concentrações de 500 a 7,8 µg/mL do composto onde foram adicionados 2 mM de cloreto ferroso (FeCl₂) e 5 mM de ferrozina. O branco e o controle foram preparados com água destilada, substituindo a ferrozina e a derriobtusona A, respectivamente. As amostras foram incubadas a 25 °C durante 10 minutos e a densidade óptica foi mensurada a 562 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foi utilizado como controle positivo. A atividade FIC foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade quelante do íon ferro (\%)} = \frac{[O.D_{\text{controle}} - (O.D_{\text{amostra}} - O.D_{\text{branco}})]}{O.D_{\text{controle}}} \times 100\%$$

4.3.7.3 Método de redução do ferro (FRAP)

O poder antioxidante de redução férrica de derriobtusona A foi determinado através do método descrito por Ganesan e colaboradores (2008). Inicialmente a derriobtusona A foi diluída em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) com 1% de ferricianeto de potássio, em concentrações que variaram de 500 a 7,8 µg/mL. As amostras foram incubadas a 50 °C por 20 minutos. Após arrefecimento, foram adicionados 10% de ácido tricloroacético. Uma alíquota foi misturada com 0,1% de cloridrato de ferro em água destilada. Após 10 minutos, a densidade óptica foi mensurada a 700 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). Butilhidroxianisol (BHA) foi utilizado como controle positivo. Quanto maior a densidade óptica indica maior capacidade do composto em reduzir o ferro.

4.3.7.4 Método de inibição da oxidação do β-caroteno (BCB)

A capacidade de derriobtusona em inibir a oxidação do β-caroteno e do ácido linoléico foi determinada através do método descrito por Chew e colaboradores (2008). O reagente para a realização deste ensaio é constituído por 3 mL de 0,1mg/ml de β-caroteno dissolvido em clorofórmio, 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado utilizando um rotaporador, e em seguida água ultrapura (Milli-Q) foi adicionada a solução. Derriobtusona A nas concentrações que variaram de 500 a 7,8 µg/mL. A densidade óptica das soluções foi mensurada inicialmente a 470 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340), em seguida, novamente após 3 horas de incubação a 50 °C. BHA foi utilizado como controle positivo para este ensaio. A atividade antioxidante foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left(\frac{O.D_{\text{final}}}{O.D_{\text{inicial}}} \right) \times 100\%$$

4.3.8 Ensaio de toxicidade com *Artemia* sp.

Cistos de *Artemia* sp., na proporção de 1g/L de água do mar artificial estéril,

foram incubados a 28 °C em constante aeração e luminosidade em água do mar em Erlenmeyer e após 48 horas foram utilizados para o ensaio.

Derriobtusone A foi diluída em água do mar artificial (contendo 4% de DMSO) em uma concentração estoque de 1 mg/mL. O ensaio foi realizado utilizando placas de Linbro de 24 poços contendo 10 náuplios de *Artemia* sp. em um volume final de 2 mL. As soluções de derriobtusone A foram adicionadas aos poços em concentrações que variaram de 500 a 7.8 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e o controle negativo foi realizado apenas com água do mar sem a presença de derriobtusone A (contendo 4% de DMSO). As placas foram deixadas a 25 °C e após 24 e 48 horas o número de náuplios mortos de cada poço foram contados.

4.3.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 5,0. Para os ensaios antibacterianos, os resultados foram expressos como média dos valores \pm S.E.M. para *n* experimentos. A avaliação estatística foi combinada pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significantes.

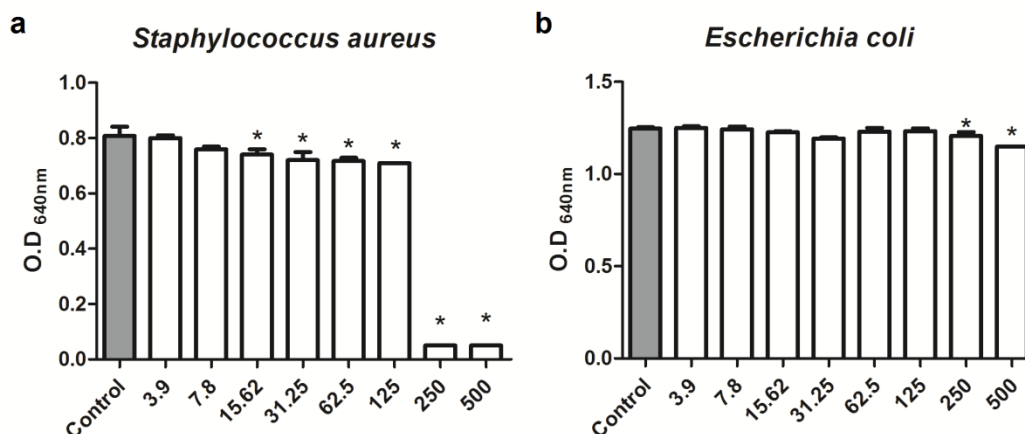
Para os ensaios antioxidantes, os valores percentuais obtidos nos ensaio de DPPH, FIC e BCB para cada uma das concentrações testadas foram convertidos para valores absolutos, submetidos à transformação angular e comparados através do teste t Student's para valores independentes. Os valores de densidade óptica obtidos no ensaio FRAP também foram analisados usando o teste t Student's para valores independentes. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Efeito de derriobtusona A sobre o crescimento planctônico

Os resultados mostraram que derriobtusona A foi capaz de reduzir totalmente o crescimento planctônico de *S. aureus* nas concentrações de 500 e 250 µg/mL, no entanto, nas concentrações de 125 a 15,5 µg/mL o composto apresentou baixa diminuição no crescimento bacteriano quando comparado ao controle (Figura 21a). Por outro lado, a derriobtusona A apresentou uma baixa inibição do crescimento de *E. coli* apenas nas duas concentrações mais altas (500 e 250 µg/mL) (Figura 21b).

Figura 21 – Efeito de derriobtusona A sobre o crescimento planctônico de (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*. * $p < 0.05$ comparado com o controle.

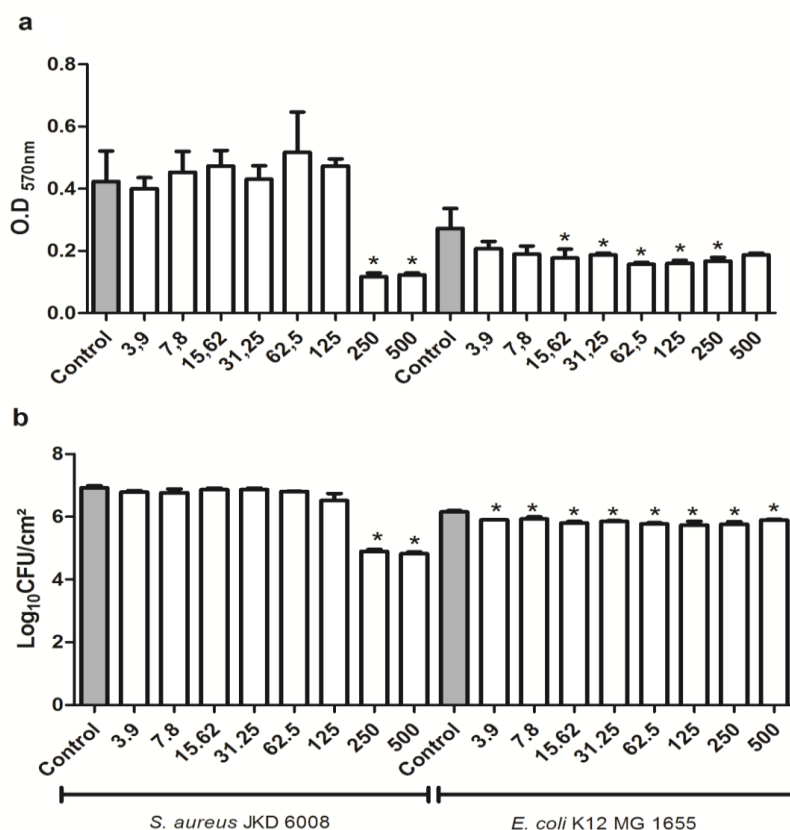


4.4.2 Efeito de derriobtusona A sobre a formação de biofilmes

Na Figura 22a encontram-se os resultados de inibição da formação de biomassa de *S. aureus* e *E. coli* após 24 horas causado pelo contato com derriobtusona A. Os dados mostram que nas concentrações de 500 e 250 µg/mL o composto diminuiu abruptamente a formação de biomassa de *S. aureus* e para *E. coli* o composto reduziu significativamente a biomassa nas concentrações de 250 a 15,6 µg/mL.

No que diz respeito, ao efeito de derriobtusona A no número de células viáveis dos biofilmes a Figura 22b apresenta a média dos valores com seus respectivos desvios padrões de logUFC/cm² para ambas as bactérias. Corroborando com os resultados obtidos na redução de biomassa, derriobtusona A nas concentrações de 500 e 250 µg/mL reduziu o número de UFC's do biofilme de *S. aureus* em aproximadamente 2,0 log, no entanto as demais concentrações não mostraram qualquer efeito sobre o número de células viáveis da bactéria. Em relação a *E. coli*, todas as concentrações testadas a derriobtusona A foram capazes de reduzir o número de UFC's entre 0,2 e 0,4 logUFC/cm².

Figura 22 – Efeito de derriobtusona A sob a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (a) Biomassa dos biofilmes (b) número de células viáveis em $\log_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$. * $p < 0.05$ comparado com o controle.



4.4.3 Atividade antioxidante de derriobtusona A

No ensaio de sequestro de DPPH a derriobtusona A mostrou atividade antioxidante em todas as concentrações testadas com valores percentuais de 50 a 60%. O controle positivo (ácido ascórbico) apresentou valores significativamente mais elevados que a derriobtusona A em todas as concentrações testadas, apresentando valores percentuais de 70 a 97% (Figura 23a).

Com relação à capacidade de derriobtusona A ligar-se a íons metálicos, mas especificamente ao íon ferro (ensaio FIC), o composto mostrou ação quelante dose dependente com valores percentuais aproximados de 8, 10, 14, 17, 19, 22 e 34% nas concentrações de 7,8 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Assim como no ensaio de sequestro do radical DPPH, o controle positivo (EDTA) apresentou valores significativamente mais elevados quando comparados aos resultados apresentados pela

derriobtusona A. Nas maiores concentrações o EDTA apresentou valores percentuais que se aproximaram de 100% (Figura 23b).

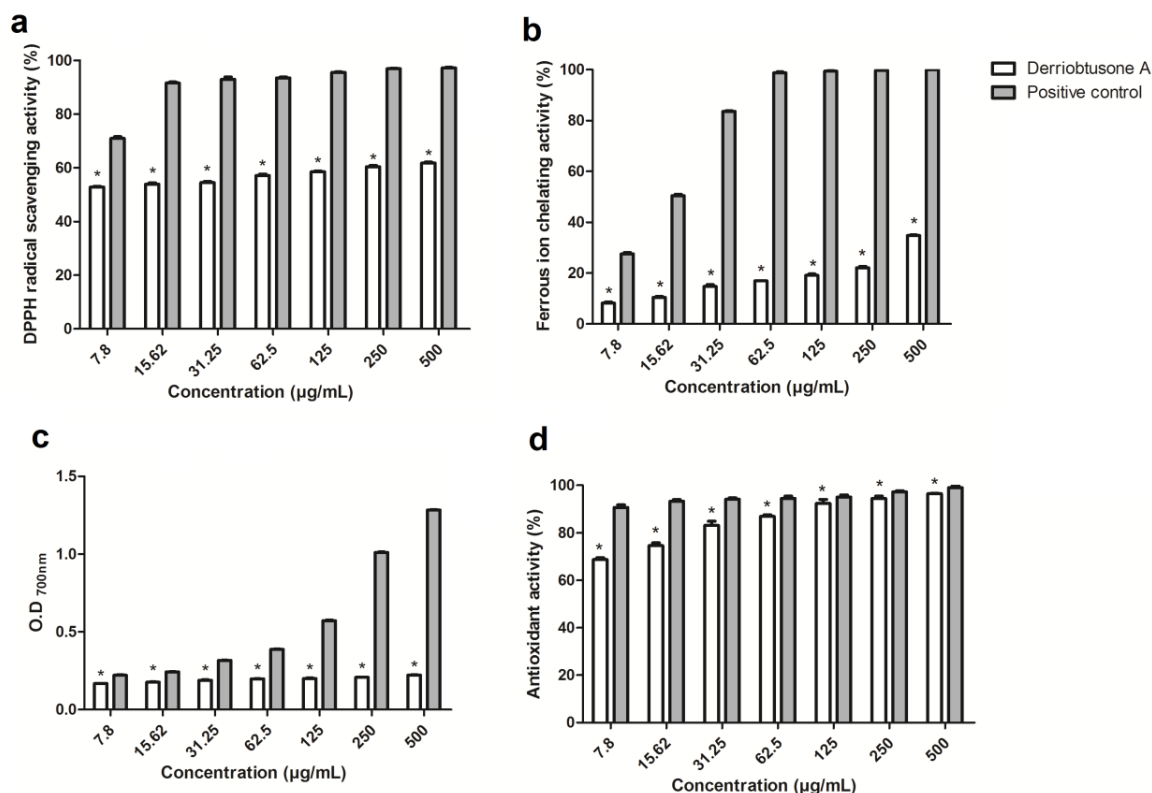
A derriobtusona A também foi avaliada pela sua capacidade de redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} . Neste ensaio os resultados obtidos mostraram que a densidade óptica aumentou com o aumento das concentrações de derriobtusona A. A variação da densidade óptica da derriobtusona A nesse ensaio foi de 0,168 a 0,222, enquanto que o controle positivo (BHA) apresentou um aumento abrupto de 0,226, na menor concentração, para 1,283 (Figura 23c).

Por último, foi avaliada a capacidade de derriobtusona A de inibir a oxidação do β -caroteno. O composto mostrou uma alta atividade oxidante, com uma variação dos valores percentuais de 68,7 para 96,7%. As concentrações mais altas de derriobtusona A chegaram a inibir a oxidação do β -caroteno quase em 100%, valores próximos aos encontrados no controle positivo (BHA) (Figura 23d).

4.4.4 Toxicidade de derriobtusona A sobre náuplios de *Artemia* sp.

A toxicidade de derriobtusona A sobre náuplios de *Artemia* sp. foi avaliada após 24 e 48 horas de exposição. Os resultados mostraram que os náuplios de *Artemia* sp. não foram suscetíveis, em nenhuma concentração testada, à presença da derriobtusona A quando expostos a 24 e 48 horas.

Figura 23 – Atividade antioxidante de derriobtusona A por diferentes métodos. (a) Sequestro do radical DPPH (%); (b) Capacidade quelante de íons ferrosos (%); (c) Capacidade de redução dos íons ferro; (d) Inibição de oxidação do β -caroteno (%). * $p < 0.05$ comparado com o controle positivo.



4.5 DISCUSSÃO

S. aureus e *E. coli* são bactérias geralmente associadas a infecções humanas e contaminações na indústria de alimentos. Esses micro-organismos geralmente exibem uma maior resistência a agentes antimicrobianos devido a sua capacidade de formar biofilmes (PARSEK; Singh 2003; MILLEZI *et al.*, 2012; BROOKS; JEFFERSON 2012; MIKA; HENGGE 2013). O presente estudo avaliou o efeito de derriobtusona A, um flavonoide isolado de *L. obtusus*, sobre o crescimento planctônico e formação de biofilmes das bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, o composto foi avaliado quanto a sua atividade antioxidante e toxicidade.

O ensaio de crescimento planctônico mostrou que *S. aureus* foi susceptível a presença de derriobtusona A, apresentando CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$. Em contraste, a bactéria Gram-negativa *E. coli*, mostrou ser mais resistente à ação do composto. Os resultados

obtidos nesse estudo corroboram com Magalhães e colaboradores (2007) que mostraram que a mesma molécula (derriobtusona A) isolada de *Lonchocarpus montanus* apresentou ação antimicrobiana contra *S. aureus*, mas não contra *E. coli* em ensaios de bioautografia.

Outros estudos têm evidenciado a ação antibacteriana de diversos flavonoides em diferentes concentrações (CUSHNIE; LAMB, 2005; CUSHNIE; LAMB, 2011). A penduratina A, uma chalcona isolada de *Kaempferia pandurat*, apresenta atividade antibacteriana contra vários isolados clínicos de *Staphylococcus* em concentrações variando entre 0,063 e 2 µg/mL (RUKAYADI *et al.*, 2009). Outro flavonoide isolado de *Artocarpus sepicanus*, conhecida como sepicanina A, apresenta inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* a uma concentração de 2 µg/mL (RADWAN *et al.*, 2009). Por outro lado, o flavonoide sintético 4'-oxymethylflavanone também apresenta ação contra *S. aureus*, porém em concentrações superiores a 1000 µg/mL (ALCARAZ *et al.*, 2000). Desta forma podemos evidenciar uma discrepância nas concentrações ativas dos flavonoides em ensaios antibacterianos.

Basile e colaboradores (2000) demonstraram que o flavonoide conhecido como apigenina, isolado de *Castanea sativa*, inibiu o crescimento de *S. aureus* em concentrações superiores a 128 µg/mL, em contrapartida, Sato e colaboradores (2000) mostraram que este mesmo flavonoide, agora isolado de *Scutellaria barbata*, inibiu o crescimento da bactéria em concentrações bem inferiores, 3.9 e 15.6 µg/mL. Esta discrepância nas concentrações ativas dos flavonoides pode ser atribuída alguns fatores, como diferentes técnicas utilizadas para avaliar a ação antimicrobiana dos flavonoides, diferentes solventes utilizados para solubilizar as amostras ou ainda a procedência da molécula utilizada (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Flavonoides são compostos fenólicos produzidos pelas plantas e que desempenham importantes papéis no vegetal, incluindo defesa contra pragas como os micro-organismos (VIKRAM *et al.*, 2010). De fato, os flavonoides têm sido detectados como moléculas antibacterianas e essa atividade esta diretamente relacionada com a sua estrutura. Li e colaboradores (2009) mostraram que a ligação do anel N-heterocíclico com o anel A do flavonoide crisina faz com que a molécula aumente sua ação bacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* de 16 a 32 vezes em relação à molécula original.

Diversos mecanismos de ação têm sido propostos para ação antibacteriana dos flavonoides. De acordo com Cushnie e Lamb (2011) entre os possíveis mecanismos de ação destas moléculas estão: danos na membrana citoplasmática, causados pela

formação de poros na membrana ou reduzindo a sua fluidez; inibição da síntese de ácidos nucleicos, devido à inibição da enzima topoisomerase; inibição da energia metabólica da célula, causada pela inibição da enzima NADH citocromo C-redutase; inibição da síntese da parede celular, causado pela inibição da enzima D-alanina/D-alanina ligase; inibição da síntese da membrana celular. Outro possível mecanismo de ação proposto é a capacidade de agregação celular causado pelos flavonoides, causando assim a diminuição da área de superfície da população bacteriana, resultando na diminuição do oxigênio e nutrientes consumidos pelas bactérias (CUSHNIE; LAMB 2011). Contudo, alguns estudos sugerem que os flavonoides não possuem apenas um mecanismo de ação, mas sim múltiplos mecanismos que associados podem ser eficientes em sua ação antimicrobiana (WU *et al.*, 2008; GORDON; WAREHAM 2010; CUSHNIE; LAMB 2011).

Este trabalho mostrou ainda que derriobitusona A inibiu a formação de biofilmes de *S. aureus* e *E. coli*, reduzindo a biomassa e número de células viáveis. Embora diversos estudos relatem a atividade antibacteriana dos flavonoides, poucos descrevem o potencial antibiofilme destas moléculas. Budzyńska e colaboradores (2011) mostraram que um flavonoide sintético (3-arilidene flavonas 3C) apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e inibiu a adesão da bactéria resultando no bloqueio da formação de biofilme. Vikram e colaboradores (2010) mostraram que flavonoides cítricos foram capazes de inibir a formação de biofilmes de *Vibrio harveyi* e *E. coli*. Os resultados encontrados por Liljemark e colaboradores (1981) utilizando lectinas, mostraram que a formação de agregados celulares diminui o número de *Streptococcus* aderentes e conseqüentemente inibem a formação de biofilmes. Como relatado anteriormente, alguns flavonoides têm habilidade de agregar células bacterianas, podendo ser uma possível explicação para a inibição da formação do biofilme bacteriano causado por derriobtusona A (CUSHNIE; LAMB, 2011). Além disso, o flavonoide isolado a partir da maçã inibi a expressão de um gene que condifica uma molécula autoindutora (*lsrACDBF*), sugerindo sua interferência em uma molécula de sinalização do *quorum-sensing* (AI-2) (Lee *et al.*, 2011). Lee e colaboradores (2011) relatam ainda que este flavonoide reduziu a produção de fimbrias de *E. coli*. As fimbrias são importantes estruturas que influenciam na adesão bacteriana, assim, a inibição da formação das fimbrias pode ser uma via para a ação dos flavonoides sobre a formação dos biofilmes (RENDÓN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2011).

Além de apresentar ação antibacteriana, derriobitusona A também mostrou um potencial efeito antioxidante em diferentes ensaios. Compostos fenólicos de plantas têm sido relatados como benéficos à saúde devido ao alto consumo de frutas e vegetais, estando associados à ação antioxidante destas moléculas (HEIM *et al.*, 2002; BALASUNDRAM *et al.*, 2006). De acordo com Narsinghani e colaboradores (2013) auronas derivatizadas têm desempenhado diversas atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante. Mudanças na estrutura destas moléculas têm sido de grande importância para o desenvolvimento de novos compostos antioxidantes, aumentando sua eficiência e diminuindo a sua toxicidade (NARSINGHANI *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo mostraram que derriobtusona A foi capaz de sequestrar o radical DPPH, mesmo na menor concentração testada o composto desempenhou atividade em torno de 50%. Com relação à capacidade de quelar os íons ferrosos, a derriobtusona A apresentou atividade moderada com relação ao controle. Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com Narsinghani e colaboradores (2013) que mostraram uma significativa atividade antioxidante de cinco auronas sintéticas utilizando os testes relatados anteriormente. Em contraste, estes autores mostraram que estes compostos sintéticos mostraram um significativo poder de redução do íon ferro, atividade não evidenciada nesse estudo.

A derriobtusona A mostrou um alto potencial em inibir a oxidação do β -caroteno por protegê-lo de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Em algumas concentrações a derriobtusona A apresentou atividade similar ao controle positivo (BHA), entretanto, é interessante ressaltar que em altas concentrações de BHA pode induzir efeitos tóxicos em animais, como hiperplasia gastrointestinal (CRUCES-BLANCO *et al.*, 1999).

Estudos têm mostrado que a atividade antioxidante dos flavonoides depende do arranjo nuclear dos grupos funcionais presentes na sua estrutura (HEIM *et al.*, 2002; FARKAS *et al.*, 2004). Por exemplo, múltiplos grupos hidroxil e diferentes posições na molécula podem conferir uma maior atividade antioxidante, quelante e ação pro-oxidante, assim como uma *O*-metilação pode suprimir a ação do composto (CAO *et al.*, 1997; BURDA; OLESZEK, 2001). Outras características estruturais importantes para a ação antioxidante dos flavonoides é a presença de uma insaturação junto a uma função 1-oxo no anel C e a presença de grupos funcionais capazes de ligar a íons metálicos de transição (RICE-EVANS *et al.*, 1996). A falta destes grupos em derriobtusona A pode

explicar a moderada ação quelante dos íons ferrosos, assim como seu poder de redução do Fe^{3+} mostrados nesse estudo.

Com relação à toxicidade dos flavonoides, tem sido sugerido que pelo fato dessas moléculas serem amplamente encontradas em vegetais utilizados na alimentação, estes compostos estão associados a uma baixa toxicidade (CUSHNIE; LAMB, 2005). Entretanto, Magalhães e colaboradores (2007) mostraram que flavonoides isolados de *L. montanus* apresentaram uma alta toxicidade utilizando testes de letalidade contra *Artemia* sp., dentre os flavonoides testados uma derriobtusona A que apresentou uma CL50 de 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Corroborando com estes resultados, Santos e colaboradores (2009) mostraram que o extrato e três flavonoides isolados de *Lonchocarpus filipes* também apresentaram uma alta toxicidade utilizando este mesmo ensaio. No entanto, apesar da derriobtusona A utilizada neste estudo também pertencer ao gênero *Lonchocarpus*, não foi evidenciado nenhuma mortalidade dos náuplios de *Artemia* sp. mesmo em altas concentrações. Sendo assim, a molécula de estudo apresenta-se como um composto não tóxico para o ensaio de letalidade de náuplios de *Artemia*.

4.6 CONCLUSÕES

Em conclusão, derriobtusona A mostrou uma potencial ação antibacteriana contra *S. aureus* e foi capaz de inibir a formação de biofilme desta bactéria, no entanto *E. coli* foi mais resistente ao composto e sua ação apresentou-se mais evidente na inibição da formação de biomassa do biofilme desta bactéria. Derriobtusona A teve uma potencial ação antioxidante em diferentes ensaios. Em suas concentrações ativas, tanto na sua ação contra bactérias como antioxidante o composto não apresentou toxicidade. Desta maneira, este composto é considerado um potencial agente antimicrobiano contra infecções e contaminações causadas por *S. aureus*, além de apresentar ação antioxidante, onde pode ser utilizada contra o estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, L. E.; BLANCO, S. E.; PUIG, O. N.; TOMAS, F.; FERRETTI, F. H. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Theor. Biol.**, v. 205, n. 2, p. 231-40, jul. 2000.
- ARTINI, M.; PAPA, R.; BARBATO, G.; SCOARUGHI, G. L.; CELLINI, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; SELAN, L. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, n. 2, p. 920-926, jan. 2012.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant. Physiol.**, v. 141, n. 2, p. 391-396, jun. 2006.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem.**, v. 99, n. 1, p. 191-203, jul. 2006.
- BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANO, D.; CASTALDO COBIANCHI, R.; VUOTTO, M. L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 110-116, ago. 2000.
- BEECH, I. B.; SUNNER, J. A.; HIRAOKA, K. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **Int. Microbiol.**, v. 8, n. 3, p. 157-168, set. 2005.
- BROOKS, J. L.; JEFFERSON, K. K. Staphylococcal biofilms: quest for the magic bullet. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 81, p. 63-87, 2012.
- BROWN, J. P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. **Mutat. Res.**, v. 75, n. 3, p. 243-277, maio 1980.
- BUDZYNSKA, A.; ROZALSKI, M.; KAROLCZAK, W.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; SADOWSKA, B.; ROZALSKA, B. Synthetic 3-arylidene flavanones as inhibitors of the initial stages of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. **Z. Naturforsch. C.**, v. 66, n. 3-4, p. 104-114, mar./abr. 2011.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, maio 2001.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, n. 5, p. 749-760, jun. 1997.
- CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 41, n. 6, p. 1067-1072, jul. 2008.

- CRUCES-BLANCO, C.; CARRETERO, A. S.; BOYLE, E. M.; GUTIÉRREZ, A. F. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs, **Talanta**, v. 50, n. 5, p. 1099-1108, dez. 1999.
- COBRADO, L.; AZEVEDO, M. M.; SILVA-DIAS, A.; RAMOS, J. P.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, n. 5, p. 1159-1162, maio 2012.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, ago. 2011.
- DUAN, X. J.; ZHANG, W. W.; LI, X. M.; WANG, B. G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chem.**, v. 95, n. 1, p. 37-43, mar. 2006.
- DUNNE Jr, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 155-166, abr. 2002.
- FARKAS, O.; JAKUS, J.; HÉBERGER, K. Quantitative Structure – Antioxidant activity relationships of flavonoid compounds. **Molecules**, v. 9, n. 12, p. 1079-1088, dez. 2004.
- GANESAN, P.; KUMAR, C. S.; BHASKAR, N. Antioxidants properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 8, p. 2717-2723, maio 2008.
- GANESH, C. K; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, jun. 1998.
- GORDON, N. C.; WAREHAM, D. W. Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 36, n. 2, p. 129-131, ago. 2010.
- HARBORNE, Jeffrey; BAXTER, Herbert. **The handbook of natural flavonoids**. Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons, 1999. 1800 p.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, nov. 2000.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, n. 10, p. 572-584, out. 2002.

HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; VAN BREUSEGEM, F.; MUNNÉ-BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends Plant. Sci.**, v. 14, n. 3, p. 125-132, mar. 2009.

KAWAI, M.; HIRANO, T.; HIGA, S.; ARIMITSU, J.; MARUTA, M.; KUWAHARA, Y.; OHKAWARA, HAGIHARA, T.K; YAMADORI, T; SHIMA, Y; OGATA, A; KAWASE, I; TANAKA, T. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. **Allergol. Int.**, v. 56, n. 2, p. 113-123, jun. 2007.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; CAVAL, S. M.; BINKOSK, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am. J. Med.**, v. 113, n. 9, p. 71-88, dez. 2002.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Med.**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, out. 2010.

LEE, J. H.; REGMI, S. C.; KIM, J. A.; CHO, M. H.; YUN, H.; LEE, C. S.; LEE, J. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 12, p. 4819-4827, dez. 2011.

LI, H. Q.; SHI, L.; LI, Q. S.; LIU, P. G.; LUO, Y.; ZHAO, J.; ZHU, H. L. Synthesis of C(7) modified chrysin derivatives designing to inhibit β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) as antibiotics. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 17, p. 6264-6269, set. 2009.

MAGALHÃES, D. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, A. D. P. C.; PEREZ, M. A. F. Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 79, n. 3, p. 351-367, set. 2007.

MAGALHÃES, A. F.; SANTOS, C. C.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A. Detection of polyhydroxyalkaloids in *Lonchocarpus* extracts by GC-MS of acetylated derivatives **Phytochem. Anal.**, v. 13, n. 4, p. 215-221, jul./ago. 2002.

MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. **Food Chem.**, v. 131, n. 2, p. 541-545, mar. 2012.

Mc CAY, P. H.; OCAMPO-SOSA, A. A.; FLEMING, G. T. A. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 30-38, jan. 2010.

MIDDLETON Jr, Elliott; CHITHAN, Kandaswami. **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer**. In: Harborne Jeffrey, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall, 1993.

MIKA, F.; HENGGE, R. Small regulatory RNAs in the Control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 3, p. 4560-4579, fev. 2013.

MILLEZI, F. M.; PEREIRA, M. O.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N.; AUAD, I.; CARDOSO, M. D. G.; PICCOLI, R. H. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **J. Food Saf.**, v. 32, n. 3, p. 351-359, ago. 2012.

PAN, M. H.; LAI, C. S.; HO, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food Funct.**, v. 1, n. 1, p. 15-31, out. 2010.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 677-701, out. 2003.

RADWAN, M. M.; RODRIGUEZ-GUZMAN, R.; MANLY, S.P.; JACOB, M.; ROSS, S.A. Sepicanin A- A new geranyl flavanone from *Artocarpus sepicanus* with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytochem. Lett.**, v. 2, n. 4, p. 141-143, nov. 2009.

REN, W.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: promising anticancer agents. **Med. Res. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 519-534, jul. 2003.

RENDÓN M. A.; SALDAÑA, Z.; ERDEM, A. L.; MONTEIRO-NETO, V.; VÁZQUEZ, A.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, n. 25, p. 10637-10642, jun. 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, abr. 1996.

RUKAYADI, Y.; LEE, K.; HAN, S.; YONG, D.; HWANG, J. K. In vitro activities of panduratin A against clinical *Staphylococcus* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 10, p. 4529-4532, out. 2009.

SANTOS, E. L.; COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; VAZ, N. P.; MAIA, B. H. L. N. S.; MAGALHÃES, E. G.; TOZZI, A. M. Toxicity and antioxidant activity of flavonoids from *Lonchocarpus filipes* root bark. **Quím. Nova**, v. 32, n.9, p. 2255-2258, nov. 2009.

SATO, Y.; SUZAKI, S.; NISHIKAWA, T.; KIHARA, M.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, n. 3, p. 483-488, out. 2000.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 8, p. 979-990, ago. 2012.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal J. Med. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 72-78, jan./jun. 2009.

STANNER, S. A.; HUGHES, J.; KELLY, C. N.; BUTTRISS, J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. **Public Health Nutr.**, v. 7, n. 3, p. 407-422, maio 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000.

NARSINGHANI, T.; SHARMA, M. C.; BHARGAV, S. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. **Med. Chem. Res.**, v. 22, n. 9, p. 4059-4068, set. 2013.

VAN BREUSEGEM, F.; DAT, J. F. Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiol.**, v. 141, n. 2, p. 384-390, jun. 2006.

VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JESUDHASAN, P. R.; PILLAI, S. D.; PATIL, B. S. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, n. 2, p. 515-527, ago 2010.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chem.**, v. 116, n. 1, p. 240-248, set. 2009.

WU, D.; KONG, Y.; HAN, C.; CHEN, J.; HU, L.; JIANG, H.; SHEN, X. D-alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, n. 5, p. 421-426, nov. 2008.

Capítulo V

EFEITO DE DITERPENO CASBANO NA PREVENÇÃO E CONTROLE DE BIOFILMES MONOESPÉCIE E MISTOS FORMADOS POR BACTÉRIAS E LEVEDURAS ³

5.1 INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais humanas estão associadas, em sua maioria, à formação de biofilmes (HØIBY 2011; MURPHY; CLEGG, 2013). Essas comunidades microbianas apresentam elevada resistência às defesas dos hospedeiros e também aos agentes antimicrobianos administrados (HØIBY *et al.*, 2010). Os biofilmes podem ser formados por bactérias e/ou fungos, e vários estudos têm descrito a associação de um conjunto destes micro-organismos em amostras clínicas (PETERS *et al.*, 2010; ELIAS; BANIN, 2012).

Candida albicans é descrita como uma das principais espécies causadora de infecções nosocomiais na corrente sanguínea em pacientes em unidades de terapia intensiva e em estado de neutropenia (KETT *et al.*, 2011; BONNIN, 2012). Esta levedura é frequentemente encontrada em biofilmes polimicrobianos associados com bactérias (DOUGLAS, 2002). Alguns trabalhos mostram que *Candida* e *Pseudomonas* foram isoladas em associação a partir de fibrose cística pulmonar e infecções em lesões causadas por queimaduras (GUPTA *et al.*, 2005; VALÊNCIA *et al.*, 2008). A interação entre estes dois micro-organismos é caracterizada como uma interação antagônica (MCALESTER *et al.*, 2008; WILLIAMS; CÁMARA, 2009). *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* também têm sido isolados juntos, na forma de biofilmes, a partir de diversas superfícies mucosas, incluindo mucosa vaginal e oral (KLOTZ *et al.*, 2007). A combinação entre *C. albicans* e *S. aureus* resulta em uma interação sinérgica entre as espécies (CARLSON; JOHNSON, 1985; CARLSON, 1988).

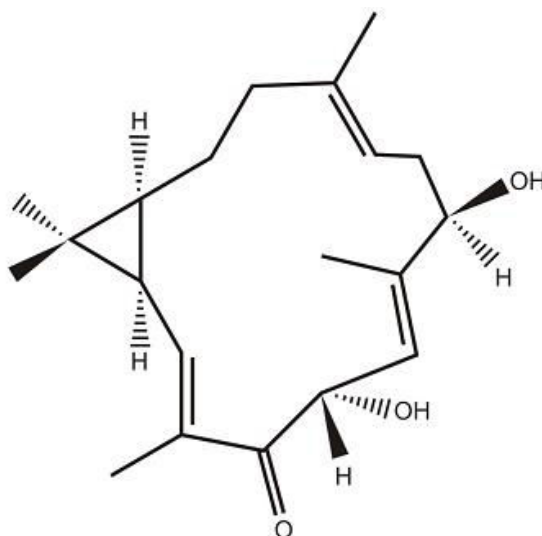
A maioria dos estudos que relatam a interação entre o gênero *Candida* e espécies bacterianas em biofilmes mistos concentram-se na espécie de *C. albicans*, desconsiderando muitas vezes biofilmes formados por outras espécies de *Candida*

³ Trabalho recentemente submetido para publicação como: Mayron A. Vasconcelos, Francisco V. S. Arruda, Helcio S. Santos, Adriano S. Rodrigues, Paulo N. Bandeira, Maria R.J.R. Albuquerque, Benildo S. Cavada, Edson H. Teixeira, Mariana Henriques, Maria O. Pereira. Effect of casbane diterpene on the prevention and control of biofilm infections caused by bacteria and *Candida* species. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*.

(BANDARA *et al.*, 2010). Em estudos anteriores, *Candida glabrata* era considerada uma levedura saprófita não patogênica presente na flora de pessoas saudáveis, não sendo associada a infecções graves. Porém, ao contrário do que se acreditava, esta espécie pode disseminar-se rapidamente por todo o corpo e as infecções causadas estão associadas a uma alta mortalidade (SILVA *et al.*, 2011).

Estudos de infecções causadas por biofilmes mistos são limitados. As análises de infecções polimicrobianas são comumente confundidas com outros fatores de risco que levam a uma análise clínica ineficaz, causando uma maior gravidade da doença devido à utilização de terapias inadequadas (PELEG *et al.*, 2010; MORALES; HOGAN, 2010). Neste contexto, devem ser tomadas medidas no intuito de estudar compostos capazes de prevenir ou erradicar biofilmes formados por mais de uma espécie microbiana. Compostos naturais isolados de plantas vêm surgindo como potenciais ferramentas biotecnológicas com potencial antimicrobiano (SCHACHTER, 2003). Alguns estudos mostram que uma classe de moléculas conhecidas como diterpenos estão diretamente associados à atividade antimicrobiana de alguns extratos naturais (HABIBI *et al.*, 2000; VELIKOVA *et al.*, 2000). Diterpeno casbano (DC, 1,4-diidroxí-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbano) (Figura 24) foi isolado de *Croton nepetaefolius* (SANTOS *et al.*, 2008), e sua atividade antimicrobiana contra bactérias e leveduras patogênicas foi recentemente estudada (CARNEIRO *et al.*, 2011; SÁ *et al.*, 2012).

Figura 24 – Estrutura química do diterpeno casbano isolado da casca do tronco de *Croton nepetaefolius*. (CARNEIRO *et al.*, 2010)



5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do diterpeno casbano (DC), isolado de *C. nepetaefolius*, sobre o crescimento planctônico, formação de biofilme e biofilmes pré-formados por uma única espécie ou pela associação entre bactéria-*Candida*.

5.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade do DC sobre o crescimento planctônico de *S. aureus* JKD 6008, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC 2001;
- Avaliar a atividade do DC sobre o crescimento planctônico da associação formada entre bactéria-*Candida*;
- Avaliar a inibição da formação de biomassa dos biofilmes de bactérias e leveduras citadas anteriormente além dos biofilmes mistos formados entre bactéria-*Candida* na presença diferentes concentração de DC;
- Avaliar a ação de DC sobre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) presentes nos biofilmes formados pelas bactérias e leveduras citadas anteriormente e pelos biofilmes mistos formados entre bactéria-*Candida*;
- Verificar a ação do DC sobre a biomassa dos biofimes pré-formados das bactérias e leveduras citadas anteriormente e pelos biofilmes mistos formados entre bactéria-*Candida*;
- Avaliar a atividade de DC sobre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) presentes nos biofilmes pré-formados das bactérias e leveduras citadas anteriormente e pelos biofilmes mistos formados entre bactéria-*Candida*;
- Avaliar através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a topologia dos biofilmes formados entre bactéria-*Candida* e a morfologia das células presentes nos biofilmes crescidos na presença e ausência do DC;
- Avaliar através de Microscopia Eletrônica de Varredura a topologia dos biofilmes pré-formados de bactéria-*Candida* e a morfologia das células presentes nos biofilmes após o tratamento com DC;

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Material vegetal

Cascas do tronco de *C. nepetaefolius* foram coletadas em Caucaia - Ceará (Brasil) e material foi identificado pelo Dr. Edson Paula Nunes, no Herbário Prisco Bezerra (EAC), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. A exsiccata da espécie encontra-se depositada no mesmo herbário de identificação sob o número 33.582.

5.3.2 Isolamento do diterpeno casbano

A casca do tronco (5,0 kg) de *C. nepetaefolius* foi triturado a pó e submetida à extração com etanol (EtOH) a 25 °C. O solvente foi removido sob pressão reduzida resultando no extrato de EtOH. O extrato de EtOH (58,6 g) foi fracionado em uma coluna de gel de sílica por eluição com hexano (F 1-15), hexano/acetato de etila (EtOAc) (1:1 F 16-25), EtOAc (F 26-40) e EtOH (F 41-48), obtendo-se um total de 48 frações de 100 mL cada. As frações de hexano (22,5 g) foram alíquotadas e recromatografadas em uma coluna de gel de sílica utilizando o hexano (F' 1-10), hexano/EtOAc (1:1 F' 11-16), EtOAc (F' 17-21) e EtOH (F' 22-25), obtendo-se um total de 25 frações de 100 mL cada. As frações (F' 11-16 - 14,0 g), obtidas com hexano/EtOAc (1:1) foram fracionadas em uma coluna de gel de sílica por eluição com hexano (F'' 1), hexano/EtOAc (9:1 F'' 2-5; 8:2 F'' 6-15; 7:3 F'' 16-32) e EtOAc (F'' 33), obtendo-se um total de 33 frações de 100 mL cada. As frações (F'' 10 -13) obtidas com hexano/EtOAc (8:2) forneceram o diterpeno 1,4-diidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbano.

5.3.3 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, *S. aureus* JKD 6008 e *P. aeruginosa* ATCC 10145.

5.3.4 Condições de Cultivo

As bactérias e leveduras foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Liofilchem, Itália), respectivamente, e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento, uma colônia isolada da bactéria e da levedura foi removida e inoculada em 10 mL de caldo de Triptona de Soja (TSB) e Sabouraud

Dextrose (SDB) (Liofilchem, Itália), respectivamente, e incubadas durante 18 horas a 37 °C sob agitação constante de 120 rpm. Antes do uso, as células foram centrifugadas a 8000 rpm durante 10 minutos a 4 °C e lavadas com tampão fosfato de sódio 0,1 M (PBS, pH 7,0). Em seguida, a concentração final do inóculo de bactérias foi ajustada para 2×10^6 células/mL em Caldo Nutriente (CN) (Liofilchem, Itália) através de curvas de calibração previamente determinadas para cada bactéria. A concentração de cada inóculo de leveduras foi ajustada para 2×10^6 células/mL utilizando câmara de Neubauer.

5.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O efeito do DC sobre o crescimento planctônico foi determinado pelo método de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços. O DC foi diluído em CN contendo 4% de dimetilsulfóxido (DMSO, v/v) em concentrações que variaram de 62,5 a 1000 µg/mL e incubados juntamente com os micro-organismos previamente ajustados a 2×10^6 células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas a 120 rpm. A densidade óptica de cada poço foi mensurada a 640 nm (OD_{640}) usando um leitor de Elisa automático (Synergy TM HT Multi-Detection Microtiter Reader). A CIM foi considerada como a menor concentração de DC que inibiu completamente o crescimento visível dos micro-organismos. Os ensaios foram realizados com uma única espécie e em combinações entre bactérias e leveduras.

5.3.6 Efeito do diterpeno sob a formação de biofilmes e biofilme pré-formado

A ação de DC foi testada sobre a formação do biofilme e também sobre os biofilmes pré-formados. A metodologia utilizada para os ensaios baseou-se no teste de placa de microtitulação desenvolvido por Stepanovic e colaboradores (2000), com algumas modificações. Assim como o ensaio de crescimento planctônico, os ensaios para ação do composto sobre biofilmes foram realizados com uma única espécie (monoespécie) e em combinações entre bactérias e leveduras (biofilmes mistos).

Os ensaios para avaliar ação de DC na formação dos biofilmes foram realizados em placas de polipropileno de 96 poços estéreis. As placas foram preparadas utilizando um procedimento semelhante ao utilizado para os ensaios de crescimento planctônico, com a mesma concentração de células e DC, assim como os mesmos meios de cultura. Todas as placas foram incubadas em um agitador horizontal (120 rpm) a 37

°C durante 24 horas para o desenvolvimento do biofilme. Após o crescimento do biofilme, na presença ou ausência de DC, o conteúdo de cada poço foi removido e os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS com o objetivo de remover as células fracamente aderidas. Em seguida, cada poço foi raspado vigorosamente com uma ponteira e as suspensões contidas nos poços foram alíquotadas em tubos de 1,5 mL. Para os biofilmes formados por uma única espécie, foram feitas diluições decimais seriadas a partir da suspensão obtida, e em seguida plaqueadas em TSA e SDA para bactérias e leveduras, respectivamente. Para o biofilme formado por duas espécies, os micro-organismos foram inoculados em meios específicos. *S. aureus* foi inoculado em Agar Sal Manitol (MSA, Liofilchem, Itália) e *P. aeruginosa* em Pseudomonas Isolation Agar (PIA, Fluka Analytical, Suíça), com o objetivo de inibir o crescimento das espécies de *Candida*. As leveduras foram inoculadas em SDA suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich), para inibir o crescimento de *S. aureus* e com 50 µg/mL de tetraciclina (Sigma-Aldrich) para inibir o crescimento de *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, o número total de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi enumerado e os resultados foram apresentados em logUFC/cm² da placa de microtitulação.

A biomassa dos biofilmes foi determinada utilizando a coloração violeta cristal. Para a fixação do biofilme foram adicionados a cada poço 200 µL de metanol a 99% (Romil, Reino Unido). Após 15 minutos, o metanol foi removido e as placas secas a 25 °C. Em seguida, 200 µL de violeta cristal (Merck, Alemanha) foram adicionados a cada poço, e após 5 minutos foi removido o excesso do corante e as placas lavadas com água. Finalmente, 200 µL de ácido acético (33%, v/v) (Pronalab, Portugal) foram adicionados a todos os poços para dissolver a coloração do violeta cristal e a absorbância foi medida a 570 nm (OD₅₇₀).

Os ensaios de biofilmes pré-formados, com uma única espécie ou com duas espécies, também foram realizados em placas de 96 poços. As suspensões de células (200 µL de 10⁶ células/mL em CN) foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37 °C durante 24 horas a 120 rpm. Após esse período, o meio de cultura foi removido de cada poço e um volume igual de DC diluído em CN (mesmas concentrações descritas anteriormente) ou apenas meio foi adicionado aos poços. Após a formação dos biofilmes durante mais 24 horas, o meio foi retirado e cada poço foi lavado com 200 µL de PBS para remover as células não aderidas. A mesma metodologia citada anteriormente foi utilizada para remover os biofilmes aderidos nas placas, bem como

enumeração de células viáveis e quantificação da biomassa do biofilme.

5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes mistos

A ação de DC sobre a formação de biofilmes mistos, formados por bactéria e levedura, assim como biofilmes pré-formados foram analisados por MEV (S-360, Leo, Cambridge, EUA). Tanto a ação de DC na formação dos biofilmes quanto sua ação sobre os biofilmes pré-formados foram desenvolvidos utilizando metodologias semelhantes às descritas anteriormente, no entanto utilizando placas de 24 poços, porém o composto foi utilizado em uma única concentração (250µg/mL). Após a formação dos biofilmes as células fracamente foram retiradas e as placas foram lavadas com água estéril e posteriormente desidratadas com álcool (etanol a 70% durante 10 minutos, 95% de etanol durante 10 minutos e etanol a 100% durante 20 minutos). Após a desidratação, as placas foram secas a 25°C e então excisados os fundos das placas contendo os biofilmes. Os cortes referentes ao fundo placa de poliestireno contendo os biofilmes foram revestidos com ouro e visualizados em Microscópio Eletrônico de Varredura S-360 (Leo, Cambridge, USA).

5.3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA), com o teste Bonferroni post-hoc. $p < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Concentração inibitória mínima

Os resultados mostraram que o DC foi capaz de inibir o crescimento de planctônico de todos os micro-organismos avaliados. Entretanto, no crescimento planctônico de *C. glabrata* e *P. aeruginosa*, assim como na associação entre *P. aeruginosa* e as duas espécies de *Candida*, a inibição do crescimento não total, sendo assim a CIM não foi determinada (Tabela 6). Contudo, DC causou uma inibição de 64 e 45% sobre o crescimento de *C. glabrata* e de 73 e 50% sobre o crescimento de *P. aeruginosa* nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, respectivamente. No crescimento planctônico de *P. aeruginosa* e *C. albicans* e na associação entre elas, DC inibiu o

crescimento em 78 e 48% e na associação a inibição foi de 87 e 45% nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, respectivamente. A molécula apresentou CIM para *S. aureus* e *C. albicans* nas concentrações de 125 e 500 µg/mL, respectivamente e para associação entre *S. aureus* e *C. albicans* o composto apresentou uma CIM de 500 µg/mL e entre *S. aureus* e *C. glabrata* a CIM foi de 250 µg/mL (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentração inibitória mínima (CIM) de diterpeno casbano contra micro-organismos monoespécie e associações entre bactérias e leveduras.

Micro-organismos	CIM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> JKD 6008	125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	-
<i>C. albicans</i> ATCC 902008	500
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	-
<i>S. aureus</i> JKD 6008 / <i>C. albicans</i> ATCC 902008	500
<i>S. aureus</i> JKD 6008 / <i>C. glabrata</i> ATCC 2001	250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 / <i>C. albicans</i> ATCC 902008	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 / <i>C. glabrata</i> ATCC 2001	-

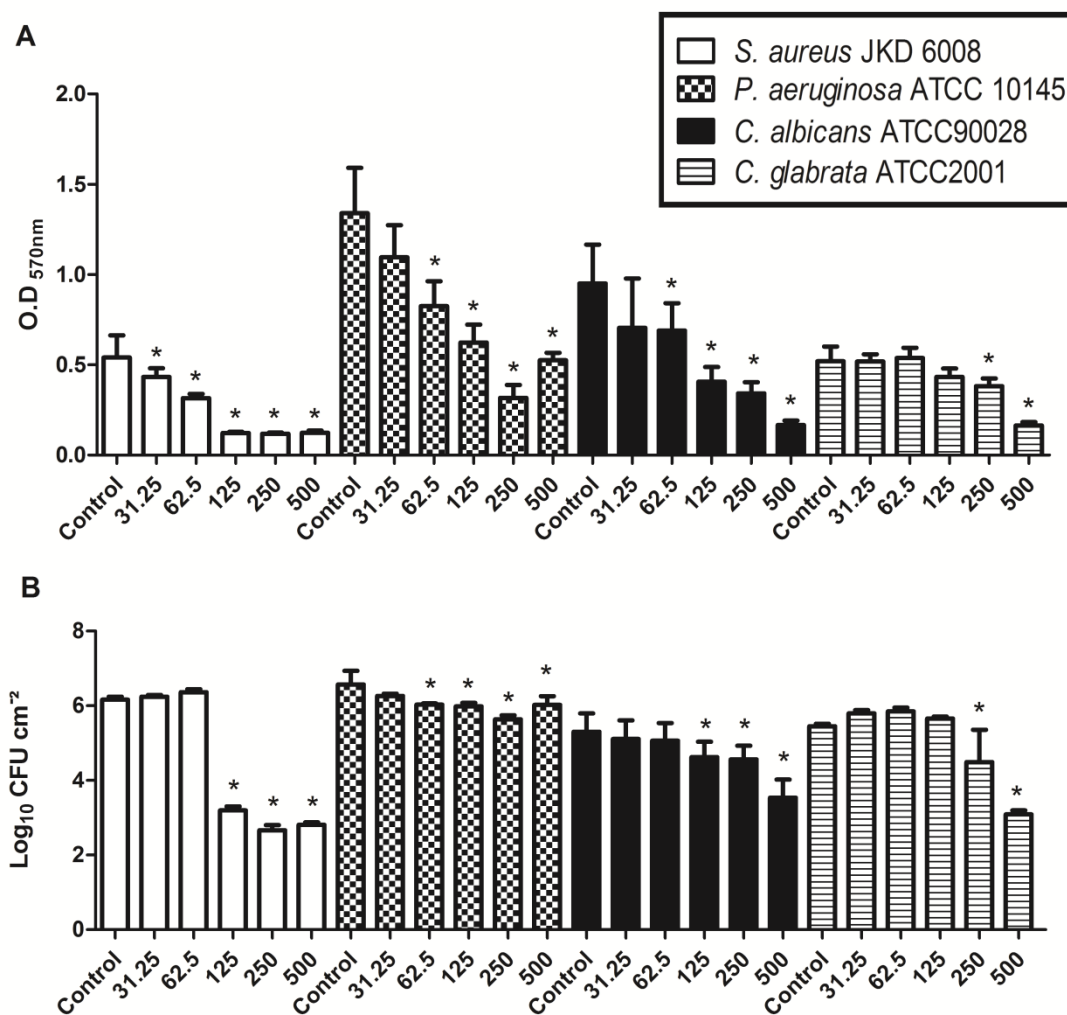
5.4.2 Efeito de DC sobre a formação de biofilmes monoespécies

Corroborando os resultados obtidos com a ação do DC sobre o crescimento planctônico, o composto foi capaz de reduzir a formação de biofilmes monoespécie de todos os micro-organismos, seja bactéria ou levedura. Na figura 25A observa-se que DC inibiu a formação de biomassa dos biofilmes de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* em quase todas as concentrações testadas. No entanto, a biomassa do biofilme de *C. glabrata* foi reduzida apenas nas duas maiores concentrações.

Em relação ao número de UFC's presentes nos biofilmes monoespécie, nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL DC foi capaz de reduzir o número de UFC's em cerca de 3,0 log nos biofilmes de *S. aureus* e em apenas 1,0 log o número de células viáveis do biofilme de *P. aeruginosa* (Figura 25B). Em relação as leveduras, DC reduziu o número de células viáveis em 1,8, 0,8 e 0,7 log do biofilme de *C. albicans* nas

concentrações de 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ e 2,4 e 0,9 log para o biofilme de *C. glabrata* nas concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25B).

Figura 25 – Formação de biofilme monoespécie na presença de diterpeno casbano. (A) Quantificação da biomassa dos biofilmes e (B) número de células viáveis presentes nos biofilmes. * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



5.4.3 Efeito do diterpeno sobre a formação de biofilmes mistos

Assim como para os biofilmes formados por apenas uma espécie DC também foi capaz de inibir a formação de biomassa e o número de UFC's presentes nos biofilmes formados pela associação entre bactéria e levedura.

DC foi capaz de reduzir a formação de biomassa dos biofilmes formados pela associação entre *S. aureus* e as duas espécies de *Candida* (Figura 26A e 26C).

Além disso, o composto mostrou-se capaz de reduzir a biomassa do biofilme formado pela associação entre *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 27A). Curiosamente, DC apresentou uma baixa redução de biomassa no biofilme formado entre *P. aeruginosa* e *C. glabrata* (Figura 27C).

Em relação à ação de DC sobre o número de células viáveis dos biofilmes mistos, o composto apresentou ação semelhante sobre *S. aureus* quando comparado em biofilmes mistos (com as duas espécies de *Candida*) e monoespécie (Figura 26B e D). Curiosamente, as leveduras foram menos sensíveis à DC em biofilmes mistos com *S. aureus*. Para as duas espécies de *Candida*, DC reduziu o número de células viáveis dos biofilmes apenas na maior concentração (500 µg/mL), reduzindo o número de UFC's de *C. albicans* e *C. glabrata* em aproximadamente 1,0 e 2,0 log, respectivamente (Figura 26B e D).

Em biofilmes mistos formados por *P. aeruginosa* e as duas espécies de *Candida*, a redução das células viáveis da bactéria foi semelhante aos resultados observados no biofilme monoespécie (Figuras 27B e D). Para *C. albicans*, DC apresentou uma redução moderada no número de UFC's da levedura em quase todas as concentrações testadas (Figura 27B), enquanto que o composto mostrou bastante efetividade sobre *C. glabrata*, reduzindo a 0 o número de UFC's nas concentrações de 500 e 250 µg/mL e reduzindo moderadamente nas concentrações de 125 e 62,5 µg/mL (Figura 27D).

Curiosamente, em biofilmes mistos, verificou-se que os números de células viáveis das duas espécies de *Candida* apresentaram uma redução de aproximadamente 1,0 log na presença de *S. aureus* e *P. aeruginosa* quando comparados ao número de UFC's obtido em biofilmes monoespécie. Além disso, na presença das leveduras, o número de células viáveis de *S. aureus* aumentou em aproximadamente 1,0 log, enquanto que o número de UFC's de *P. aeruginosa* permaneceu nas mesmas proporções (dados não mostrados).

Figura 26 – Formação de biofilmes mistos da associação entre *S. aureus* e duas espécies de *Candida* na presença de diterpeno casbano. (A) e (C) Quantificação da biomassa dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes. * $p < 0,05$ em comparação com o controle.

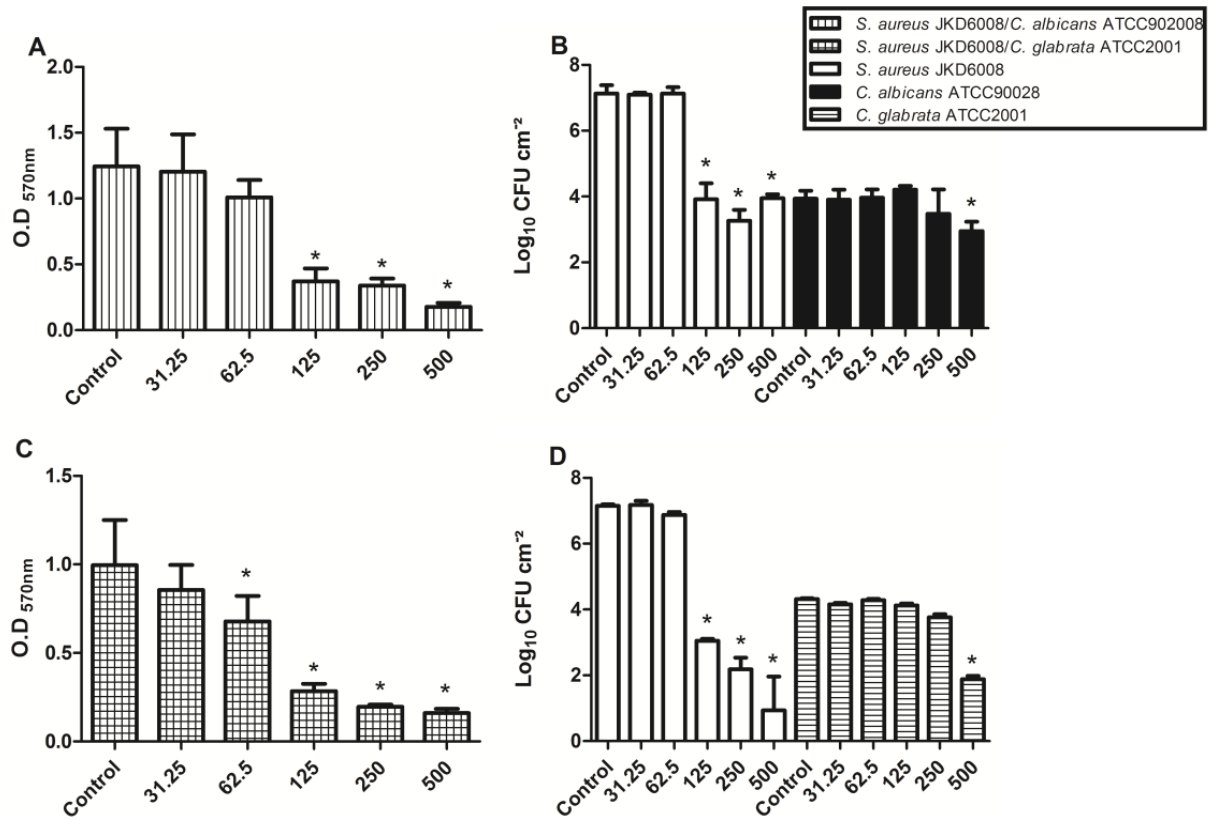
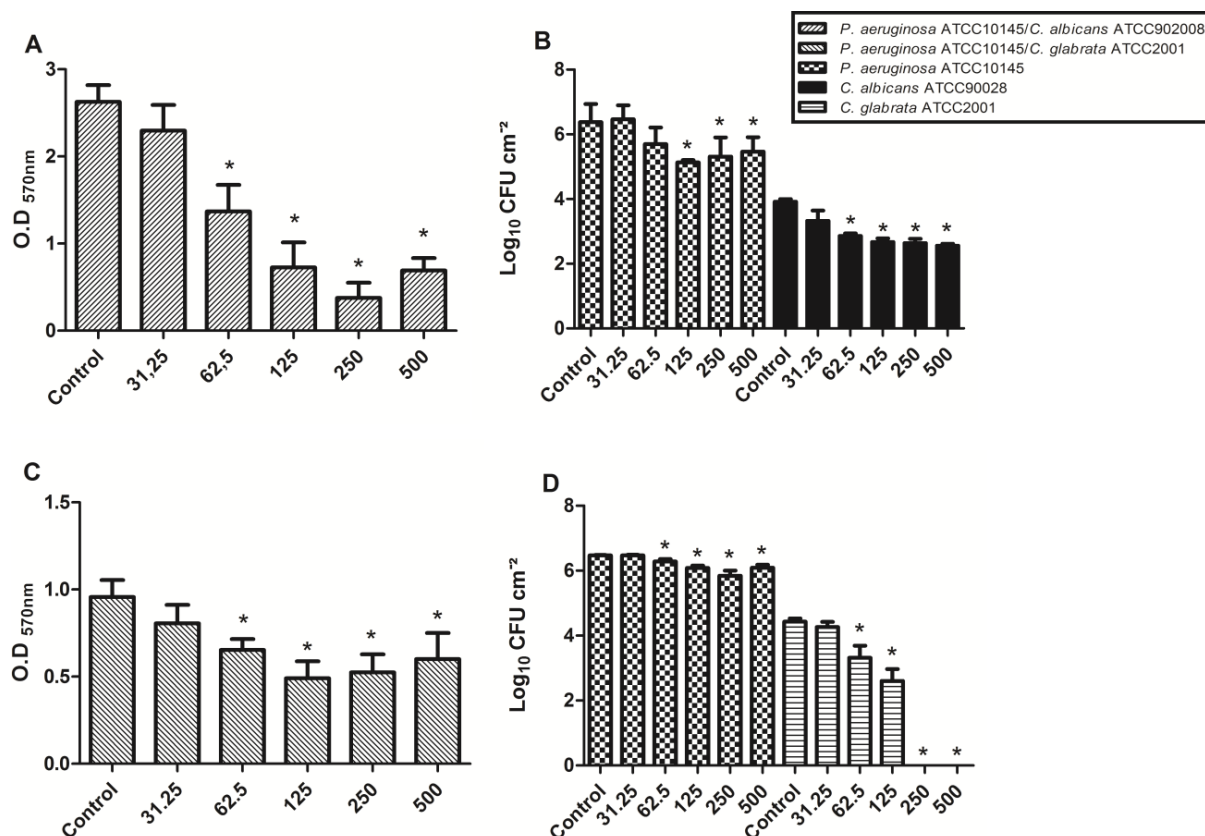


Figura 27 – Formação de biofilmes mistos da associação entre *P. aeruginosa* e duas espécies de *Candida* na presença de diterpeno casbano (A) e (C) Biomassas dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes. * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



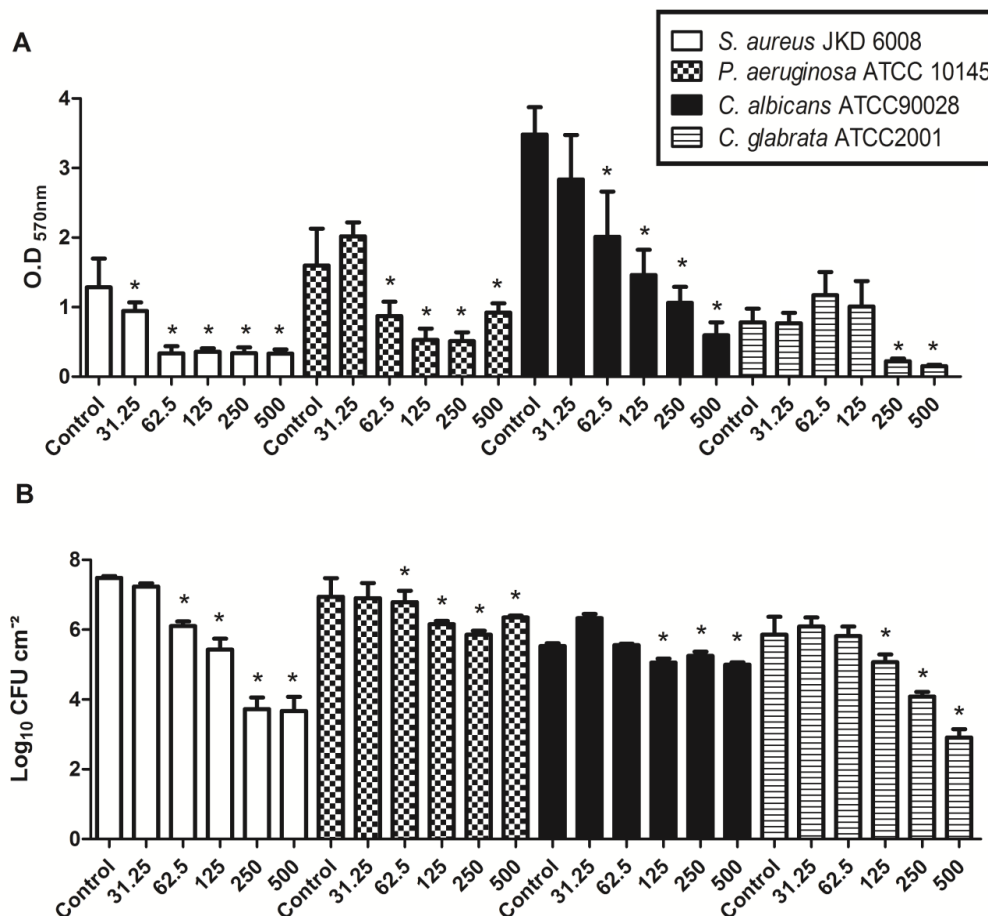
5.4.4 Efeito do diterpeno sobre biofilmes pré-formados monoespécie

Além dos ensaios de formação de biofilme na presença do DC, este composto foi adicionado aos biofilmes pré-formados e verificada sua ação sobre a biomassa e número de células viáveis dos biofilmes monoespécies, assim como sobre biofilmes mistos.

Os resultados mostraram que o DC foi capaz de reduzir a biomassa de todos os biofilmes monoespécies em quase todas as concentrações testadas e apenas o biofilme formado por *C. glabrata* teve sua biomassa reduzida apenas nas duas maiores concentrações do composto (Figura 28A).

Em relação ao número de células viáveis dos biofilmes pré-formados monoespécies (Figura 28B), DC reduziu o número de UFC's de *S. aureus* em aproximadamente 3 log nas concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$ e 1,5 nas concentrações de 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, os mesmo resultados não foram observados para *P. aeruginosa*, onde DC reduziu o número de UFC's em menos de 1,0 log em quase todas as concentrações do composto. Com relação ao número de células viáveis dos biofilmes pré-formados das duas espécies de *Candida*, o tratamento do biofilme de *C. albicans* com DC mostrou uma redução de aproximadamente 0,5 log nas três maiores concentrações, em contrapartida, a ação de DC sobre o biofilme de *C. glabrata* apresentou uma redução de 3 e 2 log nas concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 28 – Ação do diterpeno casbano sobre os biofilmes pré-formados monoespécie. (A) Quantificação da biomassa dos biofilmes e (B) número de células viáveis presentes nos biofilmes. * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



5.4.5 Efeito do diterpeno em biofilmes pré-formados mistos

Nos biofilmes formados por *S. aureus* e as duas espécies de *Candida* DC reduziu a biomassa em todas as concentrações testadas (Figura 29). Para o biofilme formado por *P. aeruginosa* e *C. albicans*, o DC reduziu a formação de biomassa nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL (Figura 30A). A redução da biomassa também foi observada no biofilme formado pela associação entre *P. aeruginosa* e *C. glabrata* nas concentrações de 500, 250 e 31,25 µg/mL de DC, não sendo observado um comportamento dependente da concentração (Figura 30C).

Com relação ao número de células viáveis dos biofilmes pré-formados composto por *S. aureus* e *C. albicans*, DC reduziu o número de UFC's de *S. aureus* em aproximadamente 4 log, nas concentrações de 500 e 250 µg/mL, e em 2,0 e 1,5 log, nas concentrações de 125 e 62,5 µg/mL, respectivamente. No entanto, para *C. albicans* o composto reduziu apenas 0,7 e 0,4 log o número de UFC's nas concentrações de 500 e 250 µg/mL (Figura 29B). Para o biofilme formado pela associação entre *S. aureus* e *C. glabrata*, a ação do DC sobre a bactéria foi bastante semelhante aos resultados obtidos com no biofilme formado por *S. aureus* e *C. albicans*. Porém, para *C. glabrata* DC reduziu o número de UFC's em 2,0, 0,4 e 0,3 log nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL, respectivamente (Figura 29D).

Em relação aos biofilmes mistos formados pela a associação de *P. aeruginosa* e as duas espécies de *Candida*, a redução das células viáveis da bactéria foi mínima e em algumas concentrações não apresentou diferença estatística quando comparado ao controle (Figura 30B e D). Por outro lado, a ação de DC foi bastante eficaz sobre as duas espécies de *Candida*, reduzindo o número de UFC's de *C. albicans* a zero ou próximo de zero nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL. Para *C. glabrata* o número de UFC's também foi reduzido à zero na concentração de 500 µg/mL, e nas demais concentrações testadas, o número de UFC's foi significativamente reduzido (Figura 30B e D).

Em biofilmes mistos pré-formados, a presença de *S. aureus* não alterou o número de células viáveis de *C. albicans*, no entanto para *C. glabrata* houve uma redução de aproximadamente 1,5 log, e na presença de *P. aeruginosa* a redução foi de aproximadamente 1,5 log para as duas leveduras. Assim como nos ensaios de formação de biofilmes a presença das duas espécies de *Candida* aumentou o número de células viáveis de *S. aureus* em aproximadamente em 1,0 log e reduziu o número de células viáveis de *P. aeruginosa* em 1,0 log.

Figura 29 – Ação de diterpeno casbano sobre os biofilmes pré-formados da associação entre *Staphylococcus aureus* e duas espécies de *Candida*. (A) e (C) Quantificação da biomassa dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes. * $p < 0.05$ em comparação com o controle.

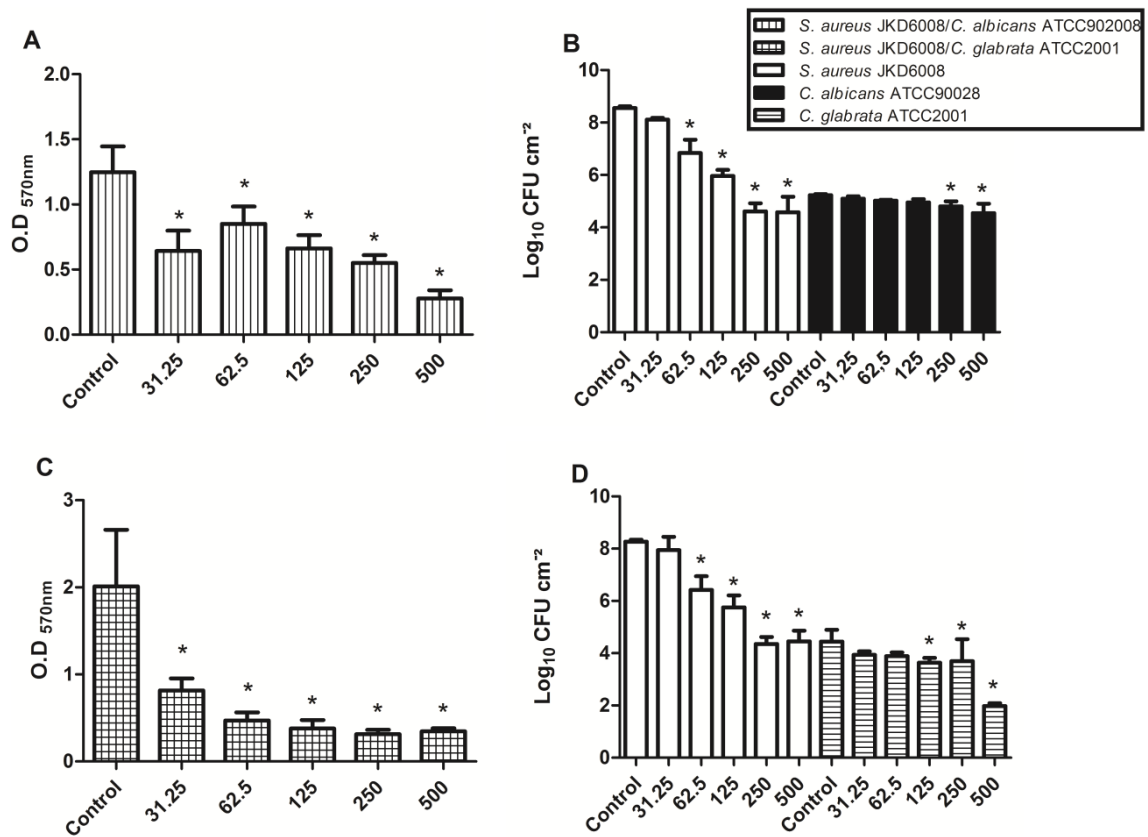
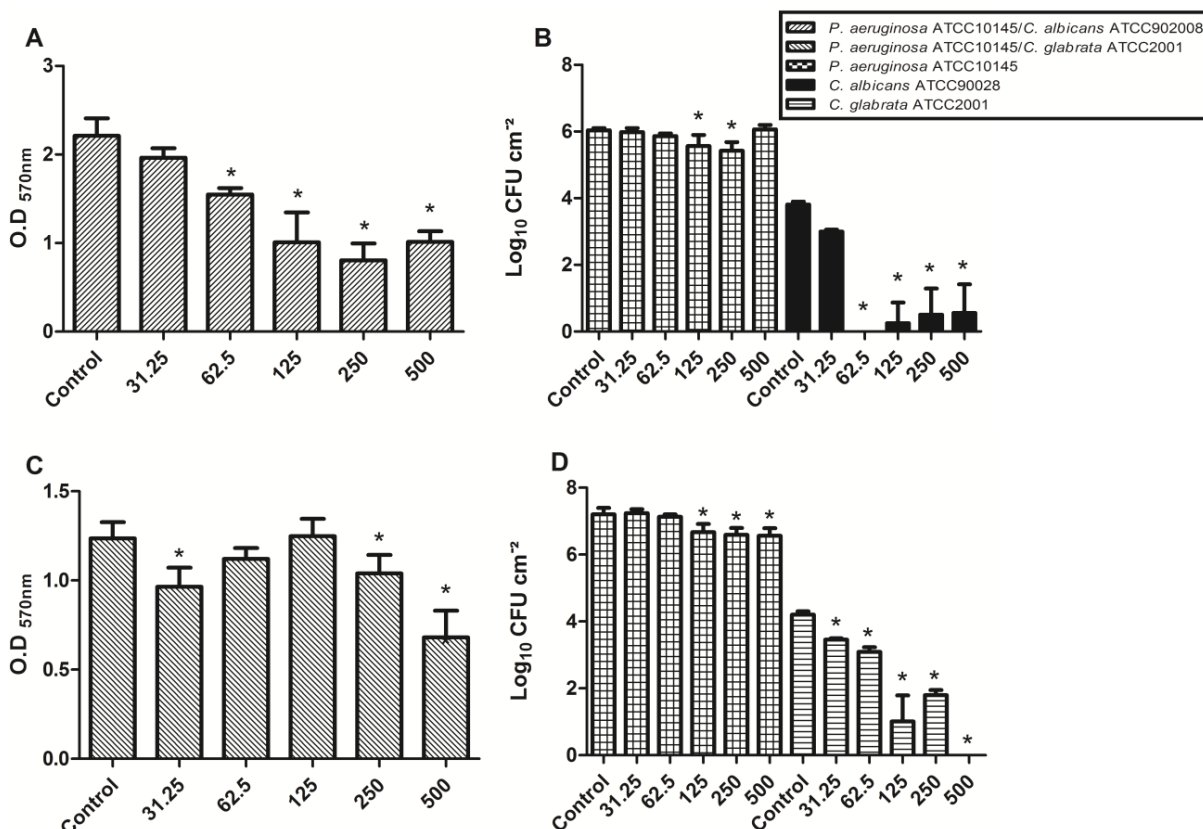


Figura 30 – Ação de diterpeno casbano sobre os biofilmes pré-formados da associação entre *Pseudomonas aeruginosa* e duas espécies de *Candida*. (A) e (C) Quantificação da biomassa dos biofilmes mistos e (B) e (D) número de células viáveis presentes nos biofilmes. * $p < 0.05$ em comparação com o controle.



5.4.6 Análise dos biofilmes mistos através de Microscopia Eletrônica de Varredura

A ação do DC durante a formação dos biofilmes mistos, assim como sua ação sobre os biofilmes pré-formados foi avaliada através de MEV (Figuras 31 e 32). A interação entre bactérias e leveduras foi claramente observada em todas as áreas dos biofilmes, onde as duas bactérias (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) foram observadas se desenvolvendo sobre as hifas formadas por *C. albicans*, assim como sobre as células de *C. glabrata*.

As imagens mostram que em geral o diterpeno induziu uma redução no número de células, assim como a mudanças na estrutura topográfica dos biofilmes e modificações morfológicas sobre as células microbianas. As imagens dos biofilmes mistos obtidos através de MEV confirmam os resultados mostrados anteriormente da ação do DC sobre as células viáveis dos biofilmes mistos. Curiosamente, durante a

formação dos biofilmes de *S. aureus* em associação com *C. albicans*, DC inibiu claramente a formação de hifas de *C. albicans* e reduziu significativamente o número de células de *S. aureus* (Figura 31B). No entanto, esta ação de DC não foi observada no biofilme misto formado por *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 31F). Nos biofilmes formados entre as duas bactérias e *C. glabrata* foi observada redução no número de células, tanto para as bactérias quanto para as leveduras na presença de DC (Figura 31D e H).

A figura 32 mostra as imagens obtidas pela ação de DC sobre os biofilmes mistos pré-formados. No biofilme formado por *S. aureus* e *C. albicans* DC claramente diminuiu o número de células de *S. aureus*, porém essa diminuição não foi observada para *C. albicans*, assim como, nenhuma inibição da formação de hifas (Figura 32B). No biofilme formado por *S. aureus* e *C. glabrata* foi observada redução no número de células da bactéria e da levedura (Figura 32D). Por outro lado, nos biofilmes formados por *P. aeruginosa* e as duas espécies de *Candida*, foi observada uma redução no número de células das duas leveduras, enquanto poucas alterações foram observadas sobre o número de células de *P. aeruginosa* (Figura 32F e H).

Figura 31 – Imagens obtidas através de MEV da formação de biofilmes mistos formados na presença e ausência de diterpeno casbano (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 3000 x magnificação. Barra = 10 μm .

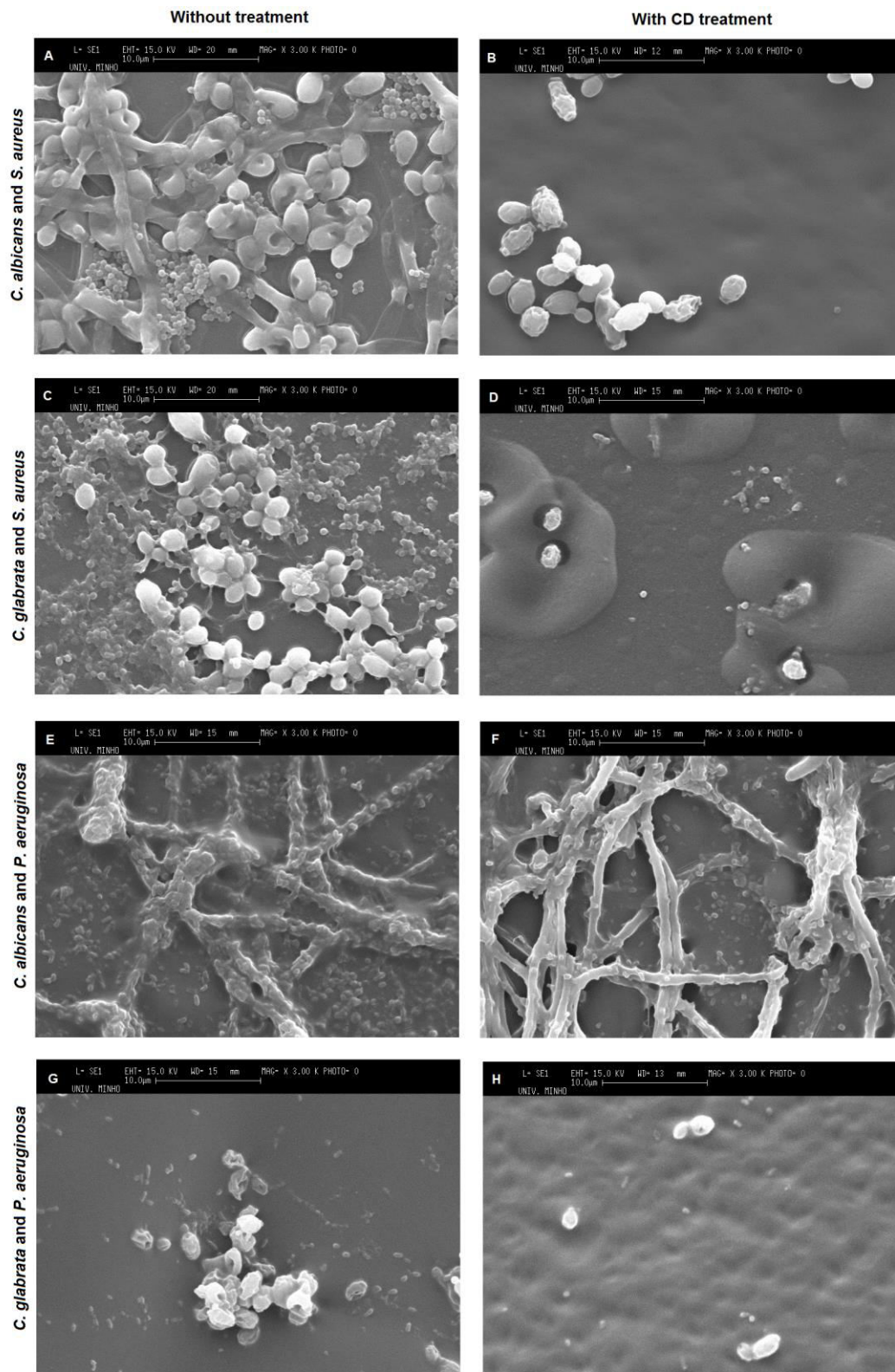
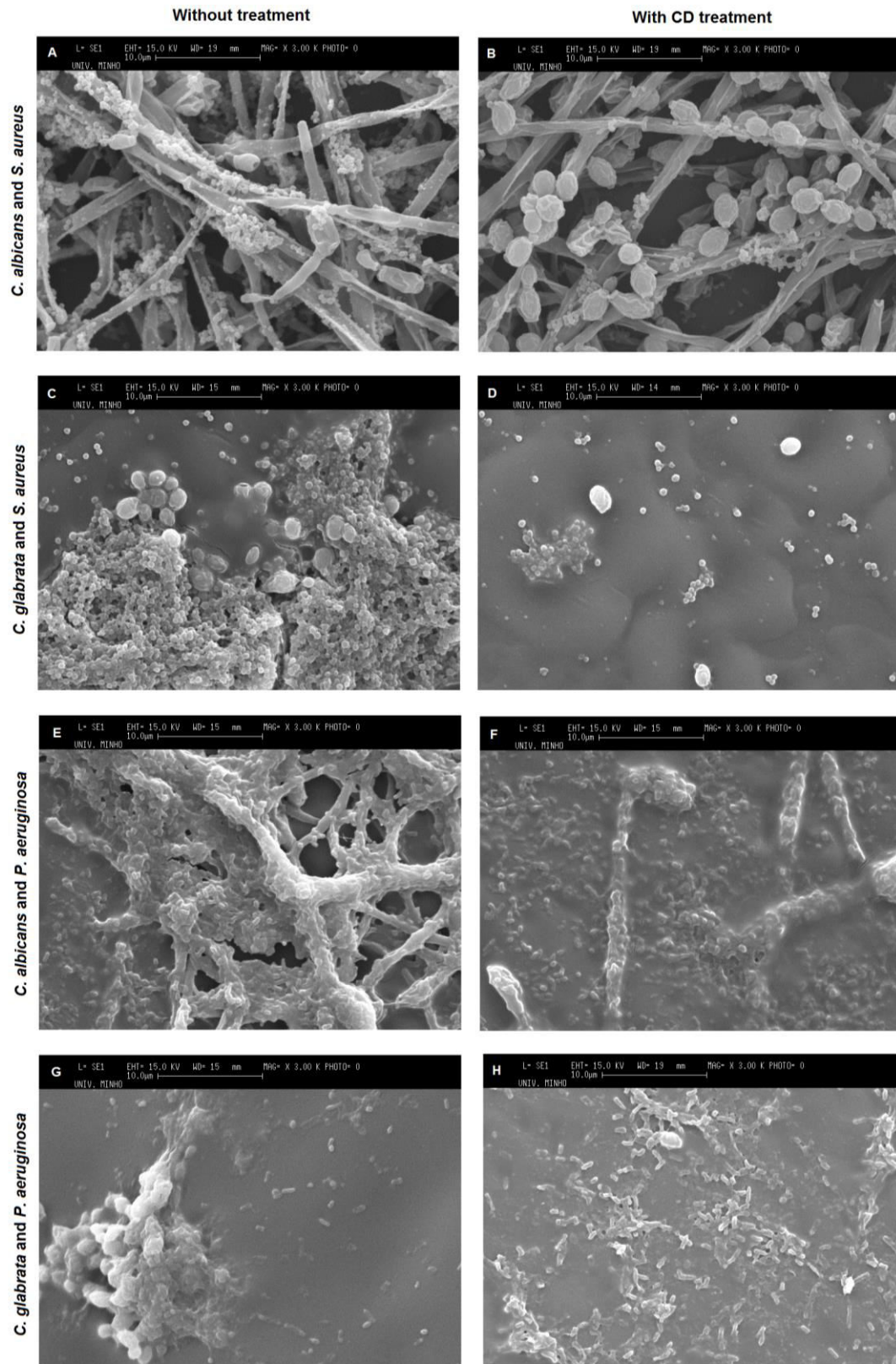


Figura 32 – Imagens obtidas através de MEV dos biofilmes pré-formados mistos tratados ou não tratados com diterpeno casbano (250 $\mu\text{g/mL}$). 3000 x magnificação. Barra = 10 μm .



5.5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito do DC, um diterpeno isolado de *C. nepetfolius*, sobre o crescimento planctônico, formação de biofilmes e biofilmes pré-formados por uma única espécie ou pela associação entre bactérias e leveduras. Os resultados mostraram que o DC apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microorganismos testados, corroborando com outros estudos que relatam a atividade antimicrobiana de diterpenos (HABIBI *et al.*, 2000; VELIKOVA *et al.*, 2000; MENDOZA *et al.*, 2002; URZÚA *et al.*, 2006).

O ensaio da CIM mostrou que bactérias e leveduras, mesmo em culturas mistas, foram susceptíveis ao DC (Tabela 6). Os resultados antimicrobianos encontrados são semelhantes aos obtidos por Sá e colaboradores (2012) trabalhando com o mesmo diterpeno contra *Streptococcus* orais. Além disso, Carneiro e colaboradores (2010) testaram o mesmo composto contra bactérias e leveduras, tais como testado no presente estudo, no entanto os resultados mostraram uma CIM maior (250 µg/mL) para *S. aureus* bem como uma menor redução do crescimento planctônico de *C. albicans* e *P. aeruginos* quando comparado com os resultados obtidos no presente trabalho. Embora as mesmas espécies e concentrações semelhantes de DC tenham sido utilizadas, as diferenças encontradas entre os dois trabalhos pode ser resultado de pequenas diferenças metodológicas, incluindo diferentes meios de cultura utilizados.

O mecanismo de ação pelo qual os diterpenos apresentam sua atividade antimicrobiana ainda não está claro, mas acredita-se que esta classe de compostos pode interagir com ácidos graxos, presentes na bicamada lipídica, desestabilizando os fosfolipídios de membrana (URZÚA *et al.*, 2008; CARNEIRO *et al.*, 2010). Segundo Urzúa e colaboradores (2008) a atividade antimicrobiana de diterpenoides pode ser devido à natureza química da molécula, que possui uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, podendo se inserir e causar danos à membrana plasmática, interferindo no desenvolvimento microbiano ou ainda causando lise na célula.

No presente estudo, DC mais eficaz contra *S. aureus* (Gram-positiva) em comparação com *P. areuginosa* (Gram-negativa) (Tabela 6). Outros estudos mostram que alguns diterpenos apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, mas não contra as Gram-negativas (URZÚA *et al.*, 1998; URZÚA *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2010). A membrana exterior presente em bactérias Gram-negativas pode constituir uma barreira física contra a permeabilidade dos diterpenoides, inibindo assim o efeito antimicrobiano do composto.

Embora diversos estudos tenham relatado atividade antimicrobiana dos diterpenos, poucos relatam a ação destes compostos sobre biofilmes. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o diterpeno casbano inibe significativamente a formação de biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, em biofilmes monoespécies bem como biofilmes mistos. Além disso, o composto também mostrou eficácia quando aplicado sobre biofilmes pré-formados.

Como mostrado anteriormente, DC é capaz de reduzir o crescimento planctônico de todas as espécies avaliadas (Tabela 6), o que explica o fato de DC diminuir a produção de biomassa e o número de células viáveis das espécies nos ensaios de formação de biofilme, uma vez que o composto é aplicado juntamente com os micro-organismos antes do biofilme estar estabelecido. A aplicação de DC no biofilme pré-formado também resultou numa redução da biomassa e de UFC's. O composto de estudo é uma pequena molécula que provavelmente pode penetrar na matriz extracelular dos biofilmes e difundir-se em seu interior através dos poros, tal como os canais de água, fazendo com que a molécula alcance os micro-organismos inseridos na matriz e assim desempenhe sua atividade antimicrobiana.

Apesar do DC mostra baixa eficiência em reduzir o número de UFC's de *P. aeruginosa*, é interessante salientar que foi capaz de reduzir significativamente a biomassa dos biofilmes formados por esta bactéria. Evans e colaboradores (1996) descrevem a importância da matriz extracelular de *P. aeruginosa* e seu importante papel como fator de virulência e resistência a antimicrobianos. Assim, de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se esperar que DC possa atuar como um facilitador da ação de outras drogas ao inibir a formação da matriz da bactéria, fazendo com que outros fármacos possam agir mais facilmente sobre as células de *P. aeruginosa* em biofilmes.

Este estudo demonstrou que *P. aeruginosa* e *S. aureus* são capazes de formar biofilmes com espécies de *Candida* e que a interação bactéria-*Candida* induz alterações nas células presentes nos biofilmes. Curiosamente, após 24 e 48 horas de formação do biofilme, a quantidade de células viáveis de *C. albicans* e *C. glabrata* foi significativamente reduzida na presença das duas bactérias quando comparados com seu biofilme monoespécie. Corroborando com esses resultados, alguns estudos têm sugerido a possível influência negativa de *P. aeruginosa* sobre o crescimento de espécies de *Candida* (HOGAN; KOLTER, 2002; WILLIAMS; CÁMARA, 2009; GIBSON *et al.*, 2009; HOLCOMBE *et al.*, 2010; BANDARA *et al.*, 2010). Hogan e Kolter (2002)

demonstraram que vários fatores de virulência de *P. aeruginosa*, incluindo o pili e algumas moléculas secretadas por esta bactéria, podem agir em conjunto para inibir a formação ou ainda lisar hifas de *Candida*. Além disso, Williams e Câmara (2009) demonstraram que células de *C. albicans* tiveram sua filamentação suprimida na presença de uma homoserina lactona sintetizado por *P. aeruginosa*. Gibson e colaboradores (2009) trabalhando com uma molécula denominada de piocianina (5-metil-phenazinium-1-carboxilato), produzida por *P. aeruginosa*, observaram que a molécula induz a lise das células de *C. albicans*. Como relatado anteriormente, apesar de *C. albicans* e *C. glabrata* terem a quantidade de células viáveis alteradas pela presença de *P. aeruginosa*, os resultados não apontaram inibição da formação de hifas em *C. albicans*. Outros estudos mostraram que espécies de *Candida* e *Staphylococcus* foram isoladas em associações e que a interação infecciosa parece apresentar um sinergismo (COSTERTON *et al.*, 1999; TIMSIT *et al.*, 2001; RAMAGE *et al.*, 2004). O presente estudo mostrou que o número de células viáveis de *S. aureus* aumentou na presença das duas espécies de *Candida*. Corroborando estes resultados, Carlson (1983) mostrou que *C. albicans* estimula diretamente o crescimento de *S. aureus* e ainda aumenta a sua virulência.

Com base no presente estudo, é interessante notar que o DC demonstra um possível efeito sinérgico com algum fator secretado por *P. aeruginosa* contra *C. albicans* e *C. glabrata*, diminuindo fortemente o número de células viáveis quando comparada à atividade do DC sozinho (Figura 28B e D). A presença de DC juntamente com *S. aureus* inibiu o desenvolvimento de hifas de *C. albicans* quando comparado com o controle sem tratamento (Figura 29A e B). Esta ocorrência, no entanto, não foi observada em *P. aeruginosa* (Figura 29E e F). A capacidade de sofrer modificações morfológicas (formação de hifas) tem sido sugerida como um importante fator de virulência em *C. albicans* (HAMMER *et al.*, 2000). Embora DC e *S. aureus*, em conjunto, não diminuam o número de células viáveis de *C. albicans* quando comparado com biofilmes monoespécie, um possível efeito sinérgico entre o composto e a bactéria parece inibir um importante fator de virulência das leveduras, a formação de hifas. Shirtliff e colaboradores (2009) em seus estudos demonstram que a interação inicial entre *C. albicans* e *S. aureus* parece ser sinérgica, no entanto, em algum momento durante o desenvolvimento do biofilme é possível que a relação torna-se competitiva e antagonista. Em estudos microbiológicos envolvendo biofilmes formados a partir da associação de bactérias e *C. glabrata*, Bandara e colaboradores (2010) demonstraram

que em biofilmes mistos, formados por *C. glabrata* e *P. aeruginosa*, ocorre uma redução significativa no número de células viáveis da levedura (58%) após 24 horas e uma redução total no número de células após 48 horas de desenvolvimento. Além disso, Grillot e colaboradores (1994) observaram uma inibição completa ou parcial de espécies de *Candida*, incluindo *C. glabrata*, na presença de *P. aeruginosa*.

Em geral a ação do diterpeno foi mais eficaz em biofilmes de *C. glabrata* quando comparado com os biofilmes de *C. albicans*, sejam eles monoespécie ou mistos. De acordo com Samaranayake e colaboradores (2005) *C. albicans* forma biofilmes mais densos e complexos quando comparados a *C. glabrata*. *C. albicans* é uma levedura polimórfico capaz produzir hifas, pseudo-hifas ou ainda blastosporos, enquanto *C. glabrata* produzem apenas blastosporos. Assim, as hifas de *C. albicans* facilitam a arquitetura do biofilme, tornando-os mais difíceis de eliminar (SENEVIRATNE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011). Essas diferenças entre os biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* podem explicar a maior eficácia do DC sobre o biofilme de *C. glabrata*. Na natureza, biofilmes relacionados com infecções são geralmente formados por várias espécies microbianas. Em biofilmes mistos, formados por bactérias e fungos, pode-se observar a ocorrência de uma variedade de interações, incluindo o aumento da resistência aos antibióticos, colonização superficial, sinergismo e/ou antagonismo entre as espécies (SHIRTLIFF *et al.*, 2009; MORALES; HOGAN, 2010; PELEG *et al.*, 2010).

5.6 CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que o DC é um composto capaz de inibir a formação de biofilme e causar danos nos biofilmes pré-formados sejam estes monoespécie ou formados pela associação entre bactérias e leveduras. Assim, pode-se sugerir que o diterpeno casbano possa ser utilizado como uma potencial e promissora molécula a ser utilizada em tratamentos de infecções causadas por biofilmes de bactérias e *Candida*, bem como de biofilmes multi-espécies.

REFERÊNCIAS

- BANDARA, H. M.; YAU, J. Y. Y.; WATT, R. M.; SAMARANAYAKE, L. P. Research article *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 125, 2010.
- BONNIN, A. The commensal-pathogen transition in invasive *Candida albicans* infection: molecular and cellular approaches. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 196, n. 1, p. 139-149, jan. 2012.
- CARLSON, E.; JOHNSON, G. Protection by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus* in the establishment of dual infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 50, n. 3, p. 655-659, dez. 1985.
- CARLSON, E. Effect of strain of *Staphylococcus aureus* on synergism with *Candida albicans* resulting in mouse mortality and morbidity. **Infect Immun.**, v. 42; n. 1, p. 285-292, out. 1983.
- CARLSON, E. Synergism of *Candida albicans* and delta toxin producing *Staphylococcus aureus* on mouse mortality and morbidity: protection by indomethacin. **Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg.**, v. 269, n. 3, p. 377-386, nov. 1988.
- CARNEIRO, V. A.; SANTOS, H. S.; ARRUDA, F. V. S.; BANDEIRA, P. N.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PEREIRA, M. O.; HENRIQUES, M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Casbane diterpene as a promising natural agente against biofilm-associated infections. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 190-201, dez. 2011.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, maio 1999.
- DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, n. 3, p. 139-143, set. 2002.
- ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, n. 5, p. 990-1004, set. 2012.
- EVANS, S. A.; TURNER, S. M.; BOSCH, B. J.; HARDY, C. C.; WOODHEAD, M. A. Lung function in bronchiectasis: the influence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Eur. Respir. J.**, v. 9, n. 8, p. 1601-1604, ago. 1996.
- GIBSON, J.; SOOD, A.; HOGAN, D. A. *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 2, p. 504-513, jan. 2009.
- GRILLOT, R.; PORTMANN-COFFIN, V.; AMBROISE-THOMAS, P. Growth inhibition of pathogenic yeasts by *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro: clinical implications in blood cultures. **Mycoses**, v. 37, n. 9-10, p. 343-347, out. 1994.

GUPTA, N.; HAQUE, A.; MUKHOPADHYAY, G.; NARAYAN, R. P.; PRASAD, R. Interactions between bacteria and *Candida* in the burn wound. **Burns.**, v. 31, n. 3, p. 375-378, maio 2005.

HABIBI, Z.; EFTEKHAR, F.; SAMIEE, K.; RUSTAIYAN, A. Structure and antibacterial activity of a new labdane diterpenoid from *Salvia leriaefolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 2, p. 270-271, jan. 2000.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, v. 38, n. 5, p. 355-362, out. 2000.

HOGAN, D. A.; KOLTER, R. *Pseudomonas*–*Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2229-2232, jun. 2002.

HØIBY, N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **BMC Med.**, v. 9, p. 32, 2011.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 35, n. 4, p. 322-332, abr. 2010.

HOLCOMBE, L. J.; MCALESTER, G.; MUNRO, C. A.; ENJALBERT, B.; BROWN, A. J.; GOW, N. A.; DING, C.; BUTLER, G.; O'GARA, F.; MORRISSEY, J. P. *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 156, p. 1476-1486, fev. 2010.

KETT, D. H.; AZOULAY, E.; ECHEVERRIA, P. M.; VINCENT, J. L.; EXTENDED PREVALENCE OF INFECTION IN ICU STUDY (EPIC II) GROUP OF INVESTIGATORS. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Crit. Care Med.**, v. 39, n. 4, p. 665-670, abr. 2011.

KLOTZ, S. A.; GAUR, N. K.; DE ARMOND, R.; SHEPPARD, D.; KHARDORI, N.; EDWARDS, J. E.; JR LIPKE, P. N.; EL-AZIZI, M. *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 4, p. 363-370, jun. 2007.

McALESTER, G.; O'GARA, F.; MORRISSEY, J. P. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 563-569, jan. 2008.

MENDOZA, L.; TAPIA, L.; WILKENS, M.; URZÚA, A. Antibacterial activity of 13-*epi*- sclareol, a labdane type diterpene isolated from *Pseudognaphalium heterotrichium* and *P. cheiranthifolium* (Asteraceae). **Bol. Soc. Chil. Quím.**, v. 47, n. 2, p. 91-98, jun. 2002.

MORALES, D. K.; HOGAN, D. A. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 4, e1000886, abr. 2010.

MURPHY, C. N.; CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 8, p. 991-1002, ago. 2013.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 5, p. 340-349, maio 2010.

PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A.; SCHEPER, M. A.; LEID, J. G.; COSTERTON, J. W.; SHIRTLIFF, M. E. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus-Candida albicans* dual-species biofilms. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 59, n. 3, p. 493-503, ago. 2010.

RAMAGE, G.; TOMSETT, K.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; REDDING, S. W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 98, n. 1, p. 53-59, jul. 2004.

SÁ, N. C.; CAVALCANTE, T. T.; ARAÚJO, A. X.; DOS SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R.; BANDEIRA, P. N.; DA CUNHA, R. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial and antibiofilm action of casbane diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Arch. Oral Biol.**, v. 57, n. 5, p. 550-555, maio 2012.

SAMARANAYAKE, Y. H.; YE, J.; YAU, J. Y.; CHEUNG, B. P.; SAMARANAYAKE, L. P. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 818-825, fev. 2005.

SANTOS, H. S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quím. Nova**, v. 31, n. 3, p. 601-604, fev. 2008.

SCHACHTER, B. Slimy business – the biotechnology of biofilms. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 4, p. 361-365, abr. 2003.

SENEVIRATNE, C. J.; SILVA, W. J.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, n. 11, p. 1052-1060, nov. 2009.

SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 299, n. 1, p. 1-8, out. 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends Microbiol.**, v. 19, n. 5, p. 241-247, maio 2011.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000.

TIMSIT, J. F.; CHEVAL, C.; GACHOT, B.; BRUNEEL, F.; WOLFF, M.; CARLET, J.; REGNIER, B. Usefulness of a strategy based on bronchoscopy with direct examination of bronchoalveolar lavage fluid in the initial antibiotic therapy of suspected ventilator-associated pneumonia. **Intensive Care Med.**, v. 27, n. 4, p. 640-647, abr. 2001.

URZÚA, A.; CAROLI, M.; VASQUEZ, L.; MENDOZA, L.; WILKENS, M.; TOJO, E. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, n. 3, p. 251-254, out. 1998.

URZÚA, A.; JARA, F.; TOJO, E.; WILKENS, M.; MENDOZA, L.; REZENDE, M. C. A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudates of *Haplopappus uncinatus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, n. 2, p. 297-301, jan. 2006.

URZÚA, A.; REZENDE, M. C.; MASCAYANO, C.; VÁSQUEZ, L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules**, v. 13, p. 882-891, abr. 2008.

VALENZA, G.; TAPPE, D.; TURNWALD, D.; FROSCH, M.; KÖNIG, C.; HEBESTREIT, H.; ABELE-HORN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. **J. Cyst. Fibros.**, v. 7, n. 2, p. 123-127, mar. 2008.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. **Z. Naturforsch. C.**, v. 55, n. 9-10, p. 785-789, out. 2000.

WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 12, n. 2, p. 182-191, abr. 2009.

Anexos

*(Trabalhos publicados e aceitos no período 2010-
2013)*

Research Article

Toxicity and Binding Profile of Lectins from the Genus *Canavalia* on Brine Shrimp

Francisco Vassiliepe Sousa Arruda,¹ Arthur Alves Melo,² Mayron Alves Vasconcelos,² Romulo Farias Carneiro,² Ito Liberato Barroso-Neto,² Suzete Roberta Silva,³ Francisco Nascimento Pereira-Junior,² Celso Shiniti Nagano,³ Kyria Santiago Nascimento,² Edson Holanda Teixeira,¹ Silvana Saker-Sampaio,³ Benildo Sousa Cavada,² and Alexandre Holanda Sampaio³

¹ Integrated Laboratory of Biomolecules (LIBS-BioMol Group), Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, 62042-280 Fortaleza, CE, Brazil

² Laboratory of Biologically Active Molecules, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, 60440-970 Fortaleza, CE, Brazil

³ Marine Biochemistry Laboratory, Fishing Engineering Department, Federal University of Ceará, 60440-970 Fortaleza, CE, Brazil

Correspondence should be addressed to Benildo Sousa Cavada; bscavada@ufc.br

Received 16 July 2013; Accepted 24 October 2013

Academic Editor: Daiana Avila

Copyright © 2013 Francisco Vassiliepe Sousa Arruda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lectins are sugar-binding proteins widely distributed in nature with many biological functions. Although many lectins have a remarkable biotechnological potential, some of them can be cytotoxic. Thus, the aim of this study was to assess the toxicity of five lectins, purified from seeds of different species of *Canavalia* genus. In order to determine the toxicity, assays with *Artemia* nauplii were performed. In addition, a fluorescence assay was carried out to evaluate the binding of lectins to *Artemia* nauplii. In order to verify the relationship between the structure of lectins and their cytotoxic effect, structural analysis was carried out to evaluate the volume of the carbohydrate recognition domain (CRD) of each lectin. The results showed that all lectins exhibited different toxicities and bound to a similar area in the digestive tract of *Artemia* nauplii. Concerning the structural analysis, differences in spatial arrangement and volume of CRD may explain the variation of the toxicity exhibited by each lectin. To this date, this is the first study that establishes a link between toxicity and structure of CRD from Diocleinae lectins.

1. Introduction

Lectins are sugar-binding proteins widely distributed in nature in organisms such as viruses, bacteria, fungi, plants, and animals [1]. Some of these proteins bind mono- and oligosaccharides specifically and reversibly but are devoid of catalytic activity and, in contrast to antibodies, are not products of an immune response [2]. Lectins have many biological functions, such as host defense, cell-cell interaction, glycoprotein folding, symbiosis, regulation of cell growth, apoptosis, fertilization, and other functions [3, 4]. Lectins purified from the Leguminosae family are the most extensively studied carbohydrate-binding proteins [5]. The

subtribe Diocleinae has lectins that are multimeric structures composed of identical monomers of 25.5 kDa and exhibit a pH-dependent equilibrium between dimer and tetramer conformations. Diocleinae lectins also share the same carbohydrate recognition specificity for D-mannose and D-glucose, require divalent ions such as Ca^{2+} and Mn^{2+} to be biologically active, and contain a hydrophobic cavity that binds to phytohormones and other hydrophobic ligands. Despite their high similarity, these ConA-like lectins induce different responses in biological assays; for example, when tested for stimulation of human lymphocyte proliferation *in vitro*, ConBr had a higher proliferation index than ConA, possibly due to minor changes in binding specificities [6].

A broad range of lectins has been found to exhibit toxic and cytotoxic activities in several different assays. These effects include *in vitro* cytotoxicity in cultured lymphoid cells [7], tumor cells [8], and T cells [9] and *in vivo* toxicity after injection of the lectin into the peritoneal cavity of mice and lethality in the brine shrimp *Artemia sp.* [10]. In particular, the *Artemia* lethality test [11, 12] has been used successfully to determine the toxicity of bioactive compounds that have a variety of pharmacological activities, including anticancer agents, antivirals, insecticides, pesticides, and anti-HIV compounds [13–15]. The *Artemia* nauplii were used because they are highly sensitive. In addition, the cysts can be easily obtained, hatched, and stored at room temperature for several months without losing their viability [16]. In the present work, the toxicity of five lectins isolated from seeds of plants from the genus *Canavalia* was evaluated using the *Artemia* lethality test.

2. Materials and Methods

2.1. *Artemia* Nauplii Hatching. The *Artemia* cysts were hatched in artificial seawater at 28°C under constant lighting and strong aeration. The cysts were incubated in a polyethylene cylindroconical tube with 1 g cysts per liter of artificial seawater. This hatching condition simulates *Artemia's* natural environment, shallow seawater. After a period of 24 h, the aeration was halted, and the lighting was directed to the bottom of the hatching vessel. Due to the phototropic nature of the nauplii, they migrate in the direction of the light to the bottom of the tube, while the unhatched cysts float. The nauplii are then collected and used for bioassays.

2.2. Purification of Lectins. Lectins from *Canavalia ensiformis* (ConA), *C. brasiliensis* (ConBr), *C. boliviana* (ConBol), *C. grandiflora* (ConGF), and *C. maritima* (ConM) were extracted from air-dried ground seeds collected in Fortaleza, CE, Brazil, and defatted with n-hexane. The protein extract was obtained by continuous stirring with 0.9% NaCl (1:10 w/v) at 20°C for 4 h, followed by centrifugation at 10,000 g for 20 min at 4°C. The purification of the lectins was carried out using established methods [6]. The supernatant was submitted to affinity chromatography on a Sephadex G-50 column (5 × 25 mm), equilibrated with 0.9% NaCl containing 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂. Then the column was washed using the same buffer at a flow rate of 1 mL/min. The bound lectin was eluted with 0.1 M glycine, pH 2.6, dialyzed extensively against distilled water, and lyophilized. The purity of each lectin was monitored by SDS-PAGE, as described by Laemmli [17].

2.3. *Artemia* Lethality Test. Lectins were dissolved in artificial seawater at a concentration of 200 µg/mL. The assay was performed boarding 24 well Linbro plates in which each well contained 10 *Artemia* nauplii in a final volume of 2 mL. Lectin solution was added to the wells at final concentrations of 12.5, 25, 50, or 100 µg/mL. The experiments were performed in triplicate, and negative control wells contained 2 mL of artificial seawater with 10 *Artemia* nauplii. Another control

group, which consisted of (bovine serum albumin) BSA at the same lectins concentration, was too included. After 24 h, the number of dead nauplii in each well was counted. From these data was calculated the percentage of death at each concentration and the LC₅₀ value by probit analysis as described by Finney [18].

2.4. Blocking the ConBr CRD. A solution of 200 µg/mL purified ConBr was incubated in artificial seawater containing 0.1 M α-methyl mannoside for 1 h at 37°C. That solution was then assayed in the *Artemia* lethality test at final concentrations of 12.5, 25, 50, or 100 µg/mL ConBr. After 24 h, the number of dead nauplii was counted. The percentage of death and the LC₅₀ value were calculated by probit analysis as described by Finney [18].

2.5. FITC-Labeled Lectin. FITC-labeled lectins were prepared in inhibition buffer (0.1 M D-mannose in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.0), conjugation buffer (0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.0), and washing buffer (phosphate-buffered saline: 0.01 M sodium phosphate buffer, 0.027 M KCl and 0.15 M NaCl, pH 7.4). Initially, the lectins were dissolved in inhibition buffer and incubated at 37°C for 1 h. Then, 250 µL fluorescein isothiocyanate (FITC) (500 µg/mL in conjugation buffer) was added dropwise. The solution was incubated for 2 h at room temperature under gentle stirring. Subsequently, unconjugated FITC was separated from FITC lectin by size exclusion chromatography using a Sephadex G-25 column previously equilibrated and eluted with washing buffer. The absorbance of all fractions was determined at 280 nm (protein) and 495 nm (FITC) to verify chromatographic efficiency. The FITC-labeled lectins were then dialyzed against 0.1 M acetic acid for 1 h to remove the blocker carbohydrate and extensively dialyzed against distilled water. The BSA was coupled to FITC following the same steps used to lectins, without the use of inhibition buffer.

2.6. Lectin Fluorescence Microscopy. Briefly, the shrimp were incubated with FITC-lectins or FITC-BSA (50 µg/mL) and kept overnight. The shrimp were then washed 3 times in phosphate-buffered saline, placed on slides, and observed under a fluorescence microscope (Eclipse E200/epi-fluorescence, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (DS-2Mv, Nikon, Tokyo, Japan). Images were acquired with NIS-Elements software version 2.3 (Nikon, Tokyo, Japan). The resolution of all acquired images was 5.0 Mpixel (Media Cybernetics, Silver Spring, MDI, USA).

2.7. Structural Analysis. The CRD volume of all lectins was calculated using the Q-SiteFinder program [19]. Briefly, crystal structures of *C. ensiformis* (PDB code: 1JBC), *C. brasiliensis* (PDB code: 3JU9), and *C. maritima* (PDB code: 2OW4) were obtained from Protein Data Bank (PDB) repository [20]. Atomic coordinates from *C. boliviana* (CBol) and *C. grandiflora* (ConGF) are in-house data and remain under publication. The structures were visualized using COOT [21] and PyMol [22].

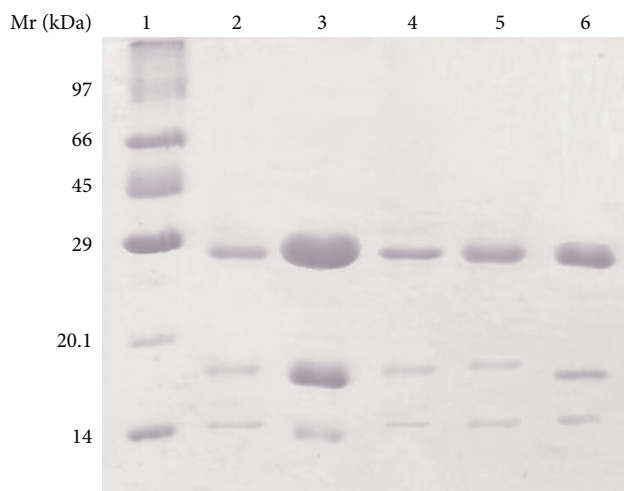


FIGURE 1: SDS-PAGE: (1) molecular mass markers (phosphorylase b, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; and α -lactalbumin, 14 kDa); (2) ConBr (3) ConA, (4) ConM, (5) ConBol, and (6) ConGF.

3. Results and Discussion

The SDS-PAGE of ConBr, ConA, ConM, ConBol, and ConGF showed a pattern of subunits characteristic of the lectins from the Diocleinae subtribe. The proteins migrated through the electric field and were separated into three bands consisting of the full-length intact polypeptide chain (α -chain) and two fragments, β and γ (Figure 1).

Canavalia lectins exhibited a range of different toxicities toward *Artemia* nauplii. The LC_{50} values for ConA, ConBr, ConM, ConBol, and ConGF are shown in Table 1. The least toxic lectin in this assay was ConA, which had a LC_{50} of 376.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The most toxic was ConBr, which exhibited LC_{50} of 54.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$. When preincubated with α -methyl mannoside, the LC_{50} of ConBr increased from 54.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 337.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 1).

Toxicological studies have been conducted on all kinds of bioactive molecules and natural extracts [23, 24]. The *Artemia* lethality test has been used as a preliminary toxicity assay commonly performed before other bioassays that detect anticancer, antiviral, insecticide, pesticide, and anti-HIV activity; as such, the *Artemia* lethality test is very suitable for biotechnological purposes and the evaluation of bioactive compounds. Until now, only a small number of lectins have been evaluated in the *Artemia* lethality test. In most instances, lectins such as CSL-2 and PNL-2 have shown high toxicity [25–27]. In contrast, lectins such as SejaBL exhibit low toxicity [28].

It has been published elsewhere that to achieve more solubility of the lectins to perform this kind of biological tests the use of DMSO is suitable [14, 27]. Although DMSO has been reported to have low toxicity [29], this does not exclude the possibility that the *Artemia* toxicity is not affected by the addition of DMSO in these previous reports. Santos et al. [27] studying the toxicity of ConA-like lectins in the

TABLE 1: LC_{50} and percentage of dead nauplii in different concentrations of lectins.

Lectins	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Lethality 24 h	LC_{50} 24 h
ConA	12.5	20	376.48 (± 72.25)
	25	20	
	50	30	
	100	27	
ConM	12.5	7	146.55 (± 27.34)
	25	37	
	50	33	
	100	37	
ConBol	12.5	20	218.13 (± 38.50)
	25	20	
	50	33	
	100	33	
ConBr	12.5	43	54.38 (± 23.48)
	25	40	
	50	50	
	100	60	
ConGF	12.5	3	110.51 (± 8.79)
	25	10	
	50	13	
	100	43	
ConBr + sugar	12.5	17	337.75 (± 53.54)
	25	27	
	50	27	
	100	27	

presence of DMSO found out a LC_{50} for ConBr of 15.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The present work obtained an LC_{50} of 54.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in an assay that contained no DMSO (Table 1). Increased toxicity of ConBr in the presence of DMSO in the work by Santos et al. [27] may be due to a synergy between the two compounds. Ramos et al. [10] reported that a highly toxic lectin isolated from *Abrus pulchellus* had an LC_{50} of 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ without the addition of DMSO. The findings pointed out the fact that it is possible to carry on studies of lectin toxicity without the use of DMSO.

Preincubation of ConBr with α -methyl mannoside showed that the carbohydrate-recognition domain is involved in the toxic effect of the lectin on brine shrimp. When preincubated with the carbohydrate, the LC_{50} of ConBr increased from 54.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 337.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 1).

Microscopy confirmed that lectins bound to *Artemia* nauplii (Figure 2). All lectins bound to a similar area of the organism and this area represents the digestive tract of the nauplii. The binding in this area was probably due to specific carbohydrate recognition, since the addition of α -methyl mannoside reduced the binding of the FITC-labeled lectins to the digestive tract of the nauplii (data not shown).

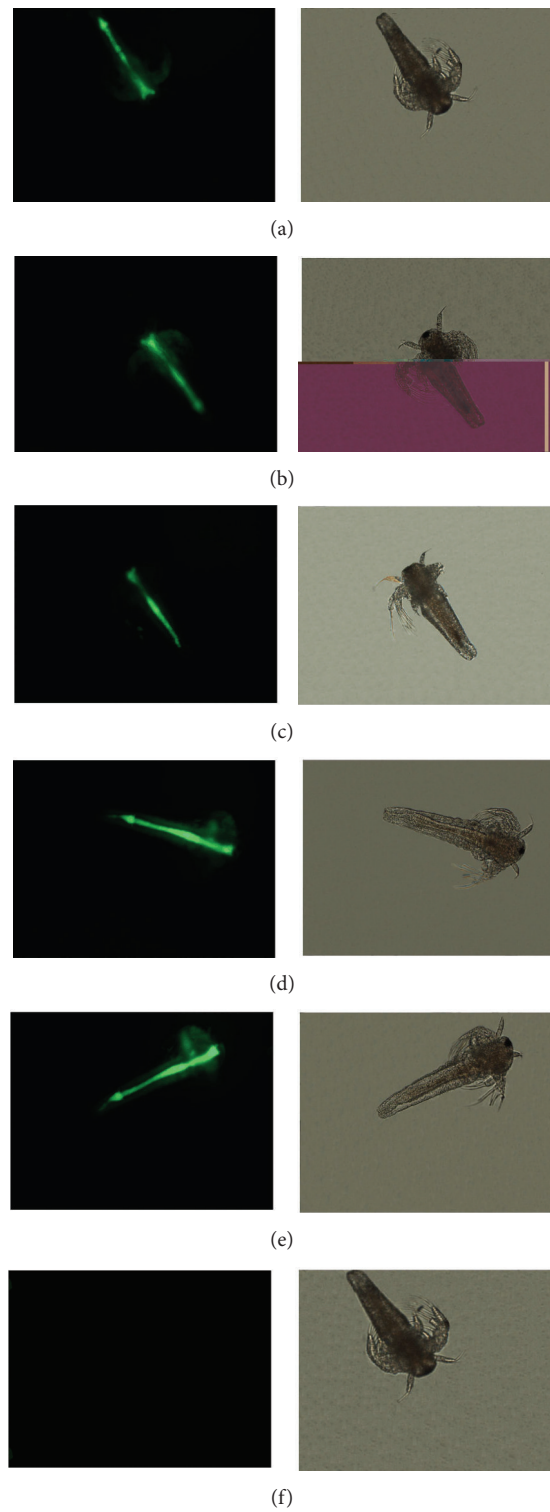


FIGURE 2: Binding of FITC-labeled lectins to *Artemia* nauplii detected by fluorescence microscopy. The green color indicates the presence of FITC-labeled lectins in the digestive tract of the animal. (a) FITC-ConBr; (b) FITC-ConA; (c) FITC-ConBol; (d) FITC-ConM; (e) FITC-ConGF; and (f) FITC-BSA. The same images were also acquired in bright field without fluorescence excitation.

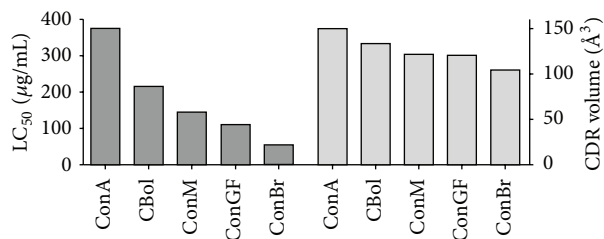


FIGURE 3: Relationship between CRD volumes and toxicity of the *Canavalia* lectins.

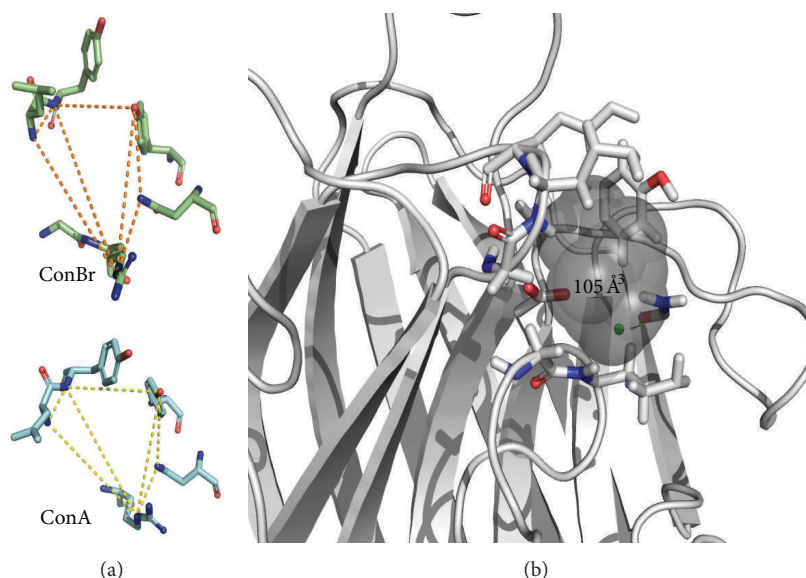


FIGURE 4: (a) Distances between residues comprising the CRD of ConBr (green) and ConA (blue). (b) ConBr structure with highlighted residues that comprise its CRD in sticks surrounding spheres, which comprise the volume of the CRD.

The exact mechanism by which lectins play its toxicity on *Artemia* is still unclear; however, fluorescence tests showed the presence of lectins in the digestive tract of *Artemia* nauplii, suggesting that the surface of the digestive tract is extensively glycosylated (Figure 2). Previous studies have shown that plant lectins have an affinity for the surface of gut epithelial cells of mammals and insects [30–32]. These lectins when attached to the surface of the gut epithelial cells may cause an antinutritional action, inhibiting the absorption of nutrients or occasionally causing toxic effects, leading to necrosis in the gut cells [30].

Despite the high structural similarity shared by *Canavalia* lectins, significant differences were seen when the toxicity was assessed on *Artemia* nauplii. Key distances between residues comprising the CRD will determine its shape and hence the volume of each domain (Figures 3 and 4). Such characteristics directly impact the carbohydrate recognition and elicitation of biological effects [33, 34].

Interestingly, a direct relationship between the CRD volume and the toxicity level of lectins on *Artemia* nauplii was achieved. Among the tested lectins, ConBr was the most toxic, with LC₅₀ of 54.38 mg/mL. ConBr has a CRD volume of 105 Å³ (the smallest CRD volume among the tested lectins).

On the other hand, ConA had an LC₅₀ of 376.48 mg/mL and has a CRD volume of 151 Å³ (the largest volume among the tested lectins).

Thus, it was observed that the relationship between LC₅₀ and CRD volume is directly proportional (Figure 3). That is, when the CRD volume is small the LC₅₀ is low. Therefore, if the lectins are ordered according to LC₅₀ and CRD volume, the following sequence is obtained: ConA (LC₅₀ of 376.48 µg/mL; CRD volume of 151 Å³) > ConBol (218.13 µg/mL; 134 Å³) > ConM (146.55 µg/mL; 122 Å³) > ConGF (110.51 µg/mL; 121 Å³) > ConBr (54.38 µg/mL; 105 Å³).

Despite the structural similarities shared between *Canavalia* lectins and hence in the specificities for carbohydrates, the term “ConA-like” is not suitable when the issue refers to biological activities. Cavada et al. [6] reported that minor changes in the overall structure of some lectins lead to different biological activities. These differences arise from changes in three major physicochemical parameters: binding specificity for complex carbohydrates, the pH-dependent oligomerization state (dimer-tetramer equilibrium), and the relative orientation of the carbohydrate-binding sites. The smallest CRD volume

of ConBr among other *Canavalia* lectins has been shown to be the major reason of its lower activation of nitric oxide synthase in aortic endothelial cells [35]. In this study, the smallest CRD volume of ConBr proved to be the major reason of its high toxicity on brine shrimp.

Although *Canavalia* lectins are structurally similar, minor structural changes are the basis by which they differ from each other. Such modifications change the three-dimensional structure of these proteins (as in the CRD arrangement) and hence may cause significant differences in several biological activities. Thus, the structural analysis of lectins in response to a biological activity can provide valuable information concerning their mechanisms of action.

4. Conclusions

According to the data reported in this study, ConBr is the most toxic on brine shrimp, while ConA is the least toxic, and ConBol, ConM, and ConGF exhibit intermediate levels of toxicity. Concerning the experimental methodology, it is a new approach to establish the toxicity of lectins on *Artemia* nauplii. In addition, new insights were provided about the role of lectins structure and its effect on viability of brine shrimp, which probably will contribute in further studies.

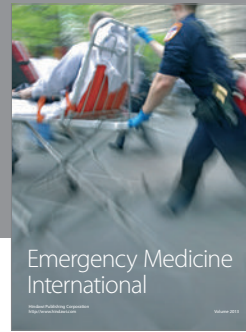
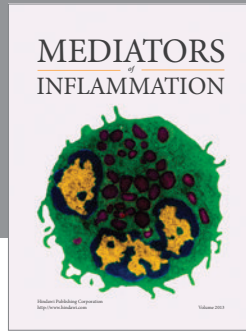
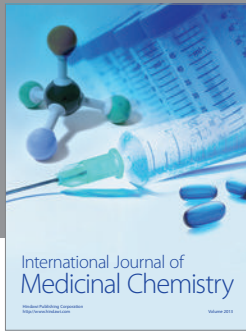
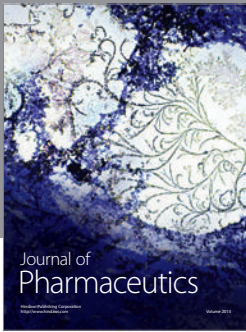
Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). The authors thank the American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>) for helping with the English language editing of the paper. Kyria Santiago Nascimento, Edson Holanda Teixeira, Benildo Sousa Cavada, and Alexandre Holanda Sampaio are senior investigators of CNPq.

References

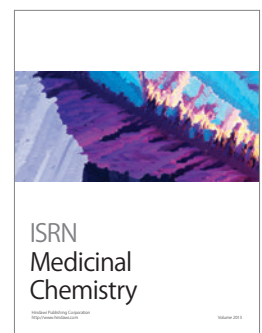
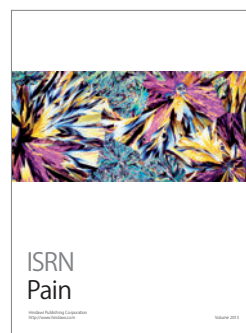
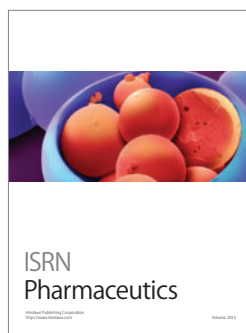
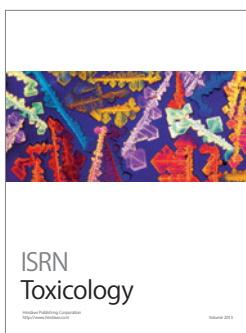
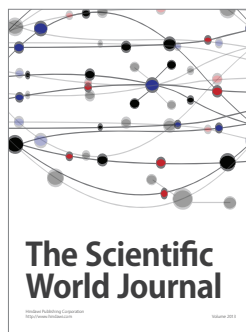
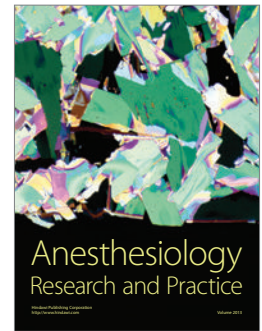
- [1] N. Sharon and H. Lis, *Lectins*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 3rd edition, 2003.
- [2] W. J. Peumans and E. J. van Damme, "Lectins as plant defense proteins," *Plant Physiology*, vol. 109, no. 2, pp. 347–352, 1995.
- [3] D. C. Kilpatrick, "Animal lectins: a historical introduction and overview," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1572, no. 2-3, pp. 187–197, 2002.
- [4] N. Sharon and H. Lis, "History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules," *Glycobiology*, vol. 14, no. 11, pp. 53R–62R, 2004.
- [5] E. J. M. van Damme, W. J. Peumans, A. Barre, and P. Rougé, "Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles," *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 17, no. 6, pp. 575–692, 1998.
- [6] B. S. Cavada, T. Barbosa, S. Arruda, T. B. Grangeiro, and M. Barral-Netto, "Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins," *Current Protein and Peptide Science*, vol. 2, no. 2, pp. 123–135, 2001.
- [7] B. M. Vose and G. D. Bonnard, "Limiting dilution analysis of the frequency of human T cells and large granular lymphocytes proliferating in response to interleukin 2. I. The effect of lectin on the proliferative frequency and cytotoxic activity of cultured lymphoid cells," *The Journal of Immunology*, vol. 130, no. 2, pp. 687–693, 1983.
- [8] K. Urech, G. Schaller, P. Ziska, and M. Giannattasio, "Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumour cells in culture," *Phytotherapy Research*, vol. 9, no. 1, pp. 49–55, 1995.
- [9] J. M. Alvarez, M. O. de Landazuri, G. D. Bonnard, and R. B. Herberman, "Cytotoxic activities of normal cultured human T cells," *The Journal of Immunology*, vol. 121, no. 4, pp. 1270–1275, 1978.
- [10] M. V. Ramos, D. M. Mota, C. R. Teixeira, B. S. Cavada, and R. A. Moreira, "Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds," *Toxicon*, vol. 36, no. 3, pp. 477–484, 1998.
- [11] P. Sorgeloos, C. R. van der Wielen, and G. Persoone, "The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests—a critical analysis," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 2, no. 3-4, pp. 249–255, 1978.
- [12] G. Persoone, *Proceeding of the International Symposium on Brine Shrimp, Artemia Salina*, vol. 1–3, University Press, Wetteren, Belgium, 1980.
- [13] J. L. Carballo, Z. L. Hernández-Inda, P. Pérez, and M. D. García-Grávalos, "A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products," *BMC Biotechnology*, vol. 2, no. 17, pp. 1–5, 2002.
- [14] F. Pervin, M. M. Hossain, S. Khatun et al., "Comparative cytotoxicity study of six bioactive lectins purified from pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) rootstock on brine shrimp," *Journal of Medical Sciences*, vol. 6, no. 6, pp. 999–1002, 2006.
- [15] J.-C. Ho, C.-M. Chen, and L.-C. Row, "Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of *Tetrapanax papyriferus*," *Phytochemistry*, vol. 68, no. 5, pp. 631–635, 2007.
- [16] P. Vanhaecke, G. Persoone, C. Claus, and P. Sorgeloos, "Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, no. 3, pp. 382–387, 1981.
- [17] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [18] D. J. Finney, *Probit Analysis*, vol. 18, University Press, Cambridge, UK, 3rd edition, 1971.
- [19] A. T. R. Laurie and R. M. Jackson, "Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 9, pp. 1908–1916, 2005.
- [20] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams et al., "The protein data bank: a computer based archival file for macromolecular structures," *Journal of Molecular Biology*, vol. 112, no. 3, pp. 535–542, 1977.
- [21] P. Emsley and K. Cowtan, "Coot: model-building tools for molecular graphics," *Acta Crystallographica Section D*, vol. 60, no. 1, pp. 2126–2132, 2004.
- [22] W. L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, San Carlos, Calif, USA, 2002.
- [23] J. E. Thompson, R. P. Walker, and D. J. Faulkner, "Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine

- sponge species from San Diego, California, USA,” *Marine Biology*, vol. 88, no. 1, pp. 11–21, 1985.
- [24] A. V. Krishnaraju, T. V. N. Rao, D. Sundararaju, M. Vanisree, H. S. Tsay, and G. V. Subbaraju, “Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay,” *International Journal of Applied Science and Engineering*, vol. 3, no. 2, pp. 125–134, 2005.
- [25] I. M. Vasconcelos, B. S. Cavada, R. A. Moreira, and J. T. A. Oliveira, “Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*,” *Journal of Food Biochemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 137–154, 1991.
- [26] M. A. Ali, M. A. Sayeed, and N. Absar, “Antibacterial activity and cytotoxicity of three lectins purified from *Cassia fistula* Linn. seeds,” *Journal of Medical Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 240–244, 2003.
- [27] A. F. D. Santos, B. S. Cavada, B. A. M. D. Rocha, K. S. D. Nascimento, and A. E. G. Sant’Ana, “Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*,” *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 2, pp. 794–798, 2010.
- [28] A. F. M. Vaz, R. M. P. B. Costa, A. M. M. A. Melo et al., “Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*,” *Food Chemistry*, vol. 119, no. 4, pp. 1507–1513, 2010.
- [29] R. Vignes, “Dimethyl Sulfoxide (DMSO): a “new” clean, unique, superior solvent,” in *Proceedings of the American Chemical Society Annual Meeting*, pp. 20–24, Washington, DC, USA, 2000.
- [30] A. Pusztai and S. Bardocz, “Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications,” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, vol. 8, no. 41, pp. 149–165, 1996.
- [31] N. Sauvion, C. Nardon, G. Febvay, A. M. R. Gatehouse, and Y. Rahbé, “Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells,” *Journal of Insect Physiology*, vol. 50, no. 12, pp. 1137–1150, 2004.
- [32] K. Miyake, T. Tanaka, and P. L. McNeil, “Lectin-based food poisoning: a new mechanism of protein toxicity,” *PLoS ONE*, vol. 2, no. 1, article e687, 2007.
- [33] M. J. B. Bezerra, N. V. F. C. Rodrigues, A. F. Pires et al., “Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin,” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 45, no. 4, pp. 807–815, 2013.
- [34] M. A. de Vasconcelos, C. O. Cunha, F. V. S. Arruda et al., “Lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds (conbr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* in vitro,” *Molecules*, vol. 17, no. 5, pp. 5244–5254, 2012.
- [35] E. H. S. Bezerra, B. A. M. Rocha, C. S. Nagano et al., “Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 408, no. 4, pp. 566–570, 2011.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*

Theodora Thays Arruda Cavalcante¹, Victor Alves Carneiro², Cinara Carneiro Neves², Humberlânia de Sousa Duarte², Maria Gleiciane de Queiroz Martins³, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda⁴, Mayron Alves de Vasconcelos³, Hécio Silva dos Santos⁵, Rodrigo Maranguape da Silva Cunha⁶, Benildo Sousa Cavada², Edson Holanda Teixeira^{3*}

¹Faculty of Dentistry, Institute of Applied Theology (INTA), Sobral, Brazil

²Integrate Biomolecules Laboratory (LIBS), Faculty of Medicine of Sobral, Federal University of Ceará, Sobral, Brazil

³Biologically Active Molecules Laboratory (Biomol-Lab), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

⁴Integrate Biomolecules Laboratory (LIBS), Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

⁵Center of the Exact Sciences and Technology, Acaraú Valley State University, Sobral, Brazil

⁶Center of Agricultural Science and Biological, Acaraú Valley State University, Sobral, Brazil

Email: *edsonlec@gmail.com

Received 24 September 2013; revised 28 October 2013; accepted 1 December 2013

Copyright © 2013 Theodora Thays Arruda Cavalcante *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Bacteria form biofilms as an adaptive mechanism in response to environmental changes. *Streptococcus mutans* is the biofilm-forming bacterium that is primarily associated with dental caries. The expression of important genes by bacteria in biofilms is different from that of planktonic cells. Lectins are proteins that bind specifically to carbohydrates and may have important biological activities on bacterial cells, acting as antibacterial and anti-biofilm agents. ConM (*Canavalia maritima* lectin) is a protein that is able to inhibit the planktonic growth and biofilm formation of *S. mutans*. In this context, this study aimed to evaluate the effects of ConM and concanavalin A (ConA) on the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *S. mutans*. The results showed that ConM significantly reduced the expression of genes encoding enzymes related to adhesion, formation and regulation of biofilms. On the contrary, ConA did not alter the expression of the genes studied. Because the two lectins have a high degree of similarity, the differences in the actions of ConM and ConA may be explained by the small structural differences in the carbohydrate recognition domain of the lectins.

*Corresponding author.

Keywords: *Streptococcus mutans*; Lectin; *Canavalia maritima*; Biofilm; Expression

1. INTRODUCTION

Most microorganisms have a natural tendency to develop cell aggregates surrounded by a self-produced polysaccharide matrix called a biofilm [1]. Biofilms formed on tooth surfaces (dental plaque) are the main etiologic factor for the majority of dental disorders such as caries, gingivitis and periodontitis [2,3]. Furthermore, oral biofilms are the main cause of the dental implant failure [4]. Concerning the microorganisms involved in oral biofilms, *Streptococcus mutans* is commonly found in the human oral cavity. This species is a potent initiator of caries due to a wide range of factors, which plays an important role in caries formation [5].

When such microorganisms adhere to a surface, they develop biofilms and express an altered phenotype through the repression or activation of specific genes [6, 7]. In fact, biofilm formation by *S. mutans* is followed by differential expression of several genes compared to planktonic cells. This distinct pattern of expression is frequently associated with biofilm regulation, formation, resistance and bacterial physiology [8,9].

According to Wen and Burne [10], the expression of

genes associated with biofilm development, such as *spaP* and *gpbB*, regulation (*brpA*), and those involved in the formation of extracellular glucans (*gtfB*), plays an important role in the regulation of biofilm development by *S. mutans*.

Lectins are a group of proteins of non-immune origin that have the ability to bind specifically and reversibly to carbohydrate epitopes without modifying them [11]. These proteins work as mediators of information in various biological systems, acting through interactions with glycoproteins, glycolipids and oligosaccharides [12, 13]. The ability of lectins to detect small differences in the configuration of carbohydrates [14] makes these proteins important in several studies involving microbial biofilms. Among the biological applications of lectins, the antibacterial activity deserves special attention [15], as lectins have been shown to inhibit biofilm formation in some studies [16,17]. Thus, to verify the different effects of lectins on the expression of virulence genes in *S. mutans*, the bacterium was grown in the presence of lectins, and the relative expression of *spaP*, *gtfB*, *gpbB*, *brpAI* and *ldh* was analyzed using *burk16S* as a normalizing reference gene.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microorganism

Streptococcus mutans UA159 was maintained in BHI (Brain Heart Infusion) broth with 20% glycerol at -80°C until use. For experiments, an aliquot of 100 μl of the stock was inoculated into 10 ml of fresh BHI broth and incubated at 37°C with 10% CO_2 . After growth, the cells were centrifuged at $1500 \times g$ for 20 min at 4°C and washed twice with 0.9% NaCl.

2.2. Lectins

Seeds of *Canavalia maritima* and *C. ensiformis* were separately ground into a fine powder using a coffee mill. The powder was homogenized with 0.15 M NaCl (1:10 w/v) at room temperature overnight. The extract was then centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min at 4°C , and the supernatant was applied to a Sephadex G-50 column (Amersham-Bio-sciences, USA) that had been pre-equilibrated with 0.15 M NaCl containing 5 mM CaCl_2 and MnCl_2 . After removal of the unbound material, each lectin was eluted with 0.1 M of glucose in 0.15 M NaCl and submitted to a 1 h dialysis against 0.1 M acetic acid, which was succeeded by an extensive dialysis against distilled water. Finally, the lectins were freeze-dried and stored at 4°C for later use. The purity of the lectins was assessed by SDS-PAGE as described by Laemmili [18].

2.3. Experimental Groups

Prior to RNA extraction, the bacterial suspension was

washed three times by centrifugation at $5000 \times g$ for 5 min at 4°C with 0.9% NaCl. The cells were adjusted to 2×10^8 CFU/ml in BHI broth and transferred to a 96 well polystyrene plate. The lectins ConM and ConA (250 $\mu\text{g/ml}$) were then added to wells containing bacterial suspensions. The negative control was carried out with 0.9% NaCl. The plate was then incubated for 1 h at 37°C with 10% CO_2 . After 1 h, 300 μl of the bacterial suspension from each condition was inoculated into 30 ml of fresh BHI broth and incubated at 37°C with 10% CO_2 . The RNA extraction was performed when bacterial growth reached an absorbance of 0.4 to 0.5 absorbance units (AU), corresponding to the beginning of the logarithmic phase.

2.4. Extraction of total RNA and cDNA synthesis

Extraction steps were performed using RNase-free water, reagents and plastics. Briefly, as soon as bacterial growth reached 0.4 to 0.5 AU, the cells were centrifuged at $6000 \times g$ for 10 min at 4°C , and the pellet was resuspended in 1 ml of Tris-EDTA (100 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8.0) containing 15 mg/ml lysozyme and incubated for 30 min in a water bath at 37°C . The pellet was then centrifuged as previously described, and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended with 1 ml of TRI-ZOL[®] reagent and homogenized through up-down movements in a pipette. To maximize the action of the reagent and prevent degradation of RNA, the samples were kept on ice during all intervals between procedures. Following this step, 200 μl of cooled chloroform was added, and the tubes were vigorously mixed by inversion for 15 s. The resulting solution was centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4°C to obtain a three-phase system, in which the upper phase, which is aqueous and colorless, corresponds to the extracted RNA. The RNA was then transferred to a new tube containing 500 μl of isopropanol and kept on ice for 10 min to allow its precipitation and DNA dehydration. The RNA was then centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min at 4°C , and the pellet was resuspended with 1 ml of cold 75% ethanol (DNase/RNase-free DEPC water). This solution was centrifuged at $7000 \times g$ for 5 min at 4°C , and then the tube was immersed on ice and kept open for 5 min inside a flow chamber to prevent contamination. Finally, the pellet was resuspended in 30 μl of DEPC water and assessed for purity and concentration using a spectrophotometer (GENquant, Amersham Biosciences) [19]. The integrity and quality of the total RNA samples were determined by electrophoresis on a 1.2% agarose gel [20].

To avoid contamination with DNA, samples were treated with DNase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations [19]. The synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed using Super-Script Reverse Transcriptase[®] (Invitrogen) and Random

Hexamers[®] primers (Qiagen). All procedures were performed in triplicate.

2.5. Real-Time Reverse Transcriptase PCR (qRT-PCR) Analysis

The quantitative analysis of gene expression was carried out by qRT-PCR. For this purpose, 300 ng of cDNA from each sample was used in each reaction. In addition, primers for specific genes, which were previously optimized, as well as 10 μ l of 2x Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) were added to a final volume of 20 μ l. The amplification reaction was performed with 40 cycles at 95°C for 5 s, 55°C for 5 s and 68°C for 20 s. The initial denaturation was performed at 95°C for 5 min.

Primer selection was based on the study by Wen and colleagues [21] (**Table 1**). To evaluate the effect of lectins on selected genes, the expression of an unaffected gene (*Burkholderia* 16S ribosomal RNA) was used as the endogenous control and compared to the expression of target genes. The assays were carried out with a RealPlex 4S thermocycler[®] (Eppendorf) using the 2x Power SYBR[®] Green Master Mix Kit (Applied Biosystems). All reactions were performed in quadruplicate. The cycle threshold (Ct) used in the analysis corresponded to the arithmetic mean between the quadruplicate of the target and the endogenous control genes. To achieve the relative expression of the target genes, the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method was used as previously described by Livak and Schmittgen [22].

2.6. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate and repeated three times independently. Differences in relative expression between samples were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's posttest by the GraphPad Prism[®] software. Values were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

To verify the purity of the lectins, the proteins were submitted to SDS-PAGE. Both lectins showed an electrophoretic pattern that was characteristic of the Diocleinae subtribe as three different bands were visualized: a chain of 25 kDa (α -chain) and two fragments of 14 and 12 kDa (β and γ chains, respectively). Moreover, the lectins showed hemagglutinating activity on rabbit erythrocytes and were inhibited by 0.1 M D-glucose and D-mannose (data not shown). Concerning the activity of Diocleinae lectins on *S. mutans* growth, Cavalcante and colleagues [17] showed that ConM was able to inhibit the planktonic growth and biofilm formation of *S. mutans*, whereas ConA, although similar to ConM, had no effect

Table 1. List of primers used for qRT-PCR, their DNA sequences and amplicon length (adapted from Wen and colleagues [21]).

Primer	DNA Sequences (5'-3')	Amplicon
spaP-Fw spaP-Rv	TCCGCTTATACAGGTCAAGTTG GAGAAGCTACTGATAGAAGGGC	121 bp
gtfB-Fw gtfB-Rv	AGCAATGCAGCCATCTACAAAT ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA	98 bp
gbpB-Fw gbpB-Rv	CGTGTTTCGGCTATTTCGTGAAG TGCTGCTTGATTTTCTTGTTGC	108 bp
brpA-Fw brpA-Rv	CGTGAGGTCATCAGCAAGGTC CGCTGTACCCCAAAAGTTTAGG	148 bp
ldh-Fw ldh-Rv	TGGCGACGCTCTTGATCTTAG GTCAGCATCCGCACAGTCTTC	92 bp
<i>Burk</i> 16S-Fw <i>Burk</i> 16S-Rv	TCCAGCAATGCCCGTGTGT CGGTACCGTCATCCGCCACG	101 bp

Fw: Forward; Rv: Reverse.

on planktonic growth and showed only a weak inhibition on biofilm formation after 18 hr.

The integrity of the RNA extraction from cells treated with ConM and ConA was analyzed by agarose gel electrophoresis. The results showed that all steps involved in the extraction were successful (**Figure 1**). cDNA synthesis and relative expression analysis by qRT-PCR showed that ConM significantly reduced the expression of all tested genes (**Figure 2**). For example, the expression of *gtfB* decreased approximately 7-fold in cells treated with ConM as compared to the negative control. *gtfB* encodes the enzyme glucosyltransferase B (GtfB), which synthesizes extracellular insoluble glucan polymers from sucrose. In addition to being a critical virulence factor involved in the pathogenesis of dental caries, GtfB plays an important role in biofilm formation [23]. In addition to *gtfB*, ConM also reduced the expression of *spaP* and *gbpB* by 4.2 and 7.7-fold, respectively. These genes encode important adhesins, which bind to surface receptors and are important for the successful establishment of *S. mutans* biofilms [24,25]. In addition, ConM reduced the expression of *brpA* by 9.5-fold. This gene encodes a regulatory protein that plays a critical role in environmental stress responses and biofilm formation in *S. mutans* [10,26]. Interestingly, expression of the gene that encodes the enzyme lactate dehydrogenase (*ldh*) is also reduced by 8.5-fold. The *ldh* gene is constitutively expressed in *S. mutans* and is responsible for the synthesis of lactic acid from pyruvate, in addition to being an important virulence factor in the bacterium [27,28]. Hillman and colleagues [29] showed that the deficiency in LdH production might be lethal to *S. mutans* due to its importance in the generation of energy for the cell.

As previously demonstrated by Teixeira and colleagues [16], lectins have the ability to block receptor

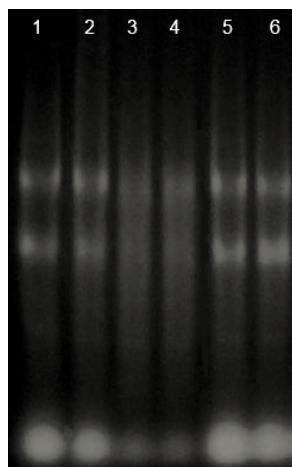


Figure 1. Integrity of the RNA extracted in the presence of lectins by agarose gel electrophoresis. Lane 1 and 2: Control; lane 3 and 4: ConA; lane 5 and 6: ConM.

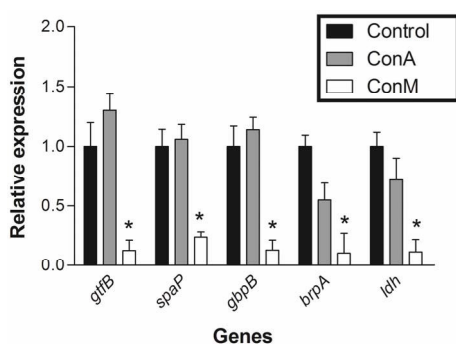


Figure 2. Analysis of the relative expression of genes related to biofilm formation of *S. mutans* in presence of ConM or ConA. Control (black bars), ConA (gray bars) and ConM (white bars). * $p < 0.01$ Relative to control.

molecules present in the acquired enamel pellicle *in vitro*, thus interfering with early adhesion of colonizers to the tooth surface and preventing the growth of cariogenic biofilms. Furthermore, *Canavalia* lectins have been demonstrated to be proteins with antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* [17]. The antibacterial effect of ConM on planktonic growth and biofilm formation in *S. mutans* as shown by Cavalcante and colleagues [17] can be attributed not only to a direct action on cells but also to its ability to inhibit some genes related to biofilm formation and virulence.

Despite the high degree of similarity between ConA and ConM, treatment with ConA did not alter the expression of any gene investigated in this work (**Figure 2**). However, this is not surprising because several studies have shown that lectins from Diocleinae subtribe, although sharing a high degree of similarity, differ in their

Table 2. Distances (\AA^3) between amino acid residues of the CDR of ConM and ConA that are involved in interactions with carbohydrates (adapted from Bezerra and colleagues [34]).

Amino acid		ConM 2CWM	ConA 1JBC
Tyr12 CZ	Gly227 CA	8.97	9.61
Leu99 CG	Tyr12 CZ	7.64	9.6
Leu99 CG	Asn14 ND	9.08	10.29
Leu99 CG	Arg228 CZ	11.16	10.53
Tyr100 CZ	Tyr12 CZ	5.26	4.37
Tyr100 CZ	Asn14 ND2	9.48	8.62
Tyr100 CZ	Arg228 CZ	13.7	10.87

biological activities [30-33]. According to Cavada and colleagues [34], small changes in the configuration of important amino acids from the carbohydrate recognition domain (CRD), as well as variations in pH-dependent oligomerization, may explain the differences in biological activities. Moreover, Bezerra and colleagues [35] showed that not only are the configuration and distances between residues in the CRD crucial to explain the difference in activity between Diocleinae lectins, but the volume of the CRD also plays an important role in the lectin activity. The distances between the amino acid residues involved in interactions with carbohydrates are different in ConM and ConA (**Table 2**), and the CRD of ConA shows a lower volume when compared with ConM. The volumes for ConA PDB 1JBC and ConM PDB 2CWM are 151 and 135 \AA^3 respectively, suggesting a plausible explanation for the differences in the antimicrobial actions of such lectins [35].

Although the mechanism of action of these lectins requires a better understanding, the results reported in the present article suggest that ConM acts by starting or interrupting intracellular signaling pathways that culminate with the lowest expression of genes associated with virulence and biofilm formation in *S. mutans*. Future experiments will be performed to investigate the mechanisms that lead to changes in expression of the selected genes and the impact of such changes on biofilm formation.

4. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We acknowledge American Journal Experts (AJE) for English editing services. BSC and EHT are senior researches of CNPq.

REFERENCES

- [1] McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D.

- and Kjelleberg, S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 39-50. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- [2] Paquette, D.W., Brodala, N. and Williams, R.C. (2006) Risk factors for endosseous dental implant failure. *Dental Clinics of North America*, **50**, 361-374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2006.05.002>
- [3] Dhir, S. (2013) Biofilm and dental implant: The microbial link. *Journal of Indian Society of Periodontology*, **17**, 5-11. <http://dx.doi.org/10.4103/0972-124X.107466>
- [4] Buser, D. and Merckse-Stern, R. (1997) Long term evaluation of nonsubmerged ITI implants. Part 1: 8 year life table analysis of a prospective multicenter study with 2359 implants. *Clinical Oral Implants Research*, **8**, 161-172. <http://dx.doi.org/10.4103/0972-124X.107466>
- [5] Marsh, P.D. (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, **32**, 7-15. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080302.x>
- [6] Brooun, A., Liu, S. and Lewis, K.A. (2000) A Dose-Response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 640-646. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x>
- [7] Sauer, K. and Camper, A.K. (2001) Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology*, **183**, 6579-6589. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.3.640-646.2000>
- [8] Shemesh, M., Tam, A. and Steinberg, D. (2007) Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *Journal of Medical Microbiology*, **56**, 1528-1535. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.22.6579-6589.2001>
- [9] Shemesh, M., Tam, A., Aharoni, R. and Steinberg, D. (2010) Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiology*, **10**, 51. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47146-0>
- [10] Wen, Z.T. and Burne, R.A. (2002) Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1196-1203. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-51>
- [11] Bies, C., Lehr, C.M. and Woodley, J.F. (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 425-435. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.722.2003>
- [12] Rakhshandehroo, M., Stienstra, R., De Wit, N.J., Bragt, M.C., Haluzik, M., Mensink, R.P., Müller, M. and Kersten, S. (2012) Plasma mannose-binding lectin is stimulated by PPAR α in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **302**, 595-602. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.030>
- [13] Zappelli, C., Van Der Zwaan, C., Thijssen-Timmer, D.C., Mertens, K. and Meijer, A.B. (2012) Novel role for galectin-8 protein as mediator of coagulation factor V endocytosis by megakaryocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 8327-8335. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00299.2011>
- [14] Hirabayashi, J. (2008) Concept, strategy and realization of lectin-based glycan profiling. *Journal of Biochemistry*, **144**, 139-147. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.305151>
- [15] Wong, J.H., Ng, T.B., Cheung, R.C., Ye, X.J., Wang, H.X., Lam, S.K., Lin, P., Chan, Y.S., Fang, E.F., Ngai, P.H., Xia, L.X., Ye, X.Y., Jiang, Y. and Liu, F. (2010) Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiology and biotechnology*, **87**, 1221-1235. <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvn043>
- [16] Teixeira, E.H., Napimoga, M.H., Carneiro, V.A., De Oliveira, T.M., Cunha, R.M., Havt, A., Martins, J.L., Pinto, V.P., Gonçalves, R.B. and Cavada, B.S. (2006) *In vitro* inhibition of streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 111-116. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2690-4>
- [17] Cavalcante, T.T., Da Rocha, B.A.M., Carneiro, V.A., Arruda, F.V.S., Do Nascimento, A.S.F., Sá, N.C., Nascimento, K.S., Cavada, B.S. and Teixeira, E.H. (2011) Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. *Molecules*, **16**, 3530-3543. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02910.x>
- [18] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16053530>
- [19] Ritz, M., Garenaux, A., Berge, M. and Federighi, M. (2009) Determination of *rpoA* as the most suitable internal control to study stress response in *C. jejuni* by RT-qPCR and application to oxidative stress. *Journal of Microbiological Methods*, **76**, 196-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.10.014>
- [20] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York.
- [21] Wen, Z.T., Yates, D., Ahn, S.J. and Burne, R.A. (2010) Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiology*, **10**, 111. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-111>
- [22] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} Method. *Methods*, **25**, 402-408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [23] Tsumori, H. and Kuramitsu, H. (1997) The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: Essential role of the GtfC enzyme. *Oral Microbiology and Immunology*, **12**, 274-280. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.1997.tb00391.x>
- [24] Banas, J.A. and Vickerman, M.M. (2003) Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **14**, 89-99. <http://dx.doi.org/10.1177/154411130301400203>
- [25] Jakubovics, N.S., Strömberg, N., Van Dolleweerd, C.J., Kelly, C.G. and Jenkinson, H.F. (2005) Differential

- binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. *Molecular Microbiology*, **55**, 1591-1605.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04495.x>
- [26] Wen, Z.T., Baker, H.V. and Burne, R.A. (2006) Influence of BrpA on critical virulence attributes of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, **188**, 2983-2992.
<http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.8.2983-2992.2006>
- [27] Merritt J., Kreth, J., Qi, F., Sullivan, R. and Shi, W. (2005) Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments. *Journal of Microbiology Methods*, **61**, 161-170.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2004.11.012>
- [28] Yang, D.Q., Liu, T.J., Zhou, X.D., He, K.F., Li, S. and Zhuang, H. (2005) Study on lactate dehydrogenase activity of *Streptococcus mutans* isolates derived from caries-active and caries-free individuals. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **23**, 116-118.
- [29] Hillman, J.D., Chen, A., Duncan, M. and Lee, S.W. (1994) Evidence that L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency is lethal in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, **62**, 60-64. <http://iai.asm.org/content/62/1/60>
- [30] Bezerra, G.A., Oliveira, T.M., Moreno, F.B., de Souza, E.P., Rocha, B.A., Benevides, R.G., Delatorre, P., De Azevedo Jr., W.F. and Cavada, B.S. (2007) Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure biological activity relationship in legume lectins. *Journal of Structural Biology*, **160**, 168-176.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.012>
- [31] Nóbrega, R.B., Rocha, B.M., Gadelha, C.A., Santi-Gadelha, T., Pires, A.F., Assreuy, A.M.S., Nascimento, K.S., Nagano, C.S., Sampaio, A.H., Cavada, B.S. and Delatorre, P. (2012) Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. *Biochimie*, **94**, 900-906.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.009>
- [32] de Vasconcelos, M.A., Cunha, C.O., Arruda, F.V.S., Carneiro, V.A., Mercante, F.M., do Nascimento Neto, L.G., de Sousa, G.S., Rocha, B.A.M., Teixeira, E.H., Cavada, B.S. and dos Santos, R.P. (2012) Lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds (ConBr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* in vitro. *Molecules*, **17**, 5244-5254.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules17055244>
- [33] Bezerra, M.J.B., Rodrigues, N.V.F.C., Pires, A.F., Bezerra, G.A., Nobre, C.B., Alencar, K.L.L., Soares, P.M.G., Nascimento, K.S., Nagano, C.S., Martins, J.L., Gruber, K., Sampaio, A.H., Delatorre, P., Rocha, B.A.M., Assreuy, A.M.S. and Cavada, B.S. (2013) Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **45**, 807-815.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.01.012>
- [34] Cavada, B.S., Barbosa, T., Arruda, S., Grangeiro, T.B. and Barral-Netto, M. (2001) Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein & Peptide Science*, **2**, 123-135.
<http://dx.doi.org/10.2174/1389203013381152>
- [35] Bezerra, E.H., Rocha, B.A., Nagano, C.S., Bezerra, G.D., Moura, T.R., Bezerra, M.J., Benevides, R.G., Sampaio, A.H., Assreuy, A.M.S., Delatorre, P. and Cavada, B.S. (2011) Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and nitric oxide release from endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **408**, 566-570.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.061>

Article

Effect of Leguminous Lectins on the Growth of *Rhizobium tropici* CIAT899

Mayron Alves de Vasconcelos¹, Cláudio Oliveira Cunha¹, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda², Victor Alves Carneiro¹, Rafaela Mesquita Bastos², Fábio Martins Mercante^{3,†}, Kyria Santiago do Nascimento^{1,†}, Benildo Sousa Cavada^{1,†}, Ricardo Pires dos Santos^{4,†} and Edson Holanda Teixeira^{2,†,*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60440-970, Brazil; E-Mails: mayronvasconcelos@gmail.com (M.A.V.); agrobrasil@gmail.com (C.O.C.); kyriasantiago@ufc.br (K.S.N.); bscavada@gmail.com (B.S.C.)

² Integrated Laboratory of Biomolecules (LIBS), Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-160, Brazil; E-Mails: vassiliepe@gmail.com (F.V.S.A.); victorcarneiro@ufc.br (V.A.C.); rafaelabastos.ufc@gmail.com (R.M.B.)

³ Embrapa Western Region Agriculture, Dourados, MS, 79804-970, Brazil; E-Mail: fabio.mercante@embrapa.br

⁴ Laboratory of Materials Engineering and Computation of Sobral (LEMCS), Federal University of Ceará, Campus do Derby, Sobral, CE, 62042-280, Brazil; E-Mail: rpsantos2007@gmail.com

† Senior investigators of CNPq (Brazil).

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: edsonlec@gmail.com; Tel./Fax: +55-85-3366-8300.

Received: 8 March 2013; in revised form: 16 April 2013 / Accepted: 14 May 2013 /

Published: 17 May 2013

Abstract: *Rhizobium tropici* is a Gram-negative bacterium that induces nodules and fixed atmospheric nitrogen in symbiotic association with *Phaseolus vulgaris* (common bean) and some other leguminous species. Lectins are proteins that specifically bind to carbohydrates and, consequently, modulate different biological functions. In this study, the D-glucose/D-mannose-binding lectins (from seeds of *Dioclea megacarpa*, *D. rostrata* and *D. violacea*) and D-galactose-binding lectins (from seeds of *Bauhinia variegata*, *Erythrina velutina* and *Vatairea macrocarpa*) were purified using chromatographic techniques and evaluated for

their effect on the growth of *R. tropici* CIAT899. All lectins were assayed with a satisfactory degree of purity according to SDS-PAGE analysis, and stimulated bacterial growth; in particular, the *Dioclea rostrata* lectin was the most active among all tested proteins. As confirmed in the present study, both D-galactose- and D-glucose/D-mannose-binding lectins purified from the seeds of leguminous plants may be powerful biotechnological tools to stimulate the growth of *R. tropici* CIAT99, thus improving symbiotic interaction between rhizobia and common bean and, hence, the production of this field crop.

Keywords: rhizobia; *Phaseolus vulgaris*; stimulus; inoculant additive

1. Introduction

Rhizobia are soil bacteria best known as root-nodule symbionts of legumes [1]. In 1991, Martinez-Romero and colleagues [2] identified a new species of common bean symbionts: *Rhizobium tropici*. This new rhizobial species was described as aerobic, Gram-negative, with optimal pH for growth ranging between 5 and 7, and characterized by high genetic stability of the symbiotic plasmid and tolerance to tropical environmental stresses such as high temperature and low soil pH [2]. Strain CIAT899, known commercially as SEMIA 4077, the type-strain of *R. tropici*, was isolated at the Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) in Colombia, and it was recognized as an effective symbiont of the common bean, *Leucaena leucocephala* and some other leguminous species [2,3].

Some studies have established the role of *R. tropici* in competition with other rhizobia during successive bean cultures and *R. tropici* was judged more competitive than either *Rhizobium leguminosarum* or *Rhizobium etli* [4,5]. Moreover, based on its superior characteristics as a common bean root-nodule symbiont, this strain is currently recommended (authorized) for the production of commercial rhizobial inoculant for common bean production in Brazil [6].

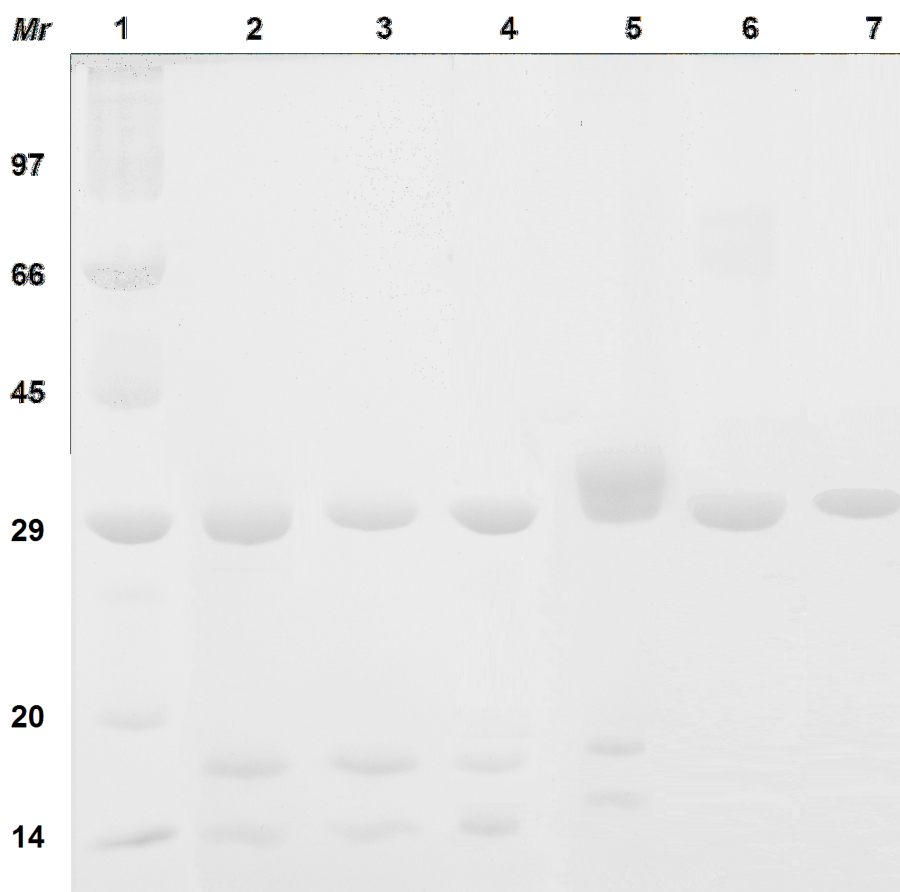
Lectins are proteins of nonimmune origin that bind to specific carbohydrates without modifying them. They are organized into structurally closely related families [7]. Because of their carbohydrate recognition ability, lectins are involved in important cellular events, such as symbiotic and pathogenic interaction between microorganisms and hosts [8]. In fact, lectins actively participate in the biological events involving the symbiosis between rhizobia and host plant [9,10]. These proteins mediate the attachment of rhizobia cells in the roots [9], agglutination of rhizobia near the roots [11] and recognition of nodulation factors [12,13]. Some studies showed that lectins may interact with rhizobia and modulate its metabolism, inducing the protein synthesis [14], increasing cellular respiration [15], stimulating the efflux of H⁺ [16] and promoting bacterial growth [17,18]. Moreover, the use of lectins can enhance the symbiotic efficiency between rhizobia and host plant, leading to an improvement in plant productivity [19,20].

The aim of this study was to evaluate the effect of three different D-glucose/D-mannose-specific lectins (purified from seeds of *Dioclea megacarpa*, *D. rostrata* and *D. violacea*) and three D-galactose specific lectins (purified from seeds of *Bauhinia variegata*, *Erythrina velutina* and *Vatairea macrocarpa*) on the *in vitro* growth of *R. tropici* CIAT 899.

2. Results and Discussion

The SDS-PAGE of *D. megacarpa* lectin (DML), *D. rostrata* lectin (DRL) and *D. violacea* (DVL) showed a pattern of subunits characteristic of lectins from the Diocleinae subtribe. The proteins migrated as three bands consisting of the full-length intact polypeptide chain (α -chain) and two fragments, β and γ (Figure 1). *V. macrocarpa* lectin (VML) showed a four-band pattern, consisting of two major bands, termed α -chains (34 and 32 kDa), and two minors bands, termed β - and γ -chains (22 and 13 kDa, respectively). A different pattern was seen for *B. variegata* lectin (BVL) and *E. velutina* lectin (EVL), which showed only one band for each protein of approximately 32 kDa (Figure 1). Moreover, all lectins showed hemagglutinating activity against rabbit erythrocytes and were fully inhibited by 0.1 M D-mannose (DML, DRL and DVL) and 0.1 M D-galactose (BVL, EVL and VML) (data not shown).

Figure 1. SDS-PAGE of the purified lectins. (1) Molecular mass markers: phosphorylase b, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; α -lactalbumin, 14.4, (2) *D. rostrata* lectin, (3) *D. megacarpa* lectin, (4) *D. violacea* lectin, (5) *V. macrocarpa* lectin, (6) *E. velutina* lectin and (7) *B. variegata* lectin.



The effect of the lectins on CIAT899 growth was detected at concentrations of 125, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and was monitored by measuring the optical density at 620 nm every 12 h, during 48 h. The results are shown in the Figures 2 and 3.

Figure 2. Effect of D-glucose/D-mannose-specific lectins on the growth of *R. tropici*. (A) DRL, (B) DML and (C) DVL. * $p < 0.01$ relative to control. Error bars indicate the standard deviation of the means. (■) Control, (▒) lectins at 125 $\mu\text{g/mL}$, (░) 250 $\mu\text{g/mL}$ and (■) 500 $\mu\text{g/mL}$.

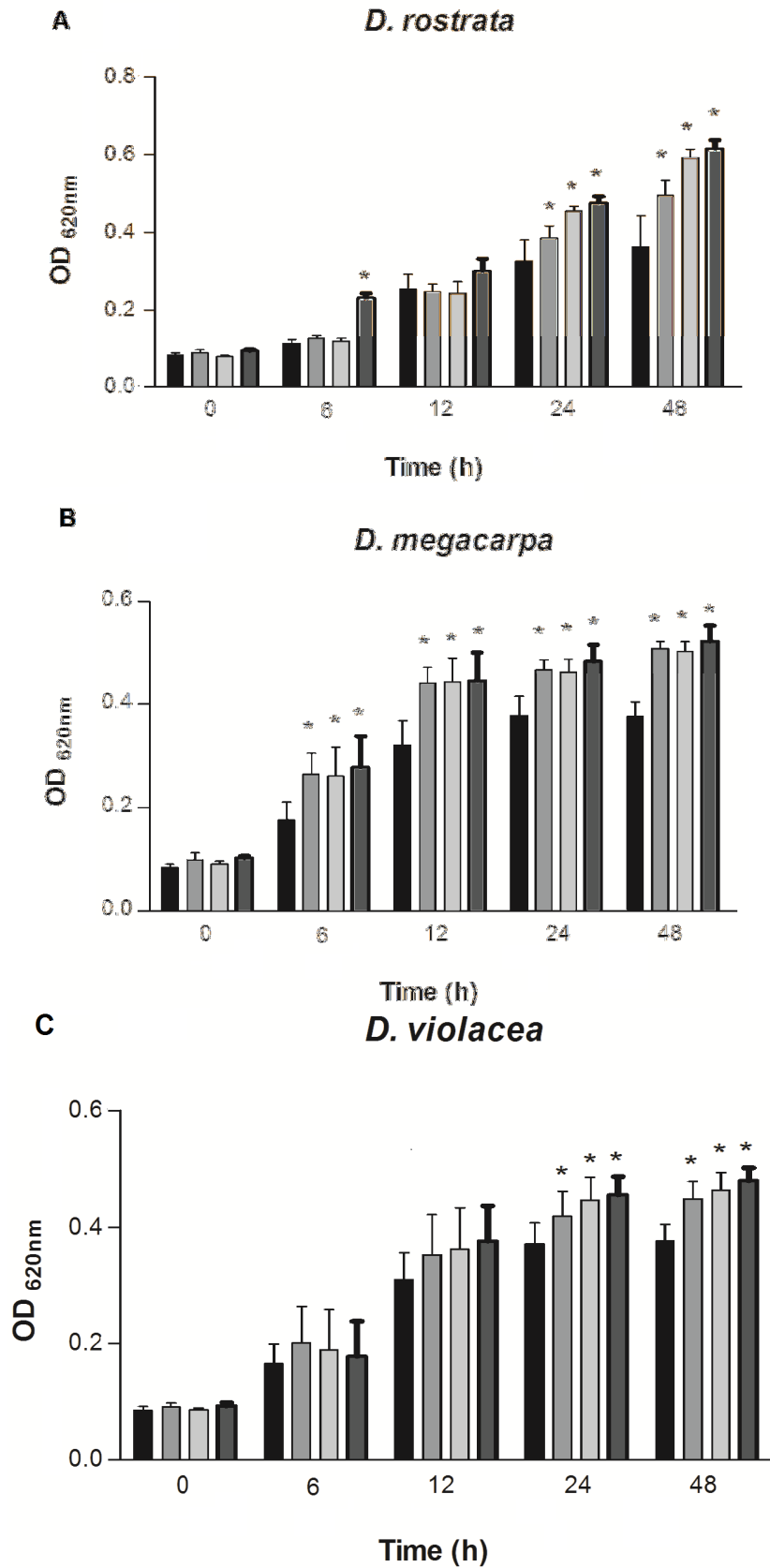
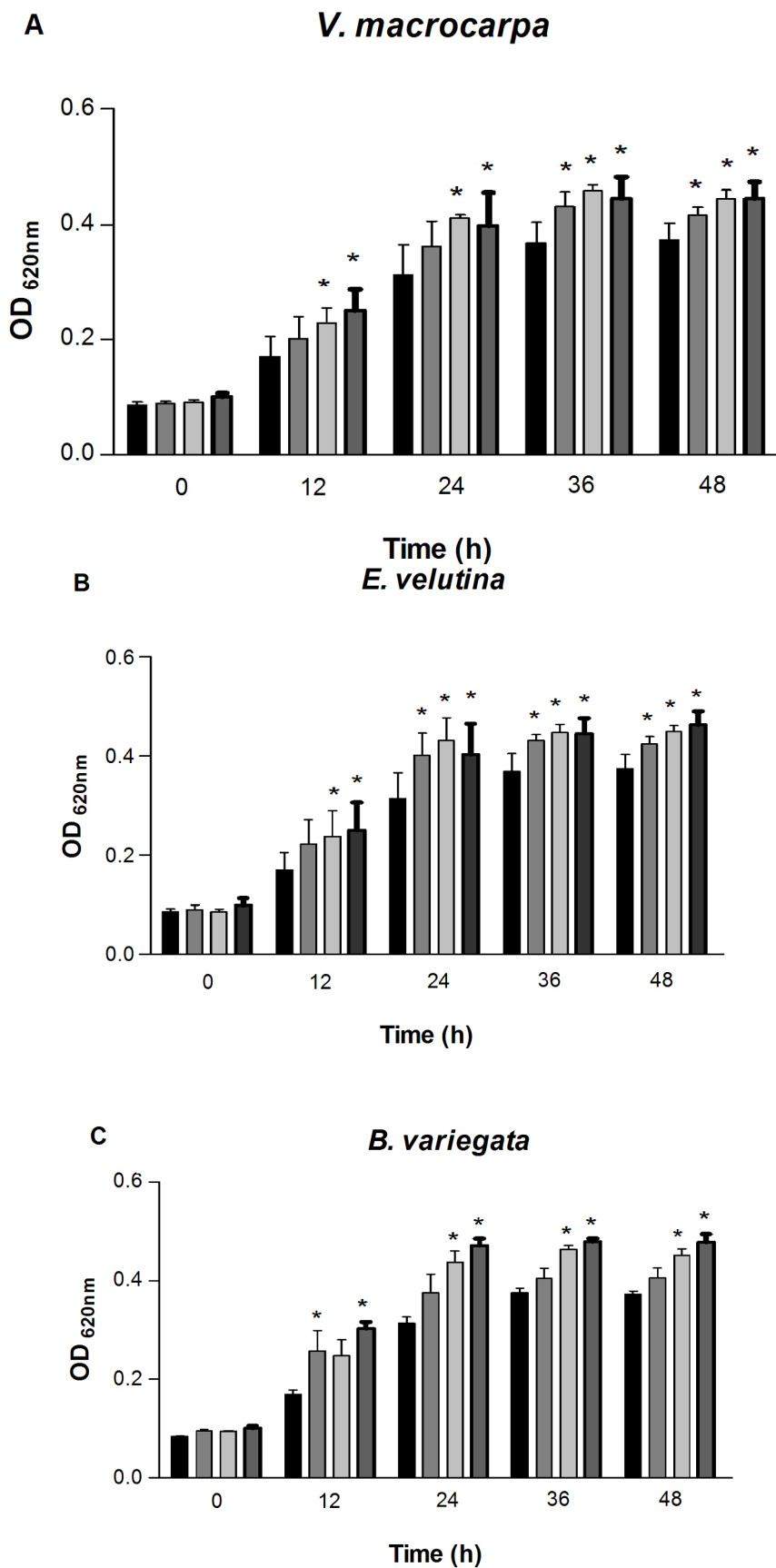


Figure 3. Effect of D-galactose-specific lectins on the growth of *R. tropici*. (A) VML, (B) EVL and (C) BVL. * $p < 0.01$ relative to control. Error bars indicate the standard deviation of the means. (■) Control, (▒) lectins at 125 $\mu\text{g/mL}$, (░) 250 $\mu\text{g/mL}$ and (▓) 500 $\mu\text{g/mL}$.



Neither glucose/mannose- nor galactose-specific lectins affected the growth of *R. tropici* CIAT899 in concentrations lower than 125 µg/mL and the non-lectin protein control bovine serum albumin (BSA) did not differ significantly from the negative control (data not shown).

According to the data analysis, it was observed that DRL at a concentration of 500 µg/mL was able to stimulate rhizobial growth after 12 h. The same effect was seen at 125, 250 and 500 µg/mL after 36 and 48 h. Interestingly, DRL had no activity after 24 h of growth (Figure 2A). DML stimulated growth at concentrations 125, 250 and 500 µg/mL for all tested times (Figure 2B). DVL was effective at the same concentrations, but only after 36 and 48 h (Figure 2C).

Despite the high degree of similarity shared by the D-glucose/D-mannose-binding lectins DML, DRL and DVL, DRL stimulated the growth of *R. tropici* more efficiently than all other proteins tested. Among the galactose-specific lectins, VML was able to stimulate rhizobial growth at concentrations of 250 and 500 µg/mL after 12 and 24 h and at 125, 250 and 500 µg/mL after 36 and 48 h (Figure 3A).

EVL stimulated growth at 250 and 500 µg/mL after 12 h. The same effect was seen at 125, 250 and 500 µg/mL after 24, 36 and 48 h (Figure 3B). Similar to galactose-specific lectins, BVL was also able to stimulate rhizobial growth at 250 and 500 µg/mL after 24, 36 and 48 h. Interestingly, BVL stimulated rhizobial growth only at 125 and 500 µg/mL after 12 h and was not effective at the concentration of 250 µg/mL (Figure 3C).

The present study evaluates the capacity of the leguminous lectins to stimulate the growth of *R. tropici* CIAT 899 *in vitro*. All lectins tested were able to significantly increase rhizobial growth, but with different levels of stimulus (Figures 2 and 3). These results agree with those of previous studies [17,18] that reported the effects of interaction and stimulation on the growth of *R. leguminosarum* and *R. tropici* by *Pisum sativum* and *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectins, respectively. Vasconcelos *et al.* [18] presented the most recent findings on ConBr, a D-glucose/D-mannose-specific lectin, showing that its effects on the interaction and stimulus of rhizobial growth in the presence of 0.1 M of D-mannose were abruptly inhibited, clearly revealing that carbohydrate binding activity is essential for the stimulation of bacterial growth.

The diocleinae lectins used in this study share a high degree of similarity and bind to D-glucose and D-mannose [21]. Despite their high similarity, these lectins induced different biological activities in different assays, as well as nitric oxide production [22], anti-inflammatory effect [23] and inhibition of biofilm formation [24]. Moreover, Vasconcelos *et al.* [18] have shown that concanavalin A (ConA), unlike ConBr, was unable to stimulate *R. tropici* growth, even though both lectins could bind to rhizobial cells. According to Cavada *et al.* [21], small differences in the relative orientation of the carbohydrate-binding sites or pH-dependent oligomerization state may explain the differences of activities exerted by these lectins.

Previous studies with VML showed that this lectin was able to stimulate the metabolism of *R. tropici* by increasing the efflux of H⁺ [15], as well as stimulating the respiration of *R. tropici* and *R. etli* [16]. The mechanisms underlying the effect of these lectins on rhizobial growth remain unclear. Nevertheless, since VML stimulates the metabolism of *R. tropici*, it is plausible that the lectins used in the present study may be able to stimulate the cellular metabolism of *R. tropici* in a similar manner.

Lectins are able to recognize carbohydrates on the cell surface. Such molecules can also interact with cell wall polysaccharides and/or glycoconjugates in the cell membrane [25]. Laus and colleagues [26] demonstrated that 95% of all polysaccharides found on the surface of a *Rhizobium leguminosarum*

strain are constituted from mannose and glucose, with minor amounts of galactose and rhamnose. Therefore, the effect of tested lectins may be related to the interaction between lectins and carbohydrate residues located on the surface of *R. tropici*. Nevertheless, some studies have shown the importance of lipopolysaccharide (LPS) on successful conclusion of the whole symbiotic process [27,28]. In addition to the lipid portion, the LPS structure consists of a saccharide portion, which is divided in an oligosaccharide (core) and an O-specific polysaccharide (OPS) [29]. The core region of some *Rhizobium* strains has a common structure consisting of an octasaccharide containing one residue of mannose, two of galactose, three of galacturonic acid and three of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid [30]. Such residues can act as anchor points for the lectins tested in this study. Thus, it is plausible to believe that the effect in the growth of *R. tropici* was exerted by the lectins that interacted with specific residues located on the surface of this bacterium.

3. Experimental

3.1. Lectin Purification

Lectins from *D. violacea*, *D. megacarpa*, *D. rostrata*, *V. macrocarpa*, *E. velutina* and *B. variegata* were isolated from seeds as previously described [31–36], with minor modifications. The purification steps are briefly described below:

3.1.1. *Dioclea* Lectin Purification

The seeds of *D. megacarpa*, *D. rostrata* and *D. violacea* were separately ground into a fine powder by a coffee mill. The powder was stirred with 0.15 M NaCl (1:10 w/v) at room temperature for 4 h. The extract was centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4 °C and the supernatant of seeds was applied to a Sephadex G-50 column (Amersham Biosciences, Salt Lake City, UT, USA) pre-equilibrated with 0.15 M NaCl containing 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂. After removing the unbound material, each lectin was eluted with 0.1 M of glucose in equilibration solution. Then, this fraction was submitted to a 1 h dialysis against 0.1 M acetic acid, followed by extensive dialysis dialyzed against distilled water. Finally, the lectins were freeze-dried and stored at 4 °C for later use.

3.1.2. VML Purification

The seeds of *V. macrocarpa* were ground into a fine powder by a coffee mill, defatted with *n*-hexane and air-dried at room temperature. The powder was stirred with 0.15 M NaCl (1:10 w/v) at room temperature for 4 h. The extract was centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4 °C, and the resulting clear supernatant was applied to a Guar gum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) column equilibrated with 0.15 M NaCl. After washing out the unbound material, the lectin was eluted with 0.1 M D-galactose in 0.15 M NaCl and this fraction was submitted to a 1 h dialysis against 0.1 M acetic acid, followed by and extensive dialysis against distilled water. Finally, the pure lectin was freeze-dried and stored at 4 °C for future use.

3.1.3. BVL Purification

Ground seeds of *B. variegata* were homogenized with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, containing 0.15 M NaCl (1:20 w/v) for 4 h at room temperature. After centrifugation at 20,000 g for 20 min at 4 °C, the supernatant containing the protein was loaded onto a lactose–agarose (Sigma) column equilibrated and eluted with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, containing 0.15 M NaCl. Bound proteins were eluted with 0.1 M lactose in equilibration buffer. The fractions were collected, pooled and dialyzed against 0.1 M acetic acid, followed by extensive dialysis against distilled water. The lectin was then aliquoted, freeze-dried and stored for future use.

3.1.4. EVL Purification

The seeds of *E. velutina* were ground into a fine powder by a coffee mill. The powder was stirred with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, containing 0.15 M NaCl, for 4 h at room temperature. After centrifugation at 20,000 g for 20 min at 4 °C the supernatant was extensively dialyzed against water and centrifuged to provide a precipitated and soluble fraction. The fraction was further fractionated by the addition of ammonium sulfate. The material precipitated between 30–90% of saturation was recovered and dialyzed in 0.15 M NaCl. The precipitate was retired and the supernatant applied to the Guar gum column (Sigma-Aldrich) also equilibrated also with 0.15 M NaCl. After washing out the unbound material, the lectin was eluted with 0.1 M D-galactose in 0.15 M NaCl. This fraction was submitted to a 1 h dialysis against 0.1 M acetic acid, followed by extensive dialysis against distilled water. The lectin was then freeze-dried and stored at 4 °C for future use.

3.2. SDS-PAGE

The purity of the lectins was assessed by SDS-PAGE as described by Laemmili [37]. Samples of each protein were submitted to electrophoresis using 15% polyacrylamide gel. Proteins were boiled in loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue (3',3'',5',5''-tetrabromophenolsulfonphthalein, BPB, albutest, 10% glycerin) for 5 min and an aliquot was loaded in each lane. High range protein standards (GE Healthcare, Salt Lake City, UT, USA,) were used as molecular weight markers.

3.3. Cultivation of Microorganisms

The rhizobial strain CIAT899 was stock-cultured on yeast-mannitol (YM) broth [38] containing 20% glycerol and stored at −80 °C. The inoculum was then transferred to Petri dishes containing YM agar and incubated at 28 °C for 48 h. Subsequently, a colony was carefully transferred to 10 mL YM broth and incubated at 28 °C for 48 h under constant agitation (120 rpm). Immediately before use, the bacterial suspension was adjusted to 1×10^8 cells/mL using McFarland standards.

3.4. Bacterial Growth Assay

The bacterial growth assay was carried out as previously described by Vasconcelos *et al.* [18]. The assay was performed using 96-well polystyrene plates. The pure lectins were dissolved in 0.15 M NaCl,

then filtered through 0.22 µm filters and serially diluted in 0.15 M NaCl from 500 to 31.25 µg/mL. Then, 100 µL of each lectin dilution was added to a new plate, plus 100 µL of bacterial suspension in YM (1×10^8 cells/mL), and incubated at 28 °C for 12 h in an orbital shaker at 120 rpm. Afterwards, 20 µL of the previously incubated suspension was inoculated in 180 µL YM broth and incubated again at 28 °C at 120 rpm. The optical density at 620 nm (OD 620nm) was measured at 12, 24, 36 and 48 h using a microplate reader (Biotrak II Visible Plate Reader Amersham Biosciences). Bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) was used as a non-lectin protein control and 0.15 M NaCl + YM broth as a negative control.

3.5. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed by GraphPad Prism[®] version 5.0 for Microsoft Windows[®]. The data from 3 different assays were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), with Bonferroni post-hoc test. The data were considered statistically significant when $p < 0.01$.

4. Conclusions

In conclusion, this study shows that both D-galactose- and also D-glucose/D-mannose-binding lectins purified from seeds of leguminous plants may be powerful biotechnological tools to stimulate the growth of *R. tropici* CIAT899, thus symbiotic interaction between rhizobia and the common bean and, hence, the production of this important field crop. Although the mechanisms underlying the stimulus of bacterial growth remain unclear, it can be plausibly speculated that act by modulating the metabolism of *R. tropici* CIAT899 to increase its growth. However, further studies are necessary to properly elucidate the mechanisms of action involved in lectin stimulus of rhizobial growth.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). David Martin helped with the English editing of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Denison, R.F.; Kiers, E.T. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 775–785.
2. Martinez-Romero, E.; Segovia, L.; Mercante, F.M.; Franco, A.A.; Graham, P.; Pardo, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1991**, *41*, 417–426.

3. Ribeiro, R.A.; Rogel, M.A.; López-López, A.; Ormenõ-Orrillo, E.; Barcellos, F.G.; Martínez, J.; Thompson, F.L.; Martínez-Romero, E.; Hungria, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 1179–1184.
4. Hungria, M.; Campo, R.J.; Mendes, I.C. Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soil* **2003**, *39*, 88–93.
5. Gomes, D.F.; Batista, J.S.S.; Schiavon, A.L.; Andrade, D.S.; Hungria, M. Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: Identification of conserved and specific responses to heat stress. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 1–12.
6. Chueire, L.M.O.; Bangel, E.V.; Mostasso, F.L.; Campo, R.J.; Pedrosa, F.O.; Hungria, M. Taxonomic classification of rhizobial strains recommended for soybean and common bean crops in Brazil based on the sequencing of the 16s rRNA gene. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **2003**, *27*, 833–840.
7. Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Barre, A.; Rougé, P. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* **1998**, *17*, 575–592.
8. Sharon, N.; Lis, H. History of lectins from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **2004**, *14*, R53–R62.
9. Sytnikov, D.M. How to Increase the Productivity of the Soybean-Rhizobial Symbiosis. In *A Comprehensive Survey of International Soybean Research—Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships*, 1st ed.; James, E.B., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2013; Volume 1, pp. 51–82.
10. Wang, D.; Yang, S.; Tang, S.; Zhu, H. Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualismo. *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 334–342.
11. Vandenbosch, K.A.; Rodgers, L.R.; Sherrier, D.J.; Kishinevsky, B.D. A peanut nodule lectin in infected cells and in vacuoles and the extracellular matrix of nodule parenchyma. *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 327–337.
12. Geurts, R.; Bisseling, T. *Rhizobium*. Nod factor perception and signalling. *Plant Cell.* **2002**, *14*, 239–249.
13. Roberts, N.J.; Morieri, G.; Kalsi, G.; Rose, A.; Stiller, J.; Edwards, A.; Xie, F.; Gresshoff, P.M.; Oldroyd, G.E.D.; Downie J.A.; *et al.* Rhizobial and mycorrhizal symbioses in *Lotus japonicus* require lectin nucleotide phosphohydrolase, which acts upstream of calcium signaling. *Plant Physiol.* **2013**, *161*, 556–567.
14. Antonyuk, L.P.; Ignatov, V.V. The role of wheat germ agglutinin in plant–bacteria interactions: A hypothesis and the evidence in its support. *Russ. J. Plant. Physiol.* **2001**, *48*, 364–369.
15. Martínez, C.R.; Albertini, A.V.P.; Figueiredo, M.V.B.; Silva, V.L.; Sampaio, A.H.; Cavada, B.S.; Lima-Filho, J.L. Respiratory stimulus in *Rhizobium*. sp. by leguminous lectins. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *20*, 77–83.
16. Martínez, C.R.; Chanway, C.P.; Albertini, A.V.P.; Figueiredo, M.V.B.; Sampaio, A.H.; Castellon, R.R.; Cavada, B.S.; Lima-Filho, J.L. The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: net H⁺ efflux stimulus and alteration of extracellular Na⁺ concentration. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *238*, 17–22.

17. Bajaj, M.; Soni, G.; Singh, C.K. Interaction of pea (*Pisum sativum* L.) lectins with rhizobial strains. *Microbiol. Res.* **2001**, *156*, 71–74.
18. Vasconcelos, M.A.; Cunha, C.O.; Arruda, F.V.S.; Carneiro, V.A.; Mercante, F.M.; Neto, L.G.N.; Sousa, G.S.; Rocha, B.A.M.; Teixeira, E.H.; Cavada, B.S.; *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds (ConBr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* *in vitro*. *Molecules* **2012**, *17*, 5244–5254.
19. Sytnikov, D.M.; Kirizii, D.A.; Malichenko, S.M.; Kots, S.Y. Productivity of soybean-Rhizobium symbiosis after modification of root nodule bacteria activity with exogenous proteins. *Russ. J. Plant Physiol.* **2007**, *54*, 366–372.
20. Sytnikov, D.M.; Kots, S.Y.; Datsenko, V.K. Efficacy of biological preparations of soybean root nodule bacteria modified with a homologous lectin. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 274–279.
21. Cavada, B.S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T.B.; Baral-Neto, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2001**, *2*, 1–13.
22. Andrade, J.L.; Arruda, S.; Barbosa, T.; Paim, L.; Ramos, M.V.; Cavada, B.S.; Barral-Netto, M. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol.* **1999**, *194*, 98–112.
23. Assreuy, A.M.S.; Shibuya, M.D.; Martins, G.J.; Souza, M.L.P.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A.; Ribeiro, R.A.; Flores, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. *Mediators Inflamm.* **1997**, *6*, 201–210.
24. Cavalcante, T.T.; Rocha, B.A.M.; Carneiro, V.A.; Arruda, F.V.S.; Nascimento, A.S.F.; Sá, N.C.; Nascimento, K.S.; Cavada, B.S.; Teixeira, E.H. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. *Molecules* **2011**, *16*, 3530–3543.
25. Pinto, F.G.S.; Chueire, L.M.O.; Vasconcelos, A.T.R.; Nicolás, M.F.; Almeida, L.G.P.; Souza, R.C.; Menna, P.; Barcellos, F.G.; Megías, M.; Hungria, M. Novel genes related to nodulation, secretion systems, and surface structures revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. *Funct. Integr. Genomics* **2009**, *9*, 263–270.
26. Laus, M.C.; Logman, T.J.; Lamers, G.E.; Van Brussel, A.A.N.; Carlson, R.W.; Kijne, J.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1704–1713.
27. Fraysse, N.; Couderc, F.; Poinot, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1365–1380.
28. D’Haeze, W.; Leoff, C.; Freshour, G.; Noel, K.D.; Carlson, R.W. *Rhizobium etli* CE3 bacteroid lipopolysaccharides are structurally similar but not identical to those produced by cultured CE3 bacteria. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17101–17113.
29. Castro, C.; Molinaro, A.; Lanzetta, R.; Silipo, A.; Parrilli, M. Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and Rhizobiaceae species. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1924–1933.
30. Muszyński, A.; Laus, M.; Kijne, J.W.; Carlson, R.W. Structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* RBL5523 and its UDP-glucose dehydrogenase mutant (exo5). *Glycobiology* **2011**, *21*, 55–68.
31. Moreira, R.A.; Cordeiro, E.F.; Grangeiro, T.B.; Martins, J.L.; Ramos, M.V.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, *8*, 23–29.

32. Moreira, R.A.; Monteiro, A.C.O.; Horta, A.C.G.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *megacarpa* seed lectin. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 139–144.
33. Cavada, B.S.; Grangeiro, T.B.; Ramos, M.V.; Cordeiro, E.F.; Oliveira, J.T.A.; Moreira, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, *8*, 31–36.
34. Cavada, B.S.; Santos, C.F.; Grangeiro, T.B.; Nunes, E.P.; Sales, P.V.P.; Ramos, R.L.; De Sousa, F.A.M.; Crisostomo, C.V.; Calvete, J.J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 675–680.
35. Moraes, S.M.D.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Roquebarreira, M.C.; Santos-De-Oliveira, R.; Pinto, V.P.T.; Oliveira, J.T.A. Purification, Physicochemical characterisation and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* seeds. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 977–985.
36. Pinto, L.S.; Nagano, C.S.; Oliveira, T.M.; Moura, T.R.; Sampaio, A.H.; Debray, H.; Pinto, V.P.T.; Dellagostin, O.A.; Cavada, B.S. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *J. Biosci.* **2008**, *33*, 355–363.
37. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
38. Vincent, J.M. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria, International Biological Programme Handbook No. 15*; Blackwell Science Publications: Oxford, UK, 1970; p. 164.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Article

Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart.

Vanir Reis Pinto Júnior ¹, Mayara Queiroz de Santiago ¹, Vinícius José da Silva Osterne ¹, Jorge Luis Almeida Correia ¹, Francisco Nascimento Pereira Júnior ¹, João Batista Cajazeiras ¹, Mayron Alves de Vasconcelos ¹, Edson Holanda Teixeira ², Antônia Sâmia Fernandes do Nascimento ¹, Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel ¹, Emilio de Castro Miguel ¹, Alexandre Holanda Sampaio ³, Kyria Santiago do Nascimento ¹, Celso Shiniti Nagano ³ and Benildo Sousa Cavada ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Biologically Active Molecules (Biomol-Lab), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Bloco 907, Lab. 1075, Campus do Pici, Fortaleza-CE 60440-970, Brazil; E-Mails: juniorreis4@hotmail.com (V.R.P.J.); mayara_delonge@hotmail.com (M.Q.S.); vinyosterne@gmail.com (V.J.S.O.); jorge.biomol@gmail.com (J.L.A.C.); fnpjunior@yahoo.com.br (F.N.P.J.); jcajazeiras@gmail.com (J.B.C.); mayronvasconcelos@gmail.com (M.A.V.); asamiaf@gmail.com (A.S.F.N.); thaizrangel@gmail.com (T.B.A.R.M.); emiliocmiguel@yahoo.com.br (E.C.M.); kyriasantiago@gmail.com (K.S.N.)
- ² Integrated Laboratory of Biomolecules (LIBS), Federal University of Ceará, Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Fortaleza, CE 60430-160, Brazil; E-Mail: edson@ufc.br
- ³ Laboratory of Mass Spectrometry Applied to Proteins (LEMAP), Federal University of Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Bloco 825, Campus do Pici, Fortaleza-CE 60440-970, Brazil; E-Mails: alexholandasampaio@gmail.com (A.H.S.); naganocs@gmail.com (C.S.N.)

* Author to whom correspondence should be addressed: E-Mail: bscavada@ufc.br; Tel./Fax: +55-85-3366-9818.

Received: 31 July 2013; in revised form: 29 August 2013 / Accepted: 30 August 2013 /

Published: 4 September 2013

Abstract: Lectin from the seeds of *Dioclea lasiophylla* (DlyL) was purified in a single step by affinity chromatography on a Sephadex[®] G-50 column. DlyL strongly agglutinated rabbit erythrocytes and was inhibited by monosaccharides (β -mannose and α -methyl-D-mannoside) and glycoproteins (ovalbumin and fetuin). Similar to other Diocleinae lectins, DlyL has three chains, α , β and γ , with mass of $25,569 \pm 2$, $12,998 \pm 1$ and

12,588 ± 1 Da, respectively, and has no disulfide bonds. The hemagglutinating activity of DlyL was optimal in pH 8.0, stable at a temperature of 70 °C and decreased in EDTA solution, indicating that lectin activity is dependent on divalent metals. DlyL exhibited low toxicity on *Artemia* sp. nauplii, but this effect was dependent on the concentration of lectin in solution. DlyL immobilized on cyanogen bromide-activated Sepharose[®] 4B bound 0.917 mg of ovalbumin per cycle, showing the ability to become a tool for glycoproteomics studies.

Keywords: lectin; *Dioclea lasiophylla*; Diocleinae; toxicity; immobilization

1. Introduction

Lectins currently represent an important tool in glycobiology studies because of their ability to decipher glycodes. These proteins/glycoproteins, which have at least one noncatalytic domain of recognition and reversible binding to specific carbohydrates [1], participate in a variety of cellular processes without changing the mono/oligosaccharides involved [2]. These lectins can be employed in a range of biomedical studies, including cancer and immunological research, isolation and characterization of glycoconjugates, and blood typing. In glycoproteomics, studies are facilitated by the large number of natural lectins that recognize and bind to carbohydrates. When immobilized on inert matrices, these lectins are used in affinity chromatography, assisting in the purification and separation of glycoproteins for analytical testing [3].

Recent studies have shown that these plant lectins have several applications inside the body, such as defense [4], or outside the body, such as drug delivery [5], as well as a variety of diagnostic applications for a broad spectrum of diseases [6].

Legume lectins are normally composed of two or four monomers, presenting a molecular mass of about 25–30 kDa, with each monomer presenting a unique, highly conserved carbohydrate binding site, as well as conserved metal binding sites for divalent cations (calcium and manganese). The monomers are associated by noncovalent interactions [7].

Dioclea lasiophylla belongs to the family Leguminosae (Fabaceae), tribe Phaseoleae, subtribe Diocleinae. It is endemic in Brazil and found mainly in the northeast region. Diocleinae lectins are a well-studied group of closely related lectins among the leguminous group. Different biological effects associated with these proteins have been described, such as histamine release from rat peritoneal mast cells [8] and anti- and pro-edematogenic effects [9,10]. Minor differences in the ratios of dimeric and tetrameric forms in the lectins and/or differences in the relative orientations of the carbohydrate-binding sites in the quaternary structures have been hypothesized to contribute to the differences in biological activities exhibited by Diocleinae lectins [11]. Such properties make these lectins valuable biomedical tools, and, as such, the characterization and sequence analysis of different lectins belonging to this subtribe are ongoing. Furthermore, Diocleinae lectins provide an excellent system to study the dramatic effects of minor structural differences on functional properties in proteins [12]. The present

study aims to purify and characterize the lectin from *D. lasiophylla* seeds, determine its toxicity against *Artemia* sp. and its possible biomedical applications.

2. Results and Discussion

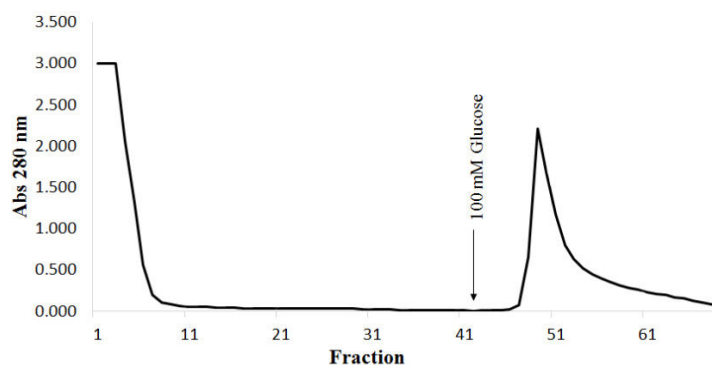
The crude extract of seeds of *D. lasiophylla* showed strong agglutination activity in native rabbit erythrocytes treated with trypsin and papain (data not shown). The inhibition assay of hemagglutinating activity with carbohydrates showed that the lectin has specificity for D-mannose and α -methyl-D-mannoside, although activity was not inhibited by D-glucose (Table 1). The hemagglutinating activity of DlyL was also inhibited by two glycoproteins, ovalbumin and fetuin, having mannose as their glycan structure.

Table 1. Inhibitory effect of saccharides and glycoproteins on the hemagglutinating activity of *Dioclea lasiophylla* lectin.

Carbohydrate	MIC *
D-Glucose	NI **
D-Mannose	25 mM
D-Galactose	NI **
N-acetyl-D-glucosamine	NI **
α -methyl-D-mannoside	6.25 mM
α -methyl-D-galactoside	NI **
α -Lactose	NI **
β -Lactose	NI **
Glycoprotein	
Ovalbumin	0.0625 mg/mL
Fetuin	0.125 mg/mL

* MIC, Minimum inhibitory concentration; ** NI, sugar not inhibitory until a concentration of 100 mM.

Figure 1. Elution profile of the Sephadex[®] G-50 affinity chromatography. Approximately 10 mL of the crude extract was applied to the column (6.5 × 1.8 cm) which was equilibrated with 150 mM NaCl plus 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂. The lectin was eluted with 100 mM D-glucose in the equilibrium solution described earlier at a flow rate of 1 mL/min. Fractions of approximately 3 mL were collected and monitored for protein content by measuring the absorbance at 280 nm.



Although the monosaccharide D-glucose was unable to inhibit the hemagglutinating activity, the DlyL was purified by a single-step affinity chromatography in Sephadex[®] G-50 column, a Dextran chromatographic support, on which the lectin was quantitatively retained in the gel and eluted with 100 mM D-glucose, providing strong evidence for carbohydrate-binding properties (Figure 1). The soluble protein content and the specific activity of the crude lectin extract were 5.2 mg/mL and 196 HU/mg proteins, respectively. For the purified lectin, the values were 0.76 mg/mL and 5,390 HU/mg proteins, respectively. The specific activity increased by 27.5-fold in the pure lectin (Table 2).

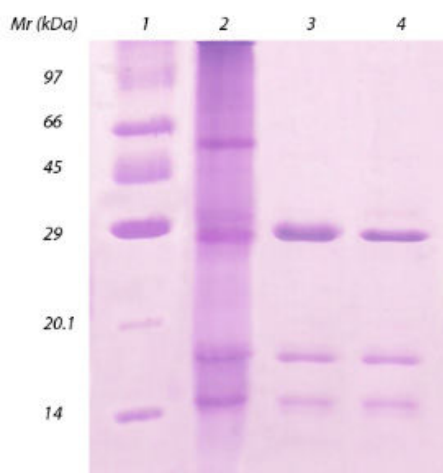
Table 2. Purification of lectin from *Dioclea lasiophylla* seeds.

Fraction	^a Total protein (mg/mL)	^b Total HU	^c Specific activity (HU/mg)	Purification (fold)
Crude extract	5.2	2 ¹⁰	196	1
PII (Sephadex [®] G-50)	0.76	2 ¹²	5390	27.5

^a Protein content; ^b Hemagglutinating activity expressed in hemagglutinating units (HU); ^c Specific activity calculated as the ratio between hemagglutinating activity and protein content.

As shown in Figure 2, SDS-PAGE assay of DlyL showed the appearance of three polypeptide chains, α , β and γ . These findings were confirmed by ESI mass spectrometry analysis proving the existence of just one lectin, composed of three chains (α , β and γ). The α -chain has a molecular mass of $25,569 \pm 2$ Da. The mass of each fragment is $12,998 \pm 1$ Da (β -chain) and $12,588 \pm 1$ Da (γ -chain).

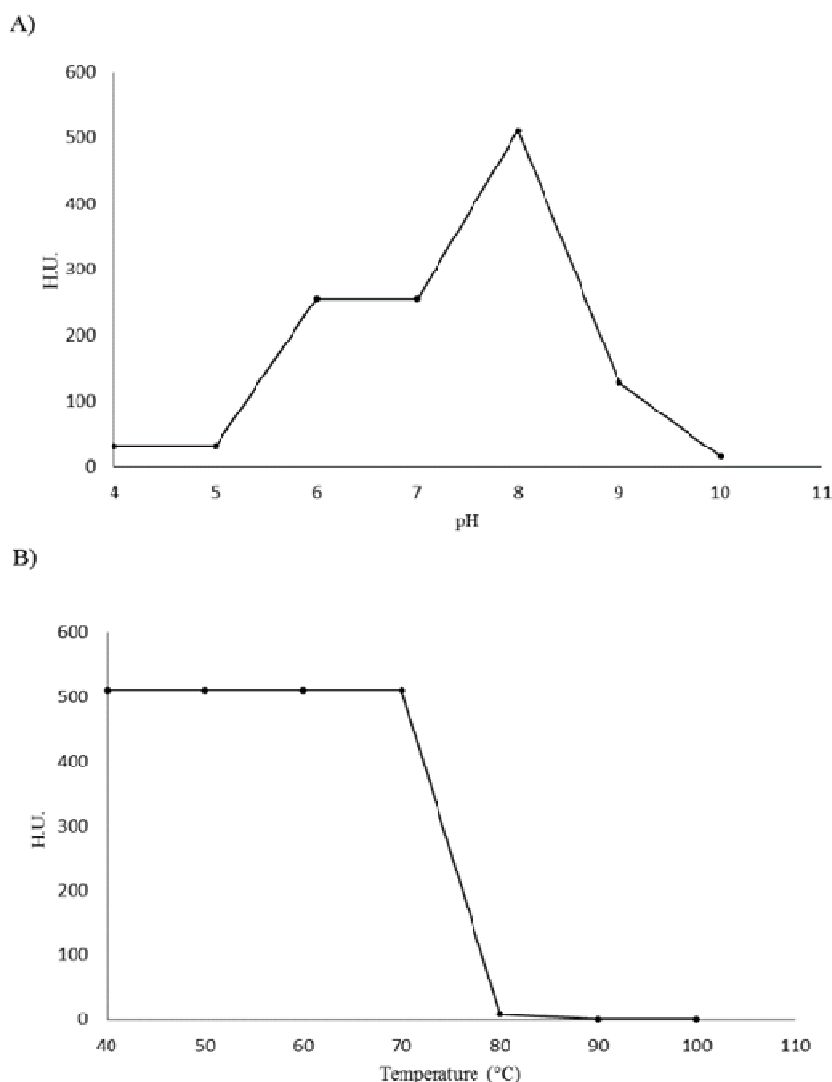
Figure 2. SDS-PAGE. Lane 1: molecular mass markers (phosphorylase b, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; and α -lactalbumin, 14 kDa); lane 2: crude extract; lane 3: DlyL (30 μ g); lane 4: DlyL (30 μ g) with 2% β -mercaptoethanol.



The addition of β -mercaptoethanol did not change the electrophoretic profile of DlyL, suggesting the absence of disulfide bonds. DlyL showed no staining by periodic acid-Schiff, suggesting that it is not a glycoprotein. These characteristics correspond to the pattern of other Diocleinae lectins, such as *Dioclea altissima* [13], *Dioclea rostrata* [14], *Dioclea violacea* [15], *Dioclea grandiflora* [16], *Dioclea guianensis* [17], *Dioclea sclerocarpa* [18] and *Dioclea lasiocarpa* [19].

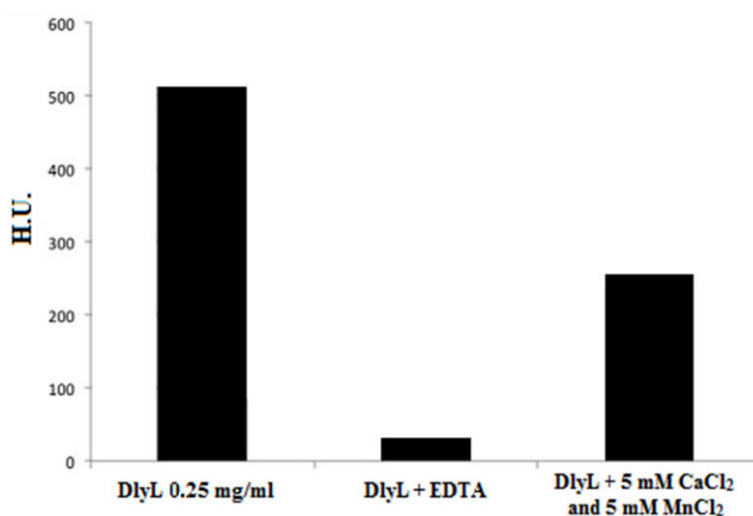
DlyL was able to maintain its hemagglutinating activity within a relatively wide pH range with maximal activity observed at pH 8.0 (Figure 3A), indicating that the lectin is more stable in this condition. A further decrease in pH (from 6.0–7.0) reduced the hemagglutinating activity of DlyL by 50%, and in pH 5.0, or lower, lectin activity was negligible. An increase in pH (above 9.0) caused a 75% loss in activity, and in pH 10.0, the lectin was nearly inactivated. DlyL was shown to be quite thermostable, supporting a temperature of 70 °C for 1 h without any loss in its hemagglutination activity (Figure 3B); in 80 °C, the lectin lost 98% of its activity, while at higher temperatures, no agglutination was detected, indicating the thermo inactivation of DlyL. Both pH stability and thermal resistance of DlyL are close to other lectins from the Diocleinae subtribe [18–21].

Figure 3. Physicochemical properties from *Dioclea lasiophylla* lectin. (A) Effect of pH on DlyL hemagglutination activity; (B) DlyL thermal stability.



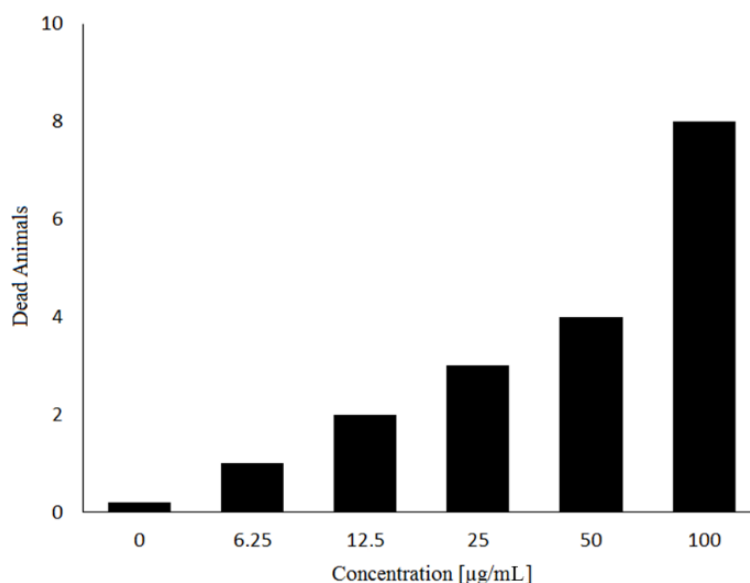
After demetalizing the lectin by sequential dialysis against EDTA and NaCl, the hemagglutination activity of DlyL was greatly reduced (loss of 94%). However, the activity was partially recovered after the addition of 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂ (Figure 4), showing that DlyL is dependent on these divalent cations for its activity. The requirement for metals is a common characteristic of legume lectins, including several of the Diocleinae subtribe [22].

Figure 4. Metal dependence of DlyL. Hemagglutinating activity of native DlyL, demetalized DlyL (dialyzed against 100 mM EDTA, followed by 150 mM NaCl) and metal added to DlyL (5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂).



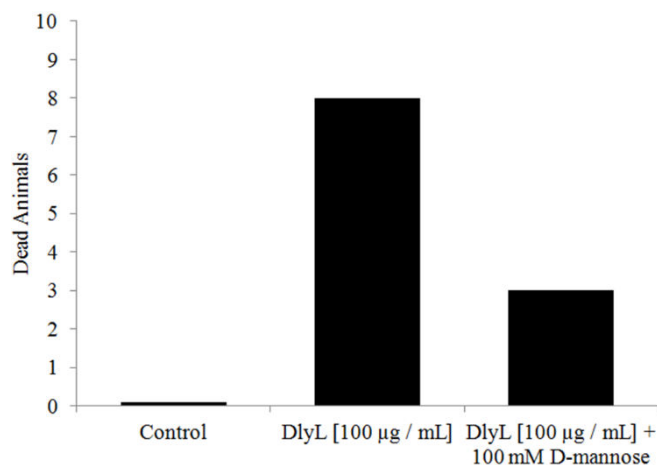
DlyL has toxic activity against brine shrimp (*Artemia* sp. nauplii), exhibiting LC₅₀ value of 45.85 µg/mL. This effect proved to be dose-dependent and was observed in a concentration range from 6.25 to 100 µg/mL (Figure 5). The *Artemia* lethality test [23,24] has been used successfully to determine the toxicity of biological molecules that have a variety of pharmacological activities, including anticancer agents, antivirals, insecticides, pesticides, and anti-HIV compounds [25–27]. Previous work showed that other lectins, such as ConA-like, also have toxic effect [28], with LC₅₀ between 2.52 and 15.5 µg/mL. In comparison to other similar lectins, DlyL exhibited low toxicity against *Artemia*.

Figure 5. Toxic effect of DlyL at different concentrations on *Artemia* sp. Nauplii.



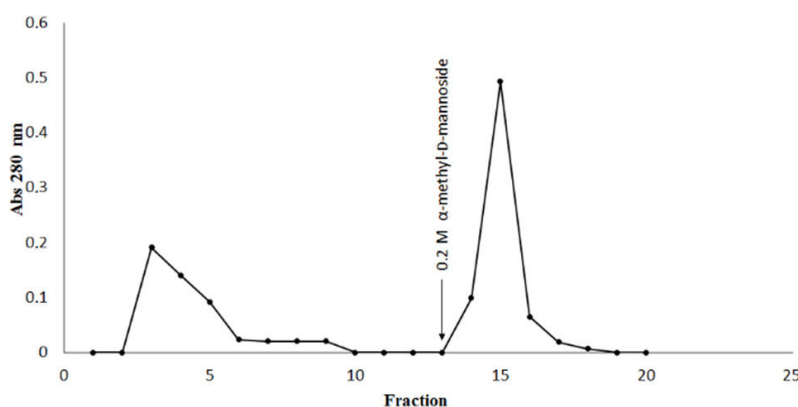
The lethality of animals decreased (reduction of 62.5%) when the lectin was incubated with D-mannose (Figure 6), showing that the carbohydrate recognition domain is responsible for the toxic activity against *Artemia*.

Figure 6. Toxic effect of DlyL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and DlyL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) previously incubated with 100 mM D-mannose.



DlyL was successfully immobilized in Sepharose 4B (yield of 97.34%) and was capable of binding strongly to ovalbumin (Figure 7). The glycoprotein was eluted with α -methyl-D-mannoside, a saccharide that best inhibited hemagglutinating activity, showing that the carbohydrate recognition domains remain active after immobilization and are responsible for interaction of DlyL-Sepharose 4B with ovalbumin. DlyL-Sepharose 4B column was able to efficiently isolate glycoprotein (0.917 mg), displaying high potential for glycoproteomics studies.

Figure 7. Chromatography on DlyL-Sepharose 4B. The column (0.8×2.7 cm) was equilibrated with 150 mM NaCl plus 5 mM CaCl_2 and 5 mM MnCl_2 . Sample (2 mg) of ovalbumin was applied to the column. The lectin affinity support was then washed with the same buffer. Elution was carried out at 25 $^\circ\text{C}$ at a flow rate of 3 mL/min. Arrows demonstrate the points at which eluent (α -methyl-D-mannoside) was added. Fractions of 1.0 mL were collected.



3. Experimental Section

3.1. Plant Material

Mature *D. lasiophylla* seeds were collected in Ceará (Brazil) and identified by in the Herbarium Prisco Bezerra EAC in the Department of Biology of the Federal University of Ceará (UFC).

3.2. Purification of DlyL

The seeds were ground to a fine powder in a coffee mill. Soluble proteins were extracted in 150 mM NaCl plus 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂ [1:10 (w:v)] under constant stirring for 4 h at room temperature. Subsequently, the extract was centrifuged at 10.000 × g at 4 °C for 20 min, and the supernatant was filtered on filter paper (Whatman™). Protein concentration was determined by the method described by Bradford [29], using bovine serum albumin as a standard. The resulting supernatant was applied to Sephadex® G-50 affinity column (6.5 × 1.8 cm) previously equilibrated with extraction solution. Unbound material (P1) was washed with the same solution, and lectin was eluted with 100 mM D-glucose in the equilibrium solution; eluted fractions were monitored by absorbance at 280 nm. The eluate was collected, dialyzed against distilled water, and lyophilized. The homogeneity of the sample was monitored by SDS-PAGE, and the pure protein was used for characterization tests.

3.3. Hemagglutination Tests

The hemagglutination assay was performed in microtiter plates by serial dilution using 3% native rabbit erythrocytes treated with the proteolytic enzymes trypsin and papain [30]. Hemagglutinating unit (HU) was expressed as a title (the value of the highest dilution giving a positive hemagglutination) per mL of sample.

3.4. Inhibition Assay

The carbohydrate binding specificity of DlyL was determined by the ability of different sugars and glycoproteins to inhibit erythrocyte agglutination, as assessed by minimum inhibitory concentration [31]. Serial dilutions were made of sugar/glycoproteins (initial concentration of 100 mM/1 mg/mL, respectively), including D-glucose, D-mannose, D-galactose, N-acetyl-D-glucosamine, α-methyl-D-mannoside, α-methyl-D-galactoside, α-lactose, β-lactose, chicken egg white albumin (ovalbumin) and fetuin, prepared in 150 mM NaCl. DlyL (32 HU) was added to each dilution.

3.5. SDS-PAGE

SDS-PAGE was carried out in accordance with the procedure described by Laemmli [32] using a Mini-Protean II apparatus (BioRad; Milan, Italy) in 0.75 mm vertical gel slabs containing a 12.5% polyacrylamide separation gel and 4% polyacrylamide stacking gel. Samples were dissolved in 0.88 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS buffer, 1% bromophenol blue and 12.5% glycerol, followed by heating at 100 °C for 5 min. The electrophoretic run was conducted at constant current of 25 mA for 60 min. The bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. The molecular markers were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa); ovalbumin (45 kDa) carbonic anhydrase, (29 kDa); trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α-lactalbumin, (14 kDa). The presence of disulfide bonds was determined by adding 2% β-mercaptoethanol in the sample buffer, and the carbohydrate presence on the structure of the DlyL was determined by staining with periodic acid-Schiff according to Zacharius and colleagues [33].

3.6. Mass Spectrometry

The averaged molecular mass of DlyL was determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) using a hybrid quadrupole/ion mobility separator/orthogonal acceleration-time of flight mass spectrometer (Synapt HDMS System, Waters Corp., Milford, MA, USA). The protein solution (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ in 50% acetonitrile and 0.2% formic acid) was infused into the system at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. The capillary voltage and the cone voltage were set at 3.5 kV and 40 V, respectively. The source temperature was maintained at 90 °C, and nitrogen was used as a drying gas (flow rate of 150 L/h). The instrument was calibrated with average m/z (charges +12 to +26) of horse heart myoglobin. The data were acquired with the Mass Lynx software, v. 4.0 (Waters Corp., Milford, MA, USA, 2002). The multiply charged spectra were deconvoluted using maximum entropy techniques [34].

3.7. Effect of pH and Temperature on Lectin Activity

In order to determine the stability of the protein at different pH values, purified lectin solution (0.25 mg/mL in 150 mM NaCl) was dialyzed for 24 h against different pH buffers (all containing 150 mM NaCl), ranging from pH 4.0 to 10.0: 100 mM sodium citrate (pH 4.0 and 6.0), 100 mM sodium acetate (pH 5.0), 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) and glycine-NaOH (pH 9.0 and 10.0). The activity of the lectins after dialysis was measured by hemagglutination activity. The effect of temperature on the activity of DlyL was studied by incubating samples of lectin solution (0.25 mg/mL) at different temperatures (40 °C to 100 °C) for 60 min with increments of 10 °C and measuring the residual activity by hemagglutination tests.

3.8. Effect of Divalent Cations

To evaluate the requirement of divalent cations for lectin activity, a sample of lectin solution (0.125 mg/mL) was demetalized by dialysis against 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) containing 150 mM NaCl for 24 h; EDTA excess was removed posteriorly with dialysis against 150 mM NaCl. The change in activity was determined after addition of 5 mM CaCl_2 and 5 mM MnCl_2 . Both the demetalized and metal-added samples had their activity determined via hemagglutination tests.

3.9. Artemia Toxicity Tests

Cytotoxicity was studied using *Artemia* nauplii. The *Artemia* cysts were hatched in artificial seawater at 28 °C under constant light and aeration. The cysts were incubated in a glass tube with 1 g cysts per liter of artificial seawater. After a period of 48 h, the aeration was halted, and the light was directed to the bottom of the tube. The phototropic nature of nauplii caused them to migrate in the direction of light toward the bottom of the tube, facilitating their separation from unhatched cysts. First, a stock solution of DlyL was made by dissolving the lectin in artificial seawater in a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This assay was made in Linbro plates (24-well) where each well contained 10 *Artemia* nauplii in a final volume of 2 mL. Stock solution of the lectin was then added to the wells at final concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The experiments were performed

in triplicate, and negative control was the artificial water and the *Artemia* nauplii in the absence of the lectin. After 24 h, the number of dead nauplii in each well was counted. In order to verify the importance of the carbohydrate binding activity in the toxicity caused by DlyL, the lectin was incubated with 100 mM D-mannose, and the *Artemia* lethality test was made at final concentration of 100 µg of lectin by mL of artificial seawater.

3.10. Determination of the LC₅₀ Value

Data obtained from the toxicity assay were plotted in a simple program (Microsoft Excel 2013) on a personal computer. The LC₅₀ values were computerized from the percentage of death and logarithm concentrations by probit analysis.

3.11. DlyL Immobilization on Sepharose 4B

Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B was used for DlyL immobilization [35]. CNBr-activated Sepharose 4B (0.5 g) was washed with HCl 1 mM, followed by 100 mM NaHCO₃ in 0.5 M NaCl, pH 8.3. Incubation (1 h, 25 °C) was performed with DlyL (15 mg of protein). After filtration and washing with NaHCO₃ solution, the DlyL-Sepharose 4B matrix was washed with 100 mM Tris-HCl in 0.5 M pH 8.0, followed by 100 mM sodium acetate in 0.5 M NaCl at pH 4.0. DlyL retention was determined by calculating the difference between the weight of loaded DlyL and the amount of protein found before washing. To analyze the performance of immobilization and capacity of DlyL-Sepharose 4B matrix to purify glycoproteins, trials were carried out with ovalbumin. Ovalbumin (2 mg) was chromatographed on DlyL-Sepharose 4B column (0.8 × 2.7 cm) equilibrated with 150 mM NaCl plus 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂ (flow rate of 0.33 mL/min). The lectin affinity support was then washed with the same buffer, and bound proteins were then eluted with buffer containing 0.2 M α-methyl-D-mannoside. Eluted fractions were monitored by absorbance at 280 nm.

4. Conclusions

DlyL is a mannose/glucose-binding lectin purified from the protein extract of the seeds of *Dioclea lasiophylla* and further characterized physicochemically. Similar to other Diocleinae lectins, DlyL has an α-chain, which generates two smaller “fragment” chains, β and γ, as a consequence of post-translational circular permutation, a posttranslational modification typical of Diocleinae lectins. In addition, DlyL was demonstrated to have low toxicity against *Artemia* sp. nauplii with dose-dependent effect, and immobilized DlyL showed high potential as a tool for purification of glycoproteins, enabling its use in glycoproteomics studies.

Acknowledgments

Research supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP); David Harding helped with english editing of the manuscript; Cavada BS and Nagano CS are senior investigators of CNPq/Brazil.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Barre, A.; Rougé, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **1998**, *17*, 575–692.
2. Gabius, H.J.; Gabius, S. *Glycoscience. Status and Perspectives*; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1997.
3. Regnier, F.E.; Jung, K.; Hooser, S.B.; Wilson, C.R. Glycoproteomics based on lectin affinity chromatographic selection of glycoforms. *Lectins: Anal. Technol.* **2007**, *8*, 193–212.
4. Vandendorre, G.; Smagghe, G.; van Damme, E.J.M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1538–1550.
5. Bies, C.; Lehr, C.M.; Woodley, J.F. Lectin-mediated drug targeting history and applications. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 425–435.
6. Gemeiner, P.; Mislovicová, D.; Tkác, J.; Svitel, J.; Pätoprstý, V.; Hrabárová, E.; Kogan, G.; Kozár, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 1–15.
7. Brinda, K.V.; Mitra, N.; Surolia, A.; Vishveshwara, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1735–1749.
8. Ferreira, R.R.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A.; Gomes, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans And Concanavalin A. *Inflamm. Res.* **1996**, *45*, 442–447.
9. Alencar, N.M.N.; Teixeira, E.H.; Asseury, A.M.; Cavada, B.S.; Flores, C.A.; Ribreiro, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediat. Inflamm.* **1998**, *8*, 107–113.
10. Asseury, A.M.S.; Shimbuya, M.D.; Martins, G.J.; Souza, M.L.P.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A.; Ribeiro, R.A.; Flores, C.A. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. *Mediat. Inflamm.* **1997**, *6*, 201–210.
11. Cavada, B.S.; Grangeiro, T.B.; Ramos, M.V.; Crisostomo, C.V.; Silva, L.M.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A. Lectin from *Dioclea guianensis* var. lasiophylla Duke seeds mobilization during germination and seedlings growth in the dark. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1994**, *6*, 21–25.
12. Sanz-Aparicio, J.; Hermoso, J.; Grangeiro, T.B.; Calvette, J.J.; Cavada, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 114–118.
13. Moreira, R.A.; Monteiro, A.C.O.; Horta, A.C.G.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* Var. Megacarpa seed lectin. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 139–144.
14. Cavada, B.S.; Grangeiro, T.B.; Ramos, M.V.; Cordeiro, E.F.; Oliveira, J.T.A.; Moreira, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, *8*, 31–36.

15. Moreira, R.A.; Cordeiro, E.F.; Ramos, M.V.; Grangeiro, T.B.; Martins, J.L.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, *8*, 23–29.
16. Moreira, R.A.; Barros, A.C.H.; Stewart, J.C.; Pusztai, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Planta* **1983**, *158*, 63–69.
17. Vasconcellos, I.M.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A. Purification and partial characterization of a lectin from the seed of *Dioclea guianensis*. *J. Food Biochem.* **1991**, *15*, 137–154.
18. Correia, J.L.A.; Nascimento, A.S.F.; Cajazeiras, J.B.; Gondim, A.C.S.; Pereira, R.I.; Sousa, B.L.; Silva, A.L.C.; Garcia, W.; Teixeira, E.H.; Nascimento, K.S.; *et al.* Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. *Molecules* **2011**, *16*, 9077–9089.
19. Nascimento, A.S.F.; Gondim, A.C.S.; Cajazeiras, J.B.; Correia, J.L.A.; Pires, A.F.; Nascimento, K.S.; Silva, A.L.C.; Nagano, C.S.; Assreuy, A.M.S.; Cavada, B.S. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. *J. Mol. Recognit.* **2012**, *25*, 1099–1352.
20. Moreira, R.A.; Cordeiro, E.F.; Cavada, B.S.; Nunes, E.P.; Fernandes, A.G.; Oliveira, J.T.A. Lectins and the chemotaxonomy of the genus *Diocleinae* (*Leguminosae-Phaseoleae*). *R. Bras. Fis. Veg.* **1995**, *7*, 7–14.
21. Rangel, T.B.A.; Assreuy, A.M.S.; Pires, A.F.; Carvalho, A.U.; Benevides, R.G.; Simões, R.C.; Silva, H.C.; Bezerra, M.J.B.; Nascimento, A.S.F.; Nascimento, K.S.; *et al.* Crystallization and Characterization of an inflammatory lectin purified from the seeds of *Dioclea wilsonii*. *Molecules* **2011**, *16*, 5087–5103.
22. Cavada, B.S.; Ramos, M.V.; Cordeiro, E.F.; Grangeiro, T.B.; Oliveira, J.T.A.; Carvalho, A.F.F.U.; Moreira, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. *Braz. J. Veg. Fis.* **1996**, *8*, 37–42.
23. Persoone, G. *The Brine Shrimp Artemia: Proceedings of the International Symposium on the Brine Shrimp Artemia Salina*; Universa Press: Corpus Christi, TX, USA, 1979.
24. Sorgeloos, P.; van Der Wielen, C.R.; Persoone, G. The use of artemia nauplii for toxicity tests-A critical analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1978**, *2*, 249–255.
25. Carballo, J.L.; Hernández-Inda, Z.L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* **2002**, *2*, 17–21.
26. Pervin, F.; Hossain, M.M.; Khatun, S.; Siddique, S.P.; Salam, K.A.; Karim, M.R.; Absar, N. Comparative cytotoxicity study of six bioactive lectins purified from pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) rootstock on Brine Shrimp. *J. Med. Sci.* **2006**, *6*, 999–1002.
27. Ho, J.C.; Chen, C.M.; Row, L.C. Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of *Tetrapanax papyriferus*. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 631–635.
28. Santos, A.F.; Cavada, B.S.; Rocha, B.A.M.; Nascimento, K.S.; Sant’Ana, A.E.G. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 794–798.

29. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry* **1976**, *72*, 248–254.
30. Ainouz, I.L.; Sampaio, A.H.; Benevides, N.M.B.; Freitas, A.L.P.; Costa, F.H.F.; Carvalho, M.R.; Joventino, F.P. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae extracts. *Botanica Mar.* **1992**, *35*, 447–479.
31. Ramos, M.V.; Moreira, R.A.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.A.; Rouge, P. Interaction of lectins from the sub tribe *Diocleinae* with specific ligands. *R. Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, *8*, 193–199.
32. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
33. Zacharius, R.M.; Zell, T.E.; Morrison, J.H.; Woodlock, J.J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1969**, *30*, 148–152.
34. Ferrige, A.G.; Seddon, M.J.; Green, B.N.; Jarvis, S.A.; Skilling, J.; Staunton, J. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 707–711.
35. Paiva, P.M.G.; Souza, A.F.; Oliva, M.L.V.; Kennedy, J.F.; Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B.; Sampaio, C.A.M. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresour. Technol.* **2003**, *88*, 75–79.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Article

Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds (ConBr) Is a Valuable Biotechnological Tool to Stimulate the Growth of *Rhizobium tropici* *in Vitro*

Mayron Alves de Vasconcelos¹, Claudio Oliveira Cunha¹, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda², Victor Alves Carneiro², Fabio Martins Mercante^{3,†}, Luiz Gonzaga do Nascimento Neto², Giselly Soares de Sousa⁴, Bruno Anderson Matias Rocha^{1,†}, Edson Holanda Teixeira^{2,†}, Benildo Sousa Cavada^{1,†,*} and Ricardo Pires dos Santos^{4,†,*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE 60440-970, Brazil; E-Mails: mayronvasconcelos@gmail.com (M.A.V.); agrobrasil@gmail.com (C.O.C.); brunoanderson@gmail.com (B.A.M.R.)

² Integrated Laboratory of Biomolecules (LIBS), School of Medicine, Federal University of Ceara, Sobral, CE 62042-280, Brazil; E-Mails: vassiliepe@gmail.com (F.V.S.A.); victorcarneiro@ufc.br (V.A.C.); ziullec@gmail.com (L.G.N.N.); edsonlec@gmail.com (E.H.T.)

³ Embrapa Western Region Agriculture, Dourados, MS 79804-970, Brazil; E-Mail: mercante@cpao.embrapa.br

⁴ Computer Engineering/Biotechnology Center of Sobral, Federal University of Ceara, CE 62011-000, Brazil; E-Mail: giselly.eng@gmail.com

† Scholarship holder of the CNPq Program for Productivity in Research.

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: bscavada@gmail.com (B.S.C.); rpsantos2007@gmail.com (R.P.S.); Tel./Fax: +55-85-3366-9818 (B.S.C.); Tel.: +55-88-3613-2829 (R.P.S.).

Received: 5 April 2012; in revised form: 22 April 2012 / Accepted: 25 April 2012 /

Published: 7 May 2012

Abstract: To study the interactions between a *Rhizobium tropici* strain and lectins isolated from the seeds of *Canavalia ensiformis* (ConA) and *Canavalia brasiliensis* (ConBr), a lectin fluorescence assay was performed. In addition, an experiment was designed to evaluate the effect of the two lectins on bacterial growth. Both lectins were found to bind to *R. tropici* cells, but the interactions were inhibited by D-mannose. Interestingly, only ConBr stimulated bacterial growth in proportion to the concentrations used (15.6–500 µg/mL), and the bacterial growth stimulation was inhibited by D-mannose as well. Structure/Function

analyses by bioinformatics were carried out to evaluate the volume and carbohydrate recognition domain (CRD) configuration of ConA and ConBr. The difference of spatial arrangement and volume of CRD may indicate the variation between biological activities of both lectins. The results suggest that ConBr could be a promising tool for studies focusing on the interactions between rhizobia and host plants.

Keywords: lectin; *Canavalia brasiliensis*; *Canavalia ensiformis*; *Rhizobium tropici*; interaction; growth

1. Introduction

Diazotrophic bacteria capable of forming symbiotic N₂-fixing associations with many plant species of the Leguminosae family are collectively known as rhizobia [1]. The establishment of symbiosis between rhizobia and host plants requires the recognition and exchange of molecular signals [2]. Several signaling molecules are exchanged between plant and bacterium (such as flavonoids, betaines and aldonic acid), thereby regulating the initiation, differentiation and functioning of the nodule [3].

Rhizobium tropici, a major symbiont of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in tropical soils, is abundant in all Brazilian biomes [4]. Certain strains of *R. tropici* are particularly effective and competitive at nitrogen fixation [5,6].

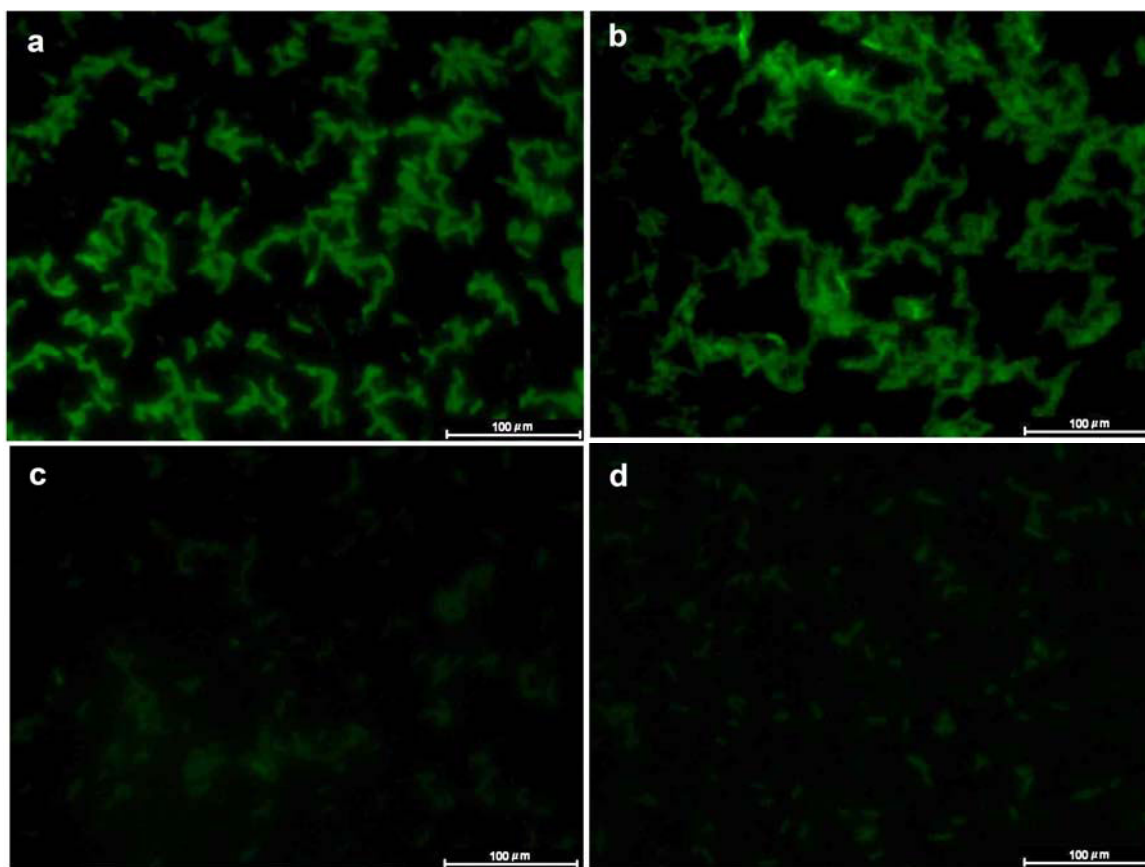
Lectins recognize and bind reversibly to carbohydrate epitopes with high specificity. They have a number of different functions in nature, the most important of which is acting as plant defense proteins and information mediators in biological systems through interactions with glycoproteins, glycolipids and oligosaccharides. Lectins can interact with bacterial polysaccharides, mainly lipopolysaccharides (LPS), to promote bacterial adhesion and improve N₂ fixation [7,8]. Lectins also stimulate cellular respiration, induce bacterial growth and modulate metabolism [9–12]. The lectins ConA and ConBr were isolated from the seeds of two species of the Diocleinae subtribe, *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis*, respectively. Although lectins isolated from Diocleinae seeds have a high degree of similarity and bind to glucose and mannose [13], they differ in their biological activity [14–16].

The objective of this study was to investigate the interaction between *Rhizobium tropici* CIAT 899 and the homologous lectins ConA and ConBr and to evaluate the effect of these proteins on bacterial growth.

2. Results and Discussion

Using fluorescence assays, this study showed that both ConA and ConBr interacted with *Rhizobium tropici*. The two lectins had similar fluorescence emission profiles (Figure 1a,b). When D-mannose was added to ConA and ConBr solutions, interaction between the lectin and bacterial surface decreased abruptly (Figure 1c,d). No fluorescence was observed when the cells were treated with FITC-BSA or FITC alone. Likewise, no intrinsic fluorescence was detected (data not shown).

Figure 1. Lectin-fluorescence microscopy of interaction between FITC-lectins and *Rhizobium tropici* CIAT 899. (a) FITC-ConA; (b) FITC-ConBr; (c) FITC-ConA plus D-mannose; and (d) FITC-ConBr plus D-mannose.



As shown in the Figure 2a, ConBr had a stimulatory effect on the growth of *R. tropici* (500 $\mu\text{g/mL}$), as compared to NaCl control. This effect was observed for all experimental incubation periods (12, 24, 36 and 48 h). Similarly, ConBr enhanced bacterial growth as compared to the ConBr-D-mannose complex (Figure 2b).

Figure 2. (a) Effect of ConBr on the growth of *R. tropici*. (\star) $p < 0.01$ related to 0.15 M NaCl; (b) Comparison between the effects of ConBr and ConBr complexed with D-mannose on the growth of *R. tropici*. (\star) $p < 0.01$ related to ConBr plus D-mannose.

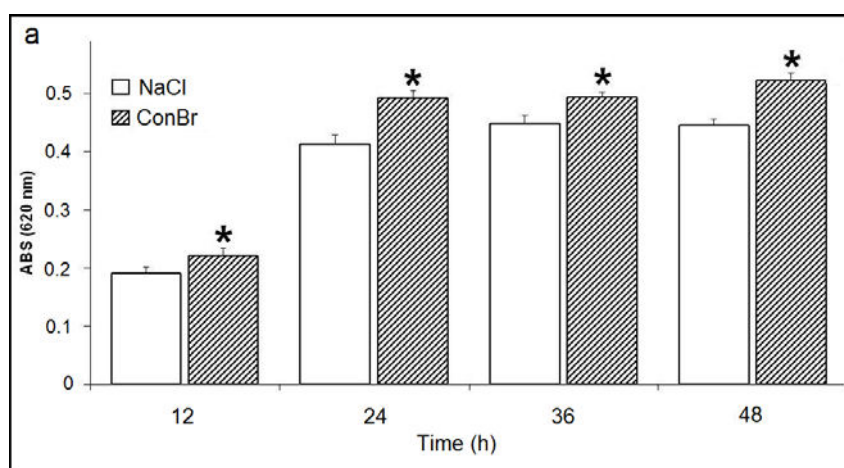
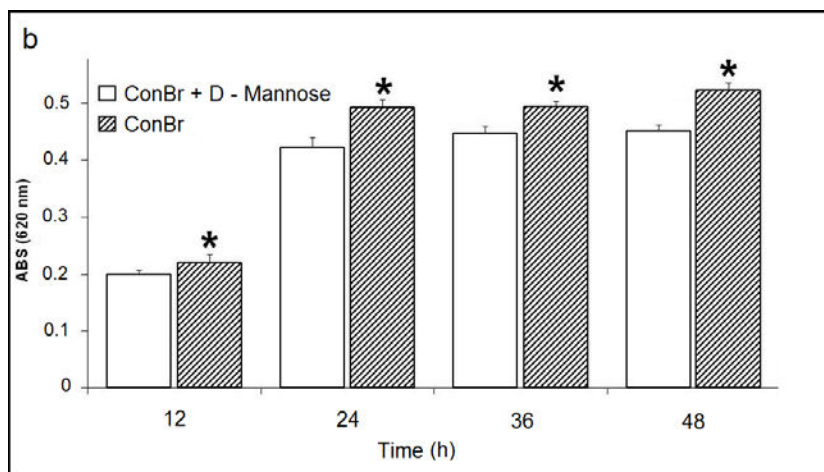
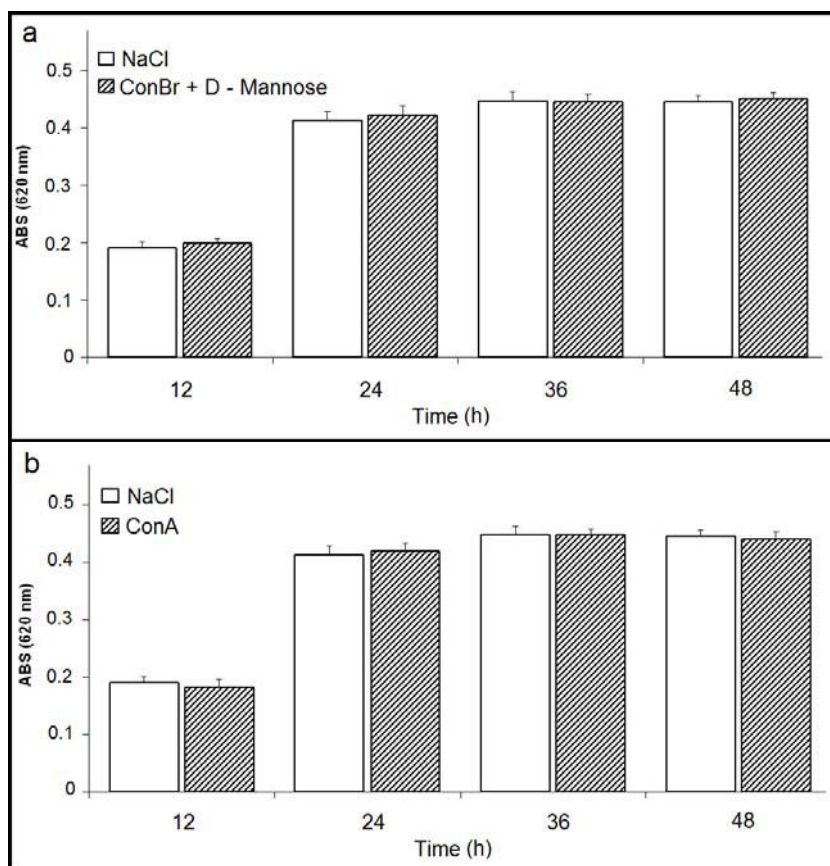


Figure 2. Cont.



Nevertheless, when ConBr was inhibited by the addition of D-mannose, no significant change in bacterial growth was reported (Figure 3a). Both ConA (Figure 3b) and ConA complexed with D-mannose had no effects on the growth of *R. tropici* (data not shown), similar to the 0.1 M D-mannose negative control (data not shown).

Figure 3. (a) Effect of ConBr complexed with D-mannose on the growth of *R. tropici*; (b) Effect of ConA on the growth of *R. tropici*.



Lectins can recognize and bind reversibly to carbohydrates on the cell surface and interact with cell wall polysaccharides and/or glycoconjugates in the cell membrane [17,18]. Carbohydrates are directly

involved in many biological processes, both physiological and pathological [18,19]. Strathmann and colleagues [20] showed that ConA isolated from seeds of *Canavalia ensiformis* interacted with carbohydrates present in the extracellular matrix of the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Likewise, another glucose/mannose-specific lectin isolated from the roots of *Sesbania aculeate* interacted with different *Rhizobium* strains [21].

Lectins are known to interact with nitrogen-fixing bacteria and play an important role in metabolism. For example, wheat germ agglutinin (WGA), is a *N*-acetylglucosamine-binding lectin isolated from wheat germ, stimulated N₂ fixing, ammonia excretion, glutamine synthetase activity and indole acetic acid production in *Azospirillum brasiliensis* [22]. In addition, *Vatairea macrocarpa* lectin (VML) enhanced H⁺ efflux in *Rhizobium tropici* [10]. Previously, Martinez and colleagues [11] demonstrated that VML and ConBr stimulated the respiration of *R. tropici* and *Rhizobium etli*.

In the present study, ConBr bound to *Rhizobium tropici* and stimulated bacterial growth probably by modifying its metabolism. However, the effect was neutralized by the presence of its specific sugar D-mannose. These findings were consistent with those published by Bajaj and colleagues [9] who demonstrated that the D-glucose-specific lectin of *Pisum sativum* stimulated the growth of *Rhizobium leguminosarum*, probably by enhancing nutrient transport.

Although ConA also binds to bacteria, it displayed no discernible activity in experiments. Similar results were reported by Araújo-Filho and colleagues [23] for three Diocleinae lectins: *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia maritima* (ConM) and *Dioclea guianensis* (Dgui). All lectins were found to bind spores of *Colletotrichum gloeosporioides*, but only Dgui inhibited germination.

Although Diocleinae lectins are similar in many respects, they vary significantly with regard to biological activity [13,24,25]. In this study, the growth of *Rhizobium tropici* was stimulated *in vitro* by the glucose/mannose-binding lectin ConBr, but not the homologous lectin ConA. Differences in biological activity between homologous lectins may be due to small changes in the configuration of important residues in the carbohydrate recognition domain (CRD) [26] or to pH-dependent oligomerization [13].

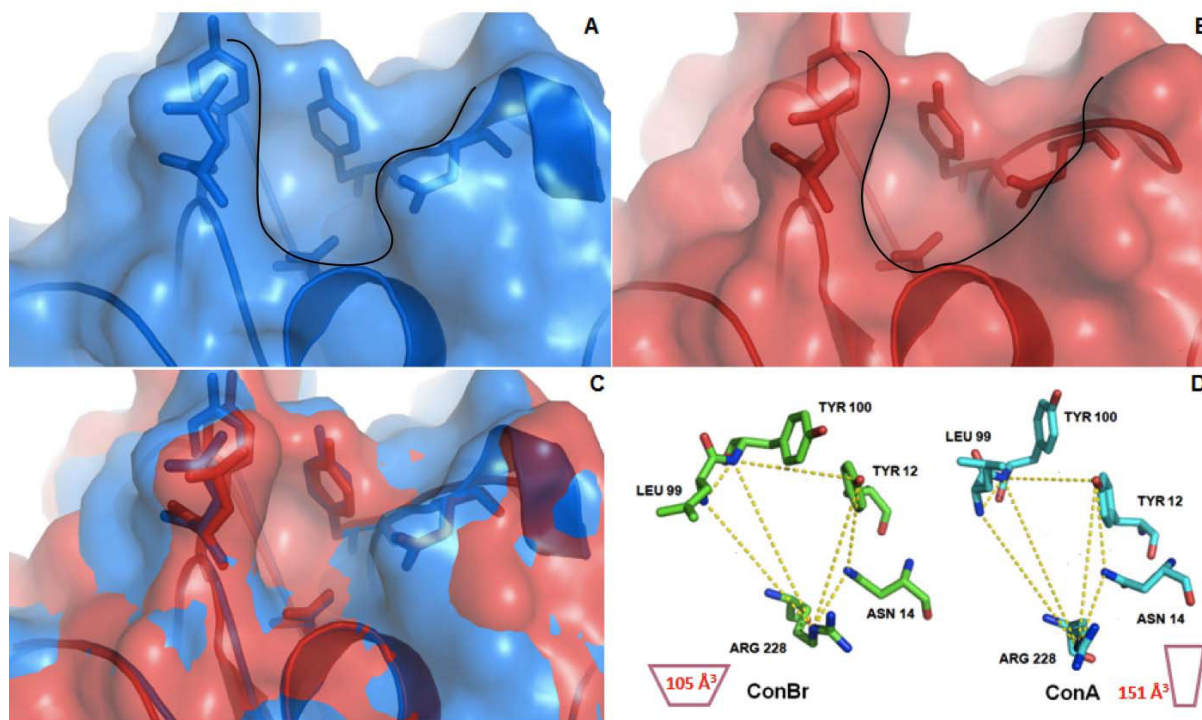
Structural comparisons showed that ConA and ConBr differ by only four residues: Asp58, Ala70, Asp151 and Glu155 in ConA versus Gly58, Gly70, Glu151 and Arg155 in ConBr (PDB codes: 1AZD and 1JBC). The CRDs of Diocleinae lectins, such as ConA and ConBr, consist of highly conserved residues (Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 and Arg228). These residues are key elements in the interaction between lectin and carbohydrate [27]. The difference in biological activity between ConA and ConBr has been attributed to a non-conservative substitution (amino acid in position 58), which makes the CRD more open in ConBr [28]. This more open conformation was due to the CRD design that induces a reduction in the volume of the ConBr carbohydrate binding site [29]. To show that highly similar Diocleinae lectins can nevertheless interact differently with carbohydrates, Ramos and colleagues [30] evaluated the fine glycan specificity of Diocleinae lectins for a number of glycoproteins using surface plasmon resonance. ConBr was observed to be much more reactive than ConA or ConM, suggesting that the carbohydrate binding site might be extended by neighboring surface residues [30]. Moreover, ConA displays homogenous behavior above pH 7.0, whereas ConBr presents a mixture of dimers (31%) and tetramers (69%) at pH 8.0 [28]. According to Cavada and colleagues [13], differences in the proportions of tetrameric and dimeric forms may explain the differences in the biological activities of Diocleinae lectins.

Comparative X-ray crystallographic analyses of dimannoside-complexed Diocleinae lectins isolated from *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* showed that even very similar lectins differ in their interactions with disaccharides. This result suggests that differences in configuration and distance between the residues in the CRD can provide information on the ability of lectins to bind to glycoprotein and glycolipid receptors [31].

ConBr exhibits differences in the distances between specific amino acid residues that compose the primary carbohydrate binding site, thus altering the volume of the site [29]. Previous evidence indicates that these differences might explain the divergences in biological activities. The results reported in this study suggest that the lower volume found in ConBr could enhance the interaction with LPS, which are composed mainly by *O*-polysaccharides in *Rhizobium*.

Figure 4 highlights the differences in CRD design and volume between ConA and ConBr. ConBr has a more open carbohydrate binding site, whereas the site of ConA is narrower and deeper. Bezerra and colleagues [29] used this evidence to rationalize the stronger interactions between the *N*-glycans and both ConA and ConM *versus* the weaker interactions displayed by ConBr [29].

Figure 4. Surface analysis and structure alignment of ConA and ConBr tridimensional structures. (A) Carbohydrate binding site of ConA (Blue); (B) Carbohydrate binding site of ConBr (Red); (C) Structure alignment of ConA and ConBr showing differences in the topology which favors ConBr interactions with LPS; (D) Schematic representation of site volume in ConA (right) and ConBr (left). Calculated volume of each site is represented inside the schemes. Black lines in (A) and (B) delimitate the topology of sites.



3. Experimental

3.1. Microorganism

Rhizobium tropici CIAT 899 was kindly provided by Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, Brazil.

3.2. Lectin Purification

ConA and ConBr were obtained from the Biologically Active Molecules Laboratory (Biomol-Lab), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Science Center, Federal University of Ceará, Brazil. The purification steps are described by Moreira and Cavada [32].

3.3. Lectin Complexation with Mannose

In bacterial growth experiments and with FITC-labeled lectins, ConBr and ConA were inhibited with D-mannose. The lectins were incubated with 0.1 M D-mannose at 37 °C for 30 min to induce complex formation. The solution was then filtering through a 0.22 µm Millipore filter and stored for later use.

3.4. FITC-Labeled Proteins

FITC-labeled proteins were prepared with inhibition buffer (0.1 M D-mannose in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.0), conjugation buffer (0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.0) and washing buffer (phosphate-buffered saline: 0.01 M sodium phosphate buffer, 0.027 M KCl and 0.15 M NaCl, pH 7.4). Initially, ConBr and ConA were dissolved in inhibition buffer and incubated at 37 °C for 1 h. Then, 250 µL fluorescein isothiocyanate (FITC) (500 µg/mL in conjugation buffer) was added drop wise. The solution was incubated for 2 h at room temperature with gentle stirring. Subsequently, unconjugated FITC was separated from FITC-lectin by molecular exclusion chromatography using a pre-equilibrated Sephadex G-25 column, and labeled lectins were eluted with washing buffer. The absorbances of all fractions were determined at 280 nm (protein) and 495 nm (FITC) to verify chromatographic efficiency. Labeled lectins were then dialyzed against 1 M acetic acid for 1 h to remove the inhibitor carbohydrate and extensively dialyzed against distilled water. Except for the inhibition with D-mannose, the same labeling protocol was used to label BSA with FITC.

3.5. Cultivation of Microorganisms

Strain CIAT899 was stock-cultured on yeast-mannitol (YM) [33] broth containing 20% glycerol and stored at −80 °C. The inoculum was then transferred to Petri dishes containing YM agar and incubated at 28 °C for 48 h. Subsequently, a colony was carefully transferred to 10 mL YM broth and incubated at 28 °C for 48 h under constant agitation. Immediately before use, the bacterial suspension was adjusted to 1×10^8 cells/mL using a McFarland scale.

3.6. Lectin Fluorescence Microscopy

Bacterial cells were incubated separately with FITC, FITC-lectins, FITC-lectins in complex with D-mannose and FITC-bovine serum albumin (FITC-BSA) and agitated for 15 min. The cells were then washed 3 times in PBS, heat-fixed on slides and observed under a fluorescence microscope (Eclipse E200/epi-fluorescence, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (DS-2Mv, Nikon, Tokyo, Japan). Images were acquired with NIS-Elements version 2.3 software (Nikon, Tokyo, Japan). Cells were observed using 100× oil-immersion objective with 1.5 s of exposure and 1× gain. Bacterial cells without treatment were observed to verify intrinsic fluorescence. The resolution of all acquired images was 5.0 Mpixels.

3.7. Bacterial Growth Assay

Assays were carried out using 96-well polystyrene plates. Following serial dilution from 500 to 15.6 µg/mL, the lectins were mixed with 100 µL bacteria suspension (1×10^8 cells/mL) and incubated at 28 °C for 12 h. A 20 µL aliquot of bacterial suspension was then inoculated into 180 µL YM broth and incubated at 28 °C. The optical density at 620 nm (ABS 620nm) was measured at 12, 24, 36 and 48 h using a microplate reader (BioTrak II-Plate Reader). BSA and 0.15 M NaCl were used as protein and negative control, respectively. Lectin-D-mannose complexes were used in the bacterial growth assays. To prevent carbohydrates from interfering with metabolism, an additional negative control consisting of 0.1 M D-mannose was used. The bacterial growth assays were designed with 9 repetitions per group.

3.8. Statistical Analysis

The normality of the data within each experimental group was verified with the Shapiro-Wilk test, and the groups were compared pair wise with Student's t test. The level of statistical significance was set at $p < 0.01$. All statistical analyses were performed with the software STATISTICA version 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.9. Structure/Function Analysis

For the structural analysis, the crystal structures of ConA (PDB code: 1JBC) and ConBr (PDB code: 3JU9) were visualized using COOT [34] and PyMol [35]. Volume calculations were performed using the Q-SiteFinder program [36].

4. Conclusions

In this study, lectins from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and *Canavalia ensiformis* (ConA) bound to *Rhizobium tropici*, but only ConBr affected bacterial growth. This might be due to an extended and more opened carbohydrate binding site presented by ConBr which favors the interaction with *Rhizobium* LPS. Based on our results, ConBr may be a useful biotechnological tool in studies on the interaction between rhizobia and host plants.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). The authors received partial financial support from CNPq (Project #550340/2007-6 and Project #501221/2009-3). Jesper Sampaio helped with the English editing of the manuscript that was also revised by AJE (American Journal Experts).

References and Notes

1. Ribeiro, R.A.; Barcellos, F.G.; Thompson, F.L.; Hungria, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium microsymbionts* of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res. Microbiol.* **2009**, *160*, 297–306.
2. Masson-Boivin, C.; Giraud, E.; Perret, X.; Batut, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 458–466.
3. Mandal, S.M.; Chakraborty, D.; Dey, S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal. Behav.* **2010**, *5*, 359–368.
4. Pinto, F.G.S.; Hungria, M.; Mercante, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* **2007**, *39*, 1851–1864.
5. Hungria, M.; Campo, R.J.; Mendes, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fert. Soils* **2003**, *39*, 88–93.
6. Pinto, F.G.S.; Chueire, L.M.O.; Vasconcelos, A.T.R.; Nicolás, M.F.; Almeida, L.G.P.; Souza, R.C.; Menna, P.; Barcellos, F.G.; Megias, M.; Hungria, M. Novel genes related to nodulation, secretion systems, and surface structures revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. *Funct. Integr. Genomics* **2009**, *9*, 263–270.
7. Agrawal, P.; Kumar, S.; Jaiswal, Y.K.; Das, H.R.; Das, R.H. As *Mesorhizobium lipopolysaccharide* (LPS) specific lectin (CRL) from the roots of nodulating host plant, *Cicer arietinum*. *Biochimie* **2001**, *3*, 440–449.
8. de Hoff, P.L.; Brill, L.M.; Hirsch, A.M. Plant lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol. Genet. Genomics* **2009**, *282*, 1–15.
9. Bajaj, M.; Soni, G.; Singh, C.K. Interaction of pea (*Pisum sativum* L.) lectins with rhizobial strains. *Microbiol. Res.* **2001**, *156*, 71–74.
10. Martinez, C.R.; Albertini, A.V.P.; Figueiredo, M.V.B.; Silva, V.L.; Sampaio, A.H.; Cavada, B.S.; Lima-Filho, J.L. Respiratory stimulus in *Rhizobium* sp. by legume lectins. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *20*, 77–83.
11. Martínez, C.R.; Chanway, C.P.; Albertini, A.V.; Figueiredo, M.V.; Sampaio, A.H.; Castellon, R.R.; Cavada, B.S.; Lima-Filho, J.L. The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: Net H⁺ efflux stimulus and alteration of extracellular Na⁺ concentration. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *1238*, 17–22.

12. Sytnikov, D.M.; Kots, S.Y.; Datsenko, V.K.A. Efficacy of biological preparations of soybean root nodule bacteria modified with a homologous lectin. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **2007**, *43*, 304–310.
13. Cavada, B.S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T.B.; Barral-Netto, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2001**, *2*, 123–135.
14. Andrade, J.L.; Arruda, S.; Barbosa, T.; Paim, L.; Ramos, M.V.; Cavada, B.S. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell. Immunol.* **2009**, *194*, 98–102.
15. Barauna, A.C.; Kaster, M.P.; Heckert, B.T.; Nascimento, K.S.; Rossi, F.M.; Teixeira, E.H.; Cavada, B.S.; Rodrigues, A.L.S.; Leal, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *85*, 160–169.
16. Barbosa, T.; Arruda, S.; Cavada, B.S.; Grangeiro, T.B.; Freitas, L.A.R.; Barral Netto, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2001**, *96*, 673–678.
17. Pinto, F.G.S.; Chueire, L.M.O.; Vasconcelos, A.T.R.; Nicolás, M.F.; Almeida, L.G.P.; Souza, R.C.; Menna, P.; Barcellos, F.G.; Megias, M.; Hungria, M. Novel genes related to nodulation, secretion systems, and surface structures revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. *Funct. Integr. Genomics* **2009**, *9*, 263–270.
18. Sharon, N.; Lis, H. Lectins—Proteins with a sweet tooth: Functions in cell recognition. *Essays Biochem.* **1995**, *30*, 59–75.
19. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
20. Strathmann, M.; Wingender, J.; Flemming, H.C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods* **2002**, *20*, 237–248.
21. Biswas, S.; Saroha, A.; Das, H.R. A lectin from *Sesbania aculeata* (Dhaincha) roots and its possible function. *Biochemistry Mosc.* **2009**, *74*, 329–335.
22. Antonyuk, L.P.; Fomina, O.R.; Ignatov, V.V. Effect of wheat lectin on the metabolism of *Azospirillum brasiliense*: Induction of protein synthesis. *Microbiology (Engl. Transl. Mikrobiologiya)* **2001**, *66*, 140–145.
23. Araujo-Filho, J.H.; Vasconcelos, I.M.; Martins-Miranda, A.S.; Gondim, D.M.F.; Oliveira, J.T.A. A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike Its Homologues, ConM and ConA. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4090–4096.
24. Barral-Netto, M.; Santos, S.B.; Barral, A.; Moreira, L.I.; Santos, C.F.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.; Cavada, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunol. Invest.* **1992**, *21*, 297–303.
25. Gadelha, C.A.; Moreno, F.B.; Santi-Gadelha, T.; Cajazeiras, J.B.; Rocha, B.A.; Assreuy, A.M.; Lima Mota, M.R.; Pinto, N.V.; Meireles, A.V.P.; Borges, J.C.; *et al.* Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *J. Struct. Biol.* **2005**, *152*, 185–194.
26. Brinda, K.V.; Mitra, N.; Surolia, A.; Vishveshwara, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1735–1749.

27. Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1383*, 9–36.
28. Sanz-Aparicio, J.; Hermoso, J.; Granjeiro, T.B.; Calvete, J.J.; Cavada, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 114–118.
29. Bezerra, E.H.; Rocha, B.A.; Bagano, C.S.; Moura, T.R.; Bezerra, G.A.; Bezerra, M.J.; Benevides, R.G.; Sampaio, A.H.; Assreuy, A.M.; Delatorre, P.; *et al.* Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *8*, 566–570.
30. Ramos, M.V.; Cavada, B.S.; Mazard, A.M.; Roug, P. Interaction of *Diocleinae lectins* with glycoproteins based in surface plasmon resonance. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 275–279.
31. Bezerra, G.A.; Oliveira, T.M.; Moreno, F.B.; Souza, E.P.; Rocha, B.A.; Benevides, R.G.; Delatorre, P.; Azevedo, W.F., Jr.; Cavada, B.S. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. *J. Struct. Biol.* **2007**, *160*, 168–176.
32. Moreira, R.A.; Cavada, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterisation and behaviour during germination. *Biol. Plant* **1984**, *26*, 113–120.
33. Vincent, J.M. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*; Blackwell: Oxford, UK, 1970; p. 164.
34. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
35. DeLano, W.L. *The PyMOL Molecular Graphics System*; DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002.
36. Laurie, A.T.; Jackson, R.M. Q-SiteFinder: An energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 1908–1916.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Article

Effect of the Lectin of *Bauhinia variegata* and Its Recombinant Isoform on Surgically Induced Skin Wounds in a Murine Model

Luiz Gonzaga do Nascimento Neto ¹, Luciano da Silva Pinto ², Rafaela Mesquita Bastos ¹, Francisco Flávio Vasconcelos Evaristo ¹, Mayron Alves de Vasconcelos ⁴, Victor Alves Carneiro ¹, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda ¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto ^{3,†}, Rodrigo Bainy Leal ^{5,†}, Valdemiro Amaro da Silva Júnior ^{3,†}, Benildo Sousa Cavada ^{4,†} and Edson Holanda Teixeira ^{1,†,*}

¹ Integrated Laboratory of Biomolecules (LIBS), School of Medicine of the Federal University of Ceará, Sobral, Ceará 62042-280, Brazil; E-Mails: ziullec@gmail.com (L.G.N.N.); rafaelabastos.ufc@gmail.com (R.M.B.); ffvebio@gmail.com (F.F.V.E.); victorcarneiro@ufc.br (V.A.C.); vassiliepe@gmail.com (F.V.S.A.)

² Center for Technological Development (CDTec), Unidad of Biotecnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, 96010-900, Brazil; E-Mail: ls_pinto@hotmail.com (L.d.S.P.)

³ Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 52171-900, Brazil; E-Mails: analuporto@yahoo.com.br (A.L.F.P.); valdemiroamaro@gmail.com (V.A.d.S.J.)

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará 60451-970, Brazil; E-Mails: mayronvasconcelos@gmail.com (M.A.V.); bscavada@gmail.com (B.S.C.)

⁵ Department of Biochemistry, CBB, Federal University of Santa Catarina, Santa Catarina 88040-970, Brazil; E-Mail: rbleal@gmail.com (B.B.L.)

† Holder of a scholarship from the CNPq Program for Productivity in Research.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: edsonlec@gmail.com; Tel.: +55-88-3611-8000; Fax: +55-88-3611-2202.

Received: 22 September 2011; in revised form: 20 October 2011 / Accepted: 27 October 2011 /

Published: 7 November 2011

Abstract: Lectins are a structurally heterogeneous group of highly specific carbohydrate-binding proteins. Due to their great biotechnological potential, lectins are widely used in biomedical research. The purpose of the present study was to evaluate the healing potential of the lectin of *Bauhinia variegata* (nBVL) and its recombinant isoform (rBVL-1).

Following surgical creation of dorsal skin wounds, seven groups of mice were submitted to topical treatment for 12 days with lectin, D-galactose, BSA and saline. The animals were anesthetized and euthanized on POD 2, 7 and 12 in order to evaluate the healing potential of each treatment. The parameters considered included wound size, contraction rate, epithelialization rate and histopathological findings. Wound closure was fastest in animals treated with rBVL-1 (POD 7). nBVL was more effective than the controls. All skin layers were reconstructed and keratin deposition increased. Our findings indicate that the lectin of *Bauhinia variegata* possesses pro-healing properties and may be employed in the treatment of acute skin wounds.

Keywords: wound healing; legume lectins; Caesalpinoideae; *Bauhinia variegata*

1. Introduction

Skin wounds are the result of disruption of tissue integrity [1]. Tissue damage initiates a cascade of events including inflammation and tissue formation and reshuffle (granulation tissue), eventually leading to partial or complete reconstruction of the damaged area [2,3]. Thus, if a wound is a disruption of anatomical and physiological continuity of an organ or tissue, a scar is an attempt of the body to restore integrity [4].

Skin healing is understood as a dynamic process with a complex cascade of cellular and molecular events involving the extracellular matrix (ECM) and soluble mediators such as cytokines [5]. The repair process starts immediately after injury and includes the following phases: Hemostasis, inflammation, proliferation, ECM remodeling and scar formation (maturation) [6].

A major health concern for many patients, delayed wound healing can significantly reduce quality of life [1,7]. Consequently, the ability of natural products to speed up the healing process with minimal pain and scar tissue formation has been extensively investigated for decades [8].

Lectins are proteins that recognize and bind specifically to epitopes of structural carbohydrates without modifying them [9]. Lectins are mediators in various biological processes, including cell-cell adhesion of fungi and bacteria to host cells, and have long been employed in the detection and analysis of carbohydrates, immune response and other processes [10-12]. Due to the participation of lectins in a range of important biological processes, the possibility of using them as biotechnological tools has been extensively explored [13-19].

Galactose-specific lectins of the subfamily Caesalpinoideae, such as *Bauhinia purpurea* (BPA), *Bauhinia monandra* (BmoLL) and *Griffonia simplicifolia*, have been used as insecticidal agents, as blood group markers, in studies on cancer cells and in several other important biological contexts [20-22].

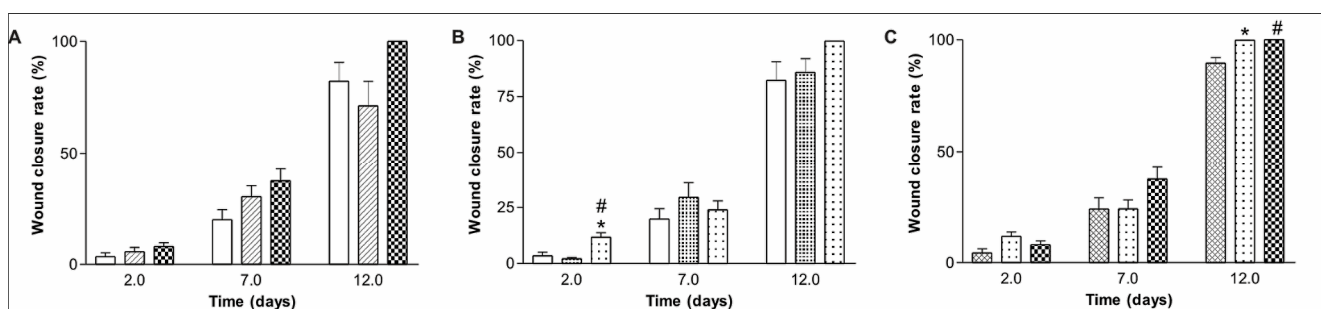
The lectin of the orchid tree *Bauhinia variegata* (nBVL) has at least two isoforms (BVL-1 and BVL-2). Both are galactose ligands with a molecular mass of 32 kDa and structurally similar to other Caesalpinoideae lectins [23]. Alencar and colleagues [24] have shown that nBVL has pro-inflammatory properties capable of inducing resident mast cell-dependent neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*.

Plant lectins may also be synthesized with the aid of expression vectors such as bacteria and yeasts, making large-scale production of biotechnically useful lectins feasible [25-27]. Recently, through cloning and expression in *E. coli*, a recombinant isoform of the lectin of *B. variegata* (rBVL-1) was obtained, with DNA sequence and amino acids similar to other well-known Caesalpinoideae lectins [23]. The purpose of this study was to investigate the healing potential of topical administration of the lectin of *B. variegata* (nBVL) and its recombinant isoform (rBVL-1) on surgically induced skin wounds in a murine model.

2. Results and Discussion

Animals treated with rBVL-1 displayed lower levels of typical inflammatory signs, such as swelling and redness, in the first days following treatment, compared to controls, indicating a possible anti-inflammatory effect. In contrast, nBVL had a pro-inflammatory effect, as shown by the finding of higher levels of swelling and redness in the wound bed. On postoperative day (POD) 9, scar tissue was observed in more animals in the rBVL-1 group than in the nBVL group (data not shown). In the inflammatory stage, healing was faster and more effective in G-I (rBVL-1) than in G-VI (nBVL) and controls. Total wound closure was observed in the animals treated with nBVL only on POD 12 (Figures 1A–C).

Figure 1. Closure rate of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of saline \square ; nBVL complexed with D-Gal ▨ and nBVL ▩ (A); saline \square ; rBVL-1 complexed with D-Gal ▨ and rBVL-1 ▩ (B); * significant in relation to saline; # significant in relation to rBVL-1 complexed with D-Gal. BSA ▨ ; rBVL-1 ▩ and nBVL ▩ (C); * and # significant in relation to BSA. Statistical test: Mann-Whitney ($p < 0.05$).



The measurement of the actual wound area was hampered by the presence of a thick scab (dry fibrin in the wound bed) formed through contact with atmospheric oxygen [28]. Despite this difficulty, reliable measurements were obtained based on the wound borders. Wound epithelization (ER) was significantly greater in G-I (rBVL-1) than in all other groups due to more efficient wound contraction (CR) during the inflammatory phase (POD 0-2) (Table 1). Both administration of nBVL and D-galactose decreased wound size from POD 7 on (data not shown). In the healing period between proliferation and remodeling (POD 7-12), G-VI (nBVL) displayed greater CR and ER values than the other groups, though differences were not significant (Table 1).

Table 1. Contraction rate (CR) and epithelialization rate (ER) of surgically induced skin wounds in mice treated with rBVL-1 (Group I), rBVL-1 complexed with D-galactose (Group II), bovine serum albumin (Group III), D-galactose (Group IV), saline (Group V), nBVL (Group VI) or nBVL complexed with D-galactose (Group VII). Figures are mean values \pm standard deviation.

POD	0–2		2–7		7–12	
Parameter	CR	ER	CR	ER	CR	ER
Group I	7.708 \pm 1.345 *	3.854 \pm 0.672 *	3.800 \pm 0.704	1.900 \pm 0.352	48.50 \pm 24.13	24.25 \pm 12.07
Group II	0.833 \pm 0.441	0.416 \pm 0.220	5.275 \pm 0.915	2.638 \pm 0.457	40.50 \pm 9.35	20.25 \pm 4.67
Group III	3.667 \pm 1.008	1.833 \pm 0.504	5.675 \pm 0.630	2.838 \pm 0.315	35.50 \pm 3.61	17.75 \pm 1.80
Group IV	2.542 \pm 1.532	1.271 \pm 0.766	4.775 \pm 1.113	2.388 \pm 0.556	69.70 \pm 25.37	34.85 \pm 12.69
Group V	2.250 \pm 1.689	1.125 \pm 0.845	4.625 \pm 1.375	1.542 \pm 0.555	14.75 \pm 1.80	2.458 \pm 1.08
Group VI	3.958 \pm 1.345	1.979 \pm 0.672	5.925 \pm 0.865	2.963 \pm 0.433	61.00 \pm 9.33	30.50 \pm 4.66
Group VII	2.542 \pm 1.167	1.271 \pm 0.583	6.125 \pm 1.616	3.063 \pm 0.808	52.75 \pm 1.93	26.38 \pm 0.96

POD = postoperative day. Parameter units: mm²/day. * Statistically significant when compared to Groups II, IV, V and VII ($p < 0.05$; ANOVA and post-Tukey test).

Histopathological Assessment

Four samples of injured tissue were collected from each group on POD 2, 7 and 12 and submitted to histopathological evaluation. Wounds treated with BSA and rBVL-1 had scab sealing the opening in the epithelium (Figure 2).

Wounds treated with rBVL-1 presented mild inflammatory exudate, but the inflammatory infiltrate in the reticular dermis was intense (Figure 2B). Wounds treated with BSA had intense inflammatory exudate (Figure 2A). On the other hand, in wounds treated with rBVL-1, collagen fibers were seen around the congested vessels irrigating unilocular adipose tissue on POD 2, suggesting collagen-producing cell proliferation and, consequently, faster healing (Figure 2D).

On POD 7, wounds treated with rBVL-1 presented restoration of the epithelial lining, subepithelial collagen deposition and thickening of collagen fibers in the reticular dermis with restructuring of the adipose tissue (Figure 3C). Figure 3D shows layers of restructured skin (epidermis, papillary and reticular dermis) and new skin appendages on animals treated with rBVL-1. This was not observed for animals treated with BSA (Figures 3A–B). In G-II (rBVL-1 complexed with D-galactose) and G-IV (D-galactose), tissue regeneration was observed only on POD 12 (Figure 4).

Healing was slow in G-VII (nBVL complexed with D-galactose), even during fibroplasia (POD 7). The animals in this group presented severe acute inflammation, little reaction of the adipose tissue to early formation of granulation tissue, hemorrhage, and degeneration of the fatty tissue below the dermis (Figure 5). On POD 7, development of epidermal hyperplasia for epithelial repair, active granulation tissue formation with adipose tissue proliferation and active cell clusters were observed in G-VI (nBVL) (Figure 6).

Figure 2. Photomicrographs of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of BSA (Group III) and rBVL-1 (Group I); POD 2 (stained with Masson's trichrome). **A:** BSA (Group III; control). See scab (star) covering the wound bed and intense inflammatory exudate (arrow), area of collagenolysis and reticular dermal edema under the exudate (between dashed blue lines), and subcutaneous skeletal muscle with congested vessels immediately below the dermis (blue arrows). Magnification: 4×; **B:** rBVL-1 (Group I). See thicker scab (star) over wound bed and less intense inflammatory exudate (arrow), area of collagenolysis, reticular dermal edema and intense inflammatory infiltrate under the exudate (between dashed blue lines), subcutaneous skeletal muscle with fibers separated by connective tissue immediately below the dermis (blue arrows), and fat cells near the area of collagenolysis (red arrow). Magnification: 4×; **C:** detail of subcutaneous skeletal muscle showing fat cells (arrow), congested vessels (star) and mild inflammatory infiltrate. Magnification: 10×; **D:** rBVL-1 (Group I). Congested vessels (star) bounded by collagen fibers embedded in proliferated unilocular adipose tissue below area of intense inflammatory exudate and scab.

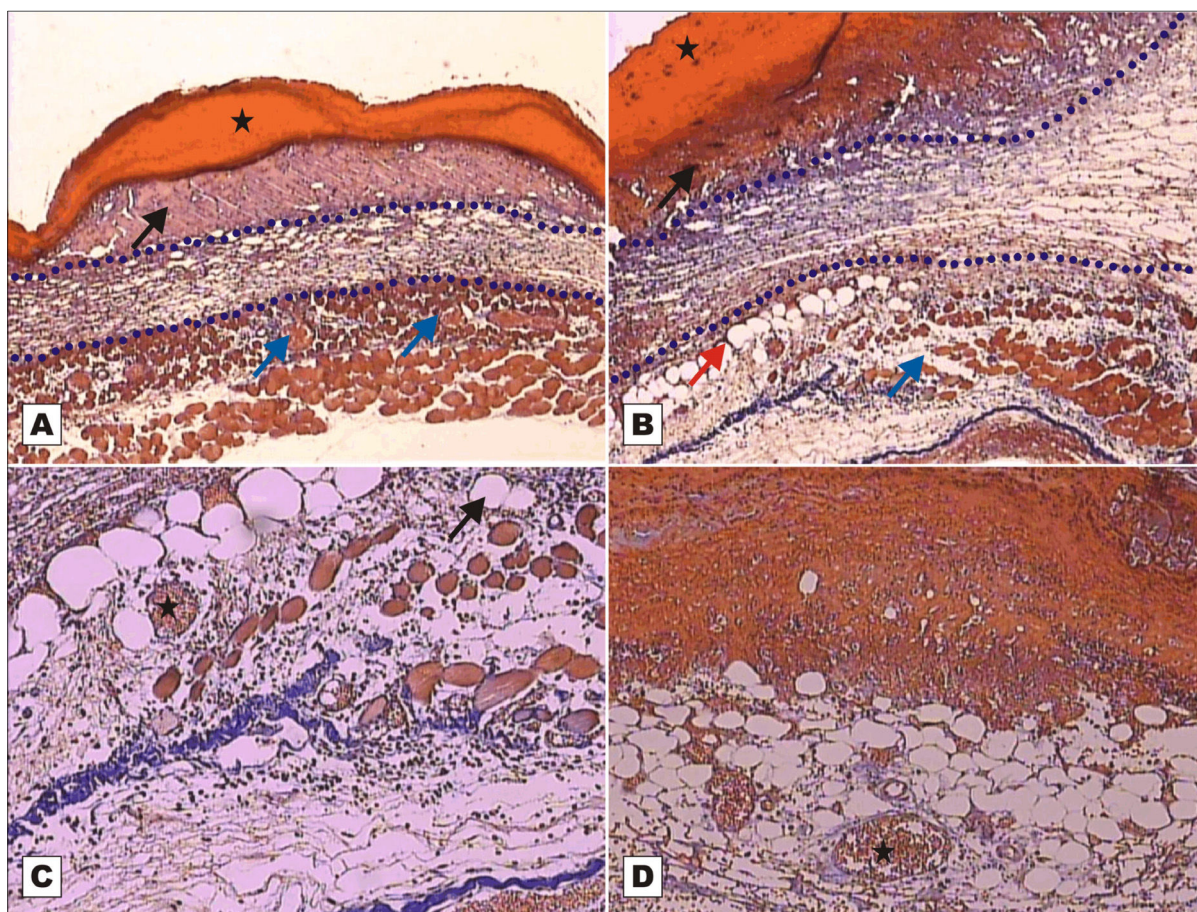


Figure 3. Photomicrographs of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of BSA (Group III) and rBVL-1 (Group I); POD 7 (stained with Masson's trichrome). **A:** BSA (Group III; control). Observe scab (star) covering the wound bed and intense inflammatory exudate (between dashed yellow lines), granulation tissue with congested vessels (arrow) and intense fibroblast proliferation below exudate, and blue band due to collagen synthesis (red arrows) immediately below the inflammatory exudate. Magnification 4×; **B:** BSA (Group III; control). Details of granulation tissue. Observe fibroblast proliferation (arrow) and mild inflammatory infiltrate around vessels (blue arrow), collagen band above granulation tissue (red arrow), and vessels in the granulation tissue (star). Magnification 10×; **C:** rBVL-1 (Group I). Scab detaching from epithelium (white star). Observe restructuring of the epithelial lining (arrow), dermis with areas of reduced subepithelial collagen deposition (star) and reticular dermis characterized by thickening of collagen fibers (red star). Observe restructured subcutaneous adipose tissue (SCAT) below the dermis. Magnification 4×; **D:** Detail of previous photo showing regular layers of restructured skin: 1) epidermis, 2) papillary dermis, and 3) reticular dermis, and budding skin appendages (arrow).

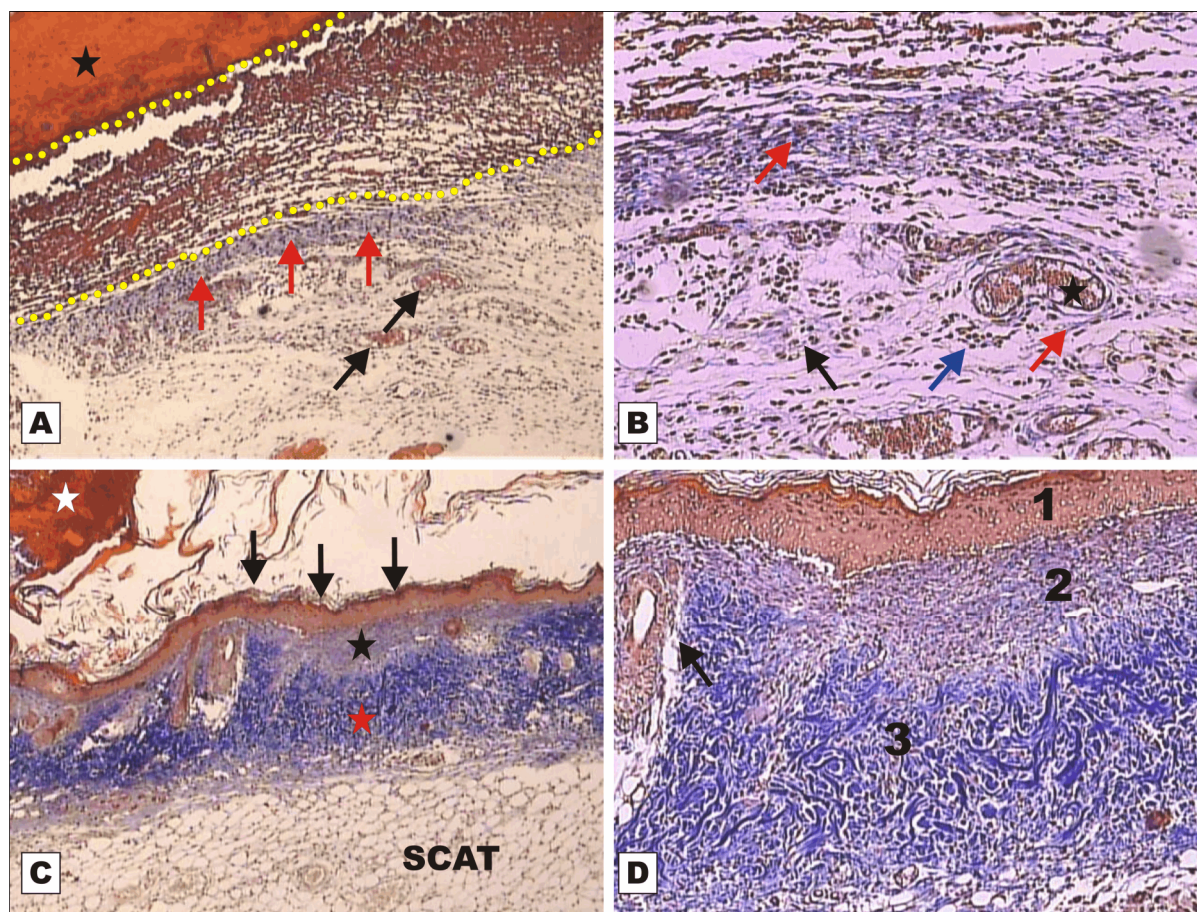


Figure 4. Photomicrographs of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of D-galactose (Group IV) and rBVL-1 complexed with D-galactose (Group II); POD 12 (stained with Masson's trichrome and hematoxylin-eosin). **A:** D-galactose (Group IV). Observe intact skin with newly formed luminal epithelium (black arrow), nearly closed wound and reduced keratin production, retracting granulation tissue just below the epithelium (star), indicating poor tissue reorganization and, further below, thickening of collagen fibers in the papillary dermis (white star). Magnification: 10 \times ; **B:** D-galactose (Group IV). Presence of luminal epithelium (black arrow). Observe the epidermal hyperplasia with formation of budding skin appendage (blue arrows). Magnification 10 \times ; **C:** rBVL-1 complexed with 2.3 mM D-galactose (Group II). Nearly closed wound with restructuring of the epithelial lining (black arrow). See the formation of budding skin appendage below the new epithelium (blue arrows). Magnification: 10 \times ; **D:** rBVL-1 complexed with 2.3 mM D-galactose (Group II). Congested vessels are seen in the papillary dermis (arrows). See the epidermal hyperplasia (Ehy) and the presence of sebaceous glands (SG) as budding skin appendages. Magnification: 10 \times .

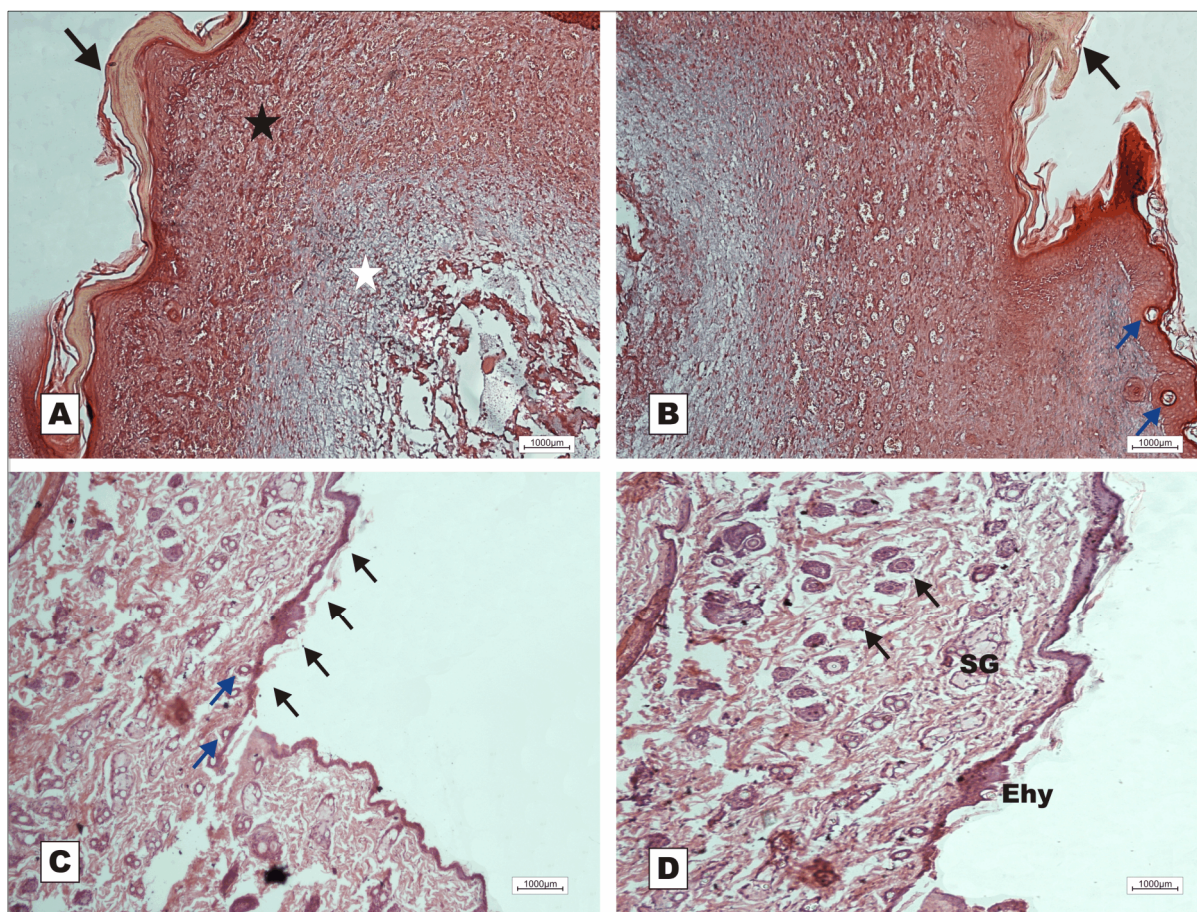


Figure 5. Photomicrographs of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of nBVLcomplexed with 2.3 mM D-galactose (Group VII); POD 7 (stained with hematoxylin-eosin). **A:** Overview of damaged area. Observe scab sealing epithelial opening (S), early stage of granulation tissue formation (star) with intense acute inflammation and degenerating adipose tissue (dAT). Magnification: 4×; **B:** Detail of previous photo showing area with degenerating adipose tissue (dAT) and unaffected adipocytes (Ad) in the granulation tissue, vessels in granulation tissue (red arrows), and congested vessels (black arrow) in area with hemorrhage. Magnification: 10×; **C:** Granulation tissue originated from reactionary adipose tissue (RAT). The red arrow shows congested vessels from granulation tissue. Observe area of intense inflammatory reaction (star). Magnification: 10×; **D:** Detail of open wound with scab, hemorrhage just below the scab, and congested vessels (arrows). Magnification: 10×.

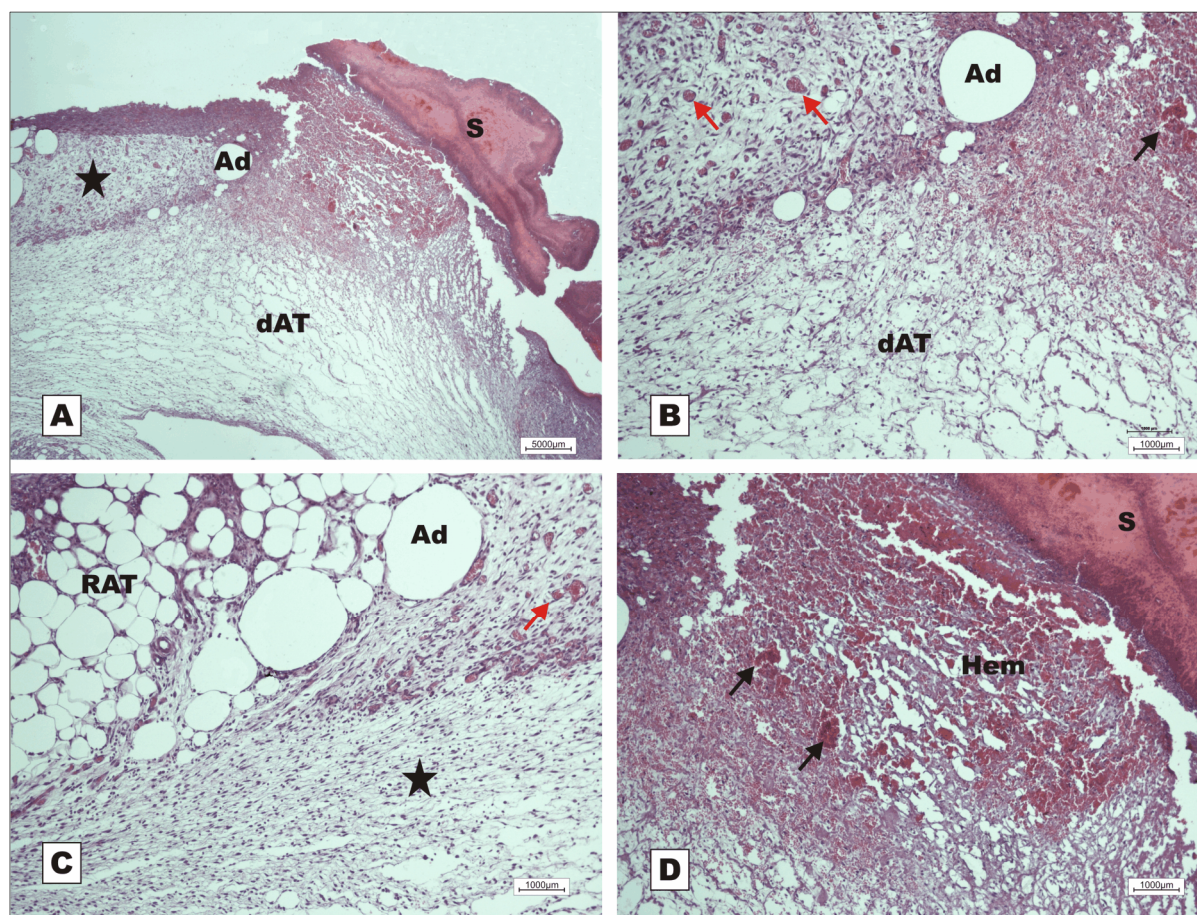
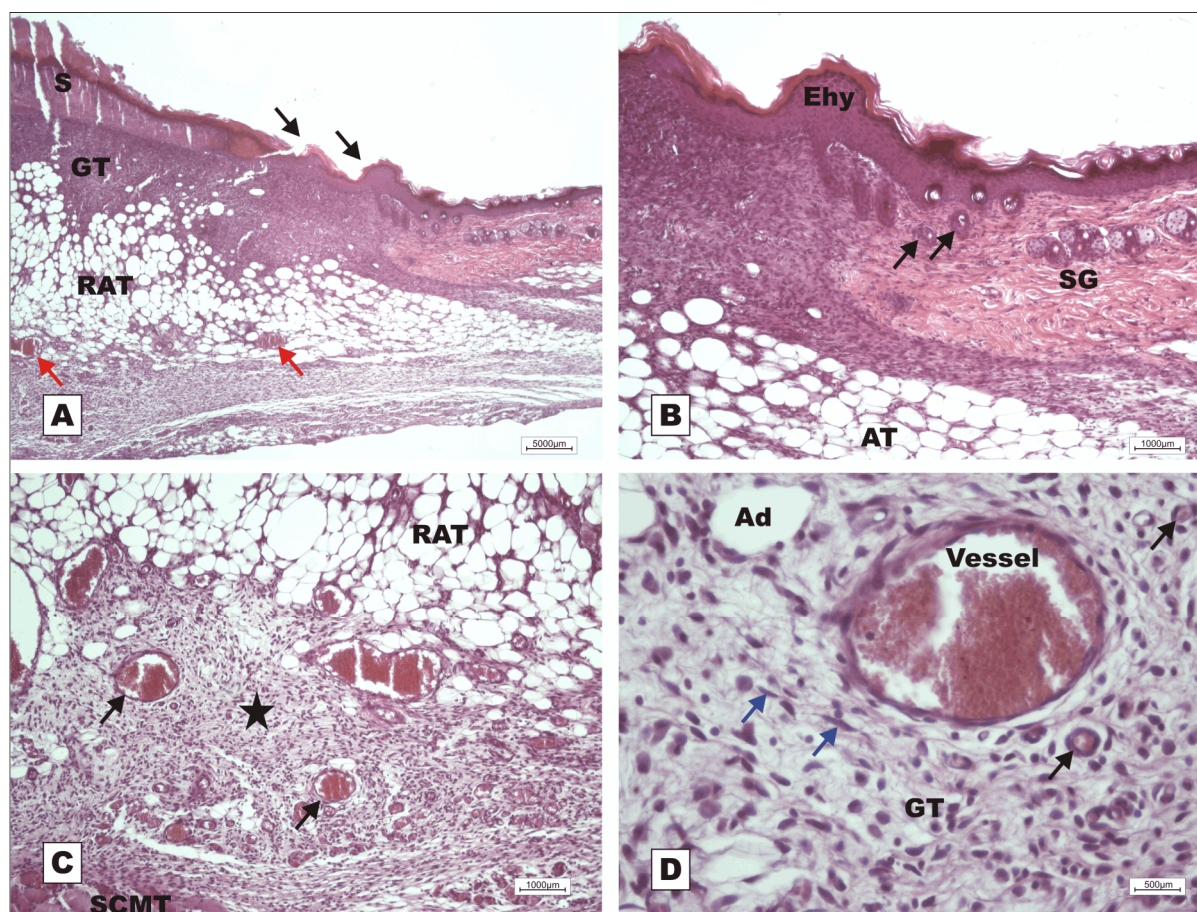


Figure 6. Photomicrographs of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of nBVL (Group VI); POD 7 (stained with hematoxylin-eosin). **A:** Scab above granulation tissue originating from unilocular adipose tissue proliferating with active cell clusters (RAT) and congested vessels in granulation tissue (red arrows). Presence of recently formed epithelium on the board of scab area (black arrows). Magnification: 4×; **B:** Detail of previous photo showing epidermal hyperplasia (Ehy) on the border of scab area, budding skin appendages (black arrows) and sebaceous gland (SG). Observe the granulation tissue area along the adipose tissue (AT). Magnification: 10×; **C:** Detail of A showing area of active granulation tissue (star) with congested vessels (arrows) below the reactional adipose tissue (RAT). Observe subcutaneous muscle tissue (SCMT). Magnification: 10×; **D:** Detail of previous photo showing new vessels (black arrows) in the granulation tissue, indicating angiogenesis. Observe the presence of reactive fibroblasts on the granulation tissue (GT) area (blue arrows). Magnification: 40×



On POD 12, the animals in G-VI (nBVL) presented restructuring of the epithelial lining with increased production of keratin, and dermal deposition of active collagen. Despite the inflammatory reaction (Figure 7A), bands of collagen were seen to proliferate towards the subcutaneous tissue, replacing the adipose tissue (Figure 7C), and ridges with dermal papillae and budding skin appendages were observed (Figure 7B). In G-V (saline), the healing process was delayed, as indicated by the presence of acute inflammatory response and early-stage granulation tissue on POD 7 (Figure 8).

Figure 7. Photomicrographs of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of nBVL (Group VI); POD 12 (stained with hematoxylin-eosin). **A:** Keratin deposition on the epithelial lining (arrows), thickening of subepithelial collagen fibers deposited in the dermis (star), and fat cells below the dermis (AT). Magnification: 10×; **B:** Detail showing the formation of epidermal ridges with consequent formation of dermal papillae (arrows), and newly formed skin appendages. Magnification: 10×; **C:** Detail showing bands of active collagen (star) moving towards the retracting adipose tissue, and congested vessels in granulation tissue (arrows) retracting along with the adipose tissue; **D:** Bands of active collagen in adipose tissue in retraction (black star). Remaining vessels of the granulation tissue can be noted. Magnification: 40×.

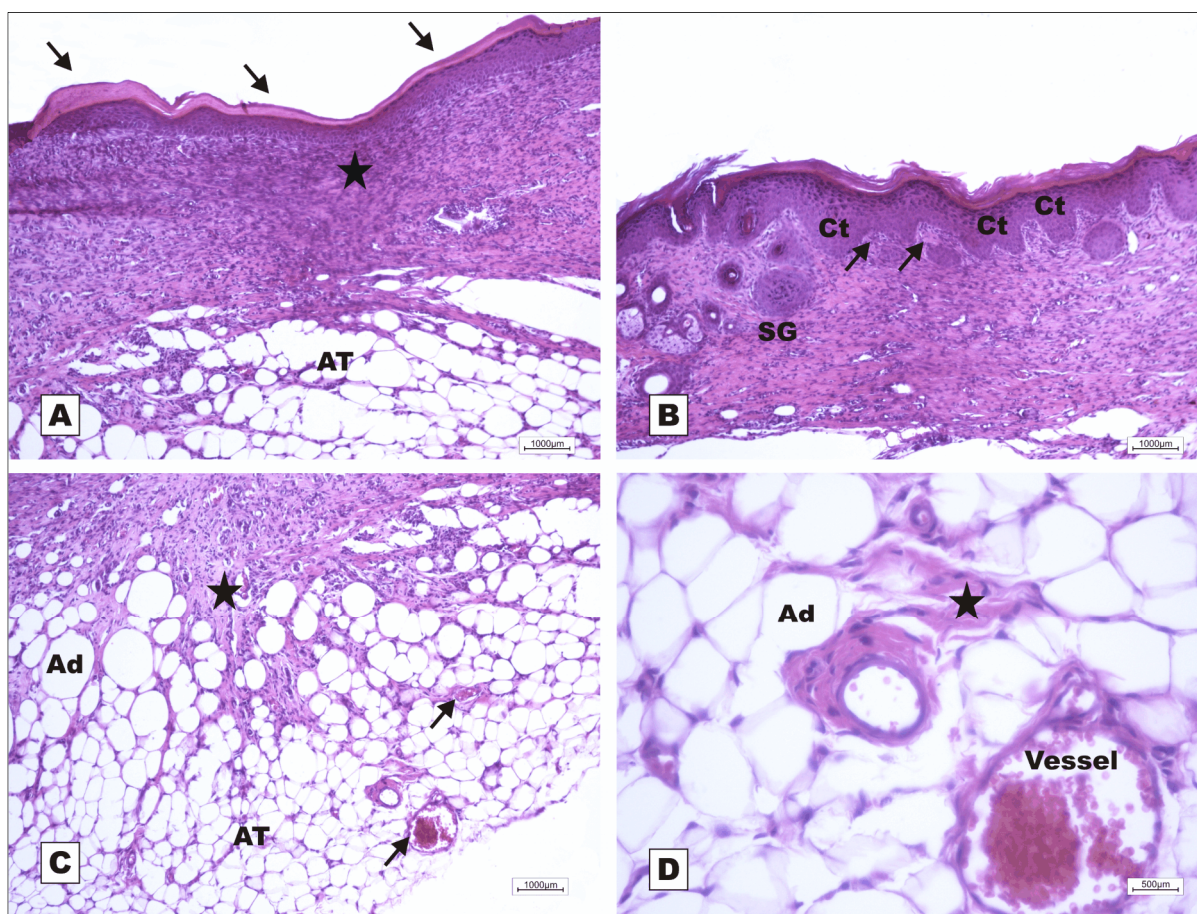
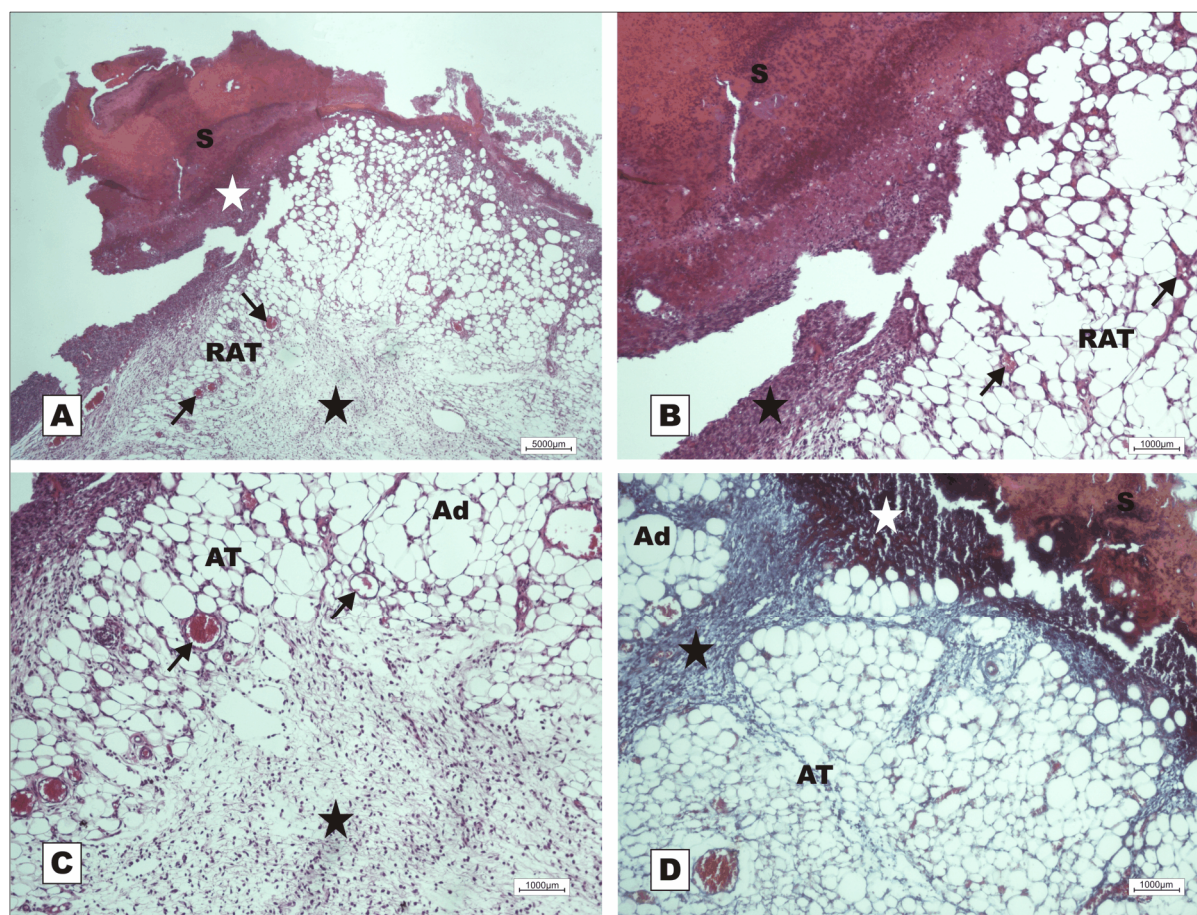


Figure 8. Photomicrographs of surgically induced skin wounds in mice treated with topical administration of 150 mM NaCl; POD 7 (stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome). **A:** Open wound with thick scab and dystrophic calcification (white star) sealing the epithelial opening (S). Observe early formation of granulation tissue originating from reactional adipose tissue (RAT) along with vessels (arrows), and waning inflammatory process (black star). Magnification: 4×; **B:** Granulation tissue with congested vessels in fat (arrows) immediately below calcified scab. Observe inflammatory exudates below scab (star). Magnification: 10×; **C:** Detail of A showing area of acute inflammation in slightly degenerated adipose tissue (star), and vessels of granulation tissue (arrows) in adipose tissue (AT) above the inflammation. Magnification: 10×; **D:** inflammatory exudate below scab (white star). Observe poor collagen deposition and granulation tissue in the dermis (black star) between areas of adipose tissue. Magnification: 10×.



The primary function of the skin is to serve as a protective barrier against the environment. The loss of skin integrity from injury or illness can lead to severe disability or even death [29]. Healing is a dynamic and well-organized biological process [30] involving cellular and biochemical components employed in the recovery of tissue morphology and function [31].

The development of technologies based on natural sources for the healing of skin wounds or ulcers is of major interest to researchers and other stakeholders in the biomedical field [32]. Of special importance are agents capable of enhancing tissue repair and reducing healing time [33,34].

Lectins are a structurally heterogeneous group of proteins with several direct biomedical and biotechnological applications [27]. Galactose-binding lectins are particularly useful because they interact with several endogenous molecules involved in innate and specific immune responses [13]. The ability of these macromolecules to activate immune cells, neutrophils, macrophages and mast cells [35,36] indicates a potential for accelerating wound healing and epithelial tissue regeneration [37].

In our study, wounds treated with nBVL presented stronger inflammatory signs characteristic of inflammatory response, inducing a proinflammatory response, than wounds treated with saline or BSA (controls). This appears to have contributed to the faster and more effective healing process observed in G-VI (nBVL).

Macrophages and mast cells are resident cells with surface glycoproteins and glycolipids which may act as ligands for lectins [13]. When activated, they release mediators capable of initiating inflammatory response [29,38]. Stimulation of adhesion molecules (VCAM-1, VE-Cadherin, ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin) and chemotaxis (CXC receptors) triggers the migration of inflammatory cells to the damaged tissues [6,39]. Iordache and colleagues demonstrated that lectins from potatoes (*Solanum tuberosum*) and extracts of marigold (*Calendula officinalis*) are able to increase the proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs) and modulate gene expression of adhesive molecules and chemotaxis, facilitating the attachment of the EPCs to the injured endothelium. Lopes and colleagues [40] demonstrated that plant lectins are capable of inducing histamine release by mast cells of different origins. In another study, lectins were shown to have a mitogenic effect on lymphocytes and to stimulate the production of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α , strongly activating macrophages cultured *in vitro* [41].

rBVL-1 (G-I) and nBVL (G-VI) induced faster healing than rBVL-1 complexed with D-galactose (G-II). These findings were confirmed by histopathological assessment (Figures 2–8). The finding in G-I of regenerated skin layers already on POD 7 suggests rBVL-1 has a greater pro-healing potential than the other treatments tested in this study. The pro-healing effect was reversed when D-galactose blocked the CRD (carbohydrate recognition domain), suggesting healing was significantly improved in the presence of rBVL-1.

The lectin of *B. variegata* (nBVL) and its recombinant isoform (rBVL-1) appear to stimulate the mitogenic activity of resident cells, turning them into potent chemotactic agents for the recruitment of neutrophils through the release of cytokines, as observed in studies on other galactose-binding lectins such as *Vatairea macrocarpa* and *Artocarpus integrifolia* [13,17]. Mast cells are responsible for secreting large amounts of growth factors, including TGF- β and α [42]. TGF- β is a major growth factor involved in the regulation or stimulation of tissue repair, angiogenesis, granulation tissue formation, collagen synthesis by fibroblasts, and fibroplasia [42,43].

In a histological analysis of the effect of monosaccharides (hexoses) on wound healing in rats, Kössi and colleagues [44] found that treatment with D-galactose caused a considerable increase in the accumulation of granulation tissue. This may explain the pro-healing effect of D-galactose in relation to the controls.

Granulation tissue consists of new capillaries generated from pre-existing ones. The growth factors FGF2 and VEGF are responsible for the development of this tissue [45]. The formation of granulation tissue in the early postoperative period seems to suggest that nBVL and rBVL-1 induce the release of

FGF2, VEGF and angiopoietins by endothelial cells modulated by cytokines produced by mast cells and macrophages.

Epithelialization starts within hours of tissue injury. In this process, the release of TGF- α and FGF flags are essential for the proliferation of epithelial cells and keratinocytes required for total wound closure. Moreover, fibroblasts are activated for collagen synthesis mediated by TGF- β released from mast cells and macrophages [43,46,47]. During tissue remodeling, the old collagen needs to be degraded by matrix metalloproteinases secreted mainly by macrophages and endothelial cells of the new vessels in the granulation tissue [48]. The new fibers deposited in the dermis (essentially the gradual replacement of type III collagen by type I collagen) are structurally more organized and will eventually form the new ECM [49].

According to Ishihara and colleagues, early healing is characterized by rapid epithelialization and wound contraction. Consequently, wound tensile strength increases, possibly due to greater deposition and stabilization of collagen fibers [50].

The CR and ER values observed in the present study strongly indicate nBVL and rBVL-1 stimulate the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, which is an extremely important event in the remodeling of connective tissue [51]. When fibroblasts are activated in damaged tissues, they differentiate into myofibroblasts which in turn exercise physical traction on the wound, stimulating contraction and helping remodel the collagen synthesized by fibroblasts during healing [43,51,52].

The difference in wound healing observed between animals treated with nBVL and rBVL-1 was most likely due to structural differences in the CRD of these lectins. rBVL-1 is but one of many potential isoforms of nBVL [23].

3. Experimental

3.1. Lectin Extraction and Purification

Lectin extracted from the seeds of *Bauhinia variegata* (nBVL) was purified by affinity chromatography on a lactose-agarose column (Sigma, St. Louis, MO, USA), then cloned and expressed in *E. coli* to produce the recombinant isoform (rBVL-1), following the method described by Pinto and coworkers [23].

3.2. Induction and Treatment of Skin Wounds

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of Ceará State University (UECE) under entry #11042434-4 and all animals were treated following the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US Department of Health and Human Services (NIH publication No. 85–23, revised 1985).

The *in vivo* study employed eighty-four 10-week-old male Swiss albino mice (*Mus musculus*) weighing 35.0 ± 5.0 g, supplied by the laboratory animal facility of the Federal University of Ceará (BIOCEN/UFC). During the experimental procedures, the animals were kept in individual cages in a controlled environment (circadian cycle, 25 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ humidity, food and water *ad libitum*) at the School of Medicine in Sobral (UFC).

Prior to the surgical procedure, the animals were randomly distributed into seven groups ($n = 12$) according to the topical treatment administered: G-I (200 $\mu\text{g/mL}$ rBVL-1); G-II (200 $\mu\text{g/mL}$ rBVL-1 complexed with 2.3 mM D-galactose); G-III (200 $\mu\text{g/mL}$ bovine serum albumin); G-IV (2.3 mM D-galactose); G-V (150 mM NaCl); G-VI (200 $\mu\text{g/mL}$ nBVL); G-VII (200 $\mu\text{g/mL}$ nBVL complexed with 2.3 mM D-galactose).

The mice were then anesthetized with subcutaneous administration of 2% xylazine with 10% ketamine hydrochloride (10 mg/kg and 115 mg/kg, respectively) [53], followed by trichotomy and antiseptics of the dorsal thoracic region with povidone-iodine and sterile saline solution (150 mM NaCl). After marking the skin with a sterile mold (1.00 cm^2), circular aseptic skin wounds were created by incision with a scalpel (#15) followed by resection of the subcutaneous tissue with fine dissection tweezers. Immediately after the surgical procedure, the wounds were treated topically for 12 days according to treatment group. Animals treated with lectins and BSA received a single daily dose of 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$; the remainder received 100 μL .

3.3. Evaluation of Healing Potential

Wounds were measured daily for 12 days in order to evaluate the healing potential of each treatment. The wound area was expressed as mean \pm standard deviation, as previously reported [54]. The wound contraction rate (CR) was expressed as change in wound area (mm^2) over time (day), according to the following equation:

$$\text{CR} = \Delta \text{ area} \div \Delta \text{ time (day)}$$

The epithelialization rate was expressed as growth of new epithelium (mm^2) over time (day), according to the following equation:

$$2\text{ER} = \Delta \text{ area} \div \Delta \text{ time (day)}$$

The animals were anesthetized prior to the collection of histopathological material and subsequently euthanized [54]. Samples (4 per group) of injured tissue were collected on the 2nd, 7th and 12th postoperative day (POD), fixed in 10% formaldehyde (v/v) buffered in 0.01 M PBS (pH 7.2), prepared in 5-mm cuts for routine histological analysis [55] and stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson's trichrome. The histopathological assessment included the following parameters: Presence of scabs, re-epithelialization, collagen deposition, neovascularization and exudate. The analysis was performed under a Leica light microscope (model DM 500) at 4, 10 and 40 \times magnification.

3.4. Statistical Assessment

Intergroup differences in CR and ER values were analyzed with one-way ANOVA followed by the Tukey post-test. Differences between wound area and closure percentage were tested with the Mann-Whitney test. The data were processed with the statistics software GraphPad Prism v.3.00 for Windows[®]. Values are given as mean \pm standard deviation. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

4. Conclusions

Our results indicate that lectin extracted from the seeds of *Bauhinia variegata* (nBVL) can stimulate the healing process of skin wounds in mice, possibly by acting on cells of the immune system, enhancing proinflammatory response, collagen synthesis by fibroblasts and angiogenesis by modulating the release of inflammatory cytokines and growth factors. The recombinant isoform of the lectin (rBVL-1) displayed pro-healing effects as well.

The secretion of growth factors and consequent phenotypic change of fibroblasts into myofibroblasts may explain the observed acceleration in wound closure (faster wound contraction and increased collagen deposition by fibroblasts, even in the inflammatory phase), with effective healing accomplished by POD 7.

Acknowledgments

We would like to thank CNPq, CAPES and FUNCAP for financial support, and the School of Medicine of Sobral, Brazil. We thank Jesper Sampaio, a native English consultant, for the support in English language.

References and Notes

1. Schreml, S.; Szeimies, R.-M.; Prantl, L.; Landthaler, M.; Babilas, P. Wound Healing in the 21st Century. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2010**, *63*, 866-881.
2. Clark, R.A.F. Wound repair: Overview and general considerations. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd ed.; Clark, R.A.F., Ed.; Plenum Press: New York, NY, USA, 1996; p. 611.
3. Martin, P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* **1997**, *276*, 75-81.
4. Morgan, C.J.; Pledger, W.J. Fibroblast proliferation. In *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects*, Cohen, J.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J., Eds.; Philadelphia: WB Saunders, PA, USA, 1992; pp. 63-78.
5. Park, J.E.; Barbul, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am. J. Surg.* **2004**, *187*, 11S-16S.
6. Teller, P.; White, T.K. The Physiology of wound healing: Injury through maturation. *Surg. Clin. N. Am.* **2009**, *89*, 599-610.
7. Kumar, B.; Vijayakumar, M.; Govindarajan, R.; Pushpangadan, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing—Exploring medicinal plants of india. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *114*, 103-113.
8. Clark, R.A.F. *Cutaneous Wound Repair*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1991; p. 576.
9. Bies, C.; Lehr, C.M.; Woodley, J.F. Lectin-mediated drug targeting: History and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 425-435.
10. Minko, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 491-509.

11. Imberty, A.; Mitchell, E.P.; Wimmerov, M. Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 525-534.
12. Gomes, M.M.; Suzuki, H.; Brooks, M.T.; Tomana, M.; Moldoveanu, Z.; Mestecky, J.; Julian, B.A.; Novak, J.; Herr, A.B. Recognition of galactose-deficient O-glycans in the hinge region of IgA1 by *N*-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study. *Biochemistry* **2010**, *49*, 5671-5682.
13. Alencar, N.M.N.; Assreuy, A.M.S.; Havt, A.; Benevides, R.G.; Moura, T.R.; Sousa, R.B.; Ribeiro, R.A.; Cunha, F.Q.; Cavada, B.S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotaxis mediators. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* **2007**, *374*, 275-282.
14. Mota, M.R.L.; Criddle, D.N.; Alencar, N.M.N.; Gomes, R.C.; Meireles, A.V.P.; Santi-Gadelha, T.; Gadelha, C.A.A.; Oliveira, C.C.; Benevides, R.G.; Cavada, B.S.; Assreuy, A.M.S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.* **2006**, *374*, 1-10.
15. Teixeira, E.H.; Napimoga, M.H.; Carneiro, V.A.; Oliveira, T.M.; Nascimento, K.S.; Nagano, C.S.; Souza, J.B.; Havt, A.; Pinto, V.P.T.; Gonçalves, R.B.; *et al.* *In vitro* inhibition of oral *Streptococci* binding to the acquired pellicle by algal lectins. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 1001-1006.
16. Figueiredo, J.G.; Bitencourt, F.S.; Beserra, I.G.; Teixeira, C.S.; Luz, P.B.; Bezerra, E.H.S.; Mota, M.R.L.; Assreuy, A.M.S.; Cunha, F.Q.; Cavada, B.S.; *et al.* Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* **2009**, *380*, 407-414.
17. Chahud, F.; Ramalho, L.N.Z.; Ramalho, F.S.; Haddad, A.; Roque-Barreira, M.C. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. *Int. J. Exp. Path.* **2009**, *90*, 166-173.
18. Pinto, V.P.T.; Teixeira, E.H.; Teixeira, A.H.; Carneiro, V.A.; Cristino-Filho, G.; Dus, D.; Debray, H.; Sampaio, A.H.; Cavada, B.S. Lectins isolated from Brazilian beans as markers of membrane glycoconjugates of human colon cancer cells. *J. Cancer Res. Exp. Oncol.* **2010**, *2*, 54-59.
19. Cavalcante, T.T.A.; Rocha, B.A.M.; Carneiro, V.A.; Arruda, F.V.S.; Nascimento, A.S.F.; Sá, N.C.; Nascimento, K.S.; Cavada, B.S.; Teixeira, E.H. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral *Streptococci*. *Molecules* **2011**, *16*, 3530-3543.
20. Khan, F.; Khan, R.H.; Sherwani, A.; Mohmood, S.; Azfer, M.A. Lectins as markers for blood grouping. *Med. Sci. Monit.* **2002**, *8*, 293-300.
21. Wu, A.M.; Wu, J.H.; Liu, J.-H.; Singh, T. Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). *Life Sci.* **2004**, *74*, 1763-1779.
22. Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Silva, M.B.R.; Coelho, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes fuscatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **2007**, *146*, 486-498.
23. Pinto, L.S.; Nagano, C.S.; Oliveira, T.M.; Moura, T.R.; Sampaio, A.H.; Debray, H.; Pinto, V.P.T.; Dellagostin, O.A.; Cavada, B.S. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *J. Biosci.* **2008**, *33*, 355-363.

24. Alencar, V.B.M.; Melo, S.C.; Albuquerque, K.F.; Pereira, B.A.; Nagano, C.S.; Andrade Neto, M.; Pinto, L.S.; Alencar, N.M.N.; Ribeiro, R.A.; Cavada, B.S. *Bauhinia variegata* induces neutrophil migration by resident cells *in vivo* and *in vitro*. *Interlec 19^a*, **2001**, 115.
25. Lin, L.; Lu, J.; Zeng, H.; Liang, Z.; Zhou, Y.; Lin, J. Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from *Pinellia cordata*. *Mol. Biol. Rep.* **2008**, *35*, 641-647.
26. Oliveira, C.; Costa, S.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. cDNA cloning and functional expression of the alpha-D-galactose-binding lectin frutalin in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **2009**, *43*, 212-220.
27. Lam, S.K.; Ng, T.B. Lectins: Production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 45-55.
28. Robbins, S.L.; Contran, R.S.; Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose In *Robbins e Contran. Patologia—Bases Patológicas das Doenças* (title in portuguese), 7rd ed.; Elsevier Press: Rio de Janeiro, Brazil, 2005; pp. 91-124.
29. Kondo, T.; Ishida, Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic. Sci. Int.* **2010**, *203*, 93-98.
30. Santoro, M.M.; Gaudino, G. Celular and molecular facets of keratinocyte repithelization during wound healing. *Exp. Cell Res.* **2005**, *304*, 274-286.
31. Kapoor, M.; Kojima, F.; Appleton, I.; Kawai, S.; Crofford, L.J. Major enzymatic pathways in dermal wound healing: Current understanding and future therapeutic targets. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2006**, *7*, 418-422.
32. Stephen, C.; Davis, B.S.; Perez, R. Cosmeceuticals and natural products: Wound healing. *Clin. Dermatol.* **2009**, *27*, 502-506.
33. Schultz, G.; Mazingo, D.; Romanelli, M.; Claxton, K. Wound healing and time; new concepts and scientific applications. *Wound Repair Regen.* **2005**, *13*, S1-S11.
34. Süntar, I.P.; Akkol, E.K.; Yalçın, F.N.; Koca, U.; Keles, H.; Yesilada, E. Wound healing potential of *Sumbucus ebulus L.* leaves and isolation of an active component, quercetin 3-*O*-glucoside. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *129*, 106-114.
35. Panunto-Castelo, A.; Souza, M.A.; Roque-Barreira, M.C.; Silva, J.S. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* **2001**, *11*, 1035-1042.
36. Moreno, A.N.; Jamur, M.C.; Oliver, C.; Roque-Barreira, M.C. Mast cell degranulation induced by lectins: effect of neutrophil recruitment. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**, *132*, 221-230.
37. Pinto-da-Silva, L.L.; Panunto-Castelo, A.; De Souza, G.M.H.; Roque-Barreira, M.C.; Oliveira, R.S.; Dias, B.; Blancode Molfetta, M.J. Wipo. Use of KM+ lectin from wound healing, Patent WO2004100861, 2004.
38. McGreal, E.P.; Martinez-Pomares, L.; Gordon, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 1109-1121.
39. Iordache, F.; Iordache, C.; Pop, A.; Lupu, M.; Andrei, E.; Buzila, C.; Maniu, H. Effects of plant lectin and extracts on adhesion molecules of endothelial progenitors. *Cent. Eur. J. Biol.* **2011**, *6*, 330-341.
40. Lopes, F.C.; Cavada, B.S.; Pinto, V.P.T.; Sampaio, A.H.; Gomes, J.C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. *Bras. J. Med. Biol. Res.* **2005**, *38*, 935-941.

41. Cavada, B.S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T.B.; Barral-Netto, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2001**, *2*, 123-135.
42. Murphy, K.E.; Hall, C.L.; Mccue, S.W.; Sean Mcelwain, D.L. A two-compartment mechanochemical model of the roles of transforming growth factor β and tissue tension in dermal wound healing. *J. Theor. Biol.* **2011**, *272*, 145-159.
43. Rhett, J.M.; Ghatnekar, G.S.; Palatinus, J.A.; O'quinn, M.; Yost, M.J.; Gourdie, R.G. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 173-180.
44. Kössi, J.; Peltonen, J.; Ekfors, T.; Niinikoski, J.; Laato, M. Effects of hexose sugars: Glucose, fructose, galactose and mannose on wound healing in the rat. *Eur. Surg. Res.* **1999**, *31*, 74-82.
45. Werner, S.; Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 835-870.
46. Grose, R.; Werner, S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol. Biotechnol.* **2004**, *28*, 147-166.
47. Barrientos, S.; Stojadinovic, O.; Golinko, M.S.; Brem, H.; Tomiccanic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 585-601.
48. Gill, S.E.; Parks, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *IJBCB* **2008**, *40*, 1334-1347.
49. Steed, D.L. The role of growth factors in the wound healing. *Surg. Clin. North Am.* **1997**, *77*, 575-586.
50. Swamy, H.M.; Krishna, V.; Shankarmurthy, K.; Abdul Rahiman, B.; Mankani, K.L.; Mahadevan, K.M.; Harish, B.G.; Raja Naika, H. Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes* Burm. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 529-534.
51. Li, B.; Wang, J.H.C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *J. Tissue Viabil.* **2011**, *20*, 108-120.
52. Moulin, V.; Auger, F.A.; Garrel, D.; Germain, L. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns* **2000**, *26*, 3-12.
53. Hall, L.W.; Clarke, K.W. *Veterinary Anaesthesia*; BallièreTindall Press: London, UK, 1991; p. 410.
54. Prata, M.; Haddad, C.; Goldenberg, S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* **1998**, *3*, 43-48.
55. Michalany, J. *Técnica Histológica em Anatomia Patológica*, 2nd ed.; São Paulo Press: São Paulo, Brazil, 1991; p. 277.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Fortaleza, 23 de julho de 2013

CARTA DE ACEITE

REF: artigo 12-098 **USO DO CARIOGRAM[®] NA AVALIAÇÃO DO RISCO DE CÁRIE EM CRIANÇAS EM UM MUNICÍPIO BRASILEIRO: ESTUDO PILOTON de autoria de** Fábio Solon Tajra, Theodora Thays Arruda Cavalcante, Mayron Alves de Vasconcelos, Victor Alves Carneiro, Edson Holanda Teixeira, Andréa Silvia Walter de Aguiar.

Temos a satisfação de informar que seu trabalho acima referido, foi aceito para publicação na RBPS, devendo entrar no processo final de revisão. Para tanto, na maioria dos manuscritos, ajustes são necessários para a qualificação do trabalho e do periódico.

Contamos com a agilidade dos autores durante o processo final até a publicação.

Aproveitamos a oportunidade para expressar nossos agradecimentos pela sua contribuição a RBPS.

Cordialmente,



Daniela Gardano Bucharles Mont'Alverne

Editora chefe da RBPS

**USO DO CARIOGRAM[®] NA AVALIAÇÃO DO RISCO DE CÁRIE EM CRIANÇAS
EM UM MUNICÍPIO BRASILEIRO: ESTUDO PILOTO**

Use Of Cariogram[®] In Evaluating The Risk Of Caries In Children In A Brazilian City: Pilot
Study

Risco de cárie a partir do Cariogram[®]

Artigo original

Autores:

Fábio Solon Tajra

Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA – Sobral-Ce

Theodora Thays Arruda Cavalcante

Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA – Sobral-Ce

Mayron Alves de Vasconcelos

Universidade Federal do Ceará – Fortaleza

Victor Alves Carneiro

Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA – Sobral-Ce

Andréa Silvia Walter de Aguiar

Universidade Federal do Ceará – Fortaleza

Edson Holanda Teixeira

Universidade Federal do Ceará - Fortaleza

Endereço do Primeiro Autor

Fábio Solon Tajra

End.: Rua Francisco de Assis Fernandes, Nº 531, Domingos Olímpio, CEP 62022-410,

Sobral-Ceará

Fax: (88) 3611-6971

E-mail: fabioludus@gmail.com

Autor Responsável:

Edson Holanda Teixeira

Departamento de Patologia e Medicina Legal - Faculdade de Medicina

Universidade Federal do Ceará

Rua: Monsenhor Furtado, S/N

Rodolfo Teófilo

60.441-750 - Fortaleza - CE

Telefone: (85) 3366.8300 / 3366.8301

Fonte Financiadora da pesquisa: Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Ceará
(FUNCAP)

Artigo da Dissertação

Tajra FS. **Avaliação das Potencialidades Biotecnológicas da lectina de alga marinha da espécie *Hypnea musciformis* (HML) no Diagnóstico e Prevenção de Cárie Dentária.**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará, 2009, 89p.

RESUMO

Objetivo: Identificar do risco de cárie dentária em crianças de 12 anos de idade e comparar estes dados com a possibilidade de evitar novas cáries, através do Cariogram[®]. Métodos: Foi realizado estudo-piloto de acurácia, em 31 crianças de 12 anos de idade de uma escola pública de ensino fundamental, em uma cidade do nordeste brasileiro. Foram coletados dados referentes à experiência de cárie e doenças sistêmicas relacionadas; presença de açúcar na dieta e frequência de ingestão; quantidade de placa e contagem de estreptococos do grupo *mutans*; uso de produtos fluoretados, fluxo salivar e capacidade tampão, que foram inseridos no Cariogram[®] e um perfil de risco de cárie individual foi gerado. Resultados: Verificou-se que 78% apresentaram riscos individuais de cárie nos níveis intermediário e alto; e 45% dos participantes apresentaram menos de 50% de chance de evitar novas cáries. Ainda, que 6,45% das crianças apresentavam possibilidade de evitar novas lesões de cárie menor que 75%, ou seja, configuravam em alto risco de desenvolvimento de cáries; e 12,90% apresentavam uma possibilidade maior que 75%, baixo risco de evitar estas lesões, portanto. Houve associações positivas ($p < 0,05$) entre presença de açúcar na dieta e fluxo salivar, em que indivíduos com dieta cariogênica apresentavam fluxo salivar diminuído. Conclusão: O Cariogram[®] preencheu de modelo de determinação do risco de cáries em crianças aos 12 anos de idade com elevada precisão, efetividade e facilidade de utilização.

Descritores: Cáries dentárias; Suscetibilidade á Cárie Dentária; Medição de Risco

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, tem sido constatado uma tendência ao decréscimo da prevalência de cárie em crianças de 12 anos de idade de todas as regiões do mundo inclusive no Brasil (1-4).

Para adoção de medidas específicas para prevenção da cárie dentária, se fazem necessárias estratégias aceitáveis, com acurácia e de custo-efetividade plausíveis para de identificação de indivíduos de alto risco; e que ao mesmo tempo possa abordar os múltiplos fatores de risco (5).

Na maior parte dos estudos, a predição é expressa em termos de especificidade e sensibilidade. Mesmo que qualquer variável individualmente atinja o nível de precisão proposto, a experiência de cárie é a preditor individual mais poderoso para determinação de cárie futura, e a meta dos preditores é determinar o risco individual de desenvolvimento da cárie, antes da formação da cavidade cariiosa (5).

Os fatores de risco para desenvolvimento da cárie dentária podem ser estudados a partir de programa de computador desenvolvido por Bratthall e Hänsel-Pettersson, denominado Cariogram[®] (6). O Cariogram[®] consiste de um programa educacional interativo desenvolvido para melhor entendimento dos aspectos multifatoriais da cárie dentária e tem o objetivo de estimular a introdução de medidas preventivas, antes que novas lesões de cárie possam se estabelecer. Os pacientes são classificados na dieta, biofilme dentário, experiência de cárie, contagem de bactérias e secreção salivar, e os resultados são apresentados em um gráfico de perfil de risco.

O programa foi validado tanto para crianças quanto para pacientes idosos e, uma relação significativa entre os dados do Cariogram[®] e o incremento de cárie tem sido reportada -na literatura (7-9). O programa também demonstra a chance de ocorrência da cárie e a

extensão que estes fatores podem alcançar (10) e tem sido particularmente útil em populações de elevada prevalência da doença (11).

O objetivo do presente trabalho foi realizar o piloto de identificação do risco de cárie dentária em crianças de 12 anos de idade, matriculadas em uma escola pública em uma cidade do nordeste brasileiro, através da utilização do Cariogram[®], bem como comparar estes dados com a possibilidade de evitar novas cáries.

MÉTODOS

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de acurácia, de forma explicativo-experimental de abordagem quantitativa, com procedimento de exame clínico incluído questionário, entrevista, estimativa de higiene bucal e amostra de saliva.

Sujeitos

Para a realização do estudo piloto, participaram 31 crianças de 12 anos de idade que freqüentavam uma escola pública de ensino fundamental, em uma cidade do nordeste brasileiro. Os critérios de inclusão foram pertencer a referida faixa etária, estarem regularmente matriculados na instituição de ensino e estarem presentes na escola nos dias agendados para os exames.

Coleta de Dados

A coleta de dados seguiu a ordem de execução da pesquisa, a saber: entrevista, exame clínico para detecção de experiência de cárie e índice de higiene oral simplificado e coleta de amostra de saliva. Todas as fases da coleta de dados foram realizadas por um único cirurgião-dentista experiente e todos os exames foram cegos.

Entrevista

Questionários estruturados, conforme descrição do Manual do Cariogram[®] para língua portuguesa foram aplicados aos pais ou responsáveis. Foram colhidas informações acerca da

utilização de produtos fluoretados, dieta – presença de açúcar e frequência de ingestão, e doenças sistêmicas relacionadas.

Os escores para cada uma das variáveis acima elencadas foram sistematizadas no Quadro I.

(inserir Quadro I)

Exame clínico

O exame clínico bucal foi realizado com o objetivo de avaliar as condições de saúde bucal determinando a experiência de cárie e índice de higiene oral simplificado. Em cada exame, utilizou-se um espelho bucal nº5, uma sonda exploratória e espátula de madeira. Os critérios clínicos utilizados foram os estabelecidos pela OMS (12).

Os dados da experiência de cárie foram detectados pelo índice mundialmente utilizado – CPOD, em que cárie (C) foi definida como presença de esmalte socavado; sulcos e fissuras com opacidade do esmalte, manchas de cárie ou presença de tecido amolecido; restaurações com recidiva; em casos de dúvida entre cariado e extração indicada, o dente foi considerado cariado. No caso de dente perdido (P), foi identificado o dente que foi extraído devido à cárie dentária, enquanto que o dente com extração indicada era aquele que apresentava lesão cariosa que atingira a câmara pulpar. Foi considerado dente obturado (O) aquele que apresentava material restaurador definitivo e em caso de dúvida entre obturado e cariado, o dente foi considerado obturado. Os dentes hígidos eram aqueles em que inexistia lesão cariosa ou restaurações. Em caso de dúvida entre a hígidez e a presença de cárie, o dente foi considerado hígido; assim como dentes com selantes de fissuras foram incorporados no componente hígido. (12)

Para quantificação do biofilme dental foi utilizado foi realizado inicialmente o registro do IHO-S (Índice de Higiene Oral Simplificado). Foram examinadas as superfícies dos seguintes dentes: vestibular do primeiro molar superior direito (16V); vestibular do incisivo

central superior direito (11V); vestibular do primeiro molar superior esquerdo (26V); lingual do primeiro molar inferior esquerdo (36L); vestibular do incisivo central inferior esquerdo (31V) e lingual do primeiro molar inferior direito (46L). No caso de ausência dos dentes requisitados para o exame ou de eles se encontrarem cariados ou restaurados, estes foram substituídos pelo dente subsequente. (13)

Coleta de saliva

As amostras de saliva estimulada foram obtidas através de mastigação de bloco de parafina de 1cm³, dispensadas em tubos Falcon estéreis imersos em gelo para diminuir a formação de bolhas e espuma, e imediatamente submetidas a mensuração de pH e cultura em meios biológicos. Para isso, foi necessário que o paciente estivesse em jejum 1 hora antes da realização da coleta e sem higiene prévia da cavidade oral. A determinação do fluxo salivar foi realizada utilizando-se uma proveta graduada de 20 mL. (14).

A capacidade tampão da saliva dos alunos foi mensurada com auxílio de um pH-metro (Micronal®) com eletrodos de vidro e mostrador digital previamente equilibrado com soluções padronizadas com valores de pH = 7 e pH = 4. Para a mensuração final, foram feitas três medidas consecutivas do pH de cada amostra.

As amostras de saliva requeridas para a determinação da contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* foram realizadas em laboratório de Microbiologia de uma Universidade Federal do Ceará. Foi efetuada a contagem padrão de colônias de *Streptococcus mutans* viáveis (UFC/ml) e o resultado final em UFC/ml de saliva foi obtido através da conversão da quantidade inoculada (0,1ml) e do fator de diluição.

Por fim, os resultados foram inseridos no Cariogram® e um perfil de risco de cárie individual foi gerado. (6) O perfil de cárie foi estimado e apresentado em um gráfico tipo pizza, a partir de setores, expressos em percentagens: (1) Circunstâncias, setor amarelo – baseado na experiência de cárie e doenças sistêmicas relacionadas; (2) Dieta, setor azul escuro

– baseado na presença de açúcar na dieta e frequência de ingestão; (3) Bactéria, setor vermelho – baseada na quantidade de placa e contagem de estreptococos do grupo mutans; (4) Susceptibilidade, setor azul claro – baseada no uso de produtos que contém flúor, fluxo salivar e capacidade tampão e (5) possibilidade real de evitar novas cáries, setor verde. Por fim, os indivíduos foram classificados em risco alto, intermediário e baixo.

Preceitos éticos

Para realização do estudo-piloto, foi solicitada junto à Prefeitura Municipal de Sobral para a utilização de espaço físico e mobilização da equipe desta instituição. Ainda, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos da Universidade Estadual Vale do Acaraú, e aprovado sob o número 703 / CEP-UVA de 11 de novembro de 2009. A coleta de dados foi realizada após prévia permissão da Diretoria da escola e após autorização dos pais ou responsáveis de cada criança, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Análise Estatística

Os dados foram digitados no SPSS 18.0, em que foram identificadas as frequências das variáveis, individualmente. A seguir, os resultados foram consolidados através da intersecção das variáveis acima citadas e traduzidas em interpretações específicas quanto à possibilidade real de evitar novas cáries e susceptibilidade a novas lesões. Toda a análise estatística dos dados foi realizada considerando o agrupamento de idades estatisticamente semelhantes em relação à experiência de cárie no grupo etário de 12 anos e teste de associação entre as variáveis foi o Teste Qui-quadrado bicaudal, com valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativa.

RESULTADOS

Para identificação do risco individual das crianças aos 12 anos, de acordo com o Cariogram[®], os dados foram dispostos na tabela (Tabela I), para posterior classificação e

distribuição percentual. Observou-se que nenhuma criança apresentava dieta balanceada com pouca ingestão de açúcar e que a frequência de ingestão foi entre três e cinco vezes ao dia. Todas as crianças apresentavam biofilme dentário. É importante salientar que o uso de métodos adicionais de fluoretos de forma infrequente foi apontado por menos de 10% da amostra, e os níveis de secreção, para a maioria da amostra apresentavam níveis de fluxo salivar mais baixos que o normal.

(Inserir Tabela I)

Ao realizar associação entre as variáveis, observou-se associações positivas ($p < 0,05$) entre presença de açúcar na dieta e fluxo salivar, em que indivíduos com dieta cariogênica apresentavam fluxo salivar diminuídos; assim como entre a presença e frequência de ingestão ($p = 0,000$).

Ao categorizar os indivíduos de acordo com CPOD, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 26% os participantes do estudo apresentaram-se livres de cárie e sem restaurações, entretanto crianças com CPOD maior que 3 na faixa etária estudada foi preocupante. Em geral, o CPOD permaneceu abaixo de 3 em 58% dos casos, contudo ao avaliar a susceptibilidade de cárie dentária, somente 32,26% dos participantes apresentaram a susceptibilidade menor que 10% (Figura 1).

(inserir Figura 1)

O risco individual de cárie, conforme proposta pela ferramenta Cariogram[®], foi classificado em baixo e alto. Um terceiro nível foi adicionado – intermediário. Tal classificação está fortemente ligada à possibilidade de evitar novas cáries. Assim sendo, verificou-se através deste estudo que 78% apresentaram riscos de cárie nos níveis intermediário e alto (Figura 2) e, 45% dos participantes apresentam menos de 50% de chance de evitar novas cáries (Figura 3).

(inserir Figura 2)

Ao avaliar, ainda, os valores do Cariogram[®], no que tange a porcentagem de possibilidade de evitar novas lesões de cárie, pôde-se observar que 6,45% das crianças apresentavam possibilidade de evitar novas lesões de cárie menor que 75%, ou seja, configuravam em alto risco de desenvolvimento de cáries; e 12,90% apresentavam uma possibilidade maior que 75%, baixo risco de evitar estas lesões, portanto. (Figura 3).

(Inserir Figura 3)

DISCUSSÃO

Cárie dentária é uma doença multifatorial com vários componentes bem conhecidos. O objetivo da determinação do risco de cárie é investigar as possíveis estratégias de promoção, manutenção da saúde bucal e prevenção de agravos a serem adotadas pelos indivíduos e grupos mais suscetíveis à doença. Neste sentido, mesmo em pessoas que já manifestam sintomas da doença, essa avaliação é importante, já que propicia a determinação do tipo e intensidade do tratamento a ser desenvolvido. Um método de avaliação do risco de cárie deve estar pautado nos vários fatores envolvidos, se possível, deve ser sensível suficiente para detectar o máximo de sujeitos possíveis, mas também ser capaz de identificar aqueles com baixo risco. (11)

Na perspectiva de avaliação do risco individual de cárie em pacientes, várias ferramentas já foram idealizadas e testadas. Em 2002, um instrumento de avaliação de risco de cárie – *Caries Risk Assessment Tool* (CAT) foi desenvolvido pela Academia Americana de Odontopediatria com finalidade de aplicabilidade na clínica pediátrica. (15). No ano seguinte, um consórcio de organizações em Odontologia, desenvolveram o *Caries Management by Risk Assessment* (CAMBRA), instrumento de manejo de tratamento de cárie baseado na avaliação de risco. Este instrumento é utilizado, atualmente cursos de Odontologia nos estados da Califórnia, Oregon, Washington, Nevada e Arizona, nos Estados Unidos (16). Vale

acrescentar que a evolução do conceito da doença cárie foi indispensável para que fossem elaborados métodos específicos de registro e avaliação.

O risco de cárie dentária está voltado para os fatores microbiológicos, propriedades salivares e variáveis clínicas. Contudo, outras características como presença de doenças sistêmicas, uso de serviços odontológicos, hábitos comportamentais e dietéticos também são importantes para identificação de risco de cárie futura. Desta forma, o Cariogram[®] apresenta-se como uma ferramenta tecnológica importante. Vários estudos clínicos tem sido publicados desde seu desenvolvimento, e aplicados tanto em crianças, adultos e idosos (5,7,9-10,17-24) e foi traduzido e validado para língua portuguesa (25).

As circunstâncias que levam a um risco individual de cárie, de acordo com o Cariogram[®], destacam-se a experiência de cárie e presença de doenças que possam impactar diretamente no aumento da cárie como na debilidade do indivíduo. Todas as crianças apresentaram-se saudáveis, sem quais quer alterações sistêmicas.

Um componente relevante para subsidiar esta análise é a experiência anterior de cárie dentária de um indivíduo ou um grupo deles. Assim, a OMS recomendou o índice CPOD para medir e comparar a experiência de cárie dentária em populações, cujo valor obtido por este índice expressa a média de dentes Cariados, Perdidos e Obturados em um grupo de indivíduos (12).

Estudos demonstram que houve redução nos índices de cárie dentária em crianças aos 12 anos, contudo, vale ressaltar as diferenças regionais, às vezes atribuídas ao acesso ou não a água fluoretada (26), e diferenças importantes entre grupos populacionais de níveis socioeconômicos diferentes (27) influenciam, sobremaneira o resultado encontrado em cada região.

Até o ano 2000, a OMS recomendou o índice CPOD no máximo igual a 3 para crianças de 12 anos. Para esta idade, no Brasil, de acordo com o último levantamento

epidemiológico, os menores índices encontraram-se na região Sudeste e Sul, enquanto na região Nordeste este valor chegou a 2,63 dentes com experiência de cárie dentária (4).

Neste estudo, verificou-se que 42% dos escolares apresentaram índice superior ao esperado (CPOD > 3). Isso se reflete no número de indivíduos que apresentam maior susceptibilidade no desenvolvimento de novas lesões. Vale destacar que os indivíduos que apresentam experiência de cárie devem ser constantemente monitorados e, dependendo da atividade de cárie presente, submetidos a métodos efetivos na prevenção da doença cárie.

Considerando as metas anteriores e a heterogeneidade no grau de resposta a elas nas diversas populações do mundo, novas metas para 2020 foram propostas, para adaptação, em termos de percentuais de redução do CPO-D aos 12 anos, com especial ênfase no componente “C” (28).

Em indivíduos que consomem grandes quantidades de sacarose, a composição da placa modifica-se e seu potencial cariogênico aumenta pelo predomínio de lactobacilos e estreptococos do grupo mutans (29). Dos escolares em questão que faziam ingestão de açúcar mais de cinco vezes ao dia, cerca de 25,8% dos escolares em questão apresentaram uma alta ingestão de açúcar, caracterizada como dieta cariogênica, com associação positiva ($p=0,000$) entre estas variáveis.

É sabido que os hábitos alimentares são difíceis de avaliar e modificar e isto reflete o quanto é difícil controlar o processo saúde-doença da cárie dentária, quando a dieta é o principal fator de risco (30).

Sob o ponto de vista microbiológico, a cavidade bucal de humanos é palco de uma microbiota complexa numa rede dinâmica de mais de 700 espécies de microrganismos, entre bactérias, fungos, protozoários e micoplasmas em diferentes sítios. (29). Para cada um destes nichos, existe, ainda, uma sensibilidade específica a agentes nocivos de uma espécie. Isto pode ser influenciado, sobretudo, por especificidade de aderência a determinados substratos,

especialmente no caso dos colonizadores iniciais da cavidade bucal. Outras bactérias envolvidas em estágios posteriores a este processo podem ser capazes de aderir não só as superfícies bucais, mas também as outras bactérias que já estão aderidas às superfícies e, assim contribuir na formação do biofilme. Os estreptococos do grupo mutans constituem um complexo de espécies bacterianas do gênero *Streptococcus*, estreitamente relacionadas, incluindo as espécies *S.mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. downei* e *S. macacae*, em que os dois primeiros são espécies mais frequentemente encontradas na cavidade bucal. O biofilme localizado em sítios específicos dos dentes é capaz de produzir uma variedade de irritantes locais após maturar-se, os quais, com o tempo, invariavelmente dissolvem o dente (29).

A avaliação dos níveis salivares da bactéria é ferramenta importante na identificação precoce de indivíduos com alto risco biológico para o desenvolvimento da cárie dental. Quase 88% dos escolares avaliados apresentaram quantidade de biofilme dentário em grande parte da superfície dentária, variando de mais de 1/3 a além de 2/3 desta. (Tabela 1) Nesta perspectiva, é que se aconselha o desordenamento desta formação bacteriana através do controle adequado do biofilme oral que é de suma importância para prevenção tanto da cárie, quanto da doença periodontal.

Uma das formas de estimar o risco de cárie é quantificar os estreptococos da saliva, pois estes microrganismos associam-se numericamente ao processo de cárie. Os estreptococos são considerados colonizadores iniciais, sendo necessário um determinado intervalo de tempo, pelo menos 24 horas, sem remoção mecânica adequada para que haja formação de uma camada de biofilme clinicamente evidenciável (13) A partir do parâmetro avaliado, 16% dos escolares apresentaram contagem de estreptococos elevada (Tabela 1).

A susceptibilidade à doença cárie dentária está relacionada ao uso de fluoretos, fluxo salivar e capacidade tampão. O uso de fluoretos na água de abastecimento, nos dentifrícios e

métodos adicionais sob forma de aplicação profissional (soluções para bochechos com flúor, géis ou vernizes contendo flúor) é considerado uma medida de grande importância na prevenção de cárie dentária (31,32, 33).

Os vernizes fluoretados têm sido descritos como a forma mais conveniente de uso profissional de flúor tópico em pré-escolares com base na premissa de que são fáceis de aplicar e bem tolerados. Devido a sua capacidade formação de película que adere às superfícies dentárias, o verniz pode permanecer em contato com o esmalte dentário por várias horas (31). Observou-se um baixíssimo uso de métodos adicionais de fluoretos de aplicação profissional de produtos contendo fluoretos, em que o uso de dentifrício constituiu-se como o material mais utilizado. Em estudo sobre a presença de fluoretos em dentifrícios utilizados em crianças brasileiras constatou que a maioria dos dentifrícios usados (96%) continham fluoreto e em 84% desses a concentração de flúor total encontrada estava de acordo com a declarada na embalagem. E mais, que em 78% dos cremes dentais fluoretados, a concentração de flúor solúvel total encontrada foi igual ou superior a 1000 ppm, variando de 422,3 a 1432,3 ppm F (média \pm DP de 1017,6 \pm 239,4) (34).

A saliva desempenha um papel de revestimento dos tecidos da mucosa bucal, ajudando na manutenção de uma barreira efetiva contra injúrias externas, inclusive a doença cárie. Os constituintes salivares auxiliam na manutenção da integridade da mucosa pela hidratação dos tecidos orais, contribuindo assim com a lubrificação, limpeza mecânica, formação do bolo alimentar, função comunicativa, atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, neutralização de ácidos e bases fortes, higiene dentária, através de maturação pós-eruptiva e de processos de desremineralização (35-37).

Entre os testes salivares, o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva merecem destaque porque são de fácil execução, rápidos, de baixo custo e apresentam uma relação inversa com a experiência de cárie (36). No caso dos testes bacteriológicos, as contagens de

lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans da saliva continuam sendo as técnicas mais indicadas para avaliação do risco de cárie (6,36).

No Brasil, a falta de divulgação dos testes salivares e bacteriológicos junto aos laboratórios de análises clínicas não estimula a inclusão destes testes na rotina do laboratório de modo a atender a demanda da classe odontológica.

Fluxo salivar e capacidade tampão tem um baixo impacto no Cariogram[®] no que tange a predição de novas lesões cariosas. A importância dos testes salivares no Cariogram[®] está relacionada a idade da amostra; ou seja, em populações mais velhas apresentam taxas de secreção comprometidas, e os testes passarão a ter uma importância maior (37).

Entretanto é preciso salientar que não é possível generalizar os resultados. Em uma população diferente, com outro comportamento, os fatores envolvidos no processo de desenvolvimento da cárie, os resultados poderiam ser diferentes.

CONCLUSÕES

O Cariogram[®] preencheu um critério de bom modelo de determinação do risco, detecção de alto risco de cáries em crianças aos 12 anos de idade com elevada precisão, efetividade e facilidade de utilização.

A ferramenta pode ser utilizada por técnicos e gestores de saúde bucal no sentido de auxiliar o planejamento de ações preventivas e de promoção de saúde bucal na perspectiva de minimização de agravantes do processo saúde-doença. A partir dele, é possível delimitar programação de atenção e assistência em saúde bucal em escolares da rede pública em nível individual.

AGRADECIMENTOS

Aos membros do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral que colaboraram com a execução do trabalho, bem como os sujeitos da pesquisa que permitiram que os exames fossem realizados.

REFERÊNCIAS

1. Udoye C, Aguwa E, Chikezie R, Ezeokenwa M, Jerry-Oji O, Okpaji C. Prevalence and distribution of caries in the 12-15 year urban school children in Enugu, Nigeria. *The Internet Journal of Dental Science*. 2009; 7 (2): 24 [Acesso em 08/04/2012]: Disponível em <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-dental-science>.
2. Ollila, Päivi, Assessment of caries risk in toddlers. A longitudinal cohort study. [Dissertação] Faculty of Medicine, Institute of Dentistry, University of Oulu, 2010. [Acesso em 08/04/2012] Disponível em <http://herkules.oulu.fi/isbn9789514262227/isbn9789514262227.pdf>
3. Bastos RS, Carvalho, ÉS, Xavier A, Caldana ML, Bastos JRM, Lauris JRP. (2012), Dental caries related to quality of life in two Brazilian adolescent groups: a cross-sectional randomised study. *International Dental Journal*. 2012; 62: 137–143.
4. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Geral de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2010: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
5. Petersson GH, Isberg PE, Twetman S, Caries risk assessment in school children using a reduced Cariogram® model without saliva tests. *BMC Oral Health*. 2010; 10:5-10 [Acesso em 08/04/2012] Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/10/5>
6. Bratthall D, Hänsel-Petersson G. Cariogram® - a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005; 33:256-64.
7. Merdad K, Sonbul H, Gholman M, Reit C, Birkhed D. Evaluation of the caries profile and caries risk in adults with endodontically treated teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110:264-269
8. Zukanovic A, Kobaslija S, Ganibegovic M. Caries risk assessment in Bosnian children using Cariogram® computer model. *Int Dent J*. 2007; 57:177-83.

9. Miravet AR, Company JMM, Silla JMA. Evaluation of caries risk in a young adult population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007; 12: E412-8.
10. Gonzalez CD, Okunseri C. Senior Dental Students' Experience with Cariogram® in a Pediatric Dentistry Clinic. *Journal of Dental Education*. 2010; 74:123-129.
11. Campus G, Cagetti MG, Sacco G, Benedetti G, Strohmenger L, Lingström P: Caries risk profiles in Sardinian schoolchildren using Cariogram®. *Acta Odontol Scand* 2009; 67: 146–152.
12. Petersen PE. World Health Organization global policy for improvement of oral health - World Health Assembly 2007. *International Dental Journal*. 2008; 58: 115–121.
13. Pereira JV; Gomes DQC; Silva PKO; Oliveira RS; Florindo GTG; Costa RO. Correlation of salivary levels of *Streptococcus mutans* with the conditions *Rev Gaúcha Odontol*. 2011; 59: 571-575.
14. Sakeenabi B, Hiremath SS. Dental caries experience and salivary streptococcus mutans, lactobacilli scores, salivary flow rate and salivary buffering capacity among 6 year old Indian school children. *Clin Exp Dent*. 2011; 3(5):e412-7.
15. Southward LH, Robertson A, Edelstein BL, Hanna H, Wells-Parker E, Baggett DH, Eklund NP, Crall JJ, Silberman SL, Parrish DR: Oral health of young children in Mississippi Delta child care centers: A second look at early childhood caries risk assessment. *J Public Health Dent* 2008, 68(4):188-95.
16. Teich ST, Aizenbud D, Gutmacher Z. Guiding the practitioner through the caries management by risk assessment (CAMBRA) protocol. *Alpha Omega*. 2011; 104 (3-4):68-72.
17. Almosa NA, Al-Mulla AH, Birkhed D. Caries risk profile using the Cariogram® in governmental and private orthodontic patients at de-bonding, *Angle Orthod*. 2012; 82:267–274.

18. Campus G; Cagetti MG, Sale S; Carta G; Lingström P. Cariogram® Validity in Schoolchildren: A Two-Year Follow-Up Study *Caries Res* 2012; 46:16–22
19. Fadel HT, Al-Kindy KA, Mosalli M, Heijl L, Birkhed D. Caries Risk and Periodontitis in Patients With Coronary Artery Disease. *J Periodontol* 2011; 82:1295-1303
20. Petersson GH, Isberg PE, Twetman S, Caries risk profiles in schoolchildren over 2 years assessed by Cariogram®. *Int J Paediatr Dent* 2010b; 20: 341–346
21. Melo P, Azevedo A, Henriques M. Cárie dentária – a doença antes da cavidade. *Acta Pediatr Port* 2008; 39(6):253-9.
22. Alian AY, McNally ME, Fure S, Birkhed D. Assessment of Caries Risk in Elderly Patients Using the Cariogram® Model. *J Can Dent Assoc* 2006; 72(5):459–63
23. Leous P; Tikhonova S, Peter Leous ST Caries risk assessment in young people based on the Cariogram® OHDMBSC - Vol. V - No. 1 - March, 2006, p.7-15.
24. Twetman S, Petersson GH, Bratthall D. Caries risk assessment as a predictor of metabolic control in young Type 1 diabetics *Diabet. Med.* 2005; 22: 312–315.
25. Lima JMC; Silva ACB; Forte FDS; Sampaio FC. Risco e prevenção à cárie dentária: avaliação de um programa preventivo aplicado em uma clínica infantil. *Rev Gaúcha Odonto.* 2008; 56(4):367-373.
26. Frias AC, Antunes JLF, Junqueira SR, Narvai PC. Determinantes individuais e contextuais da prevalência de cárie dentária não tratada no Brasil. *Rev Panam Salud Publica.* 2007; (22)4:279–85.
27. Watt RG, Sheiham A. Integrating the common risk factor approach into a social determinants framework *Community Dent Oral Epidemiol* 2012; 40: 289–296
28. Silva SMF, Pardi V, Vazquez FL, Ambrosano GMB, Meneghim MC, Pereira, AC. Evaluation of the National Program of Oral Health Promotion (NPOHP) at schools in Castelo Branco, Portugal. *RFO, Passo Fundo,* 2012; 17: 18-25.

29. Tanzer JM, Thompson A, Sharma K, Vickerman MM, Haase EM, Scannapieco FA. *Streptococcus mutans* Out-competes *Streptococcus gordonii* in vivo. *JDR*. 2012; 91:513-519.
30. Källestål C, Flinck A, Allebeck P, Holm AK, Wall S: Evaluation of caries preventive measures. *Swed Dent J* 2000; 24:1–11
31. MacRitchie HMB, Longbottom C, Robertson M, Nugent Z, Chan K, Radford JR, Pitts NB. Development of the Dundee Caries Risk Assessment Model (DCRAM) – risk model development using a novel application of CHAID analysis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 2012; 40: 37–45.
32. Eberhard J, Sandmann T, Marinho VCC, Dommisch H, Jepsen S, Stiesch M, Geurtsen W. Chlorhexidine versus topical fluoride treatment for the prevention and management of dental caries in children and adolescents (Protocol). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, 7. Art. No.: CD009962.
33. Carvalho DM, Salazar M, Oliveira BH, Coutinho ESF. O uso de vernizes fluoretados e a redução da incidência de cárie dentária em pré-escolares: uma revisão sistemática. *Rev. Bras. Epidemiol*. 2010, 13(1): 139-149.
34. Cury JA, Oliveira MJL, Martins CC, Tenuta LMA, Paiva SM. Available fluoride in toothpastes used by Brazilian children. *Braz. Dent. J*. 2010; 21(5): 396-400..
35. Varma S, Banerjee A; Bartlett D. An in vivo investigation of associations between saliva properties, caries prevalence and potential lesion activity in an adult UK population. *Journal of Dentistry*. 2008; 36: 294-299.
36. Garcia LB, Bulla JR; Kotaka CR; Tognim MCB; Cardoso CL Testes salivares e bacteriológicos para avaliação do risco de cárie. *RBAC*. 2009; 41(1): 69-76.

37. Saintrain MVL, Braga JO, Carlos MX, Maia MCG. Perfil epidemiológico de mulheres idosas com sintomas de ardência bucal. Rev Bras Promoção da Saúde. 2011; 24(3):238-244

Quadro I – Apresentação de escores atribuídos aos critérios do método CARIOGRAM[®]

Setor	Variável	Escore	
Circunstâncias (Setor amarelo)	Experiência de Cárie	0	CPO-D*/ ceo = 0 (Livre de cárie e sem restaurações)
		1	CPO-D*/ ceo < 3 (melhor que o normal para idade)
		2	CPO-D/ ceo = 3 (normal para idade)
		3	CPO-D/ ceo > 3 (pior que o normal para idade)
Circunstâncias (Setor amarelo)	Doenças Relacionadas	0	Paciente saudável
		1	Presença de doença que contribua para aumento do risco de cárie
		2	Paciente no leito ou uso de medicação contínua que afete a secreção salivar
Dieta (Setor Azul Escuro)	Presença de Açúcar	0	Muito pouco açúcar, dieta balanceada
		1	Baixa presença de açúcar e dieta não cariogênica
		2	Consumo de açúcar moderado, dieta com conteúdo alto de açúcar
		3	Alta ingestão de açúcar, dieta cariogênica
Dieta (Setor Azul Escuro)	Número de ingestões ao dia	0	Consumo máximo de três vezes/dia;
		1	Consumo máximo de cinco vezes/dia
		2	Consumo máximo de sete vezes/dia
		3	Consumo máximo superior a sete vezes/dia
Bactéria (Setor vermelho)	Quantidade de placa	0	Ausência de depósito
		1	Depósito até 1/3 da superfície dentária
		2	Depósitos mais de 1/3, não indo além de 2/3 da superfície dentária
		3	Depósitos cobrem mais de 2/3 da superfície dentária
Bactéria (Setor vermelho)	Contagem de Streptococci mutans	0	1 – 20 UFC/mL **
		1	21 – 100 UFC/mL
		2	Ø 100 UFC/mL
Suscetibilidade (Setor Azul claro)	Uso de Fluoretos	0	Dentifrício fluoretado, bochechos e vernizes (frequente)
		1	Dentifrício fluoretado, bochechos e vernizes (infrequente)
		2	Somente dentifrício fluoretado
		3	Sem fluoretos
Susceptibilidade (Setor Azul Claro)	Fluxo salivar	0	Secreção salivar normal: acima de 1,0 mL/ min
		1	Secreção salivar baixa: 0,8 a 1,0 mL/ min

		2	Secreção salivar muito baixa: 0,1 a 0,7 mL/ min
		3	Xerostomia: menor que 0,1 mL/ min
Susceptibilidade (Setor Azul Claro)	Capacidade tampão	0	Capacidade tampão normal: pH acima de 6,0
		1	Capacidade tampão reduzida: pH de 4,5 a 5,5
		2	Capacidade tampão baixa: pH abaixo de 4,0
	Risco	0	Sem risco
		1	Baixo Risco
		2	Risco moderado
		3	Elevado risco
*CPO-D – Cariado, perdido e Obturado ** Unidade Formadora de Colônia			

Tabela I – Distribuição de escolares de 12 anos de idade de acordo com variáveis individuais utilizadas no CARIOGRAM[®], em um município brasileiro, 2009.

Variável	N	%
Experiência de Cárie		
0 CPO-D*/ ceo = 0 (Livre de cárie e sem restaurações)	8	25,8
1 CPO-D*/ ceo < 3 (melhor que o normal para idade)	10	32,3
2 CPO-D/ ceo = 3 (normal para idade)	03	9,7
3 CPO-D/ ceo > 3 (pior que o normal para idade)	10	32,3
Doenças Relacionadas		
0 Paciente saudável	31	100
1 Doença que contribui para aumento do risco de cárie	-	-
2 Doença que afete a secreção salivar	-	-
Presença de Açúcar		
0 Muito pouco açúcar, dieta balanceada	-	-
1 Baixa presença de açúcar e dieta não cariogênica	06	19,4
2 Consumo de açúcar moderado, dieta com conteúdo alto de açúcar	17	54,8
3 Alta ingestão de açúcar, dieta cariogênica	08	25,8
Número de ingestões ao dia		
0 Consumo máximo de três vezes/dia;	20	64,5
1 Consumo máximo de cinco vezes/dia	11	35,5
2 Consumo máximo de sete vezes/dia	-	-
3 Consumo máximo superior a sete vezes/dia	-	-
Quantidade de placa		
0 Ausência de depósito	-	-
1 Depósito além de 1/3 da superfície dentária	04	12,9
2 Depósitos mais de 1/3, não indo além de 2/3 da superfície dentária	14	45,2
3 Depósitos cobrem mais de 2/3 da superfície dentária	13	41,9
Unidade Formadora de Colônia		
0 1 – 20 UFC/mL	16	51,6
1 21 – 100 UFC/mL	10	32,3
2 Ø 100 UFC/mL	05	16,1
Uso de Fluoretos		
0 Dentifrício fluoretado, bochechos e vernizes (frequente)	-	-
1 Dentifrício fluoretado, bochechos e vernizes (infrequente)	03	9,7
2 Somente dentifrício fluoretado	28	90,3
3 Sem fluoretos	-	-
Fluxo salivar		
0 Secreção salivar normal: acima de 1,0 mL/ min	14	45,2
1 Secreção salivar baixa: 0,7 a 1,0 mL/ min	08	25,8
2 Secreção salivar muito baixa: 0,1 a 0,7 mL/ min	09	29,0
3 Xerostomia: menor que 0,1 mL/ min	-	-
Capacidade tampão		
0 Capacidade tampão normal: pH acima de 6,0	31	100,0
1 Capacidade tampão reduzida: pH de 4,5 a 5,5	-	-
2 Capacidade tampão baixa: pH abaixo de 4,0	-	-
Risco de Cárie		

0 Sem risco	-	-
1 Baixo Risco	07	22,6
2 Risco moderado	13	41,9
3 Elevado risco	11	35,5
TOTAL	31	100,0

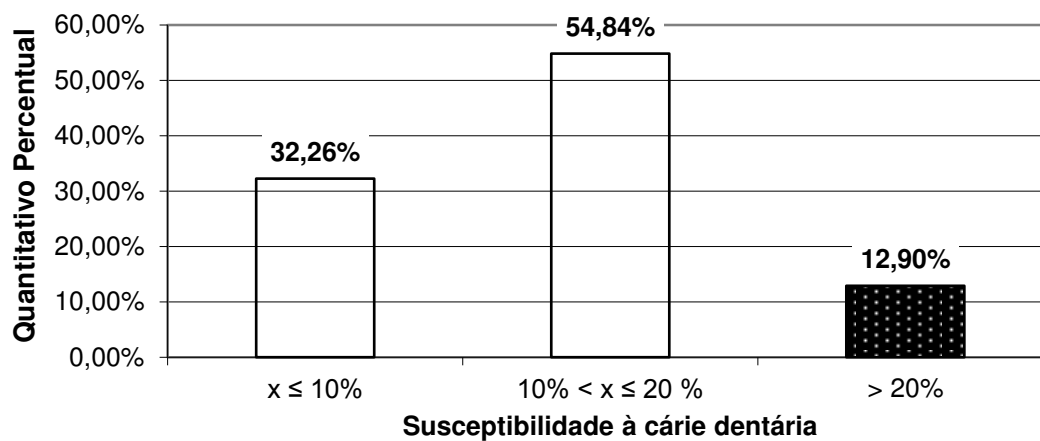


Figura 1 – Distribuição da susceptibilidade à cárie dentária pelo CARIOGRAM[®], em escolares de 12 anos de idade, em um município brasileiro, 2009.

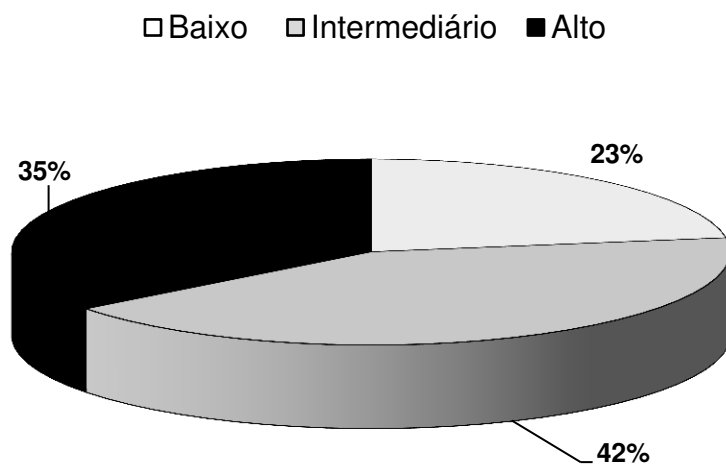


Figura 2 – Distribuição da classificação de risco à cárie dentária pelo CARIOGRAM[®], em escolares de 12 anos de idade, em um município brasileiro, 2009.

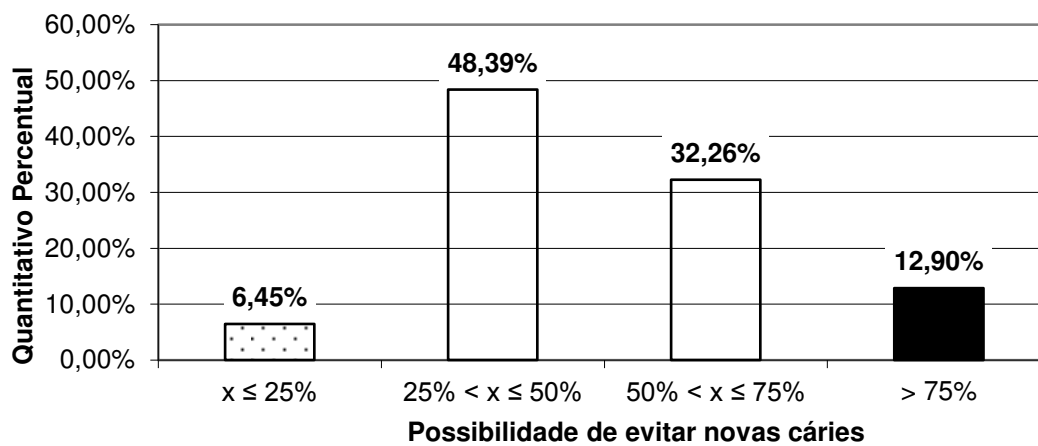


Figura 3 – Distribuição da possibilidade de evitar novas cáries à cárie dentária pelo CARIOGRAM[®], em escolares de 12 anos de idade, em um município brasileiro, 2009.